

**Bedeutung von sE-Cadherin als potenzielles
therapeutisches Ziel zur Behandlung des Taxan
resistenten Prostatakarzinoms *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sebastian Maxeiner

geb. am 24.08.1987 in Bad Kreuznach

Mainz 2022

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2022

D77

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund des Projekts.....	1
1.1.1 Das Prostatakarzinom.....	1
1.1.2 Anatomie der Prostata	2
1.1.3 Klassifikation.....	3
1.1.4 Staging	4
1.1.5 Grading	4
1.1.6 Symptomatik und Diagnostik	5
1.2 Therapie.....	6
1.2.1 Chemotherapie (Taxane)	7
1.3 Biomarker	9
1.4 sE-Cadherin.....	9
1.5 Ziel der Arbeit	11
2. Material.....	12
2.1 Apparaturen	12
2.2 Verbrauchsmaterial.....	13
2.3 Chemikalien und Agenzien	14
2.4 Nährmedien.....	15
3. Methoden.....	16
3.1 Verwendete Zellkulturen.....	16
3.1.1 Dosierungsschema.....	18
3.1.2 Splitten konfluenten Zellen	19
3.1.3 Mediumwechsel	20
3.1.4 Zellkulturen einfrieren.....	20
3.1.5 Zellkulturen auftauen	21

Inhaltsverzeichnis

3.2	MTT-Test.....	21
3.3	Klonogenes Wachstum.....	23
3.4	BrdU.....	24
3.5	Zellzyklus.....	25
3.6	Apoptose	26
3.7	LDH-Test	27
3.8	CDD-Test.....	28
3.9	Adhäsion und Migration.....	28
3.9.1	Adhäsion an immobilisierte extrazelluläre Matrixproteine (EZM).....	29
3.9.2	Chemotaxis	30
3.9.3	Scratch-Versuch.....	32
3.10	Western Blot.....	34
3.10.1	Proteinisolation aus Prostatakarzinom-Zellen.....	35
3.10.2	Konzentrationsbestimmung der Proteine.....	36
3.10.3	Auftrennung der Proteine	37
3.10.4	Western Blot.....	39
3.10.5	Immunfärbung und Chemilumineszenz	40
3.10.6	Stripping	44
3.11	Durchflusszytometer (FACS).....	45
3.11.1	Integrine	45
3.11.2	Wachstumsfaktoren	47
3.12	Konfokale Mikroskopie.....	47
3.13	Blockadestudie	49
3.13.1	MTT-Test.....	49
3.13.2	Adhäsion an Kollagen und Chemotaxis	49
3.14	Statistik.....	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	MTT-Test.....	51
4.2	Klonogenes Wachstum.....	62
4.3	BrdU.....	66
4.4	Zellzyklus.....	70

Inhaltsverzeichnis

4.5	Apoptose	73
4.6	LDH-Test	78
4.7	CDD-Test	79
4.8	Adhäsion an extrazellulärer Matrix und Endothel	80
4.9	Chemotaxis	86
4.10	Scratch-Versuch	87
4.11	Western Blot	94
4.12	Konfokale Mikroskopie	96
4.13	Durchflusszytometrie	100
4.13.1	Integrine	100
4.13.2	Wachstumsfaktoren	102
4.14	Blockadestudien mit PC3 und DU145	104
4.14.1	MTT-Test	104
4.14.2	Adhäsion	108
4.14.3	Chemotaxis	112
5.	Diskussion	114
5.1	Tumorstadium und Proliferation	114
5.2	Veränderungen des Zellzyklus	118
5.3	Bedeutung von sE-Cadherin für die Adhäsion und Migration	120
5.4	Auswirkungen von sE-Cadherin auf die Integrin-Expression	124
5.5	Blockadestudie	125
5.5.1	Bedeutung von Integrinen für das Tumorstadium	125
5.5.2	Blockade der Metastasierungsaktivität?	126
6.	Ausblick	128
7.	Zusammenfassung	129
8.	Summary	131
9.	Literatur	132
10.	Lebenslauf	141
11.	Danksagung	144
12.	Erklärung	145

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten.....	1
Abbildung 2: Einteilung der Prostata	3
Abbildung 3: Docetaxel Strukturformel	8
Abbildung 4: Cabazitaxel Strukturformel	8
Abbildung 5: Phasenkontrast-Aufnahme von DU145	17
Abbildung 6: Phasenkontrast-Aufnahme von PC3	17
Abbildung 7: Phasenkontrast-Aufnahme von LNCaP.....	18
Abbildung 8: Darstellung der Neubauer-Zählkammer	21
Abbildung 9: Strukturformel Bromdesoxyuridin.....	24
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	25
Abbildung 12: Beispiel für ein 0,25mm ² Sichtfeld.....	30
Abbildung 11: Auszählungsschema der Adhäsion	30
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Western Blot-Kammer	40
Abbildung 14: Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie PC3 + Docetaxel.....	52
Abbildung 15: Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie DU145 + Cabazitaxel	53
Abbildung 16: Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie DU145 + Docetaxel.....	54
Abbildung 17: Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie LNCaP + Cabazitaxel	55
Abbildung 18 Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie LNCaP + Docetaxel	56
Abbildung 19: Ergebnisse des MTT-Tests für sE-Cadherin Effekt auf PC3	57
Abbildung 20: Ergebnisse des MTT-Tests für sE-Cadherin Effekt auf DU145	59
Abbildung 21: Ergebnisse des MTT-Tests für sE-Cadherin Effekt auf LNCaP.....	61
Abbildung 22: Ergebnisse für das klonogene Wachstum der Zelllinie PC3.....	62
Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahme des klonogenen Wachstum der PC3 Zellen	63
Abbildung 24: Ergebnisse für das klonogene Wachstum der Zelllinie DU145.....	64
Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahme des klonogenen Wachstum der DU145 Zellen	65
Abbildung 26: Ergebnisse für den BrdU-Einbau der PC3 Zellen.....	66
Abbildung 27: Ergebnisse für den BrdU-Einbau der DU145 Zellen.....	68
Abbildung 28: Ergebnisse für den BrdU-Einbau der LNCaP Zellen	70
Abbildung 29: Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit PC3.....	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit der Zelllinie DU145	72
Abbildung 31: Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit der Zelllinie LNCaP	73
Abbildung 32: Ergebnisse für die Apoptose-Experimente mit der Zelllinie PC3	74
Abbildung 33: Ergebnisse für die Apoptose-Experimente mit der Zelllinie DU145	75
Abbildung 34: Ergebnisse für die Apoptose-Experimente mit der Zelllinie LNCaP	77
Abbildung 35: Ergebnisse für Lactatdehydrogenase-Experimente mit PC3 und DU145	79
Abbildung 36: Ergebnisse für die CDD-Experimente mit den Zelllinien PC3 und DU145	80
Abbildung 37: Ergebnisse für die Adhäsions-Versuche mit parentalen PC3	81
Abbildung 38: Ergebnisse für die Adhäsions-Versuche mit Docetaxel resistenten PC3	82
Abbildung 39: Ergebnisse für die Adhäsions-Versuche mit parentalen DU145	83
Abbildung 40: Ergebnisse für Adhäsions-Versuche der Cabazitaxel resistenten DU145	84
Abbildung 41: Ergebnisse für Adhäsions-Versuche der Docetaxel resistenten DU145	85
Abbildung 42: Ergebnisse für Adhäsions-Versuche mit PC3 und DU145 auf Endothel	86
Abbildung 43: Ergebnisse für die Chemotaxis-Experimente mit PC3(A) und DU145(B)	87
Abbildung 44: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit parentalen PC3	88
Abbildung 45: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit Docetaxel resistenten PC3	89
Abbildung 46: Zusammenfassende Grafik der „Wunddicke in %“ bei PC3	90
Abbildung 47: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit parentalen DU145	91
Abbildung 48: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit Cabazitaxel resistenten DU145	92
Abbildung 49: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit Docetaxel resistenten DU145	93
Abbildung 50: Ergebnisse der „Relative Wound Density in %“ von DU145	94
Abbildung 51: Western Blot Ergebnisse für PC3 und DU145	95
Abbildung 52: Konfokale Mikroskopie mit parentalen PC3	96
Abbildung 53: Konfokale Mikroskopie mit Docetaxel resistenten PC3	97
Abbildung 54: Konfokale Mikroskopie mit parentalen DU145	98
Abbildung 55: Konfokale Mikroskopie mit Cabazitaxel resistenten DU145	99
Abbildung 56: Konfokale Mikroskopie mit Docetaxel resistenten DU145	100
Abbildung 57: Ergebnisse für Integrin-Versuche PC3	101
Abbildung 58: Ergebnisse für Integrin-Versuche DU145	102
Abbildung 59: Ergebnisse für EGF und pEGF bei PC3 und DU145	103
Abbildung 60: Blockadestudie: $\alpha 3$ Ergebnisse des MTT-Tests PC3	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 61: Blockadestudie: β 1 Ergebnisse des MTT-Tests PC3.....	105
Abbildung 62: Blockadestudie: β 4 Ergebnisse des MTT-Tests PC3.....	106
Abbildung 63: Blockadestudie: α 3 Ergebnisse des MTT-Tests DU145.....	107
Abbildung 64: Blockadestudie: β 1 Ergebnisse des MTT-Tests DU145.....	107
Abbildung 65: Blockadestudie: β 4 Ergebnisse des MTT-Tests DU145.....	108
Abbildung 66: Blockadestudie Integrine: Adhäsion Kollagen	110
Abbildung 67: Blockadestudie Integrine: Adhäsion Fibronektin	111
Abbildung 68: Blockadestudie Integrine: Chemotaxis	113

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis	8
Tabelle 2: Erkrankungs- & Sterberate 2016	2
Tabelle 3: TNM-System nach P. Denoix, 1946	4
Tabelle 4: Erläuterung Gleason-Score	5
Tabelle 5: Verwendete Apparaturen.....	12
Tabelle 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	13
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Agenzien	14
Tabelle 8: Verwendete Nährmedien	15
Tabelle 9: Dosierungsschema für chronische Taxan-Behandlung	19
Tabelle 10: Behandlungsschema mit Annexin V und Propidiumiodid für Apoptose-Test.....	27
Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammelgels für die Gelelektrophorese im Western Blot	37
Tabelle 12: Zusammensetzungen der Trenngele für die Gelelektrophorese im Western Blot	38
Tabelle 13: Zusammensetzungen der Pufferlösungen für Western Blot.....	41
Tabelle 14: Auflistung Teil 1 aller verwendeten Primärantikörper im Western Blot	41
Tabelle 15: Auflistung Teil 2 aller verwendeten Primärantikörper im Western Blot	43
Tabelle 16: Auflistung aller verwendeten Sekundärantikörper im Western Blot.....	44
Tabelle 17: Durchflusszytometrie: Integrinsubtypen. Primärantikörper sowie Isotypen.	46
Tabelle 18: Ergebnisse für Apoptose-Experiment mit PC3	74
Tabelle 19: Ergebnisse für Apoptose-Experiment mit DU145 zu.....	76
Tabelle 20: Ergebnisse für Apoptose (AnnexinV)-Experiment mit LNCaP zu.....	78

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
Akt	Serin/Threonin Kinase, auch Proteinkinase B
BD	Becton Dickinson
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> = Albumin aus Rinderserum
Cdk	<i>Cyclin-dependent Kinase</i> = Zyklin-abhängige Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (bzw. <i>-acid</i>)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> = verstärkte Chemolumineszenzlösung
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> = epidermaler Wachstumsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> = Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> = Durchflusszytometrie
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i> = fötales Rinderserum
G0/1- & G2/M-Phase	Gap-Phasen, wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus
H	Stunden
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
K	Kontrolle
kDa	[Kilo Dalton]

Abkürzungsverzeichnis

MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl <i>tetrazolium bromide</i>
NZM	Nitrozellulosemembran
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (bzw. <i>-acid</i>)
Rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
PSA	<i>Prostata-spezifisches Antigen</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
S-Phase	Synthese-Phase
Std	Stunden
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetra-N-Methyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Methylamin
V	[Volt]

1. Einleitung

1.1 Hintergrund des Projekts

1.1.1 Das Prostatakarzinom

Im Jahr 2015 wurden weltweit 17,5 Mio. neue Krebserkrankungen, wovon 7,3 % auf Prostatakrebs entfallen [1], und 8,7 Mio. durch Krebs bedingte Todesfälle registriert [2]. Statistisch betrachtet erkranken in Deutschland jedes Jahr 99,1 von 100.000 Männern an Prostatakrebs. Auf das Erkrankungsrisiko haben weder Testosteron noch häufiger Geschlechtsverkehr einen Einfluss. Anders sieht dies für steigendes Alter (mittleres Erkrankungsalter in Deutschland liegt bei 71 Jahren [3]), bestimmte Ernährungsweisen und familiäre Belastungen aus [4]. Ein weiterer Faktor für die Erkrankungshäufigkeit scheint der ethnische Ursprung zu sein [5]. Prostatakrebs stellt auch heute noch immer die häufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste Todesursache bei Männern in Deutschland dar. Nach einem Anstieg über 20 Jahre ist die altersstandardisierte Erkrankungsrate seit 2003 stabil und darüber hinaus seit 2011 rückläufig (Abb.1). Diese Entwicklung ist vermutlich auf eine zuletzt eher abnehmende Bedeutung des prostataspezifischen Antigen (PSA)-Tests als Früherkennungsuntersuchung zurückzuführen [6]. Bei diesem Test wird das PSA im Blut gemessen. Es muss jedoch auf die Grauzone des PSA-Wertes im Blut der auch durch andere Einflüsse (z.B.: Prostataentzündung) erhöht sein kann, hingewiesen werden [7].

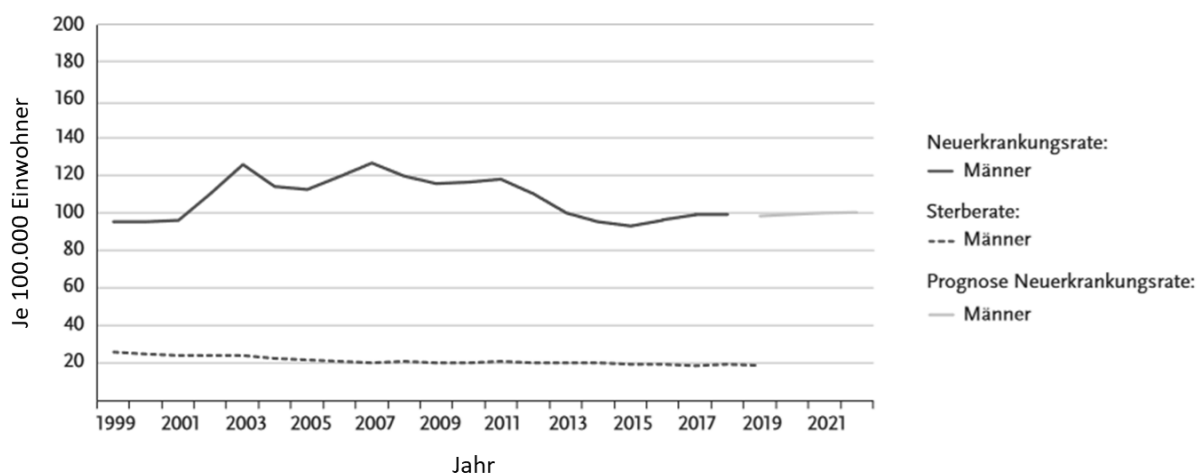


Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten, ICD-10 C61, Deutschland 1999-2018/2019. [8]

Einleitung

Tabelle 2: Erkrankungs- & Sterberate 2016 [9]

Neuerkrankungen	65.200
Standardisierte Erkrankungsrate ¹	99,1
Sterbefälle	14.963
Standardisierte Sterberate ¹	19,2
5-Jahres-Prävalenz	260.400
10-Jahres-Prävalenz	474.000
Relative 5-Jahres-Überlebensrate	89%
Relative 10-Jahres-Überlebensrate	88%

¹ Je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach altem Europastandard.

* berechnet nach Periodenmethode für 2017 / 2018

1.1.2 Anatomie der Prostata

Das Prostatakarzinom stellt einen bösartigen Tumor der Vorsteherdrüse dar. Bei einem gesunden jungen Mann ist die Vorsteherdrüse etwa so groß wie eine Kastanie und wiegt zwischen 15 – 20 g. Aufgrund ihrer Lage stehen die Blut- und Lymphgefäße der Prostata in direktem Kontakt mit denen der Harnblase und des Mastdarms. Über Fasern des vegetativen Nervensystems (Sympathikus und Parasympathikus) wird die Nervenversorgung der Prostata gesteuert [10]. Die Prostata befindet subperitoneal direkt unter der Harnblase und umschließt ringförmig die Harnröhre am Blasenaustritt [11, 12]. Sie präsentiert sich als eine fein verzweigte Drüse, die unter anderem aus Bindegewebe und Muskulatur besteht. Diese Strukturen ermöglichen eine Entleerung der Drüsenflüssigkeit, die als Transport- und Aktivierungsmittel für die Samenflüssigkeit dient. Eine Erkrankung der Prostata führt zu Störungen des Urintransports und Samenergusses, was auf die Kreuzung von Harn- und Samenweg zurückzuführen ist [4].

Die Prostata wird von innen nach außen in drei konzentrische Zonen nach McNeal (1983) unterteilt (Abb. 2) [13].

Einleitung

- Zentrale Zone: Diese umgreift die Urethra, die beiden Ductus ejaculatorii und ca. 1/3 der Drüse
- Periurethrale Zone: Sie beinhaltet Drüsen, die aus Divertikeln der Urethra hervorgegangen sind
- Periphere Zone: Hierzu zählt der distale Teil der Urethra und der Großteil des Drüsengewebes

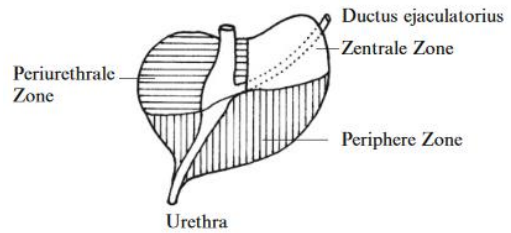


Abbildung 2: Einteilung der Prostata , schematisch; Sagittalschnitt, Ansicht von links. Nach McNeal 1983

Das Drüsenepithel der periurethralen Zone enthält Sekret- und Basalzellen, wobei die Basalzellen als Vorläuferzellen der Sekretzellen gelten. Sekretzellen bestehen zu einem großen Teil aus dem endoplasmatischen Retikulum, einem Golgi-Apparat, vielen Mitochondrien und Sekretvakuolen. Das Sekret ist leicht sauer (pH 6,4), was auf das Hauptenzym der Prostata zurückzuführen ist, die saure Phosphatase. Die sekretorische Funktion der Prostata wird über das Hormon Dihydrotestosteron (DHT) gesteuert. Das Prostatasekret, das aus Enzymen, Zitronensäure, Prostaglandin, Zink und Spermin besteht, stellt ca. 30% der Samenflüssigkeit dar [13].

1.1.3 Klassifikation

Auch wenn Prostatakrebs im Vergleich zu anderen Tumorentitäten wie z.B. dem Nierenzellkarzinom langsam wächst, spielt die Früherkennung eine bedeutende Rolle. Ein Prostatakarzinom tritt in 80-90 % der Fälle in der peripheren Zone der Vorsteherdrüse auf [14]. Einen weiteren Ursprungsort stellt die anteromediale Prostata, die Übergangszone dar. Diese liegt von der Rektaloberfläche deutlich entfernt und bildet den Ursprungsort für eine benigne knotige Hyperplasie. Die zentrale Zone, die den größten Teil der Prostatabasis ausmacht, ist selten der Ursprungsort von Prostatakrebs, wird jedoch oftmals von der Ausbreitung größerer Krebsarten heimgesucht. Pathologisch betrachtet sind Prostatakrebserkrankungen häufig multifokal. 80–85 % stammen aus der Peripheren Zone, 10–15 % aus der Zentralen Zone und 5–10 % aus der Periurethralen Zone. In den verschiedenen Tumoranteilen werden in der Regel ungleiche Differenzierungsgrade und Wachstumsmuster beobachtet [15, 16].

Einleitung

1.1.4 Staging

Mit Hilfe von Klassifikationssystemen können Karzinome bestimmten Krankheitsstadien zugeordnet werden. Dies ist für das Prostatakarzinom ebenfalls möglich. Eine solche Klassifikation ist notwendig, um speziell abgestimmte Therapieoptionen einleiten zu können. Darüber hinaus ermöglicht dies das Formulieren von Aussagen bezüglich der Prognose. Die meisten Tumorarten, auch das Prostatakarzinom werden nach dem internationalen TNM-System der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) kategorisiert [17]. „T“ steht dabei für die Tumorgröße bzw. -ausdehnung, „N“ für den Nodalstatus, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und „M“ für den Metastasierungsgrad (Tab. 3). Neben dem TNM-System steht die dreigliedrige Klassifikation nach D’Amico zur Verfügung. Diese drei sind der Gleason-Score („1.1.5 Grading“), das T-Stadium und der PSA-Wert zusammen [18, 19].

Tabelle 3: TNM-System nach P. Denoix, 1946 [20]

T = Primärtumor	T ₀	Kein Primärtumor nachweisbar
	T ₁₋₄	Primärtumor von zunehmender Größe bzw. Eindringtiefe
N = Zustand der Lymphknoten in Tumornähe	N ₀	Kein Lymphknotenbefall nachweisbar
	N ₁₋₃	Zunehmender Befall von Lymphknoten in Tumornähe
M = Auftreten von Fernmetastasen	M ₀	Keine Fernmetastasen nachweisbar
	M ₁	Nachweis von Fernmetastasen an einem oder mehreren Orten

1.1.5 Grading

Zur Einstufung des Differenzierungsgrades und der Aggressivität eines Tumors, findet neben dem Staging eine histologische Einteilung, welche als Grading bezeichnet wird, statt. Für das Prostata Karzinom wurde 1966 der nach dem amerikanischen Pathologen Donald F. Gleason benannte Gleason-Score (GS) eingeführt [21]. Dabei wird histologisch bestimmt in welchem

Einleitung

Maß sich das im Rahmen einer Biopsie entnommene Tumorgewebe von Normalgewebe unterscheidet. Dabei unterscheidet man fünf unterschiedliche histologische Differenzierungsgruppen, welche den Entdifferenzierungsgrad, genannt Gleason-Score, angeben (Tab.4).

Tabelle 4: Erläuterung Gleason-Score [22]

Gleason-Score	Bedeutung
1	Scharf begrenzter Knoten Drüsen gleichförmig Dicht gepackt und mittelgroß
2	Nicht ganz scharf begrenzter Knoten Drüsen lockerer und ungleichmäßiger
3	Unscharfer Knoten Drüsen klein und ungleichmäßig Evtl. kleine solide Bezirke
4	Tumorbereich unscharf Drüsen meist ohne Innenraum Verschmolzene Drüsen Solide Bezirke
5	Tumorbereich unscharf Keine klaren Drüsen Solide Bezirke Weitere Veränderungen

Der Gleason-Score kann zwischen dem Minimalwert 2 (1+1) und dem Maximalwert 10 (5+5) liegen, wobei in allen Fällen gilt: Umso höher der berechnete Score, umso ungünstiger ist die Prognose für den betroffenen Patienten [22].

Die folgenden drei Parameter werden für die prognostische Evaluation des Prostatakarzinoms berücksichtigt [23]:

1. Tumor-Graduierung nach Gleason
2. TNM-Kategorie
3. Chirurgische Resektionsränder des Karzinoms

1.1.6 Symptomatik und Diagnostik

Ein Risiko für eine erfolgreiche Behandlung stellt die lange symptomfreie Zeit dar. Erst wenn der Tumor aufgrund fortgeschrittenen Volumens auf die Harnröhre übergeht oder Metastasen gestreut sind treten bei Betroffenen Beschwerden auf. Die Art der Symptome ist

Einleitung

dabei mannigfaltig und können vereinzelt auch durch eine gutartige Prostatavergrößerung hervorgerufen werden [16, 24]:

- Vermehrter Harndrang
- Miktionsbeschwerden
- Blut im Urin
- Schmerzen im unteren Rücken
- Erektionsprobleme

Wichtige Indikatoren der Früherkennung sind die digital-rektale Untersuchung (DRU), die Prostatabiopsie, die Magnetresonanztomographie (MRT) und das prostataspezifische Antigen (PSA). Die DRU hat den Vorteil einer schmerzlosen Untersuchungsmethode zur Früherkennung, jedoch können mittels Tastuntersuchung lediglich 30 % aller Prostatakarzinome erkannt werden. Die Prostatastanzbiopsie erfolgt erst, wenn eine auffällige DRU in Verbindung mit PSA Werten größer 4 ng/ml festgestellt wird. Es muss jedoch kritisch eingeräumt werden, dass das PSA kein eindeutiger Krebsmarker ist, da ein veränderter PSA Wert auch auf anderen Ursachen als einer Krebserkrankung fußen kann. Ein im Blut erhöhter PSA Wert stellt lediglich ein Indiz für ein Problem der Prostata dar und muss immer durch weitere diagnostische Methoden verifiziert werden [23, 25].

1.2 Therapie

Anhand der Ausdehnung, des Differenzierungsgrades und des Metastasierungszustandes wird zwischen kurativer und palliativer Therapie unterschieden. Das Prostatakarzinom kann so wie alle anderen Tumorentitäten Metastasen ausbilden, welche keine Kuration nach aktuellem Stand der Forschung erlauben [26]. Den kurativen Therapieoptionen, welche bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen zum Einsatz kommen, werden die radikale Prostatektomie, die Strahlentherapie (Radiatio oder Brachytherapie) und die aktive Überwachung zugerechnet. Das aktive Überwachen, welches bei schweren Komorbiditäten, langsam wachsenden/ low risk Tumoren zum Einsatz kommt, soll Übertherapien und mögliche Nebenwirkungen vermeiden. Dem gegenüber stehen palliative Therapien wie die Hormontherapie und die kombinierte Hormon-Chemo-Therapie [19, 27]. Kommt eine Chemotherapie zum Einsatz, ist eine möglichst präzise Bestimmung des Benefits notwendig,

Einleitung

da diese Therapie meist mit signifikanten Nebenwirkungen einhergeht. Darüber hinaus birgt eine Chemotherapie ein weiteres Problem. Im Verlauf der Behandlung ist ein Nachlassen der Wirkung (Resistenzinduktion) zu festzustellen, was sich bis hin zu einem vollständigen Versagen des Ansprechens (Resistenz) steigern kann. Sollten alle kurativen Optionen ausgeschöpft sein, so besagen die S3-Leitlinien (Punkt 5.7.), dass palliative Therapien wie das beobachtende Abwarten oder Androgendeprivation genutzt werden müssen [23]. Da das Prostatakarzinom meist in Testosteron Abhängigkeit wächst, wird sich diese Eigenschaft für die Hormontherapie zu Nutzen gemacht. Eine medikamentöse Behandlung mit Antiandrogenen, welche mittels kompetitiver Hemmung des entsprechenden Rezeptors zu einer Androgendeprivation führen, ist möglich. Durch Kastration kann ebenfalls eine Absenkung des Testosteron-/ Androgenspiegels im Blut erzeugt werden, welcher wiederum das Wachstum des Prostatakarzinoms verlangsamt [23]. Kommt es unter einer solchen hormonbasierten Therapie zur Entstehung einer Resistenz, so spricht man von einem kastrationsrefraktären Prostatakarzinom. Ein kastrationsresistentes Prostatakarzinom wird im Anschluss an Docetaxel mit einer Cabazitaxel und Prednison Kombination behandelt. Jedoch ist aufgrund von entstehenden Resistenzen ein anfänglicher, vielversprechender Behandlungserfolg zeitlich limitiert. Das in der Erstlinienbehandlung eingesetzte Docetaxel bildet durch Aktivierung von HSP27 (Heat shock protein 27) eine Resistenz aus [28]. Cabazitaxel, was in der Zweitlinienbehandlung zum Einsatz kommt, kann im Gegensatz zu Docetaxel und Paclitaxel nicht mittels energieabhängigen Efflux-Pumpen aus der Zelle transportiert werden. Dies stellt ebenfalls eine Form der Resistenz dar [29]. Darüber hinaus stehen Abirateron und Enzalutamid zur Verfügung [23]. Sollte die prognostizierte Lebenserwartung des Patienten bei unter 10 Jahren liegen, so wird nach S3-Leitlinien das beobachtende Abwarten präferiert [23]. Eine intensive Erforschung der Resistenzmechanismen ist hinsichtlich steigender Inzidenzen- und Mortalitätsraten unabdingbar. Darüber hinaus muss auch der weiteren Entwicklung von Medikamenten ein hoher Stellenwert zugesprochen werden [30].

1.2.1 Chemotherapie (Taxane)

Bei Taxanen handelt es sich um natürlich vorkommende Zytostatika. Medikamente, welche zur Gruppe der Taxane gehören weisen zytotoxische Eigenschaften auf. 1962 machte sich das

Einleitung

US-amerikanische nationale Krebsinstitut auf die Suche nach Naturstoffen mit anti kanzerogenen Eigenschaften. Dabei fanden sie in der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) das Molekül Paclitaxel. Das aus der Rinde gewonnene Extrakt zeigte deutliche Effekte gegen Leukämiezellen in einer Maus. Da Paclitaxel jedoch nur in der Rinde exprimiert wird und aus einem vollständig ausgewachsenen Baum lediglich 350 mg extrahiert werden konnten, war die Pazifische Eibe nach kurzer Zeit fast ausgerottet. Eine chemische Synthese dieses Diterpenoids war zu dieser Zeit noch nicht möglich [31]. Der Zellzyklus wird in die Phasen G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase unterteilt. Die M-Phase steht für die Mitose. Die Mitose wird wiederum in die folgenden fünf Phasen unterteilt: Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase. In dieser Zellzyklus-Phase (Mitose) teilt sich der Zellkern und spaltet dabei die zuvor duplizierte DNA in zwei neue Zellen auf [32]. Um den Prozess der Zellteilung erfolgreich abschließen zu können, ist es unabdingbar, dass die Mitosespindeln im Anschluss an die Verteilung der Chromosomen wieder abgebaut werden [33]. Taxane hemmen durch reversible Anlagerung an die Tubuline deren Depolymerisation, wodurch der Abbauprozess der Mikrotubuli, welche die Spindeln ausbilden, gehemmt wird [34].

Docetaxel

Das Zytostatikum Docetaxel (Abb.: 3, [35]; Handelsname: Taxotere; Sanofi-Aventis), welches in der Erstlinienbehandlung beim Prostatakarzinom zum Einsatz kommt, gehört zur Gruppe der Taxane. Chemisch betrachtet handelt es sich bei Docetaxel um eine Abwandlung des Zytostatikums Paclitaxel. Docetaxel wird aus Vorläuferstoffen, welche in der europäischen Eibe vorkommen, hergestellt [36, 37].

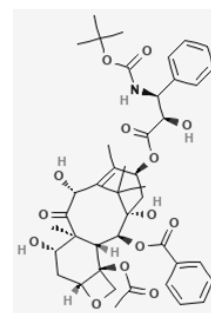


Abbildung 3: Docetaxel Strukturformel[35]

Cabazitaxel

Das Zytostatikum Cabazitaxel (Abb.: 4, [38]) wird unter dem Handelsnamen Jevtana® von der Firma Sanofi-Aventis vertrieben. Cabazitaxel gehört zu der Gruppe der Taxane. Chemisch betrachtet handelt es sich bei Cabazitaxel um ein 7,10-dimethyloxy-Derivat des Taxans Docetaxel [39]. Im Gegensatz zu Docetaxel kann Cabazitaxel aufgrund der

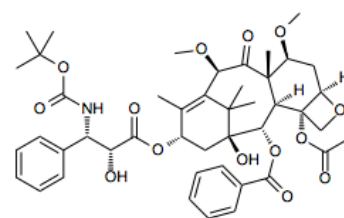


Abbildung 4: Cabazitaxel Strukturformel [38]

Einleitung

zusätzlichen Methyl Gruppe die Blut-Hirnschranke durchtreten und somit auch zur Behandlung von Metastasen im Gehirn genutzt werden [40]. Seit 2010 ist die Behandlung des fortgeschrittenen kastrationsresistenten Prostatakarzinoms mit Cabazitaxel in Kombination mit Prednison als Zweitlinienbehandlung im Anschluss an eine Docetaxel fokussierte Therapie durch die Food and Drug Administration (FDA) zugelassen [41, 42]. Ein entscheidender Vorteil von Cabazitaxel gegenüber Docetaxel ist, dass es nicht durch energieabhängige Efflux-Pumpen aus der Zelle abtransportiert werden kann.

1.3 Biomarker

Biomarker, die prognostisch und/ oder therapeutisch spezifische Aussagen zu einer Krankheit erlauben, sind bislang nicht etabliert. Angestrebt ist die Identifizierung eines hoch validen Tumormarkers, der eine exakte Abstimmung und Individualisierung der Patientenbehandlung erlaubt. Im Blut und/ oder in Gewebeprobe können biologische Merkmale gemessen und in Bezug zum Gesundheitszustand bzw. dem Krankheitsgrad gestellt werden. Dadurch ist es möglich, normale Prozesse im Organismus, aber auch krankhafte Veränderungen zu lokalisieren [43]. Ein Beispiel ist das PSA, welches eine krankhafte Veränderung der Prostata anzeigen kann. Anzumerken ist, dass das PSA kein eindeutiger Krebsmarker ist, da ein veränderter PSA Wert auch auf anderen Ursachen als einer Krebserkrankung basieren kann. Ein im Blut erhöhter PSA Wert stellt somit lediglich ein Indiz für ein Problem der Prostata dar und muss immer durch weitere diagnostische Methoden verifiziert werden [23, 25].

1.4 sE-Cadherin

Auf der Suche nach Tumormarkern wurden in einer Pilot-Studie die Serum von 165 Patienten mit einem diagnostizierten Prostatakarzinom untersucht. Dabei wies vor allem der lösliche (soluble) Teil des transmembranen Glykoproteins E(epithelial)-Cadherin signifikante Veränderungen zwischen Kontroll- und PCa-Patienten auf. Sowohl bei der Unterscheidung erkrankter und gesunder Patienten als auch bei der Diagnose aggressiver Tumore, vergleichend zum PSA-Test konnte eine höhere Korrelation zwischen sE-Cadherin Spiegel und Tumoren mit Gleason-Score >7 beobachtet werden [44–46]. E-Cadherin setzt sich aus drei Abschnitten zusammen: Eine extrazelluläre Domäne, ein transmembranständiger Abschnitt

Einleitung

und eine zytoplasmatische Domäne. Die homophile Adhäsion an andere Cadherine wird durch die Fähigkeit der extrazellulären Domäne Ca^{2+} zu binden (calciumabhängiges Zelladhäsionsmolekül) bewerkstelligt [47]. Mit Hilfe von Cateninen kommuniziert die zytoplasmatische Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett und nimmt darüber hinaus Einfluss auf weitere Signalproteine [48–50]. Aufgrund der enormen Vielfältigkeit des E-Cadherins spielt dieses in unzähligen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Zum Beispiel in der Zelladhäsion, während der Organogenese oder aber auch im Rahmen von Metastasierungsprozessen eines Tumors [51]. Eine Vielzahl von Studien konnte belegen, dass der Verlust von E-Cadherin in direktem Zusammenhang mit der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) steht [52]. Durch diesen Prozess sind Tumorzellen befähigt den Gewebeverband zu verlassen und aktiv den Metastasierungsvorgang einzuleiten [51, 53]. Das durch das CDH-1 Gen kodierte E-Cadherin spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression, Invasion und Metastasierung, sondern auch bei der Tumorentstehung. Dies geschieht hauptsächlich durch die Steuerung der Adhäsionsverbindungen zwischen den Zellen und die Aufrechterhaltung der normalen Struktur von Epithelgeweben (z.B. Prostata, Magen, usw.) [48, 54, 55]. Nach der Proteolyse wird das extrazelluläre 80 kDa schwere lösliche E-Cadherin Fragment (Ektodomäne) des 120 kDa schweren E-Cadherins mittels Sekretasen und Caspasen in die extrazelluläre Umgebung und ins Blut freigesetzt. Anschließend fördert sE-Cadherin als parakrines/autokrines Signalmolekül die Invasion und Metastasierung bei der Progression verschiedener Krebsarten [45, 56]. Nach neuesten Befunden scheint offensichtlich ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der gelösten E-Cadherin Form und einem Prostatakarzinom zu bestehen. Lacopino et al. konnten beobachten, dass eine radikale Prostatektomie mit einer signifikanten Reduktion des sE-Cadherin Blutwertes assoziiert ist [57]. Die von Tsaur et al. durchgeführten Studien zur Bedeutung von sE-Cadherin beim Nierenzell- und Prostatakarzinom legen nahe, dass es sich dabei um einen potenziellen Biomarker handeln könnte, welcher einen Benefit zur frühzeitigen Diagnose eines Prostatakarzinoms liefern könnte [44, 58]. Details zur Funktion und Bedeutung von sE-Cadherin sind jedoch unklar.

1.5 Ziel der Arbeit

Die primäre Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Analyse des Stellenwertes von sE-Cadherin als Zielmolekül für eine zielgerichtete Therapie eines Prostata Tumors. Die zur Klärung der Fragestellung durchgeführten Experimente wurden alle in vitro mit den Prostatakarzinomzelllinien PC3, DU145 (beide Androgen resistent) und LNCaP (Androgen sensitiv) durchgeführt. Ein besonderer Fokus sollte hierbei auf mögliche Effekte von sE-Cadherin auf diese Prostatakarzinomzellen mit Resistenzen gegen die Taxane Docetaxel und Cabazitaxel gelegt werden.

Der Einfluss von sE-Cadherin auf Zellwachstum und -proliferation wurde in MTT- und BrdU-Experimenten (siehe 3.2 und 3.4) untersucht. Zu Studienbeginn wurden die Taxan-Resistenzen der verwendeten Zellen anhand von Dosis-Wirkungskurven verifiziert. Ergänzend zu diesen Wachstumsstudien wurde das klonogene Wachstum kontrolliert. Um mögliche toxische Effekte durch eine sE-Cadherin Behandlung zu erfassen, kamen verschiedene Apoptose-Experimente zum Einsatz. Das veränderte Wachstum neoplastischer Zellen ist mit einer Veränderung des Zellzyklus assoziiert. Aus diesem Grund sollten mögliche Verschiebungen der einzelnen Zellzyklus-Phasen durch die Behandlung mit sE-Cadherin oder auch durch die Taxan Resistenz im Durchflusszytometer eruiert werden. Um Modulationen der Zellzyklus-Phasen molekularbiologisch detaillierter zu erarbeiten, wurde die Expression der zellzyklusregulierenden Proteine Cyclin A, B und CDK1, 2, sowie deren aktivierte (phosphorylierte) Variante untersucht. Neben dem Wachstum lag ein Augenmerk auf dem Effekt von sE-Cadherin auf das Metastasierungsverhalten. Dazu wurde zunächst das Adhäsionsverhalten der Prostatakarzinomzellen auf verschiedenen extrazellulären Matrices und auf Endothel überprüft. Nachfolgende Chemotaxis- und Scratch-Experimente dienten der Darstellung der Migrationsaktivität. Die für die Metastasierung wichtigen Oberflächenrezeptoren der Integrine wurden in Fluoreszenzanalysen im Durchflusszytometer betrachtet. Abschließende Blockadestudien sollten die Bedeutung spezifischer Integrine auf das Wachstum und die Metastasierungsaktivität der Prostatakarzinomzellen evaluieren, um eine klinische und physiologische Relevanz der einzelnen Proteine herauszuarbeiten.

2. Material

2.1 Apparaturen

Tabelle 5: Verwendete Apparaturen

Brutschrank für Zellkulturen	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Durchflusszytometer	FACScan, Becton Dickinson (Heidelberg)
Geldokumentation	Fusion FX7 PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen)
Grafikprogramm	Systat SigmaPlot 11.0
Heizblock	Thermoblock TB1, Biometra (Göttingen)
Inkubator	Heracell 240i Thermo Scientific
Konfokalmikroskop LSM780	Zeiss LSM780
Lichtmikroskop	Photomikroskop-III, Zeiss (Jena)
Magnetrührer	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroskop	Zeiss ID03
Mikroskop mit Kamera	Zeiss, Oberserver Z1/AxioCam MRm
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad (München)
Pipettierhilfe	Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
PowerPac HC	BioRad (München) #166-0828EDU
Sterilbank	Heracell
Thermocycler	TRIO-ThermoblockTM, Biometra (Göttingen)
Tischschüttler	Polymax 1040, Heidolph (Schwalbach)
Vortex	Vortex 4 digital; IKA Labortechnik (Staufen)
Waagen	Typ S-234, Denver Instrument GmbH (Göttingen) Typ SI-8001
Wasserbad	GRW 720-04, Fritz Gössner GmbH & Co. (Hamburg)
Western Blot Tanksystem	BioRad (München)
Wound Maker (Scratch-Versuch)	Essen Bioscience
Zentrifugen	Typ 5402, Eppendorf (Hamburg) Rotanta/RP, Hettich (Tuttlingen) Suprafuge 22, Heraeus (Osterode)

Material

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Annexin V-FITC Apoptosis	Becton Dickinson Biosciences
Blotting-Papier	Typ GB002, Schleicher & Schuell (Dassel)
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Colorimetrisches Assay (MTT basierend), Roche Diagnostics GmbH (Penzberg)
CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit	Becton Dickinson (Heidelberg)
CultureSlides (8 Chamber Polystyrene Vessel)	Falcon
Einmalpipetten, steril (1, 5, 10 und 25 ml)	Costar Corning (USA)
FACS-Röhrchen	Falcon (Heidelberg)
Filterpapier	VWR International (Darmstadt)
Human Fibronectin Cellware 6-Well Plate	Corning
Insulinspritze (1 ml)	Fa. Becton Dickinson, USA. #324827
Imagelock 96-Well Platte	Essen Bioscience
Kryoröhrchen (2 ml)	Nunc™ CryoTube™ Vials, Apogent, Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Nitrozellulosemembran	Hybond-C Extra, Amersham BioscienceUK Ltd. (Bucks, UK)
Neubauer-Zählkammer	W. Schreck (Hofheim/TS)
Pipetten	MicroOne, Starlab (Ahrensberg)
Pipettenspitzen (10, 200, 1.000 µl)	Starlab (Ahrensburg)
Poly-D-Lysin 24-Well-Platten	Becton Dickinson (Heidelberg)
Polystyrolzellkulturflaschen, steril (25 cm², 75 cm² Wuchsfläche)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Schwammtücher	Biorad (München)
Schwenktisch	Stuart, see-saw rocker SSL4
Western Blot Recycling Kit	Stripping, Alpha Diagnostic (USA)
Zellkulturplatten (6, 24, 96 Wells)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	PP-Test tubes, Falcon (Heidelberg)

Material

2.3 Chemikalien und Agenzien

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Agenzien

Accutase	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Albumin	Aus Rinderserum (BSA), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ammoniumperoxodisulfat (APDS)	Merck KGaA (Darmstadt)
Acrylamidlösung (30%)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Bisacrylamidlösung (2%)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Chemolumineszenz-Lösung (ECL)	Amersham-Buchler (Braunschweig)
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	B. Braun Melsung AG (Melsungen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Fibronektin 6-Well-Platte	Corning BioCoat Katalognr.: 354402
Glutaraldehyd	Merck KGaA (Darmstadt)
Isopropanol	Sigma Aldrich GmbH & Co. (Steinheim)
Kollagen-G (4 mg/ml)	aus Kälberhaut, Biochrom AG (Berlin)
Laemmli Proben-Puffer	Biorad (München)
Leupeptin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Magermilchpulver	Töpfer GmbH (Dietmannsried)
Methanol	J.T. Backer (Deventer, Holland)
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Mounting Medium	Biozol (Eching, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
PBS + (mit CaCl_2 und MgCl_2)	<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i> , Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
PBS - (ohne CaCl_2 und MgCl_2)	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Pepstatin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
peqGOLD Protein-Marker IV	<i>prestained</i> , PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

Material

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Tergitol NP40	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, AppliChem GmbH (Darmstadt)
Tris (ultrapure)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Trypanblau	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)

2.4 Nährmedien

Tabelle 8: Verwendete Nährmedien

Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Biochrom (Berlin)
Fötales Rinderserum	<i>Foetal Bovine Serum</i> (FBS), hitzeinaktiviert, Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Glutamin	GlutaMAX™, Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)

3. Methoden

3.1 Verwendete Zellkulturen

Um ein an reale Bedingungen angelehntes Prostatakrebsmodell zu verwenden, wurden drei Prostatakarzinomzelllinien mit unterschiedlichen Voraussetzungen benötigt. Dies wurde durch die drei immortalisierten Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP umgesetzt [59]. Die entscheidende Rolle bei metastasierendem Prostatakrebs spielt die Verschiebung der Sensitivität gegenüber Androgenen. Versuche haben verdeutlicht, dass mit steigender Aggressivität und Metastasierungsaktivität das Ansprechverhalten der Zellen auf Androgene deutlich abnimmt und es zur Ausbildung einer Androgen-Resistenz kommt [60].

Zur Durchführung der Experimente wurden drei verschiedene Prostatakarzinomzelllinien verwendet, welche von der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ entstammen:

- PC3
- DU145
- LNCaP

Darüber hinaus wurden die drei Zelllinien mit einer Resistenz gegen die Taxane Docetaxel und Cabazitaxel (außer PC3-Cabazitaxel; eine Resistenzinduktion war durch eine Kontamination nicht erfolgreich) verwendet. Die Resistenzen wurden im Labor der Kinderkrebsstiftung Frankfurt am Main unter der Leitung von [REDACTED] induziert. Dafür wurden die verschiedenen Zelllinien mit steigender Taxan-Konzentration kultiviert. Die Zellen wurden mit einer konstanten Taxan-Konzentration über mindestens drei Passagen kultiviert. Sobald signifikante Reduktionen des Wachstums ausblieben, wurde die Behandlungsdosis erhöht. Dieses Prozedere wurde. Allerdings musste ein Kompromiss zwischen Wirkeffekt und Wachstumsgeschwindigkeit gefunden werden, da eine vollständige Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit für eine weitere Kultivierung kontraproduktiv gewesen wäre. Der Prozess der Resistenzinduktion benötigte je nach Zelllinie und Taxan zwischen sechs und zehn Monate.

Methoden

DU145

Bei der Zelllinie DU145 (Abbildung 5) handelt es sich um eine aus einer Metastase des Zentralnervensystems abgeleitete und ursprünglich aus einem primären Prostata Adenokarzinom stammende Tumorzelle eines 69-jährigen kaukasischen Mannes. Diese Zellen exprimieren kein PSA und sind nicht hormonempfindlich. Im Vergleich zu PC3-Zellen weist DU145 eine gedämpfte metastasierende Aktivität auf [61].

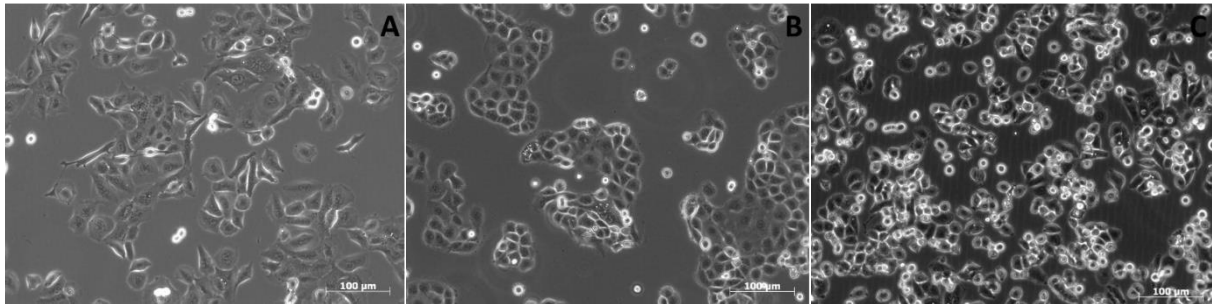


Abbildung 5: Phasenkontrast-Aufnahme von DU145; A) DU145 parental, B) DU145 Docetaxel resistant C) DU145 Cabazitaxel resistant; 10-fache Vergrößerung; Quelle: Selbst erstellt

PC3

Bei der Adenokarzinom-Zelllinie PC3 (Abbildung 6) handelt es sich um eine humane epitheliale Prostatakarzinomzelllinie. Diese ist resistent gegenüber Androgenen und sezerniert zudem kein PSA. Die Zelllinie PC3 ist eine einschichtig adhärent wachsende Zelllinie mit hohem Metastasierungspotenzial. Diese wurde 1976 aus dem Patientenisolat der Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms eines 62-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen [62]. Um ein fortgeschrittenes Prostatakarzinom darzustellen, eignet sich die Zelllinie PC3 sehr gut, da diese das größte Metastasierungspotenzial aufweist [63].

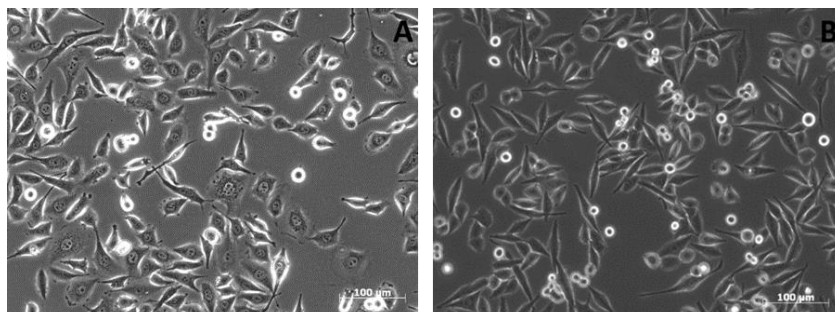


Abbildung 6: Phasenkontrast-Aufnahme von PC3; A) PC3 parental B) PC3 Docetaxel resistant; 10-fache Vergrößerung; Quelle: Selbst erstellt

Methoden

LNCaP

Die Zelllinie LNCaP (Abb.:7) ist eine androgensensitive humane Prostata Adenokarzinom Zelllinie, welche 1977 aus einer linken supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50 Jahre alten Kaukasiers entnommen wurde [64]. Diese Zellen wachsen adhärent und neigen zur Bildung von Zellverbänden [65]. Durch unzureichende Vereinzelnung beim Splitten kann es zu einer Sphäroid Entstehung kommen. Dabei handelt es sich um größere Zellansammlungen, die aufgrund von Nährstoff- und Sauerstoffgradienten verschiedene Umgebungen für das Wachstum der Zellen erzeugen. Die äußere Schicht besteht angesichts guter Versorgungsbedingungen aus proliferierenden Zellen. Ausgehend von den mittleren Schichten, die zu einem großen Teil aus Zellen in der G0-Phase bestehen, nimmt der Anteil der vitalen Zellen ab, bis sich schließlich eine Zentralnekrose bedingt durch Nähr- und Sauerstoffmangel ausbildet [66].

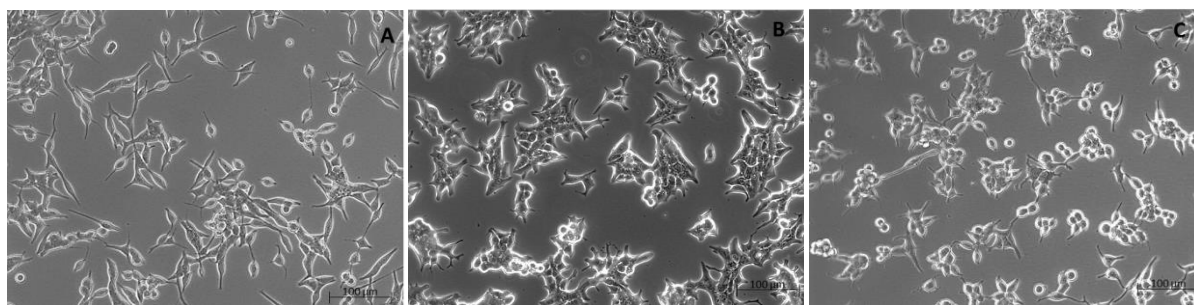


Abbildung 7: Phasenkontrast-Aufnahme von LNCaP. A) LNCaP parental B) LNCaP Cabazitaxel resistant C) LNCaP Docetaxel resistant; 10-fache Vergrößerung; Quelle: Selbst erstellt

3.1.1 Dosierungsschema

Die drei Prostatakarzinomzelllinien wurden mit stetig steigenden Konzentrationen der Taxane Docetaxel und Cabazitaxel behandelt. Dieser Prozess wurde kontinuierlich fortgeführt, bis sich eine signifikante Resistenz im Vergleich zu sensitiven Zellen einstellte. Die Resistenzinduktion wurde im interdisziplinären Labor der Frankfurter Stiftung für krebserkrankte Kinder unter der Leitung von [REDACTED] induziert.

Da die optimalen Dosierungen zwischen den drei Zelllinien unterschiedlich waren, sollen diese in der nachfolgenden Tabelle 9 veranschaulicht werden.

Methoden

Tabelle 9: Dosierungsschema für chronische Taxan-Behandlung

Zelllinie	Parental	Docetaxel	Cabazitaxel
PC3	0 ng/ml	20 ng/ml	Keine Resistenz
DU145	0 ng/ml	7,5 ng/ml	3 ng/ml
LNCaP	0 ng/ml	10 ng/ml	10 ng/ml

Die behandelten versus unbehandelten (parentalen) Tumorzellen wurden den in diesem Abschnitt („Methoden“) gelisteten Experimenten unterworfen.

3.1.2 Splitten konfluenter Zellen

Im ersten Schritt wurden die Kulturflaschen im Lichtmikroskop untersucht. Wenn die PCa-Zellen eine konfluente Schicht bildeten, mussten diese auf neue Flaschen aufgeteilt werden um ein Absterben der Zellkultur, durch zu starke Bewachsung zu vermeiden. Im ersten Schritt musste das alte bzw. aufgebrauchte Nährmedium aus den Kulturflaschen entnommen und anschließend die Zellkultur mit ca. 10 ml PBS⁻ gewaschen werden. Nachdem das PBS⁻ verworfen wurde, konnte Accutase (für PC3 und DU145; Enzymlösung mit proteolytischer Wirkung) oder Trypsin (Für LNCaPs) in die Kulturflaschen pipettiert werden (bei 25 cm² Flaschen 1 ml Accutase/0,5 ml Trypsin und bei 75 cm² Flaschen 3 ml Accutase/1,5 ml Trypsin). Die Kulturflaschen wurden anschließend für ca. 3–10 min bei 37 °C inkubiert, wobei die Inkubationszeit von Zelllinie zu Zelllinie variierte. Die abgelösten Zellen konnten nachfolgend in Nährmedium resuspendiert und je nach Bedarf auf die entsprechende Anzahl neuer Kulturflaschen ausgesät werden. Dabei variierte das Verhältnis von 1:2 bis 1:20. Je höher das Verhältnis der übertragenen Zellen war, desto schneller bildeten diese einen konfluenten Zellrasen in der neuen Zellkulturflasche aus.

Um optimale Wachstumsbedingungen für die Zellen zu gewährleisten, wurden diese bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank aufbewahrt.

Methoden

3.1.3 Mediumwechsel

War eine Zellkulturflasche nach fünf Tagen lediglich subkonfluent mit Zellen bewachsen, musste ein Mediumwechsel statt Splitting durchgeführt werden. Dafür wurde das Medium mit einer Pipette aus den Kulturflaschen entnommen und verworfen. Anschließend folgte eine Zugabe von frischem Nährmedium ohne und mit entsprechender Taxanbehandlung in die Kulturflaschen. Die Kulturflaschen wurden anschließend wieder bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank eingelagert.

3.1.4 Zellkulturen einfrieren

Im ersten Schritt erfolgte die Ablösung der Zellen wie im Abschnitt „3.1.2 Splitten konfluenter Zellen“ beschrieben. Die abgelösten Zellen wurden dann in 15 ml Falcon Tubes überführt und für 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand verworfen und das Zellpellet mit einer 200 µl Pipette so gut wie möglich von Restflüssigkeit befreit werden. Im letzten Schritt wurde das Zell-Pellet in Einfriermedium aufgenommen.

Einfriermedium: 70 % Iscove's Modified Dulbecco's Medium ohne Zusätze

 20 % FBS

 10 % DMSO

Bei Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² wurden 3–4 ml Einfriermedium benötigt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension konnte dann in vorher beschriftete Kryotubes auf Eis überführt werden. Die sicher verschlossenen und beschrifteten Kryotubes wurden dann zum Einfrieren bei –80 °C in einer Kryobox eingelagert. Diese mit 2-Propanol gefüllte Plastikbox ermöglicht ein für die Zellen schonendes Einfrieren in Schritten von ca. 1 °C/min. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryotubes in den -180 °C kalten Flüssigstickstofftank überführt und dadurch für lange Zeiträume stabil eingelagert.

3.1.5 Zellkulturen auftauen

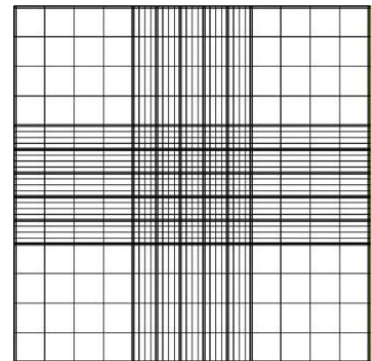
Zu Beginn wurden die Kryotubes aus dem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kalten Gefrierschrank genommen und im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ so lange angetaut, bis nur noch ein kleiner Eisbrocken zu sehen war. Dann wurde der Inhalt möglichst rasch in 15 ml Falcon Röhren überführt und mit 10 ml Nährmedium aufgefüllt. Das Falcon wurde danach für 5 min bei 1.050 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit einer 200 μl Pipette von letzten Flüssigkeitsresten befreit. Das so trockengelegte Zellpellet wurde nachfolgend sofort in Nährmedium aufgenommen, homogenisiert und in 25 cm^2 Kulturflaschen überführt.

Die Kulturflaschen wurden nach Abschluss der Arbeiten wie im Abschnitt „Splitten konfluenter Zellen“ beschrieben bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank gelagert.

3.2 MTT-Test

Messung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mithilfe des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Tests. Dafür wurden Zellen mit einem gelben Tetrazoliumsalz behandelt. Durch Verstoffwechselung dieses Salzes konnte aufgrund gleicher Ausgangszellzahl der Anteil lebender Zellen im Vergleich zwischen zwei oder mehr Proben gemessen werden. Dadurch war es möglich, verschiedene Konzentrationen eines Wirkstoffes auf eine Zellkultur zu



© LO Laboroptik

Abbildung 8: Darstellung der Neubauer-Zählkammer; [www.ZaehlKammer.de]

evaluieren und somit festzustellen, ab welcher Konzentration eine Wirkung bzw. Toxizität besteht. Der MTT-Test wurde mit den Zellkulturen PC3, DU145 und LNCaP durchgeführt. Von allen drei Zelllinien wurden je eine Kontrollkultur (Parentale) und eine gegen Taxane resistente (Cabazitaxel und Docetaxel) Kultur mit 0,5 und 5 $\mu\text{g/ml}$ sE-Cadherin inkubiert. Die verwendeten Zellkulturen wurden in 25 cm^2 Kulturflaschen kultiviert. Taxane resistente Zellen erhielten chronisch Nährmedium mit Taxane Konzentrationen wie in Abschnitt „3.1.1 Dosierungsschema“ beschrieben, um einen konstanten Resistenzdruck aufrecht zu erhalten. Die parentalen Zellen verblieben auf Nährmedium ohne Zusatz von Taxanen. Die Zellen

Methoden

wurden dann mittels PBS⁻ und Accutase/Trypsin nach bereits beschriebenen Methoden abgelöst und für 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte anschließend dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert werden. Die Bestimmung der Zellzahl stellte eine Ausbringung identischer Zellmengen in jeder Vertiefung der 96-Well-Platte sicher. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension in 90 µl 0,4%iger Trypanblau-Lösung sorgfältig resuspendiert. Trypanblau kann die nicht mehr intakten Membranen von nekrotischen Zellen durchdringen und diese blau anfärben. 10 µl der Zell-Trypanblau-Suspension wurden auf eine Neubauer-Zählkammer (Abb. 8) aufgebracht und dann mittels Lichtmikroskop die 4 x 4 Quadrate in den vier Ecken ausgezählt. Das Hauptaugenmerk lag auf den vitalen, ungefärbten Zellen. Die nicht vitalen Zellen (blau) wurden zusätzlich notiert, um die Anzahl der nekrotischen Zellen bestimmen zu können. Mit dem Durchschnitt der vier ausgezählten Quadrate, konnte die Gesamtzahl der vitalen Zellen pro Milliliter mit folgender Formel berechnet werden.

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

G = Gesamtzahl pro ml

n = Errechneter Durchschnitt der vier Quadrate der Neubauer-Kammer

F = Verdünnungsfaktor durch Trypanblau (1:10)

Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, konnte diese auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt werden. Jeweils 50 µl Zellsuspension und 50 µl Medium (ohne oder mit doppelt konzentrierter sE-Cadherin Behandlung) wurden pro Vertiefung aufgetragen, wodurch in jeder Vertiefung der 96-Well-Platte 5.000 Zellen vorhanden waren. Somit waren die 96-Well-Platten vollständig mit Zellen und Taxanen beladen und konnten bei 37 °C im Brutschrank für 24, 48 und 72 Stunden inkubieren. Nach jedem der 3 festgelegten Inkubationszeitpunkte wurden 10 µl MTT „labeling reagent“ pro Vertiefung aufgetragen und für weitere 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der 4 Stunden wurden in jede Vertiefung 100 µl Solubilisierungspuffer gegeben und die Platten für weitere 12 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung dieses Inkubationsschrittes wurden die 96-Well-Platten im ELISA-Gerät (Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Durch Verrechnen der Messwerte mit einer Standardkurve konnte nachfolgend die absolute Zellzahl

pro Vertiefung bestimmt werden. Ein Vergleich dieser Messwerte führte Unterschiede der Zellzahl bei den verschiedenen sE-Cadherin Konzentrationen aus.

3.3 Klonogenes Wachstum

Bei diesem Zellwachstumstest wird die Fähigkeit einzelner Zellen zu einer Zellkolonie auszuwachsen und somit auch die Fähigkeit sich unbegrenzt oft zu teilen untersucht [67]. Wenn eine Einzelzelle eine Kolonie bilden kann, hat diese nach Behandlung und unter den gegebenen Wachstumsbedingungen ihre proliferative Integrität/Reproduktivität – also Teilungsfähigkeit– bewahren können [68].

Dieses Experiment sollte der Effekt von sE-Cadherin auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP aufzeigen. Hierfür wurden Zellen stark vereinzelt (1.000 Zellen pro Vertiefung) ausgesät und für 6–10 Tage in 6-Well-Platten wachsen gelassen. Als Klon zählt ein Zellverbund von mindestens 50 Zellen, die auf eine einzelne Ausgangszelle zurückzuführen sind. Aus diesem Grund war es enorm wichtig, die 6-Well-Platten bereits am ersten Tag auf eine saubere Vereinzelnung der Zellen zu überprüfen.

Zu Beginn des Experimentes mussten die Zellen wie unter Punkt „3.2 MTT-Test“ beschrieben abgelöst und ausgezählt werden. Anschließend wurde die Zellzahl auf 500 Zellen/ml eingestellt und je 2 ml Zellsuspension in einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Zelllinien DU145 und PC3 wurden mit Nährmedium mit 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Zelllinien mit Nährmedium (plus Taxane bei induzierter Resistenz) ohne eine sE-Cadherin-Behandlung verwendet. Die so vorbereiteten 6-Well-Platten wurden anschließend im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit für 6–10 Tage gelagert. Während dieser Zeit war es wichtig täglich den Wachstumsstatus der Zellen zu kontrollieren, da eine zu lange Wartezeit dazu führen konnte, dass die Zellen bereits konfluent den Boden der Vertiefungen bewachsen hatten. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden in den einzelnen Vertiefungen der 6-Well-Platten die Anzahl der Klone ausgezählt.

3.4 BrdU

Messung der Zellproliferation

Je eine unbehandelte Kontroll- und Taxan resistente 25 cm² Kulturflasche wurde benötigt. Die Zellen mussten am Versuchstag wie im Abschnitt „3.2 MTT-Test“ beschrieben abgelöst und in Nährmedium auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt werden. Anschließend wurden in eine 96-Well-Platte je Vertiefung 50 µl Zellsuspension (= 5.000 Zellen) pipettiert (je Probe drei Vertiefungen → Dreifachansatz). Jeweils 50 µl Nährmedium wurden auf die Zellsuspensionen gegeben. Hier war es wichtig für die resistenten Zellen, ein Nährmedium mit doppelter Taxan-Behandlung zu verwenden, um in der 1:1 Verdünnung wieder die korrekte Konzentration zu ergeben. Auf der 24 Stunden Platte wurden nach dem Absetzen der Zellen 20 µl des 1:2.000 mit Nährmedium verdünnten Bromdesoxyuridins (BrdU; Abb.:9) in die Wells hinzugefügt. Ergänzend wurde jeweils ein Kontrollansatz ohne BrdU-Behandlung erstellt. Die Platten konnten anschließend für 24 und 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert werden. Den Platten für die 48 Stunden Messung wurde erst nach 24 Stunden 20 µl BRDU (1:2.000 verdünnt) hinzugefügt. Nach der Inkubationszeit mussten die Platten schnell über Kopf gedreht und auf Papiertüchern trocken geklopft werden. In jede der Vertiefungen wurden 200 µl Fixierungspuffer des BRDU „cell assay kits“ pipettiert und für 30 min bei RT inkubiert. Der Inhalt wurde anschließend erneut über Kopf auf Papiertüchern trocken geklopft. Die Platten waren nun bis zu einer Woche bei 4 °C haltbar.

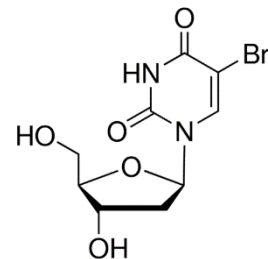


Abbildung 9: Strukturformel Bromdesoxyuridin [sigma.com]

Messung am ELISA-Gerät

Im ersten Schritt war es notwendig, den 100 x Anti-BrdU-Antikörper aus dem BrdU-Kit 1:100 mit Antikörperpuffer (ebenfalls im Kit enthalten) zu verdünnen, bevor je 100 µl in jede Vertiefung pipettiert werden konnten. Die Platten wurden anschließend für 60 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde der Waschpuffer nach Herstellerprotokoll durch Vermischen von 25 ml der 20-fach konzentrierten Lösung mit 475 ml Wasser vorbereitet. Nach Ende der Inkubationszeit konnten die Platten dreimal mit einem halbautomatischen Waschgerät (vergleichbar mit einer Multikanalpipette, welche mit einem Schlauch direkt

Methoden

Waschlösung aus einer Vorratsflasche zieht) mit 1 x Waschpuffer gewaschen werden. Bei jedem Durchgang wurden die Platten kopfüber auf Papiertüchern trocken geklopft. Das Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG HRP Konjugat, das als Pulver vorlag, musste mit 1 x PBS⁻ (250 µl) verdünnt werden. Die entsprechende Menge wurde 1:1000 mit 1x PBS⁻ verdünnt und durch eine Spritze mit einem 0,2 µm Filter gepresst. 100 µl dieser Lösung mussten in jeder Vertiefung für 30 min bei RT inkubieren. Die Platten wurden anschließend erneut dreimal mit dem halbautomatischen Waschgerät mit 1 x Waschpuffer gewaschen und jedes Mal überkopf auf Papiertüchern trocken geklopft. Die Platten mussten dann noch einmal mit H₂O_{dest.} gewaschen und auf Papiertüchern trocken geklopft werden. Je 100 µl der Substrat Solution aus dem BrdU-Kit wurden in jede Vertiefung pipettiert und für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Direkt im Anschluss folgte eine Zugabe von 100 µl Stop Solution aus dem BrdU-Kit in jede Vertiefung. Die Messung am ELISA-Gerät (450 nm) musste innerhalb der folgenden 30 min erfolgen.

3.5 Zellzyklus

Das veränderte Wachstum neoplastischer Zellen geht mit einer Veränderung des Zellzyklus (Abb.:10) Hand in Hand. Der normalerweise vom Organismus gesteuerte Zellzyklus weist eine Verschiebung der Dauer der einzelnen Zellzyklus-Phasen auf.

Zur Untersuchung des Zellzyklus wurde das CycleTest™Plus DNA Reagent Kit verwendet. Die Zellen wurden mittels Accutase/Trypsin abgelöst und anschließend für 5 min bei

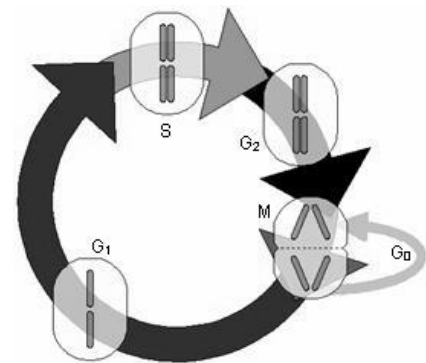


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Zellzyklus. [<http://www.biostudies.de>]

1.050 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mithilfe einer 200 µl Pipette so gut wie möglich trockengelegt werden. Anschließend wurde das Pellet in sE-Cadherin haltiges Nährmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt und im Thermocycler (Drehplatte) im Brutschrank für vier Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension in Nährmedium aufgenommen und in neue Kulturflaschen ausgesät. An Tag drei wurden die Zellen mittels Accutase/Trypsin abgelöst und bei 1.050 rpm zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde nachfolgend zweimal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend in 1 ml Pufferlösung auf Eis resuspendiert. Die Zellen wurden wie im Abschnitt „3.2 MTT-Test“ beschrieben ausgezählt.

Methoden

Anschließend wurden sie auf 5×10^5 Zellen/ml in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen in Pufferlösung eingestellt und für 5 min bei 1.050 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mithilfe einer 200 µl Pipette so gut wie möglich getrocknet. Das Pellet musste in 250 µl Trypsinpuffer (vorsichtig!) resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert werden. Im Anschluss wurden 200 µl Trypsininhibitor und RNase-Puffer aufgetragen und erneut vorsichtig resuspendiert. Nach weiteren 10 min Inkubationszeit konnten im Dunkeln und auf Eis 200 µl Propidiumiodid (PI)-Färbelösung aufgetragen und ebenfalls für 10 min (auf Eis) inkubiert werden. Die Zellsuspensionen wurde nach Ablauf der Zeit in 5 ml FACS-Röhrchen filtriert und am FACS (Durchflusszytometer) gemessen. Zur Einstellung der unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen am FACS wurden Leukozyten verwendet.

3.6 Apoptose

Zur Durchführung dieses Versuches wurden die drei Prostatakarzinomzelllinien in 25 cm² Kulturflaschen kultiviert und mit sE-Cadherin für 72 Stunden inkubiert. Mittels Accutase/Trypsin und PBS⁻ konnten die Zellen abgelöst und in 15 ml Falcon Röhrchen (Zentrifugenröhrchen) überführt werden. Da apoptotische und nekrotische Zellen abgelöst im Nährmedium treiben, war es im Gegensatz zu der im Abschnitt „3.2 MTT-Test“ beschriebenen Methode notwendig, den Überstand ebenfalls in ein 15 ml Falcon Tube zu überführen. Das Falcon mit der Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 1.050 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend musste der Überstand vollständig dekantiert und das Pellet (auf Eis) zweimal mit PBS⁻ gewaschen werden. Das gereinigte Zellpellet wurde folgend in 1 ml 1x Bindepuffer (1:10 Verdünnung aus 10x Bindepuffer mit destilliertem Wasser) aufgenommen. Um die Zellen in Bindepuff auf 2×10^6 Zellen/ml einzustellen, war zunächst eine Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer (siehe Methode „3.2 MTT-Test“) notwendig. Um jeweils 2×10^5 Zellen pro FACS-Röhrchen zu erhalten, wurden je 100 µl der eingestellten Zellsuspension (auf Eis) in diese Röhrchen überführt.

Methoden

Jede Zelllinie wurde wie folgt behandelt:

Tabelle 10: Behandlungsschema mit Annexin V und Propidiumiodid für Apoptose-Test

	Annexin V-FITC	Propidiumiodid
K1	/	/
K2	5 μ l	/
K3	/	5 μ l
P	5 μ l	5 μ l

Annexin V-FITC und Propidiumiodid mussten möglichst lichtgeschützt aufgetragen werden, da diese photosensitiv sind. Die FACS-Röhrchen wurden anschließend resuspendiert (Vortex) und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend konnten je 400 μ l 1x Bindepuffer pro FACS-Röhrchen aufgetragen werden. Die Fluoreszenz war ab diesem Zeitpunkt für eine Stunde stabil und konnte am Durchflusszytometer gemessen werden.

3.7 LDH-Test

Der Lactat-Dehydrogenase(LDH)-Test dient der Untersuchung der membrangeschädigten Zellen, weshalb man von einem Zytotoxizitätstest spricht. Im Rahmen einer Zellnekrose ist es typisch, dass es zu einer Zerstörung der Cytoplasmamembran kommt. Hierbei wird eine Vielzahl von Proteinen und Enzymen in das umliegende Medium abgegeben. Dazu zählt unter anderem auch LDH, welches durch die Umsetzung eines Formazansalzes photometrisch gemessen werden kann [69]. Die Zellen wurden zunächst in 96-Well-Platten ausgesät und für 72 Stunden mit 0; 0,5 und 5 μ g/ml sE-Cadherin inkubiert. Im Anschluss wurden die 96-Well-Platten für 10 min bei 200 g zentrifugiert und jeweils 100 μ l des Überstandes in neue 96-Well-Platten überführt. Durch die Zugabe von 100 μ l Reaktions-Mix (Natriumlactat, NAD^+ und Jodtetrazolchlorid) kam es nach ca. 5 min zu einer Rotfärbung, deren Intensität proportional zur Menge der lysierten Zellen war (Szekeres et al. 1981). Von jeder Messprobe wurde eine zusätzliche Probe nur mit Triton X-100 behandelt, da dieser Stoff den maximalen LDH-Gehalt freisetzt und somit als Positivkontrolle genutzt werden konnte. Die optische Dichte wurde mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen [69, 70].

3.8 CDD-Test

Der Cell Death Detection Test (CDD) wurde zur relativen Quantifizierung von histonkomplexierten DNA-Fragmenten, die aus dem Zytoplasma von apoptotischen Zellen freigesetzt werden, verwendet [70, 71]. Diese Methode stellt damit eine Möglichkeit zur Untersuchung apoptotischer Eigenschaften der Zelllinien dar. Die Zellen wurden wie bereits unter „3.7 LDH-Test“ beschrieben mit sE-Cadherin für 72 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der Apoptoseinitiator Staurosporin verwendet. Vergleichbar zum LDH-Test wurden die 96-Well-Platten zunächst mit 200 µl für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten dekantiert und die Zellen für 30 min mit je 200 µl Lysispuffer inkubiert. Im Anschluss wurden je 20 µl des Lysates in eine mit Streptavidin beschichtete 96-Well-Platte übertragen. Um Effekte von verwendeten Stoffen abschätzen zu können, wurden je zwei Vertiefungen der 96-Well-Platten mit Inkubationspuffer und Lysispuffer gefüllt. Nachdem alle Zelllysate in die Wells überführt wurden, mussten je 80 µl Immunoreagenz hinzugefügt werden. Die so präparierte 96-Well-Platte wurde für zwei Stunden bei RT auf einem Laborschüttler inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und die Platten drei Mal mit je 300 µl Inkubationspuffer gewaschen und kopfüber auf Papiertüchern trocken geklopft. Die gewaschenen 96-Well-Platten wurden danach mit 100 µl ABTS-Substrat-Lösungen (wasserlösliches Peroxidasesubstrat) pro Well überschichtet und für weitere 15–20 min auf dem Laborschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit war es notwendig die Staurosporin-Positivkontrolle zu beobachten, um den Prozess der Grünfärbung zum optimalen Zeitpunkt mittels Zugabe von 100 µl ABTS-Stopp-Lösung zu beenden. Im Anschluss konnten die Proben in der 96-Well-Platte mittels ELISA-Plattenreader bei 490 nm gemessen werden.

3.9 Adhäsion und Migration

Das Adhäsionsverhalten von Tumorzellen spielt im Rahmen der Metastasierung eine bedeutende Rolle. Aus diesem Grund ist es zwingend notwendig, dieses Verhalten der drei Prostatakarzinomzelllinien zu untersuchen. Sowohl durch die Induktion einer Resistenz gegen die Taxane Cabazitaxel und Docetaxel als auch unter dem Einfluss von sE-Cadherin. Um klinikrelevante Aussagen durch Taxan ausgelöste Resistenzeffekte und die daran anschließende Behandlung mit sE-Cadherin treffen zu können, musste in der Versuchsplanung

Methoden

die aggressive Dynamik der Tumorzellen sowie die beim Gefäßdurchtritt ablaufenden komplexen Interaktionen zwischen Tumor und Extrazellulärmatrix berücksichtigt werden. Gleichzeitig bestand jedoch die Anforderung, die verschiedenen Invasionsphasen separat auswerten zu können.

1. Adhäsion auf Kollagen und Fibronectin

Messungen der Bindung von Prostatakarzinomzellen an extrazelluläre Matrixproteine (Abschnitt „3.9.1“). Neben der Tumorzellinteraktion mit Endothel ist der Kontakt zur extrazellulären Matrix entscheidend für die aggressive Ausbreitung des Tumors. Dieser Zusammenhang soll im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt werden. Evaluiert wird die Bindungsfähigkeit der Tumorzellpopulationen (behandelt versus unbehandelt, resistent versus nicht resistent) an die Matrixkomponente Kollagen (Col) und Fibronectin. Poly-D-Lysin-behandelte Kulturplatten dienen der Überprüfung unspezifischer Bindungseffekte. Eine Quantifizierung fand wie im Abschnitt „3.9.1“ für die einzelnen Versuchsansätze statt.

2. Chemotaxis

Messungen der Tumormotilität und Penetration (Abschnitt „3.9.2“). In einem Doppelkammersystem wird die migratorische Aktivität der behandelten versus unbehandelten bzw. resistenten versus nicht resistenten Tumorzellen in Richtung auf einen chemotaktischen Stimulus ermittelt und quantitativ dargestellt.

3.9.1 Adhäsion an immobilisierte extrazelluläre Matrixproteine (EZM)

Für die Adhäsionsstudie wurden 6-Well-Platten mit Kollagen-G (400 µg/ml) behandelt. Die Einstellung der Matrixproteinkonzentrationen erfolgte mittels PBS⁻. Für die Studien zum Adhäsionsverhalten auf Fibronectin wurden bereits Fibronectin beschichtete 6-Well-Platten der Firma Corning verwendet. Als Kontrolle dienen vorbeschichtete Poly-D-Lysin-Platten und unbeschichtete 6-Well-Platten. Die vorbehandelten Kulturplatten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag mussten die 6-Well-Platten dreimal mit PBS⁻ gewaschen und anschließend bei RT eine Stunde mit 1 ml Blockierpuffer (1 % BSA in PBS⁻) blockiert werden.

Methoden

Währenddessen wurden die Tumorzellen abgelöst, zentrifugiert, in 1 ml Nährmedium aufgenommen und die Zellzahl pro Milliliter ermittelt (siehe „3.2 MTT-Test“). Die Einstellung der Zellzahl pro Milliliter fand durch Zugabe entsprechender Mengen Nährmedium auf 2×10^5 Zellen/ml statt. Die blockierten Kulturplatten mussten erneut dreimal mit PBS⁻ gewaschen werden. Je 500 µl eingestellte Zellsuspension (1×10^5 Zellen) wurden in eine Vertiefung der vorbehandelten Platten pipettiert und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Kulturplatten mussten mit PBS⁺ (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und 10 min mit bei 4 °C gekühltem 2%igem Glutaraldehyd bei RT fixiert werden. Die Kulturplatten wurden erneut mit PBS⁺ gewaschen und 500 µl PBS⁺ in jede Vertiefung gegeben. Die Kulturplatten waren so bei 4 °C einige Wochen haltbar. Die Auszählung der adhärenierten Tumorzellen erfolgte unter dem Mikroskop (200-fache Vergrößerung). Es wurden fünf Sichtfelder (je 0,25 mm²) ausgezählt und der sich daraus ergebende Mittelwert bestimmt (Abb.: 11;12).

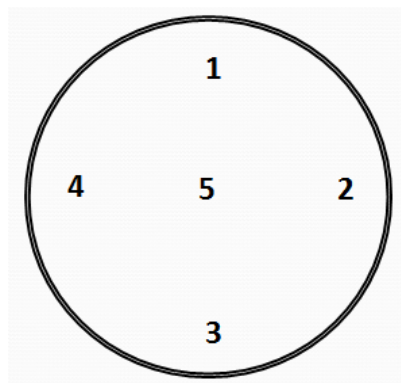


Abbildung 12: Auszählungsschema der Adhäsion. (Quelle: Selbst erstellt)

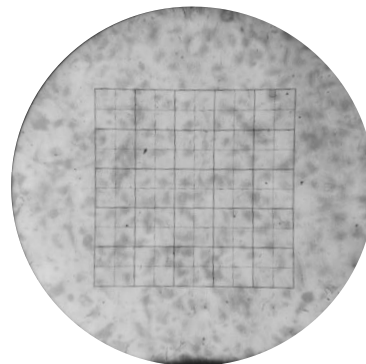


Abbildung 11: Beispiel für ein 0,25mm² Sichtfeld. (Quelle: Selbst erstellt)

3.9.2 Chemotaxis

Zur Untersuchung der Tumormotilität und Penetration einer Membran wurden Chemotaxis-Versuche durchgeführt. Chemotaxis bezeichnet die Bewegung einer Zelle in Richtung einer höheren Konzentration eines spezifischen Lockstoffes. Man spricht in diesem Fall von einer positiven Chemotaxis. Eine logische Schlussfolgerung ist, dass eine hohe chemotaktische Aktivität zu einer schnellen Verbreitung der Tumorzellen führt und somit einen Prozess einer Metastasierung positiv beeinflusst. Der Versuch wurde in einem Doppelkammersystem aufgebaut, bei dem FBS in der unteren Kammer als Lockstoff diente. Aufgrund der

Methoden

migratorischen Aktivität war zu erwarten, dass die Zellen in Richtung des FBS streben. Interessant war dabei zum einen, ob der chemotaktische Stimulus Einfluss auf die Zellen (behandelte versus unbehandelte bzw. resistente versus nicht resistente Tumorzellen) haben würde, und zum anderen in welchem Ausmaß (Quantität).

Benötigt wurde:

- Nährmedium ohne FBS
- Nährmedium mit 10 % FBS

Für den Versuch wurden sowohl parentale als auch Taxan resistente Zellen für 72 Stunden in Nährmedium mit 5 µg/ml sE-Cadherin in 25 cm² Kulturflaschen im Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden die entsprechenden Zellen in Nährmedium ohne eine Behandlung mit sE-Cadherin verwendet.

Der Versuch erstreckte sich über zwei Tage.

Tag 1:

Als erstes mussten alle Zellen aus den Kulturflaschen gelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt werden (siehe „3.2 MTT-Test“). Hier war es sehr wichtig, dass alle Zellen nur in Medium ohne FBS aufgenommen wurden. Die FBS-freie Zellsuspension wurde dann für 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets mussten anschließend in 1 ml Medium ohne FBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer eingestellt werden (siehe „3.2 MTT-Test“). In zuvor beschrifteten 6-Well-Platten wurden jeweils 2 ml Nährmedium mit FBS pro Vertiefung vorgelegt und Hängefilter mit einer Porenweite von 8 µm eingesetzt. Beim Einsetzen war es wichtig Luftblasen unter dem Filter unbedingt zu vermeiden, da an diesen Stellen keine Zellen, die ansonsten bei Kontakt mit FBS-haltigem Nährmedium durch den Filter wandern würden, migrieren könnten. Auf den Filter konnten dann jeweils 2 ml Zellsuspension (5×10^5 Zellen) aufgetragen werden. Die 6-Well-Platten wurden dann für 12–24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Methoden

Tag 2:

Im ersten Schritt wurden neue 6-Well-Platten beschriftet und in jede Vertiefung 2 ml 4 °C kaltes 2%iges Glutaraldehyd vorgelegt. Anschließend mussten die Filter zweimal mit PBS⁺ gewaschen werden, bevor sie in die 6-Well-Platten mit Glutaraldehyd gehängt werden konnten. Die Filter wurden dann bei RT für 10 min inkubiert. Direktes Licht musste dabei möglichst vermieden werden, da Glutaraldehyd photosensitiv ist. Während der Inkubationszeit konnten die Filter an den Ecken beschriftet werden und die „alten“ Platten kamen für eine spätere Auszählung der durch den Filter hindurch gewanderten Zellen in den Brutschrank. Diese Zellen mussten am Ende des Versuches unverzüglich ausgezählt werden, da keine Fixierung durchgeführt wurde. Zusätzlich konnte die Inkubationszeit genutzt werden, um Hämatoxylin zu filtern. Die Filter wurden dann zweimal auf der Seite liegend in VE-Wasser gewaschen und für 10 min mit dem gefilterten Hämatoxylin gefärbt. Im Anschluss an die Färbung wurden die Filter für weitere 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut (erst durch Oxidation entwickelt Hämatoxylin seine färbende Eigenschaft; da es dann als Hämatein vorliegt). Dabei war es förderlich, nach ca. 2 min die Filter leicht zu schwenken, um das vollständige Auswaschen der Färbung zu unterstützen. Nach diesem Waschschrift wurden die Filter in Gefäße mit VE-Wasser (vollentsalzt) gelegt und mittels eines Wattestäbchens von Zellen auf der Oberseite des Filters befreit (nur Zellen auf Unterseite des Filters sind von Interesse). Die Filter wurden dann ein letztes Mal in VE-Wasser gewaschen, bevor sie in zwischendurch gereinigte 6-Well-Platten mit je 2 ml PBS⁺ pro Vertiefung gehängt wurden. Als letzter Schritt wurden die Filter auch von oben mit je 2 ml PBS⁺ überschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Die nach diesem Prozedere fixierten und gefärbten Zellfilter waren nun für mehrere Wochen bei 4 °C haltbar.

3.9.3 Scratch-Versuch

Mit dem Scratch-Versuch stand eine weitere Methode zur Untersuchung der chemotaktischen Aktivität zur Verfügung. Das Experiment wurde in Haus 25 B der Goethe-Universität in Frankfurt am Main im Labor von [REDACTED] durchgeführt.

Methoden

Tag 1 (Urologisches Forschungslabor):

Am Vortag des Versuches mussten die 96-Well-Imagelock-Platten mit Kollagen beschichtet werden. Dafür wurde Kollagen in PBS⁻ mit einer Konzentration von 400 µg/ml angesetzt und pro Vertiefung je 150 µl aufgetragen. Die so vorbereiteten Imagelock-Platten wurden dann entweder bei 4 °C über Nacht oder für eine Stunde im Inkubator eingelagert.

Tag 2 (Urologisches Forschungslabor):

Am folgenden Tag wurden die Zellen zunächst mit PBS⁻ gewaschen und anschließend mittels Accutase oder Trypsin/EDTA im Brutschrank bei 37 °C für 3–10 min, je nach Zelllinie abgelöst. Diese proteolytisch vom Untergrund abgelösten Zellen wurden anschließend in 5 ml Nährmedium aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Tube überführt. Die Zellsuspension wurde dann für 5 min bei 1050 rpm bei RT zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Nährmedium gelöst. Die Zellen wurden wie im Abschnitt „3.2 MTT-Test“ beschrieben ausgezählt und entsprechend der Inkubationszeit so eingestellt, dass am Versuchstag ein konfluenten Zellrasen vorlag. Zum Beispiel: Parentale PC3 wurden mit 5.000 Zellen pro 300 µl Nährmedium ohne und mit 5 µg/ml sE-Cadherin bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden eingestellt. Die eingestellten Zellsuspensionen wurden dann auf spezielle 96-Well-Imagelock-Platten im Triplett-Ansatz ausgesät und für die Inkubationszeit von 72 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit gelagert.

Tag 3 (Forschungslabor von XXXXXXXXXX):

Zu Beginn musste eine spezielle Reinigungslösung vorbereitet werden, um den Wound Maker im Anschluss an das „Scratchen“ reinigen zu können. Der Wound Maker ist eine Konstruktion aus einem Ober- und Unterteil. In dem Unterteil wird die Imagelock-Platte eingelegt und fixiert. Das Oberteil hat 96 Stifte, die so positioniert sind, dass sie genau in die 96 Vertiefungen der Imagelock-Platte passen. Die mit Zellen bewachsenen Imagelock-Platten mussten zunächst auf das Vorhandensein eines konfluenten Zellrasens überprüft werden. Wenn dies positiv festgestellt werden konnte, musste die Imagelock-Platte in den unteren Teil des Wound Makers eingesetzt werden. Durch Betätigen eines Knopfes wurden das Ober- und Unterteil des Wound Makers gegeneinander verschoben. Dadurch fügten die Stifte dem Zellrasen in den Vertiefungen einen Kratzer (Scratch) zu. Die Imagelock-Platte musste dann

Methoden

aus dem Wound Maker entnommen werden, um am Durchlichtmikroskop den Erfolg des Scratchens kontrollieren zu können. Im gewünschten Fall wurden die Zellen mit einer klar abgrenzenden Kante in einem gleichmäßigen Korridor weggekratzt. Wurde der Scratch jedoch nur unsauber oder unvollständig ausgeführt, konnte die Imagelock-Platte erneut in den Wound Maker eingesetzt werden. Allerdings wurde die Platte dann um 180 Grad gedreht eingesetzt. Nachdem ein weiterer Scratch ausgeführt wurde, musste die Imagelock-Platte erneut unter dem Mikroskop kontrolliert werden. War der Scratch nun wie gewünscht, konnten die Vertiefungen mit Nährmedium gewaschen werden, um die abgekratzten Zellen zu entfernen. Dadurch sollte ein erneutes Absetzen der abgelösten Zellen im Scratch-Korridor vermieden werden. Anschließend wurden die Vertiefungen mit Nährmedium ohne und mit entsprechender sE-Cadherin-Behandlung aufgefüllt. Die so bearbeiteten Imagelock-Platten konnten dann in das Incucyte-Messgerät gestellt werden. Bis zu diesem Zeitpunkt hätte auch eine gewöhnliche 96-Well-Platte verwendet werden können. Jedoch benötigt das Messgerät Incucyte einen Orientierungspunkt für die eingebaute Kamera. Aus diesem Grund befindet sich auf dem Boden der Vertiefungen der Imagelock-Platte eine Art Fadenkreuz. Mithilfe dieser Linien kann die Kamera zu jedem Zeitpunkt auf exakt dieselbe Position zurückgestellt werden. Bei dem Messgerät Incucyte handelt es sich um ein Gerät mit einem automatisch geführten Kamerasystem, das in einem Inkubator aufgestellt ist. Dadurch können die Zellen weiterhin bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wachsen. Das Incucyte kann dann, je nach gewünschter Einstellung, zum Beispiel alle zwei Stunden Bilder von den einzelnen Scratches in den Vertiefungen erstellen. Dadurch ist es möglich, über einen Zeitraum von 24 oder mehr Stunden in regelmäßigen Abständen das Wachstum der Zellen zu dokumentieren, um den Zeitpunkt des vollständigen Verschließens des Scratches zu bestimmen.

3.10 Western Blot

Analyse der zellzyklusregulierenden Proteine und Oberflächenproteine (Integrine)

Die zellzyklusregulierenden Proteine werden über verschiedene Signalsysteme in der Zelle an- oder abgeschaltet. In diesem Experiment wurde untersucht, inwieweit sE-Cadherin auf verschiedene Signalwege einwirkt. Das Tumorstadium wird über die periodische Aktivierung bzw. Deaktivierung zellzyklusregulierender Proteine gesteuert. Mittels der auf den Zellzyklus fokussierten Western Blot-Experimente sollte ein Expressionsprofil der Zyklusproteine (Cyclin

Methoden

A, Cyclin B) sowie der CDK („cyclin dependent kinase“)-Familie (CDK1, CDK2) erstellt werden. Das Western Blot-Experiment sollte darüber Auskunft geben, in welchem Maße die physiologische Balance zwischen wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Stimuli in der Tumorzelle durch die Behandlung mit sE-Cadherin beeinflusst oder wieder hergestellt werden könnte und an welchen Schnittstellen die Therapie ansetzen müsste. Bei der Analyse intrazellulärer Signalproteine wurden auch phosphorylierte Formen der Kinasen berücksichtigt, um Aufschluss über die Aktivität des jeweiligen Proteins zu erhalten.

3.10.1 Proteinisolation aus Prostatakarzinom-Zellen

Zu Beginn des Experiments mussten die Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden mit 5 µg/ml sE-Cadherin in Nährmedium in Zellkulturflaschen inkubiert werden. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Zellen wie im Abschnitt „3.2 MTT-Test“ abgelöst. Da man bei der Proteinisolation einen Vorrat herstellen und diesen wieder einfrieren kann, wurden 75 cm² Kulturflaschen verwendet. Dadurch war für mehrere Versuchsdurchgänge ausreichend Material sichergestellt. Daher konnten fehlgeschlagene Westen-Blot-Versuche wiederholt werden. Ein positives Ergebnis wurde nicht wiederholt, da es sich dann lediglich um ein technisches Replikat handeln würde und somit statistisch nicht verwendet werden kann.

Die konfluenten Zellen wurden zunächst mit PBS⁻ (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und mit 3 ml Accutase oder Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden dann mit 7 ml PBS⁻ aufgefüllt und die gesamten 10 ml Zellsuspension in ein 15 ml Falcon Tube überführt und für 5 min bei 4 °C und 1.050 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit einer 200 µl Pipette sorgfältig von restlicher Flüssigkeit befreit. Nach diesem Schritt wurde das Zellpellet vorsichtig in 500 µl Lysispuffer (1,5 ml + 7,5 µl PMSF; immer erst kurz vor Verwendung des Puffers hinzufügen) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf Eis in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und mit einer 1 ml Insulinspritze 5–10 mal resuspendiert, um mithilfe der Scherkräfte der feinen Spritze möglichst jede Zelle aufzubrechen. Nach sorgfältigem Resuspendieren wurde die Zellsuspension bei 4 °C für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren befanden sich alle Zelltrümmer als solides Pellet am Boden des Eppendorf-Gefäßes. Ein geringerer Anteil der Zelltrümmer bildete eine Art Teppich an der Oberfläche des Überstandes. Die Proteine befanden sich gelöst im Überstand und konnten mit einer Pipette

Methoden

abgesaugt und in ein neues Kryotube überführt werden. Jeweils 3 µl der Proteinlösung wurden zur späteren Konzentrationsbestimmung in getrenntes PCR Eppendorf-Gefäß (0,2 ml) überführt. Die Proteine konnten nun entweder sofort in einem Versuch verwendet oder für einen späteren Zeitpunkt bei –80 °C eingelagert werden.

Zusammensetzung des Lysispuffers (100 ml):

- 75 ml Aqua_{dest}
- 790 mg Tris
- 900 mg NaCl
- 10 ml 10%ige Tergitollösung
- 2,5 ml 10%ige Na-deoxycholatelösung
- 1 ml EDTA [0,1 M]
- Mit Aqua_{dest} auf 92,2 ml auffüllen und dann zufügen:
 - 100 µl Aprotinin [1 mg/ml] (in H₂O_{dest} gelöst)
 - 100 µl Leupeptin [1 mg/ml] (in H₂O_{dest} gelöst)
 - 100 µl Pepstatin [1 mg/ml] (in Methanol gelöst)
 - 500 µl NaF [0,2 M] (in H₂O_{dest} gelöst)
 - 500 µl Na₃VO₄ [0,2 M] (in H₂O_{dest} gelöst)
 - 500 µl PMSF [0,2 M] (in Isopropanol gelöst)

3.10.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Zur Bestimmung der Proteine mussten die bei Proteinisolation erstellten PCR Eppendorf-Gefäße, falls diese zunächst eingelagert wurden, aufgetaut werden. Die darin enthaltenen 3 µl wurden in 27 µl Aqua_{dest} resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl der Proteinlösung in drei Vertiefungen der 96-Well-Platte (Dreifachansatz) pipettiert. Zusätzlich wurde in drei weiteren Vertiefungen parallel zu den Messproben Aqua_{dest} pipettiert und als Blank (Leerprobe) genutzt. In jede Vertiefung (Blank und Messproben) wurden anschließend 300 µl Coomassie-Brilliant Blue gegeben und die 96-Well-Platte im Dunkeln für 10 min bei RT auf den Schwenktisch gestellt. Nach der Inkubationszeit konnte die 96-Well-Platte am Tecan (ELISA) gemessen und das Ergebnis mit im Vorfeld gespeicherten Standardkurven verrechnet werden.

Methoden

Die Eichkurve bestand aus Proben unterschiedlicher Konzentration Albumins aus Rinderserum (BSA), wovon per Computersoftware die jeweilige Proteinkonzentration errechnet wurde.

Um bei der Auswertung vergleichbare Werte zu erhalten, musste zu Beginn des Versuches in jede Tasche die identische Menge an Proteinen aufgetragen werden. Pro Tasche sollten 50 µg Protein aufgetragen werden. Die Formel zur Berechnung lautet wie folgt:

$$50 / (\text{Mittelwert der Tecan (ELISA) Messung} / 1000)$$

Bsp.: Mittelwert = 1069 → 50 / 1,069 entspricht 50 µg Protein

Die berechnete Probenmenge musste im Anschluss 1:1 mit Laemmli (950 µl Laemmli + 50 µl β-Mercaptoethanol) verdünnt und 5 min bei 95 °C auf dem Heizblock denaturiert werden.

3.10.3 Auftrennung der Proteine

Die Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der „BIORAD Mini Protein II“-Apparatur aufgetrennt. Die prozentuale Dichte der Gele musste dabei je nach Molekulargewicht der Proteine gewählt und hergestellt werden. Die Gele bestanden immer aus einem 4%igen Sammelgel und einem Trenngel, das zwischen 7 und 15 % Dichte (siehe Tabelle 11, nach Laemmli) lag. In den folgenden Tabellen 11 und 12 sind die verschiedenen Zusammensetzungen des Sammel- und Trenngels aufgelistet.

Sammelgel:

Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammelgels für die Gelelektrophorese im Western Blot

Lösungen	4 %
Aqua dest.	5,4 ml
10 % SDS	100 µl
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid A	1,3 ml
Bisacryl B	0,6 ml
10 % APDS	100 µl
TEMED	20 µl

Sammelgelpuffer: 68,1 g Tris in 500 ml Aqua dest. pH auf 6,8 einstellen.

Methoden

Trenngel:

Tabelle 12: Zusammensetzungen der Trenngelge für die Gelelektrophorese im Western Blot

Lösungen	7 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Aqua dest.	3,9 ml	3,5 ml	2,6 ml	1,75 ml	150 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Trenngelpuffer	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	4,85 ml
Bisacryl B	1,1 ml	1,2 ml	1,6 ml	1,8 ml	2,25 ml
10 % APDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
kDa	30-100	20-80	15-60	10-50	5-30

Trenngelpuffer: 68,1 g Tris in 500 ml Aqua dest. pH auf 8,8 einstellen.

Nachdem die benötigten Gelkammern aufgebaut waren, wurden diese zunächst mit ca. 7 ml Trenngel befüllt. Hier war es wichtig, dass APDS und TEMED erst kurz vor dem Einfüllen zu der Trenngel Lösung zugefügt wurden, da diese die Polymerisation der Gele starteten. Sofort nach dem Einfüllen des Trenngels wurde dieses mit 100–200 µl Isopropanol überschichtet. Dadurch konnten Luftblasen entfernt sowie die Oberfläche geebnet und gegen die Umgebungsluft abgeschlossen werden. Nach ca. 20 min konnte das noch nicht verdunstete Isopropanol verworfen und die Oberfläche der Trenngelge mit Aqua_{dest} gewaschen werden. Hiernach war es sehr wichtig möglichst alle Wasser-Isopropanol-Reste mit Filterpapier sorgfältig zu entfernen, da diese sonst zu einer Trennschicht zwischen Sammel- und Trenngel hätten führen können, die den Gellauf gestört hätten. Nun wurde das Sammelgel mit APDS und TEMED versetzt und auf das Trenngel aufgetragen, bis dieses an der Oberkante fast überlief. Während das Sammelgel noch flüssig war, mussten die Kämme hineingesteckt werden, um die Form für die späteren Taschen auszubilden. Bei diesem Schritt war es wichtig, Luftblasen zwischen Kamm und Gel zu vermeiden. Das Sammelgel erhielt nun ebenfalls 20 min Polymerisationszeit. Sollte das Experiment nicht am selben Tag weitergeführt werden, so konnten die Gele in mit Aqua_{dest} befeuchtete Windeltücher eingeschlagen und bei 4 °C gelagert werden. Ein solches Einlagern war für maximal eine Woche möglich. Sollte das Experiment hingegen direkt gestartet werden, so wurden nach Ablauf der 20 min die Kämme aus dem Sammelgel entfernt und die Taschen mit Aqua_{dest} ausgespült. Anschließend musste man die Elektrophorese

Methoden

Apparatur mit 1 x Elphopuffer (siehe Tabelle 13) auffüllen und die mit Gelen beladenen Glasplatten darin befestigen. Um im Anschluss an den Versuch eine Referenz mit bekannten Größen zu besitzen, wurde ein Marker (peqGold Protein Marker IV) mit bekannten Bandengrößen in Tasche 1 (ganz links auf dem Gel) aufgetragen. Rechts davon wurden dann pro Tasche 50 µg Protein aufgetragen, das im Vorfeld bereits denaturiert wurde. Zu Beginn der Elektrophorese war eine Spannung von 80 V (Power-Pac 300 Power Supply) angelegt, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Mit dem Übergang von Sammel- zu Trenngel musste eine Spannung von 120 V angelegt werden. Während des Durchlaufens des Gels wurden die Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt. Am Ende konnte das Gel aus der Elektrophoresekammer entfernt und die Glasplatten abgenommen werden, um das Gel im Western Blot weiter zu bearbeiten.

3.10.4 Western Blot

Beim Blotting sollten die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen (NZM) überführt werden. Als erstes wurden alle benötigten NZM, Filterpapiere und Schwämme in 1 x Transferpuffer (siehe Tabelle 11) eingelegt, damit diese sich vollständig vollsaugen konnten (ca. 10 min). Die erste Schicht bildete ein Schwamm, auf den zwei Lagen Filterpapier und anschließend das SDS-Gel gelegt wurden. Auf das SDS-Gel folgte dann eine NZM, die mit einer befeuchteten 10 ml Pipettenspitze abgerollt wurde, um Luftblasen zwischen SDS-Gel und Membran zu entfernen. Bei Luftblasen würde kein Strom fließen, wodurch eine Übertragung von eventuell vorhandenen Proteinen an dieser Stelle nicht möglich wäre. Auf die Membran folgten wieder zwei Lagen Filterpapier und ein Schwamm. Das so präparierte „Gel-Sandwich“ wurde dann zusammen mit einem Kühlakku in die Proteintransferapparatur eingespannt. Nun konnte die Kammer, in der das „Gel-Sandwich“ und der Kühlakku hingen, mit 1 x Transferpuffer aufgefüllt werden. Der Blottingprozess benötigte genau 1 Stunde mit einer angelegten Spannung von 100 V (PowerPac 300 Power Supply). Nach dieser Stunde waren alle Proteine und der Marker auf die NZM übertragen und konnten weiterführend durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern detektiert und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

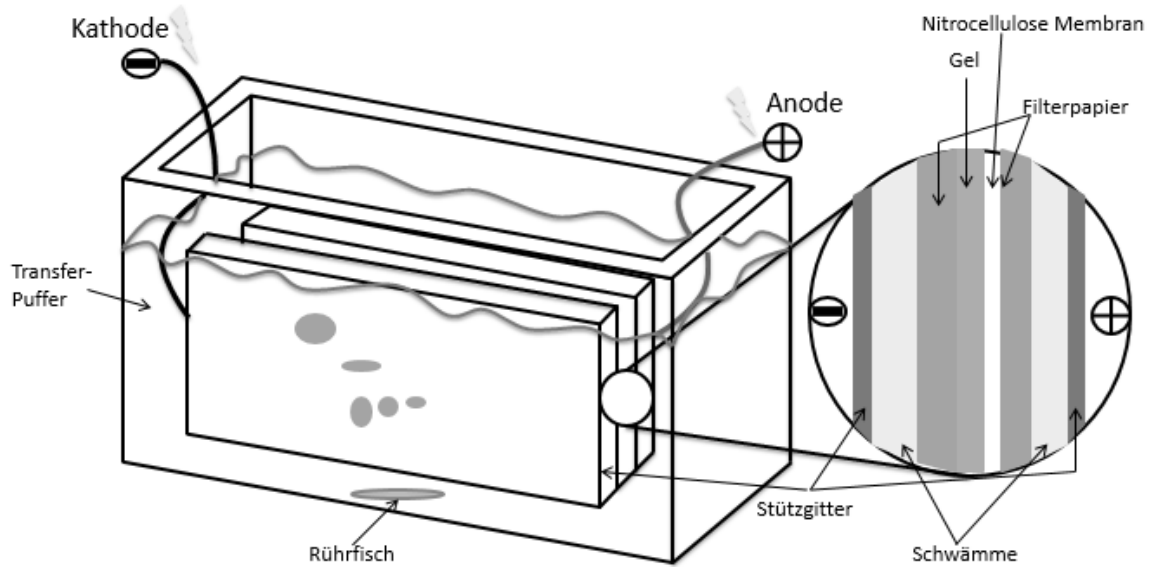


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Western Blot-Kammer. Quelle: PowerPoint-Grafik aus der Bachelorarbeit: „Biochemische und Histologische Untersuchung des aus der Familie des Karpfenfisches stammenden Glühköpfchens (*Sabwa resplendens*)“ von Sebastian Maxeiner (Eigene Bachelorarbeit).

3.10.5 Immunfärbung und Chemilumineszenz

Nach Abschluss des Blotens wurden die NZM aus den „Gel-Sandwichen“ entnommen und an einer Ecke beschriftet, bevor sie für 2 min vorsichtig in 1 x Towbinpuffer (siehe Tab. 13) gewaschen wurden. Anschließend musste der Towbinpuffer durch eine Blockierlösung (siehe Tab. 13) ersetzt werden, die auf dem Schwenktisch für mindestens eine Stunde inkubiert. Währenddessen konnte der benötigte Primärantikörper (siehe Tab. 14–15) vorbereitet und nach Vollendung der Stunde auf Blockierpuffer auf die NZM aufgetragen werden. Die Membranen konnten dann über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden, um den Versuch am nächsten Tag fortzusetzen, oder bei RT für eine Stunde, um direkt fortzufahren. Als nächstes mussten die NZM dreimal für je 15 min mit Blotpuffer (siehe Tab.13) gewaschen werden, um diese anschließend für 30 min mit dem Sekundärantikörper (siehe Tab.16) auf dem Schwenktisch zu inkubieren. Die Membranen wurden dann erneut dreimal für je 15 min mit Blotpuffer gewaschen und einmal für 5 min mit Aqua_{dest.} Während der einzelnen Waschschrte wurde eine Chemilumineszenz-Lösung (ECL-Lösung) aus 1:1 Detectionreagent 1 und 2 hergestellt. Die ECL-Lösung hatte dadurch Zeit, RT anzunehmen, bevor jeweils 1 ml gleichmäßig auf jeder NZM verteilt wurde. Nach einer Minute Inkubation mussten die Membranen mit einer Pipette aus der Lösung genommen und abgetropft werden, bevor diese

Methoden

in vorbereitete Plastikhüllen gelegt wurden, um sie im Fusion FX7 (PeqLab Biotechnology GmbH) zu entwickeln. Die Entwicklungszeit lag zwischen 3 bis 30 min je nach Antikörper.

Tabelle 13: Zusammensetzungen der Pufferlösungen für Western Blot : Zellyse, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Blotten, Immunfärbung und Stripping

Antikörperpuffer			
90 ml	Blotpuffer		
10 ml	5 g BSA in 100 ml Blot-Puffer		
Blotpuffer		Blockierlösung	
100 ml	10x Towbinpuffer	100 ml	1 x Towbinpuffer
5 ml	Tween 20	10 g	Magermilchpulver
895 ml	destilliertes Wasser		
10 x Elphopuffer (pH 8,3)		1 x Elphopuffer (Laufpuffer)	
30,3 g	Tris	100 ml	10 x Elphopuffer
144,0 g	Glycin	900 ml	destilliertes Wasser
10,0 g	SDS		
1 l	destilliertes Wasser		
10 x Transferpuffer		1 x Transferpuffer	
30,3 g	Tris	100 ml	10 x Transfer-Puffer
144,0 g	Glycin	200 ml	Methanol
1 l	destilliertes Wasser	700 ml	destilliertes Wasser
10 x Towbinpuffer		1 x Towbinpuffer	
12,1 g	Tris	100 ml	10 x Towbinpuffer
90,0 g	NaCl	900 ml	destilliertes Wasser
1 l	destilliertes Wasser		

Tabelle 14: Auflistung Teil 1 aller verwendeten Primärantikörper im Western Blot -Experiment mit Klon, Herkunfts- und Verdünnungsangaben. Verdünnungsbeispiel: p-Rictor: 9 ml Blotpuffer + 1 ml Antikörperpuffer + 10 µl p-Rictor

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verdünnung
β -Aktin (Maus Ig1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
Cdk1/ cdc2 (Maus IgG1)	1/ Cdk1/ Cdc2	34	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Purified Mouse Anti-CDK1 (pY15) (Maus IgG1)	44/ Cdk1/ Cdc2 (pY15)	34	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cdk2 (Maus IgG2a)	55/ Cdk2	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500

Methoden

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verdünnung
Phospho-Cdk2 (Thy160)		33	Cell Signaling Technologies	1:1.000
Cyclin A (Maus IgG1)	25/ Cyclin A	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin B (Maus IgG1)	18/ Cyclin B	62	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
p19 (Maus IgG1)	52/ p19	19	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
P27 (Maus IgG1)	57	27	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
Histon H3 (Kaninchen IgG)	Y173	17	Cell Signaling Technologies	1:250
Acetyl-Histon H3 (Kaninchen IgG)	Y28	17	Cell Signaling Technologies	1:250
Histon H4 (Kaninchen IgG)	N/A	14	Cell Signaling Technologies	1:250
Acetyl-Histon H4 (Lys8, Kaninchen IgG)	N/A	10	Cell Signaling Technologies	1:250
Phospho-Akt (Maus IgG1)	104A282	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
Phospho-Rictor (Kaninchen IgG)	N/A	200	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Phospho-Raptor (Kaninchen IgG)	N/A	140	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
pFAK (Maus IgG)	18	125	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000

Methoden

Tabelle 15: Auflistung Teil 2 aller verwendeten Primärantikörper im Western Blot mit Klon, Herkunfts- und Verdünnungsangaben. Beispiel: Integrin alpha1: 9 ml Blotpuffer + 1 ml Antikörperpuffer + 50 µl Integrin alpha1

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verdünnung
Integrin α1 (VLA-1, Kaninchen)	N/A	200	Cell Signaling Technologies	1:200
Integrin α2 (VLA-2, Maus)	2	150	Chemicon/Millipore GmbH (Schwalbach)	1:250
Integrin α3 (VLA-3alpha, Kaninchen)	N/A	135	Chemicon/Millipore GmbH (Schwalbach)	1:500
Integrin α4 (Ziege)	C-20	150	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:200
Integrin α5 (Maus IgG2a)	1	150	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
Integrin α6 (Kaninchen)	H-87	150	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:200
Integrin β1 (Maus IgG1)	18	130	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Integrin β3 (Maus IgG1)	1	104	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Integrin β4 (Maus IgG1)	7	150	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250

Methoden

Tabelle 16: Auflistung aller verwendeten Sekundärantikörper im Western Blot-Experiment mit Klon, Herkunfts- und Verdünnungsangaben.

Sekundärantikörper	Herkunft	Verdünnung
Ziege-Anti-Maus HRP	Upstate Bio-technology (USA)	1:5.000
Ziege-Anti-Kaninchen HRP	Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000
Rind-Anti-Ziege HRP	Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000

3.10.6 Stripping

In den Western Blot-Experimenten wurden die NZM immer für zwei Entwicklungen verwendet. Die Erste war die Detektion der gesuchten Proteine. Der zweite Durchgang wurde zum Nachweis von β -Aktin verwendet. β -Aktin, auch als Ladungskontrolle bezeichnet, diente der Überprüfung der aufgetragenen Proteinmengen und der Feststellung, ob diese gleich groß waren. Als erstes mussten die eingesetzten Antikörper von den NZM entfernt werden. Dafür wurden die Membranen dreimal für je 10 min mit 1 x Towbinpuffer (siehe Tab.13) gewaschen und anschließend für 30 min mit je 10 ml 1 x Antibody Stripping Solution (1 ml 10 x Stripping Solution + 9 ml Aqua_{dest.}) überschichtet. Im Anschluss mussten die NZM wieder dreimal für je 10 min in 1 x Towbinpuffer gewaschen und für mindestens eine Stunde mit Blockierlösung (siehe Tab.11) blockiert werden. Ab diesem Punkt wurde nach demselben Prozedere wie ab dem Abschnitt „3.10.5 Immunfärbung und Chemilumineszenz“ vorgegangen.

3.11 Durchflusszytometer (FACS)

3.11.1 Integrine

Der Kontakt von Tumorzellen an Endothel bzw. an die extrazelluläre Matrix wird über Adhäsionsrezeptoren vermittelt, die membranständig auf den Zellen exprimiert werden und mit einem passenden Liganden interagieren. Zahlreiche Studien unserer Arbeitsgruppe belegen, dass verschiedene Integrine unmittelbar am Prozess der Tumormigration beteiligt sind [72, 73].

Konsequenterweise musste untersucht werden, in welchem Maße Integrin-Rezeptoren durch 1) eine sE-Cadherin-Behandlung und 2) im Rahmen einer Resistenzentstehung (durch Taxane) bzw. möglichen Aufhebung (durch sE-Cadherin) verändert werden. Die Rezeptoranalysen beinhalteten dabei auch solche Signalsysteme in der Zelle, die für die Aktivierung der Integrine verantwortlich sind. Es wurden deutliche Expressionsveränderungen unter chronischer Therapie mit Taxanen erwartet. Gleichzeitig war davon auszugehen, dass sE-Cadherin den veränderten Rezeptorstatus in resistenten Tumoren beeinflussen könnte.

Die Zellen mussten für diesen Versuch wie im MTT-Test abgelöst und zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet auf Eis in 2 ml FACS-Puffer (PBS⁻ + 0,5 % BSA) resuspendiert. Die Zelllösung wurde dann erneut für 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert, nur mit dem Unterschied, dass die Zentrifuge nun auf 4 °C vorgekühlt wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in dem benötigten Volumen FACS-Puffer resuspendiert. Pro Messprobe wurde 1 ml Zelllösung benötigt. Auf Eis wurde je 1 ml der Zellsuspension in FACS-Röhrchen verteilt und zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen und das Zellpellet mit einer 200 µl Pipette von Restflüssigkeit befreit werden. Nun wurden die Primärantikörper (siehe Tab. 17) zum Zellpellet pipettiert und vorsichtig resuspendiert, bevor sie dann für 60 min auf Eis inkubierten. Im Anschluss daran wurden die Zellpellets zweimal mit je 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Das gewaschene Zellpellet wurde dann in 250–500 µl FACS-Puffer je nach Größe des Pellets aufgenommen und resuspendiert. Das aufgearbeitete Zellpellet konnte dann im Durchflusszytometer gemessen werden. Da die Integrin Antikörper bereits mit Phycoerythrin (PE) gekoppelt waren, wurde kein Sekundärantikörper benötigt. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden als Kontrollen Proben nur mit den entsprechenden Isotypen (siehe Tab. 17) inkubiert.

Methoden

Tabelle 17: Durchflusszytometrie: Integrinsubtypen. Primärantikörper sowie Isotypen.

Primärantikörper	Klon	Herkunft	Verdünnung	Menge
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
CD49e-PE (Integrin alpha5, Maus IgG1)	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
CD104 R-PE (Integrin beta4, Ratte IgG2b)	439-9B	Becton Dickinson (Heidelberg)	Gebrauchsfertig	20 µl
Isotypen	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

3.11.2 Wachstumsfaktoren

Bei Wachstumsfaktoren handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die für die Proliferation von den Zellen benötigt wird. Da es sich dabei um Genprodukte von Protoonkogenen handelt, besteht ein Risiko einer Veränderung durch Mutation hin zu Onkogenen. Diese können eine unkontrollierte Teilung der Zellen induzieren. Aus diesem Grund werden Wachstumsfaktoren in direkten Bezug mit der Entstehung von Krebs gesetzt. Eine Überexpression von Rezeptoren oder Wachstumsfaktoren kann einen erhöhten Proliferationsstimulus bedingen [74]. Dieses Wissen wird sich in der Klinik bereits zu Nutze gemacht und Medikamente wie z. B. Tyrosinkinase-Inhibitoren bei der Behandlung von CML (Form der Leukämie) genutzt. Nach aktuellem Kenntnisstand wird durch sE-Cadherin eine Vielzahl von Signalwegen beeinflusst, wobei die Aktivierung der Epidermal-Growth-Factor-Familie (EGF) einen besonderen Stellenwert einnimmt [75].

Untersucht wurden die Wachstumsfaktoren:

- EGF: Epidermal growth factor
- pEGF: Phosphorylated Epidermal growth factor

Die Durchführung war für die Wachstumsfaktoren im FACS vergleichbar zu dem Vorgehen bei den Integrinen. Abgesehen von den anderen Antikörpern für die 60-minütige Inkubation, wurden alle Schritte nach demselben Protokoll durchgeführt.

3.12 Konfokale Mikroskopie

Die Durchführung fand im urologischen Forschungslabor an der Goethe-Universität und dem Frankfurt Center for Advanced Microscopy (FCAM) unter der Anleitung von XXXXXXXXXX statt. Verwendet wurde das Mikroskop LSM780 der Firma Zeiss.

Tag 1:

Wie bereits im Abschnitt „3.2 MTT-Test“ beschrieben, wurden die Zellen aus den Kulturflaschen abgelöst auf eine bestimmte Zellzahl pro Milliliter eingestellt. Da die Zellen zunächst für 72 Stunden mit 5 µg sE-Cadherin pro Milliliter Nährmedium inkubiert werden mussten wurde die Zellzahl für PC3 und DU145 auf 10.000 Zellen/ml eingestellt. Da LNCaP

Methoden

deutlich langsamer wachsen, mussten diese auf 50.000 Zellen pro Milliliter eingestellt werden. Die eingestellte Zellmenge wurde anschließend auf CultureSlides der Firma Falcon aufgetragen. Dabei handelt es sich um Objektträger mit einem 8-Kammer-Aufsatz auf der Oberseite des Objektträgers. In diese Kammern konnte die Zellsuspension pipettiert werden und die Zellen adhärten direkt auf dem Objektträger.

Tag 2:

Im Anschluss an die 72 Stunden Inkubationszeit konnten die Zellen fixiert werden. Dazu musste zunächst das Nährmedium mit und ohne sE-Cadherin verworfen werden. Die Zellen wurden zweimal mit PBS⁺ gewaschen, um die abgekratzten Zellen zu entfernen und anschließend mit einem 60 zu 40 Gemisch aus Methanol und Aceton für 10 min inkubiert. Durch dieses Gemisch wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen für eine Stunde mit den Primärantikörpern inkubiert. Da einige Antikörper nicht mit zum Beispiel Alexa488 markiert erhältlich waren, musste in diesen Fällen ein weiterer Inkubationsschritt folgen. Dazu wurden Zellen zunächst einmal mit PBS⁺ gewaschen, bevor ein sekundärer Antikörper mit einer gewünschten Markierung hinzugefügt werden konnte. Die Zellen wurden mit diesem Antikörper für weitere 30 min inkubiert, bevor ein weiterer Waschschriff mit PBS⁺ folgte. Um die Objektträger für das Konfokalmikroskop vorzubereiten, musste zunächst der Kammeraufbau entfernt werden. Dafür wurde ein Plastikkeil zwischen das Kammer-system und den Objektträger geschoben. Nachdem es entfernt und der Objektträger von Kleberückständen gereinigt war, konnten 1–2 Tropfen Mounting Medium auf den Objektträger gegeben und ein Deckglas aufgelegt werden. Das Mounting Medium benötigte etwa zwei Stunden um lichtgeschützt und bei RT zu trocknen und auszuhärten. Im Anschluss konnten die Objektträger direkt im Konfokalmikroskop untersucht oder für einen späteren Zeitpunkt bei 4 °C eingelagert werden. Allerdings muss an dieser Stelle mit Nachdruck auf eine zeitnahe Bearbeitung hingewiesen werden, da die Fluoreszenz der Antikörper mit voranschreitender Zeit deutlich schwächer wurde. Für die Färbung des Zellkerns wurde DAPI verwendet, das auch nach zwei Wochen ein kräftiges Signal lieferte. Andere Färbungen wie zum Beispiel Alexa488 verloren nach etwa einer Woche bereits signifikant an Intensität und lieferten nur noch eine unzureichende Qualität.

Zur Auswertung wurde von Zeiss das Laserscanmikroskop LSM780 mit der Software „Zen“ verwendet.

3.13 Blockadestudie

Im Rahmen der Blockadestudie sollte untersucht werden, in welchem Maße die Blockade einzelner Integrine Einfluss auf die Zellzahl, Adhäsionsverhalten und Chemotaxis der Tumorzellen hat.

3.13.1 MTT-Test

Im ersten Schritt wurden die Zellen mittels blockierender Antikörper im MTT-Test auf deren Bedeutung für das Wachstumsverhalten untersucht.

Hierfür wurden die Zellen wie im Abschnitt „3.2 MTT-Test“ beschrieben abgelöst und in 1 ml Nährmedium aufgenommen. Anschließend wurden jeweils 10 µl pro Milliliter Nährmedium des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt und für 1 Stunde auf der Rotationsplatte bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Rotationsplatte sollte ein Absetzen der Zellen vermeiden, wodurch nur die obersten Zellen mit Antikörper in Kontakt gekommen wären. Ab diesem Schritt wurde wie unter Abschnitt „3.2 MTT-Test“ beschrieben fortgefahren.

3.13.2 Adhäsion an Kollagen und Chemotaxis

Um zu untersuchen welchen Einfluss die Blockade bestimmter Proteine auf das Adhäsions- und Chemotaxis-Verhalten der Tumorzellen hat, wurden diese zunächst wie im Abschnitt „3.2 MTT-Test“ abgelöst und in 1 ml Nährmedium aufgenommen. Auf die Zellen konnten dann die entsprechenden Antikörper mit je 10 µl pro Milliliter Nährmedium aufgetragen und für 1 Stunde auf der Rotationsplatte bei 37 °C im Brutschrank inkubiert werden. Die Rotationsplatte sollte ein Absetzen der Zellen vermeiden, wodurch nur die obersten Zellen mit Antikörper in Kontakt gekommen wären.

Ab diesem Schritt konnte nach dem Verfahren wie in den einzelnen Abschnitten: „3.9.1 Adhäsion an EZM“ und „3.9.2 Chemotaxis“ fortgefahren werden. Die Adhäsion wurde auch in diesen Experimenten nach 30 min ausgezählt.

3.14 Statistik

Für die Daten der funktionellen Untersuchungen wurden die Mittelwerte +/- Standardabweichung berechnet. Sämtliche Versuche wurden 3–8 mal wiederholt. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte durch den „Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test“. Dieser Test erlaubt es, zwei unabhängige Datengruppen bei einer nicht normalverteilten Grundgesamtheit miteinander zu vergleichen. Da biologische Phänomene selten der Gaußschen Normalverteilung folgen, empfiehlt sich dieser nicht parametrische Test. Differenzen wurden dabei als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ war.

4. Ergebnisse

4.1 MTT-Test

Verifizierung der Resistenzinduktion

Bevor weiterführende Untersuchungen mit den Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP durchgeführt werden konnten, mussten mittels MTT-Versuch die verschiedenen Taxan bedingten Resistenzen verifiziert werden. Hierfür wurden die sensitiven und resistenten Prostatakarzinom-Zelllinien mit steigenden Taxan Konzentrationen behandelt. Die jeweilige Zelllinie ohne Taxan Behandlung wurde als Kontrolle verwendet. Ein weiterer Nutzen dieser Versuchsreihe war die Bestimmung des IC50 Wertes für die verschiedenen Taxane. Dadurch konnte die optimale Konzentration für die chronische Behandlung der Zelllinien bestimmt werden.

Docetaxel Resistenz in PC3 Zellen

Die eingesetzten Docetaxel Konzentrationen bewegten sich für die parentalen PC3 Zellen zwischen 0 und 20 ng/ml. Wie man Abbildung 14 entnehmen kann, wurde in den Docetaxel sensitiven PC3 Zellen durch Docetaxel bei 2,5 ng/ml eine 50%ige Reduktion des Wachstums erzielt. Bei einer Konzentration von 5 ng/ml war eine Reduktion der Zellzahl unter die Anzahl der zu Beginn ausgesäten Zellen zu beobachten. Für die Docetaxel resistenten PC3 Zellen zeichnete sich ein anderes Bild. In diesem Versuch wurden Konzentrationen von 0 bis 80 ng/ml Docetaxel verwendet. Wie man der Abbildung 14 entnehmen kann, kam es bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml zu keiner Reduktion der Zellzahl. Erst ab einer Konzentration von 10 ng/ml Docetaxel war eine moderate, aber signifikante Reduktion der Zellzahl zu beobachten. In den resistenten PC3 Zellen konnte sich in Gegenwart von 5 ng/ml Docetaxel die Zellzahl innerhalb von 72 Stunden von 5.000 auf fast 15.000 Zellen verdreifachen. Eine deutliche Abnahme der Zellzahl konnte erst ab einer Konzentration von 40 ng/ml beobachtet werden.

Ergebnisse

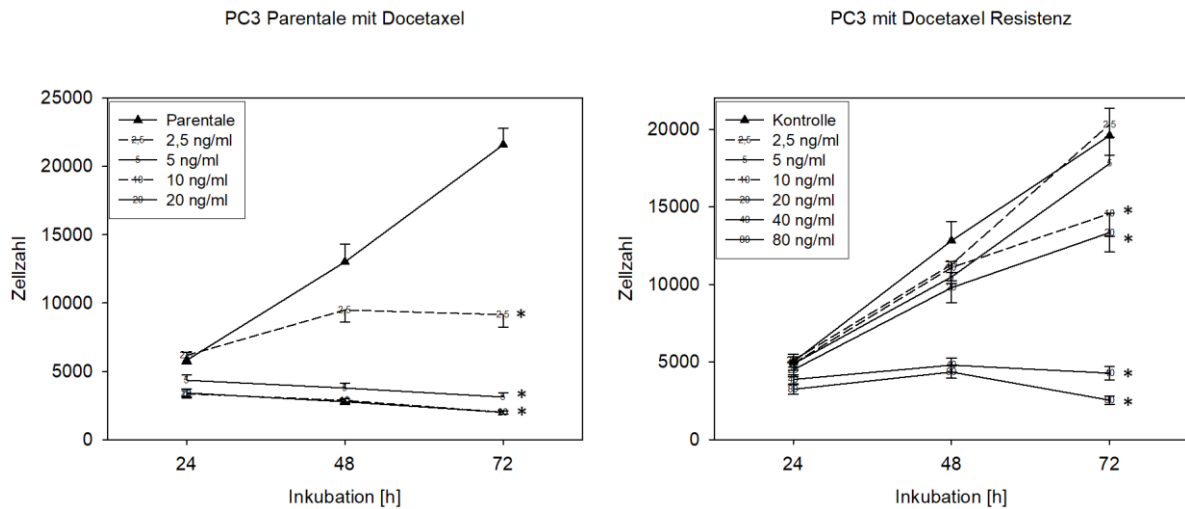


Abbildung 14: Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie PC3 + Docetaxel. Links: Parentale/ Docetaxel sensitive Zellen. Rechts: Docetaxel resistente PC3 Zellen. Die Abszisse zeigt die drei Messzeitpunkte und die Ordinate die absolute Zellzahl. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

Cabazitaxel Resistenz in DU145 Zellen

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse für die MTT-Versuche zu der Zelllinie DU145 zu sehen. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse für die Cabazitaxel sensitiven DU145 zu sehen. Verwendet wurden Konzentrationen von 0 ng/ml als Kontrolle bis zu 5 ng/ml Cabazitaxel. Die unbehandelte Probe konnte im Verlauf von 72 Stunden die Zellzahl etwa verdreifachen. Eine Behandlung mit 1,25 ng/ml Cabazitaxel führte zu einer signifikant reduzierten Zellzahl nach 72 Stunden, verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml Cabazitaxel reduzierte sich die Zellzahl unter den Ausgangswert. Bei den Cabazitaxel resistenten Zellen zeigte sich ein anderes Bild. Hier wurden Konzentrationen von 0 bis 10 ng/ml verwendet. Erst ab einer Konzentration von 5 ng/ml Cabazitaxel kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl nach 72 Stunden, verglichen zur unbehandelten Kontrolle.

Ergebnisse

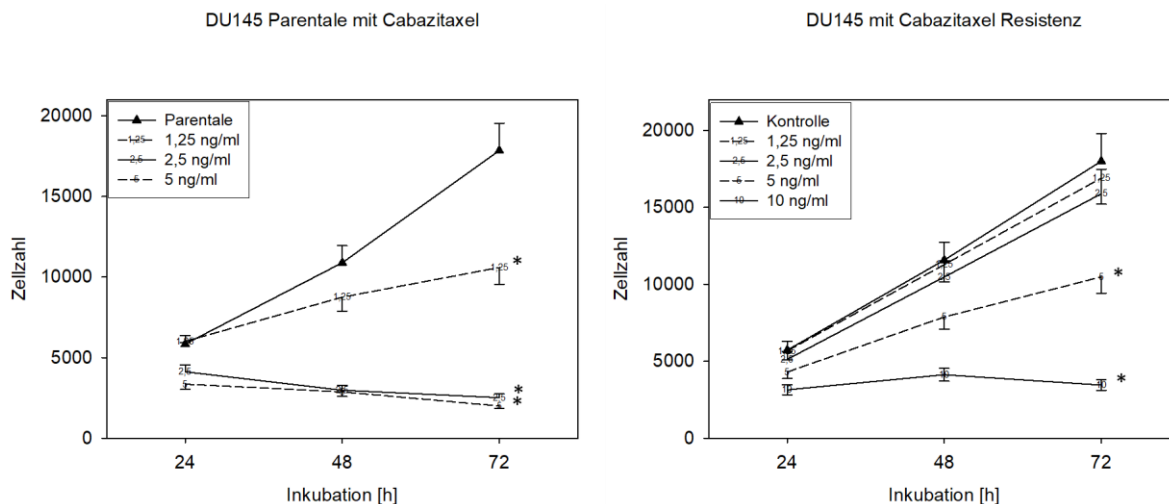


Abbildung 15: Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie DU145 + Cabazitaxel. Links: Parentale/ Cabazitaxel sensitive Zellen. Rechts: Cabazitaxel resistente DU145 Zellen. Die Abszisse zeigt die drei Messzeitpunkte und die Ordinate die absolute Zellzahl. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

Docetaxel Resistenz in DU145 Zellen

Abbildung 16 bildet die Ergebnisse für die Zelllinie DU145 unter Behandlung mit Docetaxel zur Überprüfung einer Docetaxel induzierten Resistenz ab. Auf der linken Seite sind die Docetaxel sensitiven DU145 Zellen zu sehen. Diese wurden mit Docetaxel Konzentrationen von 0 bis 10 ng/ml behandelt. Bei einer Konzentration von 2,5 ng/ml konnte eine um circa 50 % reduzierte Zellzahl beobachtet werden. Docetaxel Konzentrationen von 5 ng/ml und mehr führten zu einer Abnahme der Zellzahl unter den Ausgangswert. Auf der rechten Seite der Abbildung 16 sind die Ergebnisse für die Docetaxel resistenten DU145 Zellen zu sehen. Es wurden Docetaxel Konzentrationen von 0 bis 20 ng/ml verwendet. Deutliche Hemmeffekte wurden erst ab einer Konzentration von 10 ng/ml Docetaxel beobachtet. Erst bei der höchsten Konzentration von 20 ng/ml Docetaxel wurde das Zellwachstum nahezu komplett blockiert.

Ergebnisse

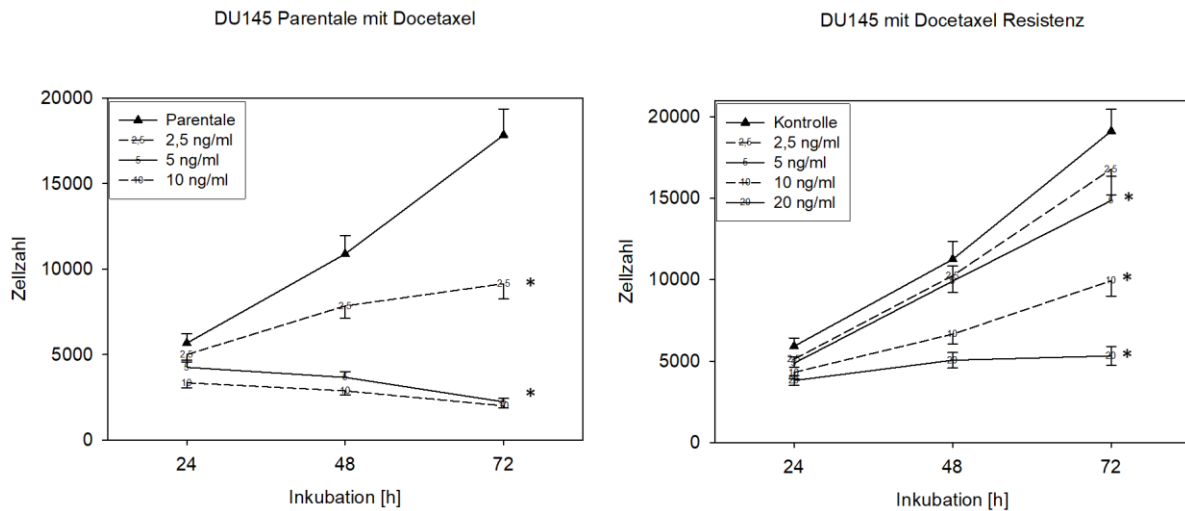


Abbildung 16: Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie DU145 + Docetaxel. Links: Parentale/ Docetaxel sensitive Zellen. Rechts: Docetaxel resistente DU145 Zellen. Die Abszisse zeigt die drei Messzeitpunkte, die Ordinate die absolute Zellzahl. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

Cabazitaxel Resistenz in LNCaP Zellen

Abbildung 17 bildet die Ergebnisse für die Zelllinie LNCaP unter Behandlung mit Cabazitaxel zur Überprüfung einer Cabazitaxel induzierten Resistenz ab. Auf der linken Seite der Abbildung 17 sind die Daten der Cabazitaxel sensitiven LNCaP Zellen abgebildet. Bereits bei 1,25 ng/ml Cabazitaxel konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahl beobachtet werden. In Gegenwart von 2,5 ng/ml Cabazitaxel entsprach die gemessene Zellzahl nach 72 Stunden nahezu dem Ausgangswert, ermittelt nach 24 Stunden. Eine weitere Erhöhung der Cabazitaxel Konzentration reduzierte die Zellzahl unter den Anfangswert. Die rechte Seite der Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse für die Zelllinie LNCaP mit einer Cabazitaxel induzierten Resistenz. Bei dieser Zelllinie wurden Cabazitaxel Konzentrationen von 0 bis 100 ng/ml Cabazitaxel verwendet. Im Gegensatz zu den sensitiven Zellen hatte eine Cabazitaxel Konzentration von 1,25 ng/ml keinen Effekt auf die Zellzahl. Erst ab einer Konzentration von ≥ 10 ng/ml Cabazitaxel reduzierte sich die Zellzahl signifikant gegenüber der Kontrolle.

Ergebnisse

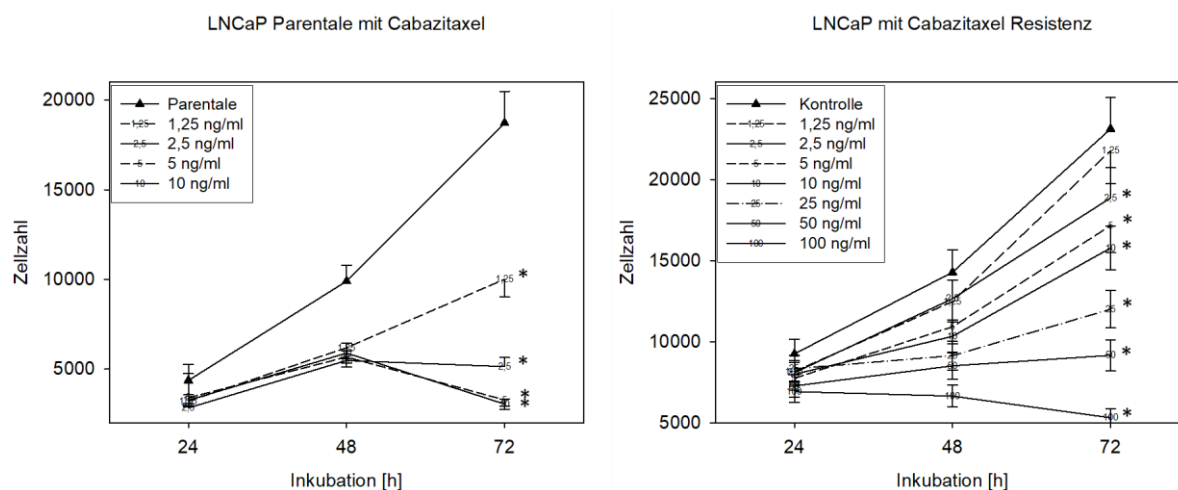


Abbildung 17: Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie LNCaP + Cabazitaxel. Links: Parentale/ Cabazitaxel sensitive Zellen. Rechts: Cabazitaxel resistente LNCaP Zellen. Die Abszisse zeigt die drei Messzeitpunkte und die Ordinate die absolute Zellzahl. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

Docetaxel Resistenz in LNCaP Zellen

Abbildung 18 bildet die Ergebnisse für die Zelllinie LNCaP unter Behandlung mit Docetaxel zur Überprüfung einer Docetaxel induzierten Resistenz ab. Auf der linken Seite der Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Docetaxel sensitiven LNCaP Zellen zu sehen. Bei einer Docetaxel Konzentration von 2,5 ng/ml konnte eine signifikante Abnahme der Zellzahl beobachtet werden (50 % Reduktion). Höhere Konzentrationen von ≥ 5 ng/ml Docetaxel führten zu einem Rückgang der Zellzahl bereits nach 48 Stunden. 20 ng/ml bewirkten ein vollständiges Absterben der Zellen. Auf der rechten Seite der Abbildung 18 sind die Ergebnisse für die Docetaxel resistenten LNCaP Zellen zu sehen. Im Gegensatz zu der deutlichen Reduktion der Zellzahl durch 2,5 ng/ml Docetaxel in den sensitiven LNCaP Zellen, hatte diese Konzentration keinen Effekt auf die resistenten LNCaP. Die Zugabe von 20 ng/ml Docetaxel war notwendig, um eine Reduktion von etwa 50 % zu erzielen. Auch die Anwendung von 100 ng/ml Docetaxel bewirkte keinen vollständigen Wachstumsstopp.

Ergebnisse

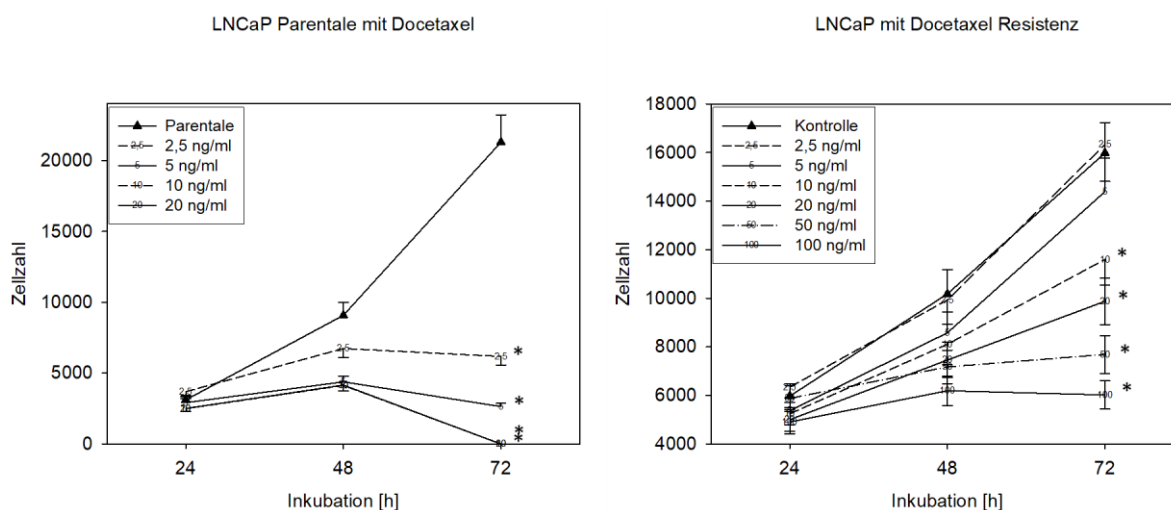


Abbildung 18 Ergebnisse des MTT-Tests für die Zelllinie LNCaP + Docetaxel. Links: Parentale/ Docetaxel sensitive Zellen. Rechts: Docetaxel resistente LNCaP Zellen. Die Abszisse zeigt die drei Messzeitpunkte und die Ordinate die Zellzahl. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

Welchen Effekt hat sE-Cadherin auf die Zellviabilität von Prostatakarzinomzellen?

Nachdem eine erfolgreiche Taxan-Resistenz Induktion mittels MTT-Tests bestätigt wurde, konnte der Effekt von sE-Cadherin auf die Prostatakarzinomzellen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst drei verschiedenen Konzentrationen von 0,5 bis 5 μg sE-Cadherin pro Milliliter Nährmedium untersucht. Als Kontrolle diente jeweils die entsprechende Zelllinie ohne eine Behandlung mit sE-Cadherin.

PC3 Parental

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von parentalen PC3 Zellen unter dem Einfluss einer sE-Cadherin Behandlung aufgeführt. Die unbehandelten parentalen PC3 Zellen dienen als Kontrolle. Eine Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. Dieser Effekt schien darüber hinaus in einem Dosis-Wirkungsverhältnis zu stehen. Mit steigender Konzentration wurde der Zellzahl reduzierende Effekt immer deutlicher. Bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin war eine signifikante Reduktion zu beobachten

Ergebnisse

PC3 Docetaxel resistent

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von Docetaxel resistenten PC3 Zellen unter dem Einfluss einer sE-Cadherin Behandlung dargestellt. Docetaxel resistente PC3 wachsen deutlich langsamer als parentale PC3 Zellen. Lag das Wachstum in den parentalen PC3 noch bei circa 800 % nach 72 Stunden, so lag es in den Docetaxel resistenten PC3 bei vergleichsweise niedrigen 400 % nach 72 Stunden. In den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zeigte sich hinsichtlich der Wirkung von sE-Cadherin ein zu den parentalen PC3 Zellen vergleichbares Bild. Die Zellen sprachen bereits signifikant auf eine Konzentration von 0,5 µg/ml sE-Cadherin an. Dieser Effekt steigerte sich auch in dieser Zelllinie mit steigender sE-Cadherin Behandlung.

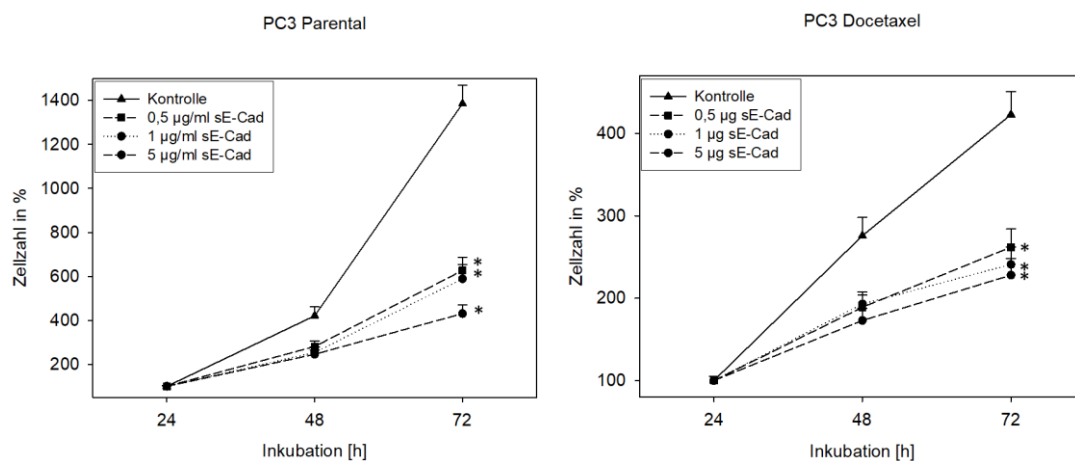


Abbildung 19: Ergebnisse des MTT-Tests für sE-Cadherin Effekt auf PC3. Die Abszisse zeigt die drei Messzeitpunkte und die Ordinate die Zellzahl in Prozent. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

DU145 Parenta

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von parentalen DU145 Zellen unter dem Einfluss einer sE-Cadherin Behandlung präsentiert. Die unbehandelten DU145 Zellen dienten als Kontrolle und konnten ihre Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden etwa versechsfachen. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl der DU145 Zellen. Bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml sE-Cadherin konnte bereits eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Dieser Effekt verstärkte sich dosisabhängig bis zu der höchsten Konzentration von 5 µg sE-Cadherin pro Milliliter.

Ergebnisse

DU145 Cabazitaxel resistent

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen unter dem Einfluss einer sE-Cadherin Behandlung dargestellt. Die unbehandelten Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen dienten als Kontrolle und konnten ihre Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden etwa verdreifachen. Im Vergleich zu den parentalen Zellen konnte durch die Cabazitaxel Resistenz bereits eine um etwa 50 % reduzierte Zellzahl beobachtet werden. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl der Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen. Bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml sE-Cadherin konnte bereits eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Die Zellzahl konnte sich im Gegensatz zur Kontrolle lediglich verdreifachen. Dieser Effekt verstärkte sich dosisabhängig bis zu der höchsten Konzentration von 5 µg/ml sE-Cadherin.

DU145 Docetaxel resistent

In Abbildung 20 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von Docetaxel resistenten DU145 Zellen unter dem Einfluss einer sE-Cadherin Behandlung zu sehen. Die unbehandelten Docetaxel resistenten DU145 Zellen dienten als Kontrolle und konnten ihre Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden etwa um den Faktor 2,5 erhöhen. Im Vergleich zu den parentalen Zellen konnte durch die Docetaxel Resistenz bereits eine um mehr als 50 % reduzierte Zellzahl beobachtet werden. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl in den Docetaxel resistenten DU145 Zellen. Bei einer Konzentration von 0,5 µg sE-Cadherin pro Milliliter Nährmedium konnte bereits eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Die Zellzahl konnte sich im Gegensatz zur Kontrolle lediglich um den Faktor 1,8 erhöhen. Dieser Effekt verstärkte sich dosisabhängig bis zu der höchsten Konzentration von 5 µg/ml sE-Cadherin. Bei dieser Konzentration konnte sich die Zellzahl nach 72 Stunden noch immer um den Faktor 1,6 erhöhen.

Ergebnisse

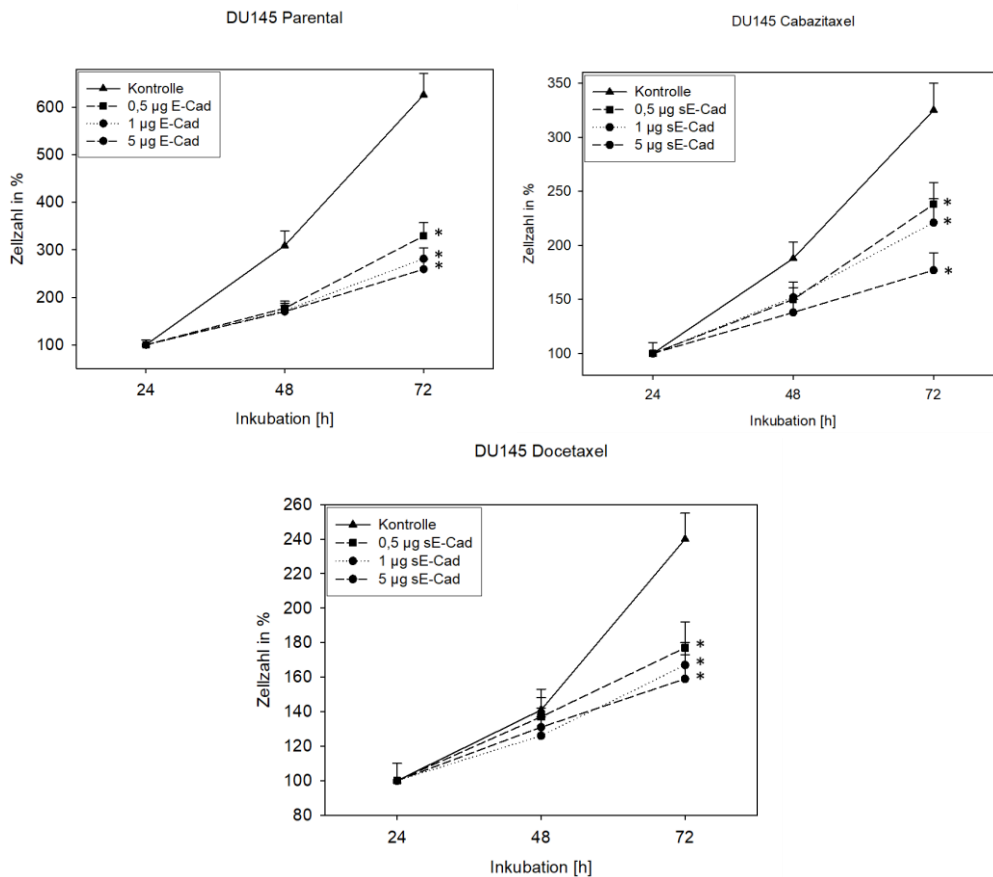


Abbildung 20: Ergebnisse des MTT-Tests für sE-Cadherin Effekt auf DU145. Die Abszisse zeigt die drei Messzeitpunkte und die Ordinate die Zellzahl in Prozent. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

LNCaP Parental

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von parentalen LNCaP Zellen unter dem Einfluss einer sE-Cadherin Behandlung dargestellt. Die unbehandelten LNCaP Zellen dienten als Kontrolle und konnten ihre Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden etwa um den Faktor 2,7 erhöhen. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl in den parentalen LNCaP Zellen. Bei einer Konzentration von 0,5 µg sE-Cadherin pro Milliliter Nährmedium konnte bereits eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Die Zellzahl konnte sich im Gegensatz zur Kontrolle lediglich um den Faktor 1,8 erhöhen. Dieser Effekt verstärkte sich dosisabhängig bis zu der höchsten Konzentration von 5 µg sE-Cadherin pro Milliliter. Bei dieser Konzentration konnte sich die Zellzahl nach 72 Stunden noch immer um den Faktor 1,6 erhöhen.

Ergebnisse

LNCaP Cabazitaxel resistent

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von Cabazitaxel resistenten LNCaP Zellen unter dem Einfluss einer sE-Cadherin Behandlung dargestellt. Die unbehandelten Cabazitaxel resistenten LNCaP Zellen dienten als Kontrolle und konnten ihre Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden etwa um den Faktor 3,3 erhöhen. Im Vergleich zu den parentalen Zellen konnte durch die Cabazitaxel Resistenz eine leicht erhöhte Zellzahl beobachtet werden. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl in den Cabazitaxel resistenten LNCaP Zellen. Bei einer Konzentration von 0,5 µg sE-Cadherin pro Milliliter Nährmedium konnte bereits eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Die Zellzahl konnte sich im Gegensatz zur Kontrolle lediglich um den Faktor 1,7 erhöhen. Dieser Effekt verstärkte sich dosisabhängig bis zu der höchsten Konzentration von 5 µg sE-Cadherin pro Milliliter. Bei dieser Konzentration konnte sich die Zellzahl nach 72 Stunden nur noch um den Faktor 1,5 erhöhen.

LNCaP Docetaxel resistent

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse für die Untersuchung von Cabazitaxel resistenten LNCaP Zellen unter dem Einfluss einer sE-Cadherin Behandlung vorgelegt. Die unbehandelten Docetaxel resistenten LNCaP Zellen dienten als Kontrolle und konnten ihre Zellzahl im Verlauf von 72 Stunden etwa um den Faktor 3,6 erhöhen. Im Vergleich zu den parentalen Zellen konnte durch die Docetaxel Resistenz eine leicht erhöhte Zellzahl beobachtet werden. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl in den Docetaxel resistenten LNCaP Zellen. Bei einer Konzentration von 0,5 µg sE-Cadherin pro Milliliter Nährmedium konnte bereits eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Die Zellzahl konnte sich im Gegensatz zur Kontrolle lediglich um den Faktor 2 erhöhen. Dieser Effekt verstärkte sich dosisabhängig bis zu der höchsten Konzentration von 5 µg sE-Cadherin pro Milliliter. Bei dieser Konzentration konnte sich die Zellzahl nach 72 Stunden nur noch um den Faktor 1,6 erhöhen. Toxische Effekte konnten bei den untersuchten Konzentrationen nicht beobachtet werden.

Ergebnisse

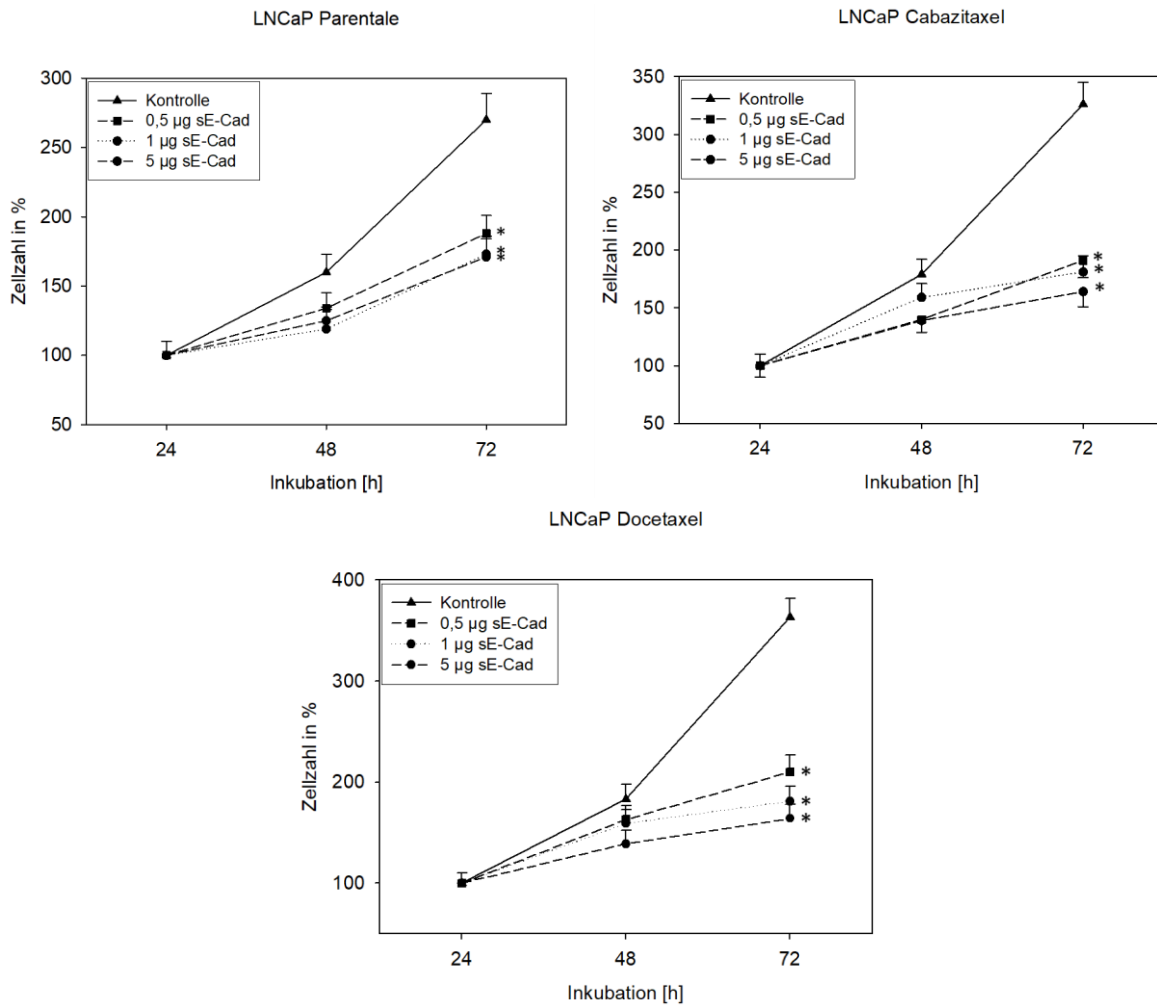


Abbildung 21: Ergebnisse des MTT-Tests für sE-Cadherin Effekt auf LNCaP. Die Abszisse zeigt die drei Messzeitpunkte und die Ordinate die Zellzahl in Prozent. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

Da im MTT-Test für die Konzentration von 5 µg sE-Cadherin pro Milliliter Nährmedium ein deutlicher Effekt beobachtet werden konnte, wurde diese Konzentration für die nachfolgenden Experimente gewählt. Diese Konzentration wurde für alle untersuchten Zellen verwendet.

4.2 Klonogenes Wachstum

PC3

In Abbildung 22 und 23 sind die Ergebnisse für die Untersuchung des klonogenen Wachstums von parentalen und Docetaxel resistenten PC3 Zellen unter dem Einfluss einer 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung wiedergegeben. In den parentalen PC3 Zellen konnte durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin eine signifikante Reduktion der gezählten Klone von etwa 40 auf 20 beobachtet werden. Das klonogene Wachstum wurde somit in den parentalen PC3 um 50 % reduziert. Für die Docetaxel resistenten PC3 Zellen konnte ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden. Die Anzahl der Klone lag bei den unbehandelten Docetaxel resistenten PC3 Zellen nicht signifikant über der Anzahl der Klone der unbehandelten parentalen PC3 Zellen. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin konnte in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen eine signifikante Reduktion der Anzahl der Klone festgestellt werden. Der reduzierende Effekt fiel in den parentalen Zellen stärker aus als in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass es in beiden untersuchten PC3 Zelllinien unter einer 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung zu einer signifikanten Reduktion des klonogenen Wachstum kommt.

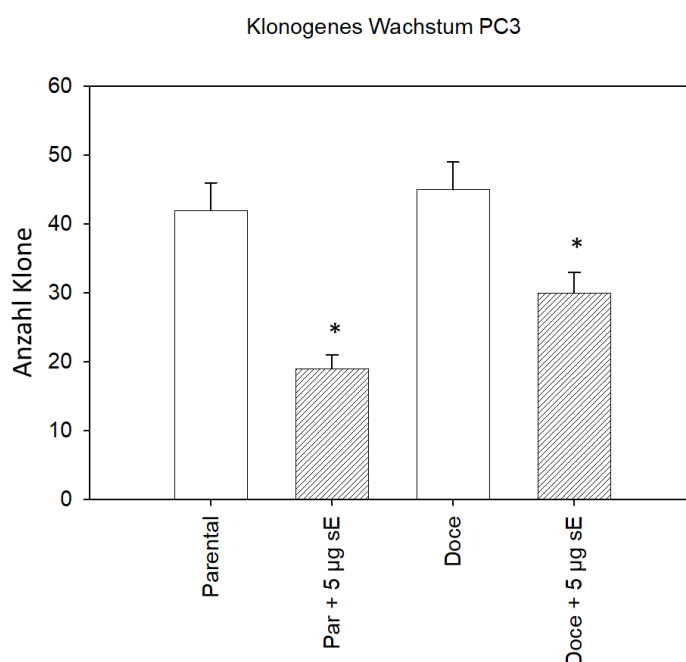


Abbildung 22: Ergebnisse für das klonogene Wachstum der Zelllinie PC3. Die Zellen wurden mit einer 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung ausgesät. Nach 7 Tagen wurden die 6-Well Platten am Durchlichtmikroskop ausgezählt. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

Ergebnisse

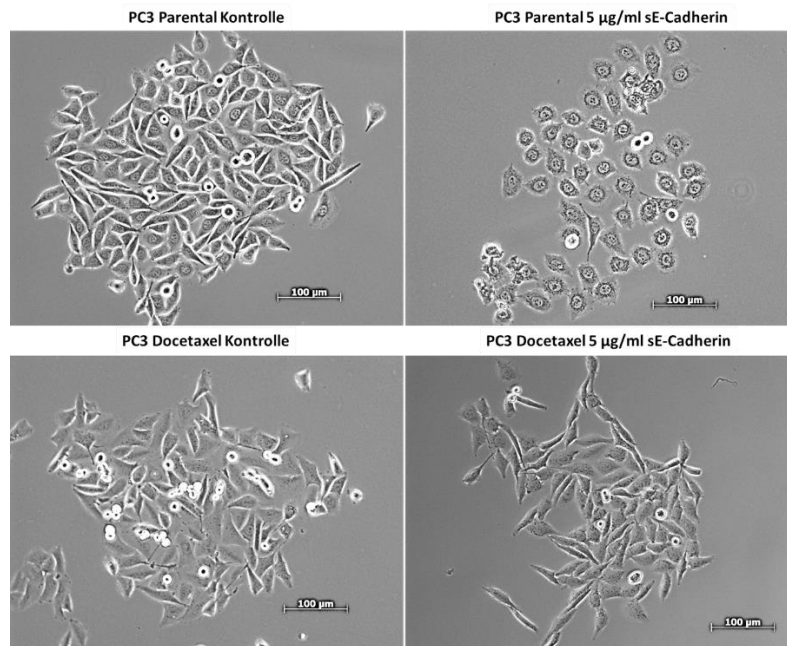


Abbildung 23: Mikroskopische Aufnahme des klonogenen Wachstums der PC3 Zellen. Parentalen und Docetaxel Resistente. Links: Kontrolle (Ohne Behandlung). Rechts: 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung. Nach 7 Tagen wurden die 6-Well Platten am Durchlichtmikroskop ausgezählt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 4.

In Abbildung 23 ist exemplarisch der Effekt von sE-Cadherin auf die Morphologie der untersuchten PC3 Zellen beschrieben. Die parentalen PC3 Zellen zeigen deutliche Veränderungen der Morphologie durch eine kugelige statt längliche Form. Zudem ist die Klonkolonie weniger dicht organisiert. Auch bei Docetaxel resistenten PC3 Zellen konnten Veränderungen ausgemacht werden. Es bildeten sich neben einer reduzierten Anzahl an Klonen auch kleinere Kolonien, welche verminderte Mengen an hellen Zellen aufwiesen.

DU145

In Abbildung 24 und 25 sind die Ergebnisse für die Untersuchung des klonogenen Wachstums von parentalen, Cabazitaxel und Docetaxel resistenten DU145 Zellen unter dem Einfluss einer 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung dargestellt. In den parentalen DU145 Zellen konnte durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin eine Reduktion der gezählten Klone um etwa 40 % beobachtet werden. Für die Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen konnte ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden. Die Anzahl der Klone lag bei den unbehandelten Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen signifikant über der Anzahl der Klone der unbehandelten, parentalen DU145 Zellen. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin konnte in den Cabazitaxel

Ergebnisse

resistenten DU145 Zellen eine signifikante Reduktion der Anzahl der Klone festgestellt werden. Der Effekt fiel schwächer aus als in den parentalen DU145 Zellen, war jedoch signifikant. Zudem fällt auf, dass die durch sE-Cadherin reduzierte Anzahl der Klone in den Cabazitaxel resistenten DU145 auf demselben Stand ist wie die unbehandelten, parentalen DU145. Auch in den Docetaxel resistenten DU145 konnte ein vergleichbarer Effekt beobachtet werden. Zunächst fällt auf, dass die unbehandelten Docetaxel resistenten DU145 deutlich weniger Klone bildeten als die unbehandelten, parentalen DU145. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin wurde die Anzahl der Klone bei den Docetaxel resistenten DU145 reduziert. Diese Reduktion fiel mit etwa 55 % signifikant aus. Es konnte zusammenfassend für alle drei verwendeten DU145 Zelllinien eine signifikante Reduktion des klonogenen Wachstums unter einer 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung beobachtet werden.

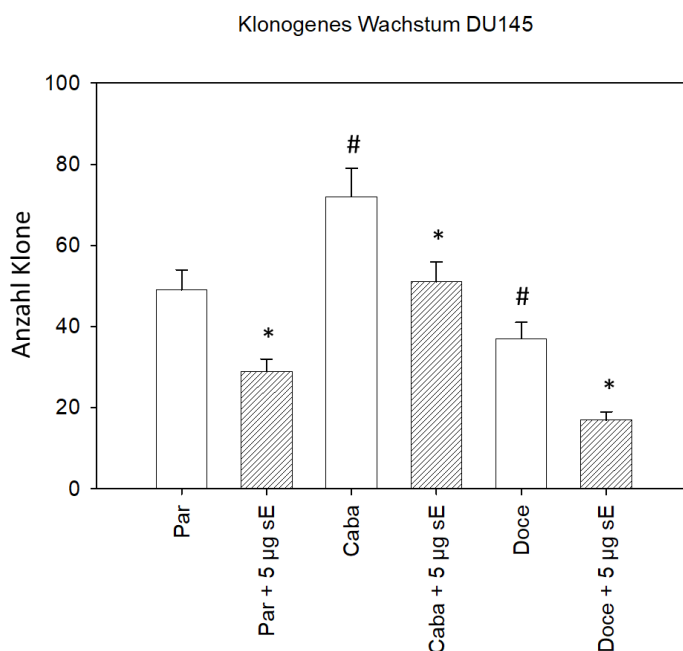


Abbildung 24: Ergebnisse für das klonogene Wachstum der Zelllinie DU145. Die Zellen wurden mit einer 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung ausgesät. Nach 7 Tagen wurden die 6-Well Platten am Durchlichtmikroskop ausgezählt. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. # = Signifikante Differenz zu unbehandelten parentalen DU145 Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

Ergebnisse

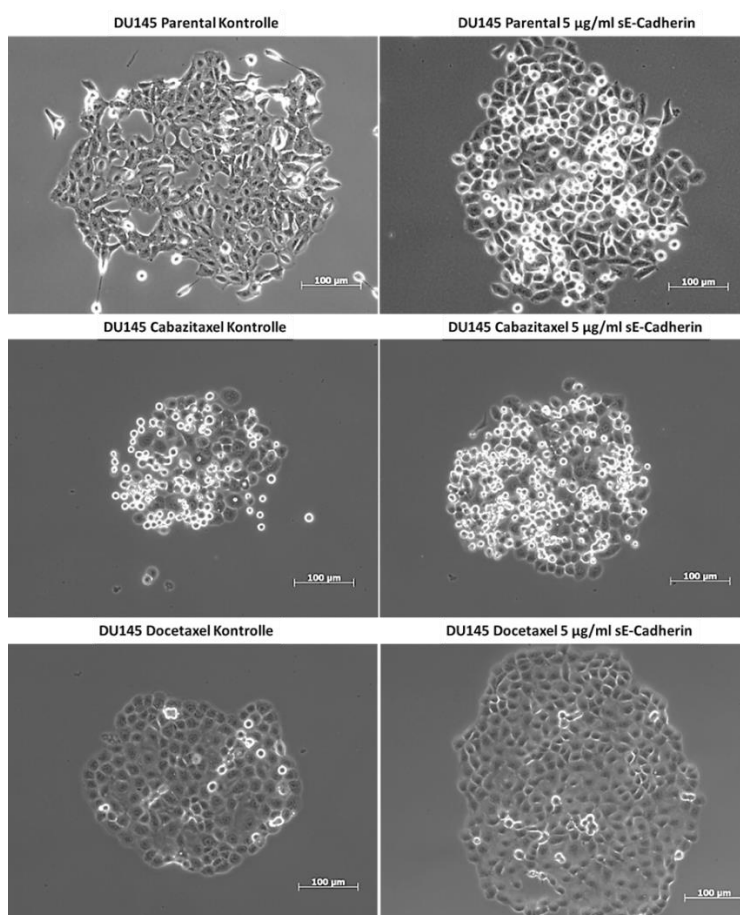


Abbildung 25: Mikroskopische Aufnahme des klonogenen Wachstum der DU145 Zellen. Parentale, Cabazitaxel und Docetaxel Resistente. Links: Kontrolle (Ohne Behandlung). Rechts: 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung. Nach 7 Tagen wurden die 6-Well Platten am Durchlichtmikroskop ausgezählt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 4.

Abbildung 25 illustriert exemplarisch die Veränderungen der Klone durch die sE-Cadherin Behandlung. Eine Zunahme der Größe der Klone bei den Taxan resistenten DU145 Zellen unter sE-Cadherin konnte beobachtet werden.

LNCaP

Die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP bildete keine Klone aus. Auch eine Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin führte zu keiner Veränderung dieses Verhaltens.

Ergebnisse

4.3 BrdU

PC3

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse für die BrdU-Versuche mit den parentalen und Docetaxel resistenten PC3 Zellen unter einer 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung zu sehen. Auf der linken Seite werden die nach 48 Stunden bestimmten Messwerte gezeigt. Rechts die Veränderung der Einbaurrate von 24 zu 48 Stunden. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es sowohl in den parentalen als auch in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate gegenüber den entsprechenden unbehandelten Kontrollen. Auf der rechten Seite sind die Veränderungen der BrdU-Einbaurrate in Relation von 24 zu 48 Stunden prozentual abgebildet. Die Einbaurrate verringerte sich in den parentalen Kontrollen leicht nach 48 Stunden gegenüber dem 24 Stunden Messzeitpunkt. In den unbehandelten Docetaxel resistenten PC3 Zellen konnte ein Anstieg der Proliferationsaktivität nach 48 Stunden beobachtet werden. Durch die sE-Cadherin Behandlungen kam es bei beiden untersuchten Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate gegenüber der 24 Stunden Messung. Dieser Effekt fiel in den parentalen PC3 Zellen deutlicher aus als in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen.

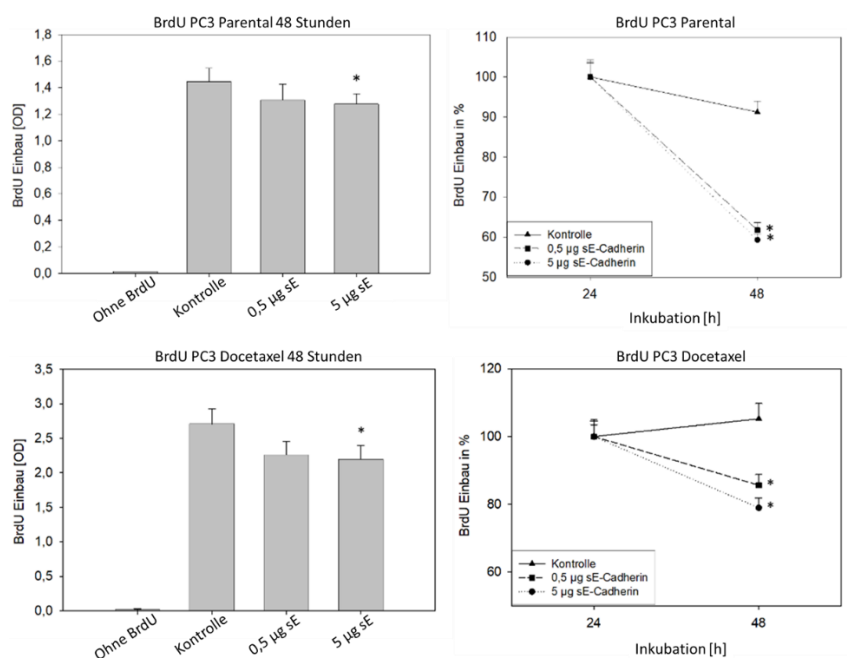


Abbildung 26: Ergebnisse für den BrdU-Einbau der PC3 Zellen. Parentale und Docetaxel Resistente. Verwendete Konzentrationen: 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. Links: Messwerte nach 48 Stunden BrdU-Einbauzeit. Rechts: Prozentuale Veränderung des BrdU-Einbaus von 24 zu 48 Stunden. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

Ergebnisse

DU145

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse für die BrdU-Versuche mit der parentalen, Cabazitaxel und Docetaxel resistenten DU145 Zellen unter einer 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung dargestellt. Auf der linken Seite werden die nach 48 Stunden bestimmten Messwerte gezeigt. Rechts die Veränderung der Einbaurrate von 24 zu 48 Stunden.

Parentale:

Durch die Behandlung mit 0,5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu keiner signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Erst mit 5 µg/ml sE-Cadherin konnte eine signifikante Reduktion beobachtet werden.

Cabazitaxel resistente:

Durch die Behandlung mit 0,5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu keiner signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach 48 Stunden. In Relation zwischen der 24 und 48 Stunden Messung war der Effekt bei 0,5 µg/ml sE-Cadherin nicht signifikant. Bei der höheren Konzentration von 5 µg/ml sE-Cadherin wurde der Effekt deutlich verstärkt, wodurch es zu einer signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate gegenüber der unbehandelten Kontrolle kam.

Docetaxel resistente:

Durch die Behandlung mit 0,5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu keiner signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach 48 Stunden. Erst bei der höheren Konzentration von 5 µg/ml sE-Cadherin konnte eine signifikante Reduktion der BrdU-Einbaurrate gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach 48 Stunden beobachtet werden. Setzt man die BrdU-Einbaurrate nach 24 zu 48 Stunden in Relation so zeigt sich, dass die Einbaurrate bei den unbehandelten Kontrollzellen ansteigt und durch die Behandlung mit sE-Cadherin signifikant reduziert wird.

Ergebnisse

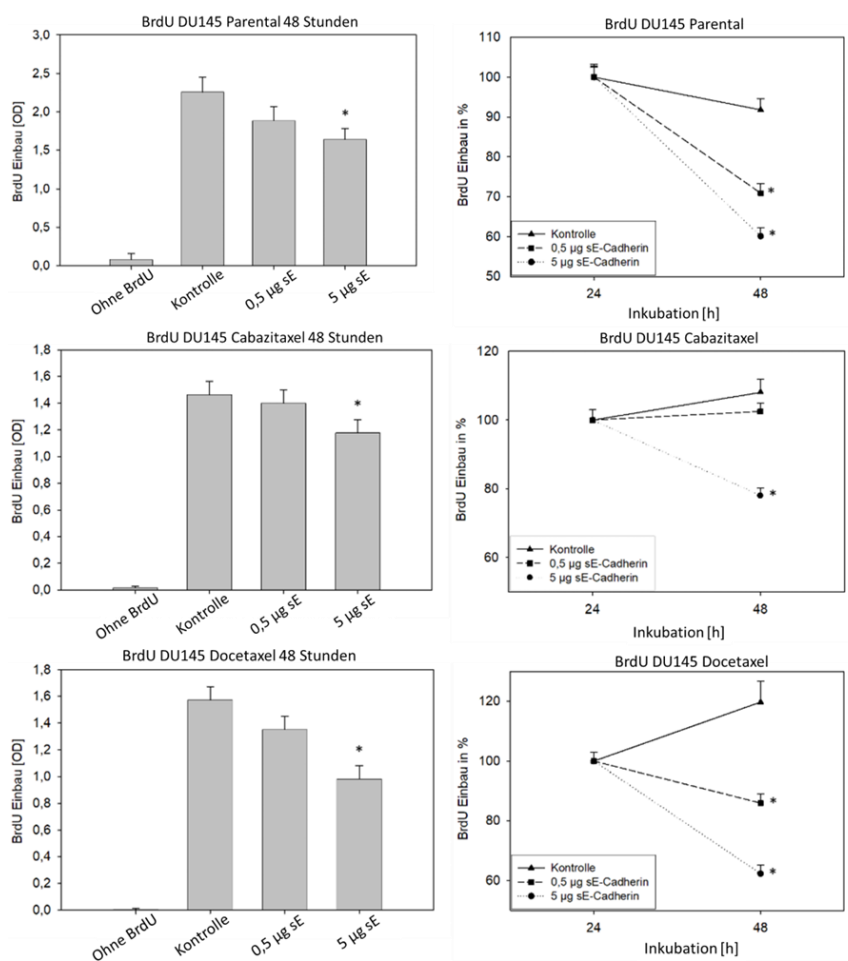


Abbildung 27: Ergebnisse für den BrdU-Einbau der DU145 Zellen. Parentale, Cabazitaxel und Docetaxel Resistente. Verwendete Konzentrationen: 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. Links: Messwerte nach 48 Stunden BrdU-Einbauzeit. Rechts: Prozentuale Veränderung des BrdU-Einbaus von 24 zu 48 Stunden. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

LNCaP

In Abbildung 28 sind die Ergebnisse für die BrdU-Versuche mit der parentalen, Cabazitaxel und Docetaxel resistenten LNCaP Zellen unter einer 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung dargestellt. Auf der linken Seite werden die nach 48 Stunden bestimmten Messwerte gezeigt. Rechts die Veränderung der Einbaurrate von 24 zu 48 Stunden.

Ergebnisse

Parentale:

Durch die Behandlung mit 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu keiner signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate nach 48 Stunden gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Erst bei einer Konzentration von 5 µg/ml sE-Cadherin konnte eine signifikante Reduktion der BrdU-Einbaurrate von 24 zu 48 Stunden beobachtet werden.

Cabazitaxel resistente:

Durch die Behandlung mit 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu keiner signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate nach 48 Stunden gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz zu den parentalen LNCaP Zellen konnte durch die Behandlung sowohl mit 0,5 als auch 5 µg/ml sE-Cadherin ein signifikanter Anstieg der BrdU-Einbaurrate von 24 zu 48 Stunden beobachtet werden.

Docetaxel resistente:

Durch die Behandlung mit 0,5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu keiner signifikanten Reduktion der BrdU-Einbaurrate nach 48 Stunden gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Für 5 µg/ml sE-Cadherin zeigte sich hingegen eine signifikante Reduktion der BrdU-Einbaurrate nach 48 Stunden gegenüber der Kontrolle. Vergleichbares konnte für die von 24 zu 48 Stunden in Relation gesetzte BrdU-Einbaurrate beobachtet werden. Eine Konzentration von 0,5 µg/ml sE-Cadherin präsentierte keine signifikante Reduktion, im Gegensatz zu 5 µg/ml sE-Cadherin.

Ergebnisse

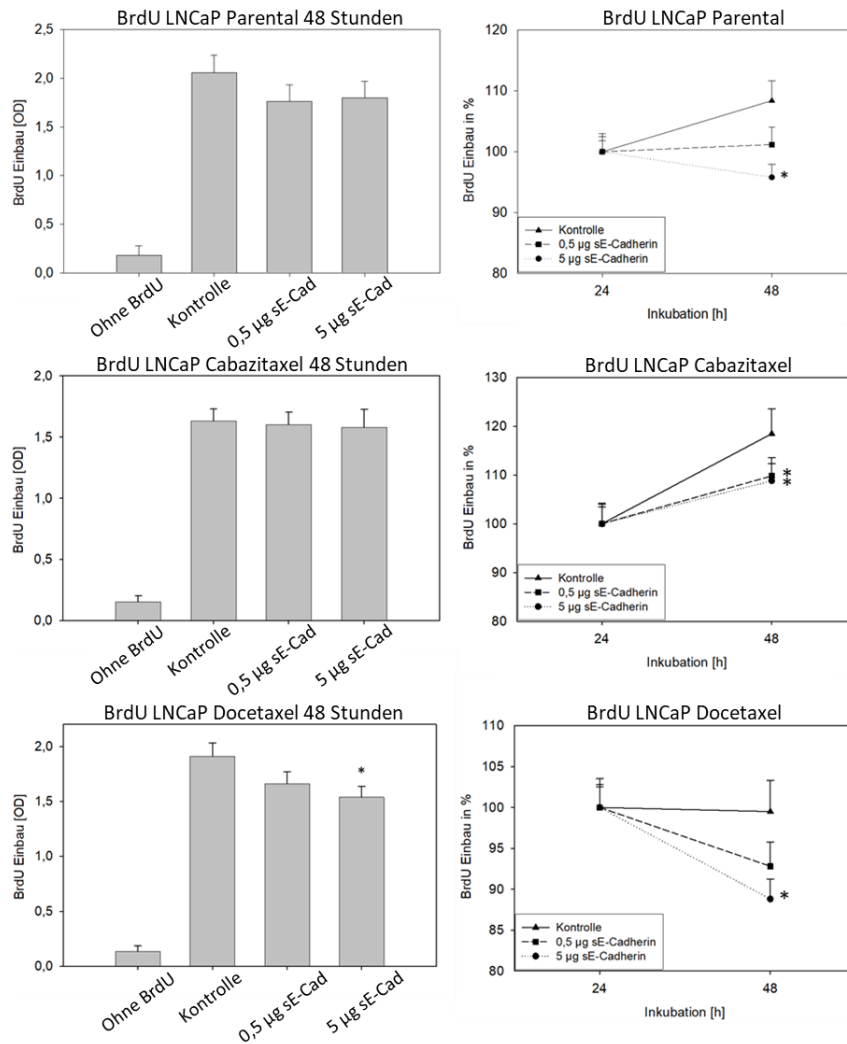


Abbildung 28: Ergebnisse für den BrdU-Einbau der LNCaP Zellen. Parentale, Cabazitaxel und Docetaxel Resistente. Verwendete Konzentrationen: 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. Links: Messwerte nach 48 Stunden BrdU-Einbauzeit. Rechts: Prozentuale Veränderung des BrdU-Einbaus von 24 zu 48 Stunden. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

4.4 Zellzyklus

PC3

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit der Zelllinie PC3 dargestellt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt. Die Kontrollen verblieben ohne eine sE-Cadherin Behandlung. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es bei den parentalen und Docetaxel resistenten Zellen zu unterschiedlichen Verschiebungen der Zellzyklus-Phasen. Die parentalen PC3 Zellen zeigten einen Anstieg des Anteils der G0/G1-Phase. Der Anteil an Zellen in der S- und G2/M- Phase reduzierte sich hingegen. Bei den Docetaxel resistenten Zellen konnte ebenfalls ein Anstieg

Ergebnisse

der Zellen in der G₀/G₁-Phase ausgemacht werden. Der prozentuale Anteil der S-Phase reduzierte sich in den resistenten etwas deutlicher als in den parentalen PC3 Zellen. Im Gegensatz zu den parentalen PC3 Zellen führte die Behandlung der resistenten Zellen mit 5 µg/ml sE-Cadherin allerdings zu einem prozentualen Anstieg der G₂/M-Phase, verglichen zu den unbehandelten Kontrollen.

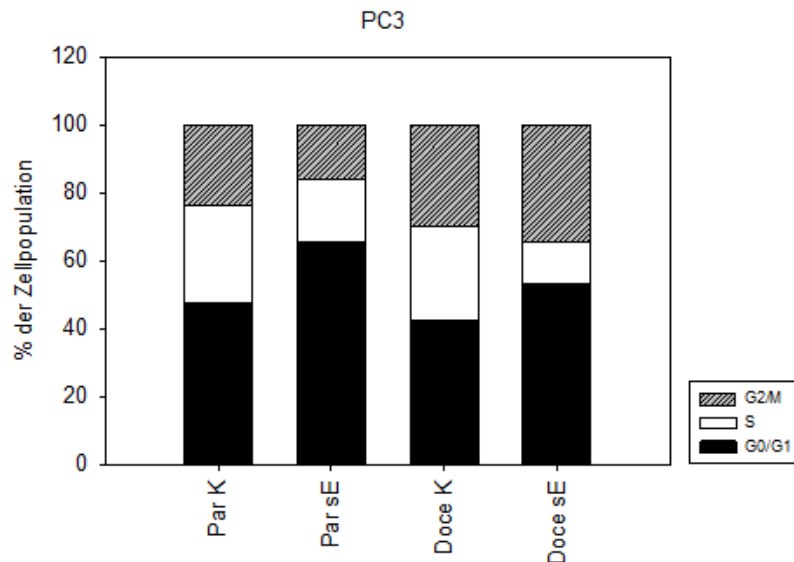


Abbildung 29: Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit PC3. Parentale (Par) und Docetaxel Resistente (Doce). Die Zellen wurden 72 Stunden mit 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n = 6.

DU145

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit der Zelllinie DU145 dargestellt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt. Die Kontrollen erhielten keine Behandlung. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es sowohl in den parentalen als auch in den resistenten DU145 Zellen zu Verschiebungen der Zellzyklus-Phasen. In allen drei Zelllinien konnte ein Anstieg der G₀/G₁-Phase beobachtet werden. Diese Zunahme fiel jedoch unterschiedlich stark aus. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin wurde der Anteil der S- und G₂/M-Phase in den parentalen und Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen reduziert. Für die Docetaxel resistenten DU145 Zellen zeigte sich eine andere Verschiebung der Phasen. Die S-Phase wurde vergleichbar mit den parentalen und Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen reduziert, wohingegen der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase zunahm.

Ergebnisse

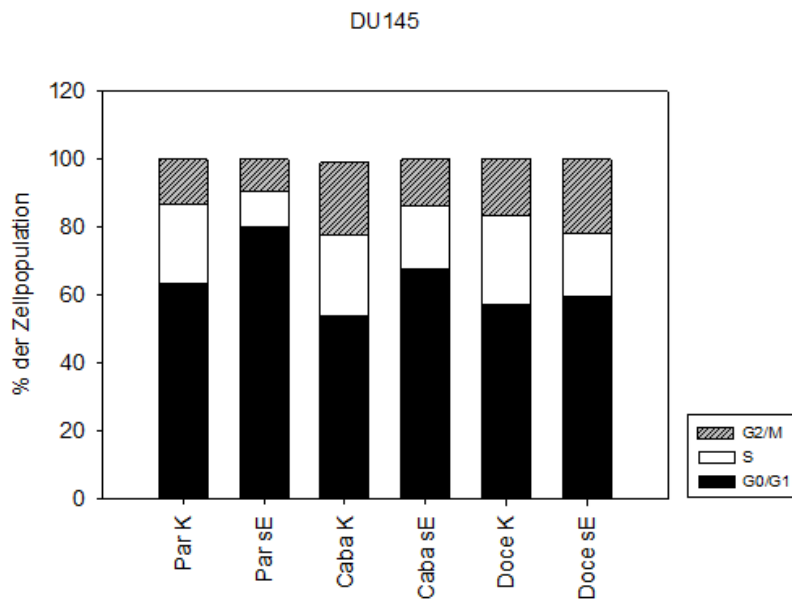


Abbildung 30: Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit der Zelllinie DU145. Parentale (Par), Cabazitaxel (Caba) und Docetaxel (Doce) Resistente. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von $n = 6$.

LNCaP

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit der Zelllinie LNCaP dargestellt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin behandelt. Die Kontrollen verblieben ohne eine sE-Cadherin Behandlung. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es sowohl in den parentalen als auch in den resistenten LNCaP Zellen zu Verschiebungen der Zellzyklus-Phasen. Die parentalen und Docetaxel resistenten LNCaP Zellen zeigten einen vergleichbaren Effekt in der Verschiebung der Zellzyklus-Phasen durch die Behandlung mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin. Bei beiden Zelllinien kam es zu einem Anstieg der G0/G1-Phase. Zudem erhöhte sich die S-Phase in den Docetaxel resistenten LNCaP, während sich die Phase bei den parentalen Zellen nicht veränderte. Bei beiden Zelllinien (Parental und Docetaxel resistent) kam es jedoch zu einer Reduktion der G2/M-Phase. Bei den Cabazitaxel resistenten Zellen zeigte sich eine zu den parentalen und Docetaxel resistenten LNCaP Zelllinien unterschiedliche Verschiebung der Zellzyklus-Phasen. Bei Cabazitaxel resistenten LNCaP Zellen reduzierte sich die G0/G1-Phase. Die G2/M-Phase blieb nahezu unverändert. Die S-Phase hingegen wies einen deutlichen Anstieg durch die Behandlung mit sE-Cadherin auf.

Ergebnisse

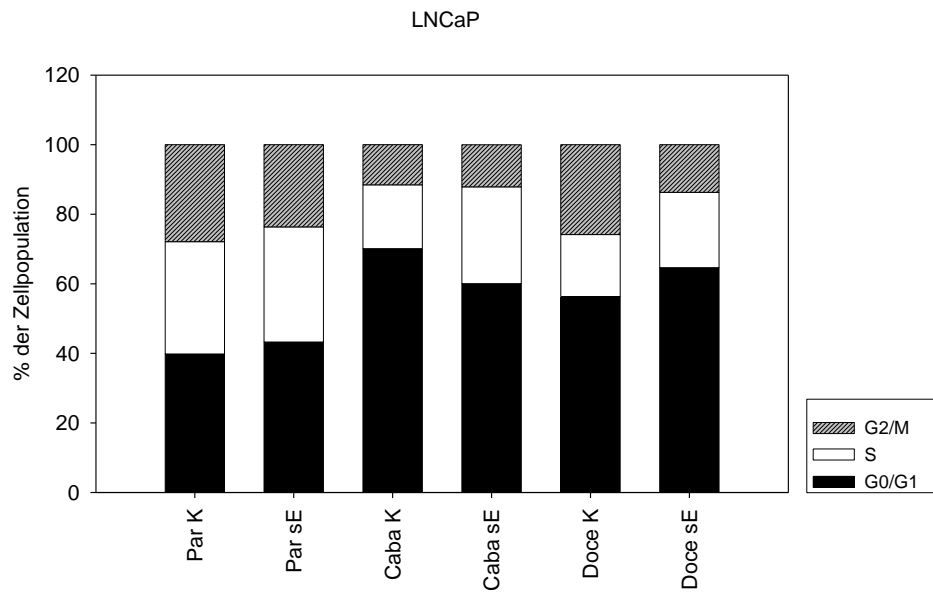


Abbildung 31: Ergebnisse für die Zellzyklus-Experimente mit der Zelllinie LNCaP. Parentale (Par), Cabazitaxel (Caba) und Docetaxel (Doce) Resistente. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von $n = 7$.

4.5 Apoptose

PC3

In Abbildung 32 und Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Apoptose-Experimente für die Zelllinie PC3 dargestellt. Untersucht wurden die parentalen und Docetaxel resistenten PC3 Zellen. Die Zellen wurden in 25 cm^2 Kulturflaschen für 72 Stunden mit sE-Cadherin behandelt, wobei die Kontrollen keine sE-Cadherin Behandlung erhielten. Sowohl die parentalen als auch die Docetaxel resistenten PC3 Zellen zeigten einen sehr hohen Anteil an vitalen Zellen. Neben den vitalen Zellen fällt zudem der Anteil an Zellen in der späten Apoptose auf. Diese stellen den zweitgrößten Anteil nach dem der vitalen Zellen dar. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es weder bei 0,5 noch bei 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Ereignisse bei PC3 Zellen.

Ergebnisse

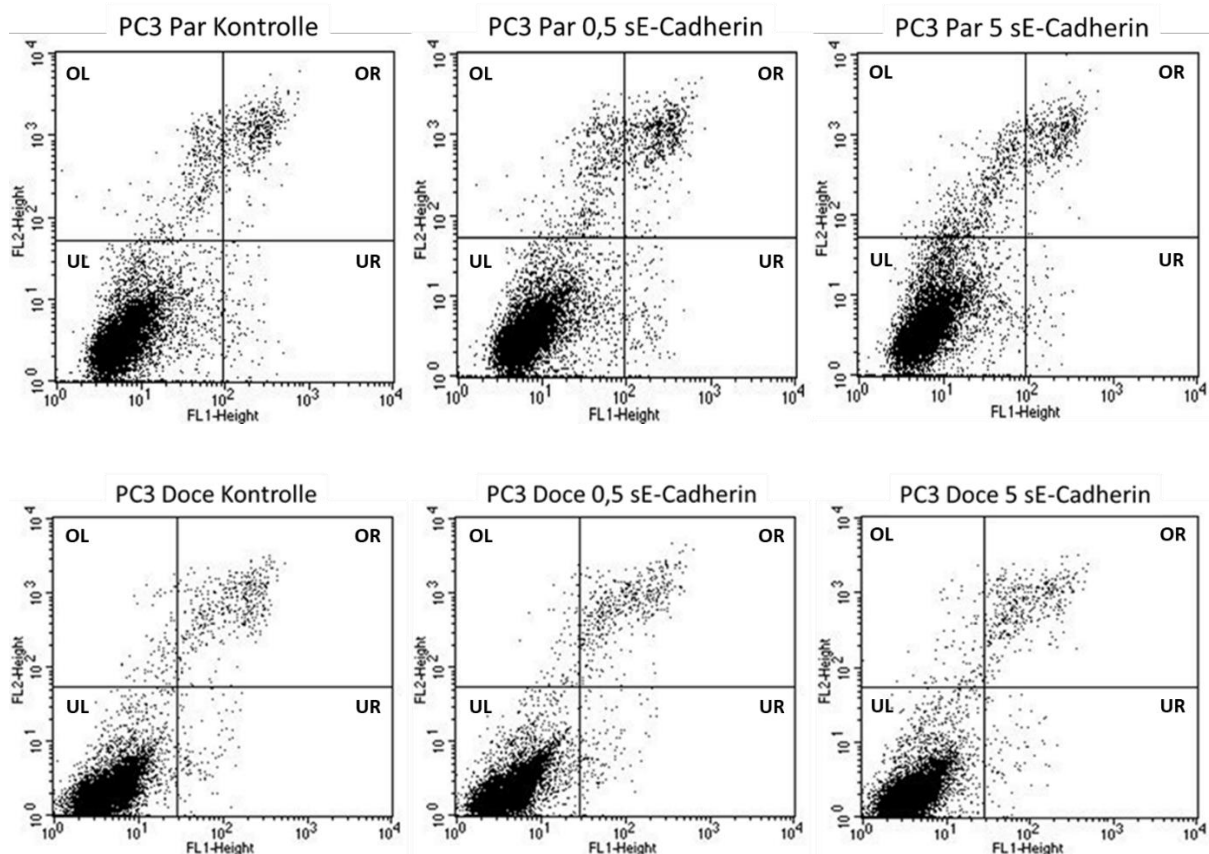


Abbildung 32: Ergebnisse für die Apoptose-Experimente mit der Zelllinie PC3. Parentale (Par) und Docetaxel (Doce) Resistente. Abszisse zeigt Propidiumiod und Ordinate AnnexinV. UL: Vitale Zellen UR: Früh apoptotische Zellen OR: Spät apoptotische Zellen OL: Nekrotische Zellen. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n = 5.

Tabelle 18: Ergebnisse für Apoptose-Experiment mit PC3 zu Abb. 32. Linke Spalte: Vitale: Lebende Zellen, Früh und Spät: Apoptose-Phase und Nekro: Nekrotische Zellen

PC3		<u>Par</u>			<u>Doce</u>	
<u>sE-Cad</u> <u>[µg/ml]</u>	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>
<u>Vital</u>	91,01	88,18	89,41	93,91	93,31	93,94
<u>Früh</u>	1,48	1,68	0,8	0,9	1,11	0,78
<u>Spät</u>	4,95	6,56	4,68	4,29	4,77	4,1
<u>Nekro</u>	2,56	3,58	5,11	0,9	0,81	1,18

DU145

In Abbildung 33 und Tabelle 19 sind die Ergebnisse für die Apoptose-Experimente mit der Zelllinie DU145 zu sehen. Untersucht wurden die parentalen, Cabazitaxel und Docetaxel resistenten DU145 Zellen. Die Zellen wurden in 25 cm² Kulturflaschen für 72 Stunden mit sE-

Ergebnisse

Cadherin behandelt, wobei die Kontrollen keine sE-Cadherin Behandlung erhielten. Für die DU145 Zellen konnte ein zu den PC3 vergleichbarer Effekt durch sE-Cadherin beobachtet werden. Der größte Anteil der Zellen war vital, wohingegen lediglich ein kleiner Teil apoptotisch oder nekrotisch war. Der Anteil der vitalen Zellen reduzierte sich jedoch mit einer induzierten Cabazitaxel oder Docetaxel Resistenz. Durch die Inkubation mit sE-Cadherin kam es weder mit 0,5 noch mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Ereignisse.

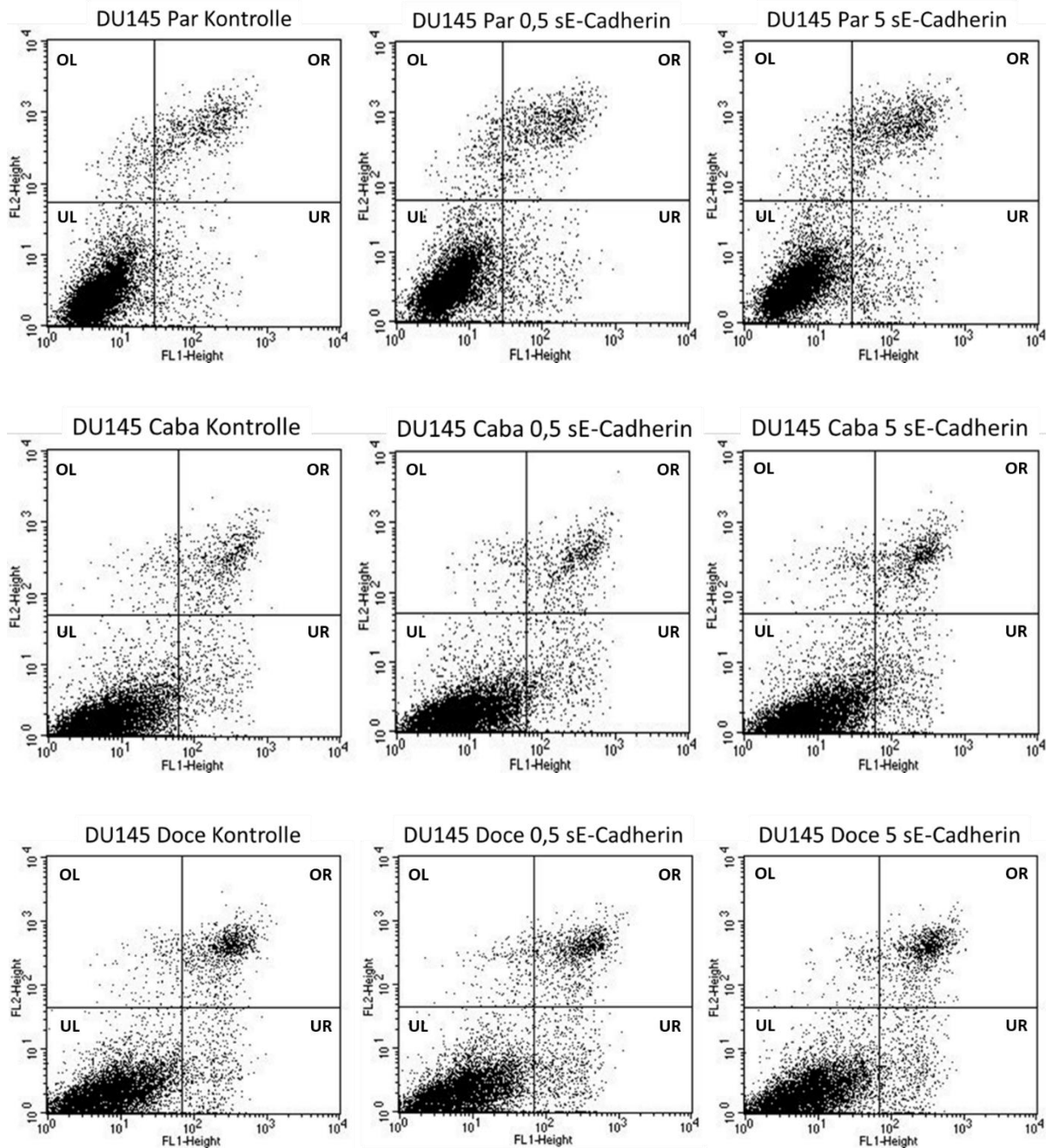


Abbildung 33: Ergebnisse für die Apoptose-Experimente mit der Zelllinie DU145. Parentale, Cabazitaxel- und Docetaxel Resistente. Abszisse zeigt Propidiumiod und Ordinate AnnexinV. UL: Vitale Zellen UR: Früh apoptotische Zellen OR: Spät apoptotische Zellen OL: Nekrotische Zellen. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 0,5 und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von $n = 5$.

Ergebnisse

Tabelle 19: Ergebnisse für Apoptose-Experiment mit DU145 zu Abb. 33. Linke Spalte: Vitale: Lebende Zellen, Früh und Spät: Apoptose-Phase und Nekro: Nekrotische Zellen

DU145		<u>Par</u>			<u>Caba</u>			<u>Doce</u>	
<u>sE-Cad</u> [µg/ml]	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>
<u>Vital</u>	86,76	84,12	80,36	68,92	60,66	63,91	77,37	77,13	76,78
<u>Früh</u>	3,67	4,69	5,14	4,34	4,68	9,16	2,24	1,98	2,85
<u>Spät</u>	7,22	8,49	11,29	17,65	31,09	20,95	11,73	12,15	12,74
<u>Nekro</u>	2,35	2,7	3,21	9,09	3,57	5,98	8,66	8,74	7,63

LNCaP

In Abbildung 34 und Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Apoptose Experimente für die Zelllinie LNCaP beschrieben. Untersucht wurden die parentalen, Cabazitaxel und Docetaxel resistenten LNCaP Zellen. Die Zellen wurden in 25 cm² Kulturflaschen für 72 Stunden mit sE-Cadherin behandelt, wobei die Kontrollen keine sE-Cadherin Behandlung erhielten. Der Effekt der sE-Cadherin Behandlung zeigte in den verschiedenen Zelllinien einen vergleichbaren Effekt. Zusammenfassend konnten nicht signifikante Anstiege der apoptotischen Aktivitäten bei LNCaP Zellen unter sE-Cadherin Behandlung beobachtet werden. Im Gegensatz zu den parentalen Zellen konnte für die beiden resistenten Zelllinien ein erhöhter Anteil an nekrotischen Zellen beobachtet werden. Für die untersuchten LNCaP Zellen zeigten sich unter sE-Cadherin keine signifikanten Veränderungen der apoptotischen Aktivitäten.

Ergebnisse

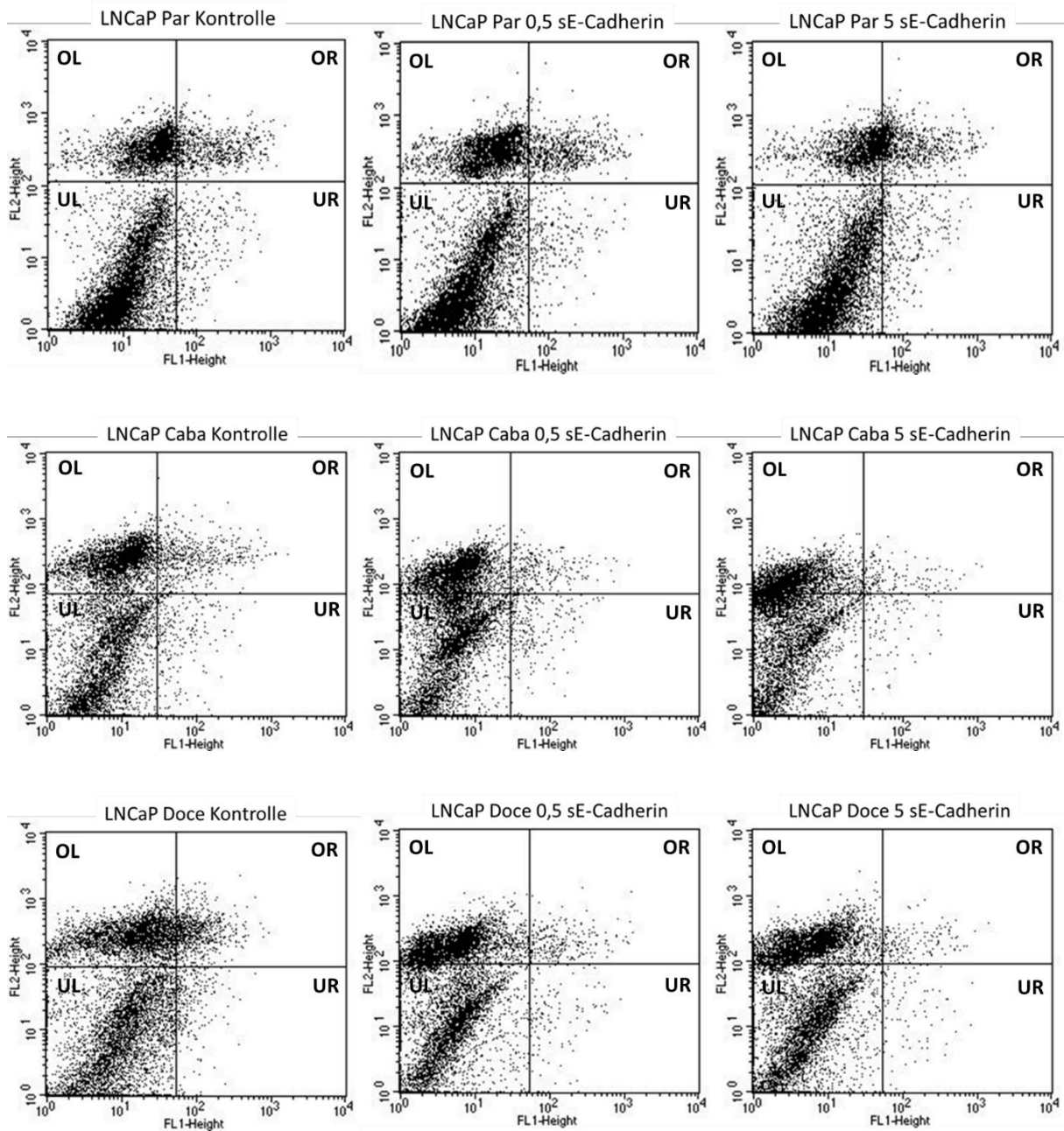


Abbildung 34: Ergebnisse für die Apoptose-Experimente mit der Zelllinie LNCaP. Parentale, Cabazitaxel und Docetaxel Resistente. Abszisse zeigt Propidiumiod und Ordinate AnnexinV. UL: Vitale Zellen UR: Früh apoptotische Zellen OR: Spät apoptotische Zellen OL: Nekrotische Zellen. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 0,5 und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin behandelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von $n = 5$.

Ergebnisse

Tabelle 20: Ergebnisse für Apoptose (AnnexinV)-Experiment mit LNCaP zu Abb. 34. Linke Spalte: Vitale: Lebende Zellen, Früh und Spät: Apoptosephase und Nekro: Nekrotische Zellen

LNCaP		<u>Par</u>			<u>Caba</u>			<u>Doce</u>	
<u>sE-Cad</u> [µg/ml]	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>	<u>0</u>	<u>0,5</u>	<u>5</u>
<u>Vital</u>	66,62	65,22	69,16	59,83	63,19	67,61	56,68	57,36	62,3
<u>Früh</u>	2,97	2,18	3,25	2,19	2,35	0,99	2,41	1,23	0,92
<u>Spät</u>	6,78	6,03	9,06	5,41	2,42	1,49	7,24	2,34	1,48
<u>Nekro</u>	23,63	26,57	18,53	32,57	32,04	29,91	33,67	39,07	35,3

4.6 LDH-Test

Um zytotoxische Effekte durch die Behandlung mit verschiedenen sE-Cadherin Konzentrationen zu untersuchen wurden Lactatdehydrogenase (LDH) Experimente durchgeführt.

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse für die LDH-Experimente mit der Zelllinie PC3 und DU145 und den sE-Cadherin Konzentrationen 0,5 und 5 µg/ml dargestellt. Untersucht wurden sowohl parentale als auch Cabazitaxel und Docetaxel resistente Zellen. Eine Positivkontrolle wurde für jede Zelllinie erstellt jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur eine exemplarisch abgebildet. Um die Effekte von sE-Cadherin korrekt einschätzen zu können wurde von jeder Zelllinie passend eine nicht mit sE-Cadherin behandelte Messung durchgeführt. Alle Messproben zeigten signifikant niedrigere Messwerte als die Triton X-100 Positivkontrolle. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es außer in den DU145 Cabazitaxel Resistenten zu einer Dosis abhängigen Reduktion des LDH-Spiegels. Diese Reduktion fiel in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark aus. Sowohl für die parentalen als auch die Docetaxel resistenten PC3 Zellen konnte eine deutlichere Reduktion als in den DU145 Zellen beobachtet werden. Für die Cabazitaxel resistenten DU145 konnte durch die Behandlung mit sE-Cadherin keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Zudem kam es durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin im Gegensatz zu allen anderen Messproben zu einem Anstieg des LDH-Spiegels. Für die untersuchten Zellen zeigte sich übergreifend eine reduzierte Zytotoxizität durch die Behandlung mit sE-Cadherin.

Ergebnisse

LDH Test PC3 und DU145 mit sE-Cadherin Behandlung

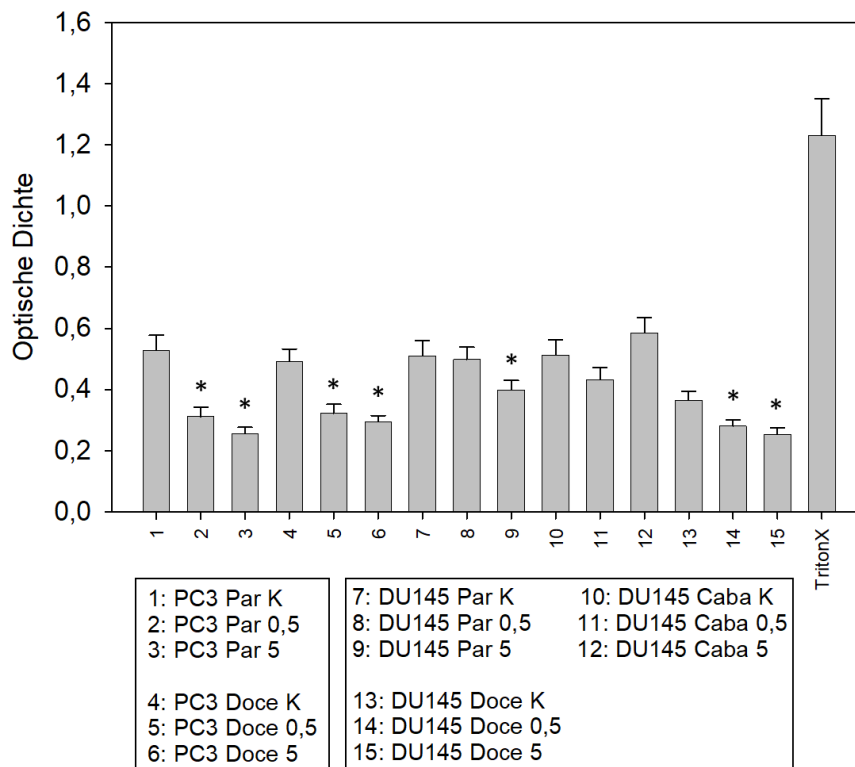


Abbildung 35: Ergebnisse für Lactatdehydrogenase-Experimente mit PC3 und DU145. K: Kontrolle, Par: Parental, Caba: Cabazitaxel, Doce: Docetaxel. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n = 3.

4.7 CDD-Test

In Abbildung 36 sind repräsentativ die Ergebnisse für die Cell Death Detection-Experimente mit den Prostatakarzinom Zelllinien PC3 und DU145 eingefügt. Untersucht wurde der Effekt von 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin auf die parentalen und Cabazitaxel bzw. Docetaxel resistenten Zellen. Hierbei konnten signifikante Unterschiede in der Intensität des Effekts beobachtet werden. Im Verhältnis zu der Staurosporin Positivkontrolle konnten in den parentalen PC3 Zellen nur sehr geringe apoptotische Effekte beobachtet werden. Durch die Behandlung mit 0,5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu einer Reduktion der Apoptose. Die 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung führte zu einer geringeren Reduktion. Für die Docetaxel resistenten PC3 Zellen zeigte sich ein entgegengesetzter Effekt. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es zu einem Anstieg der Apoptose. Dieser fiel gegenüber der unbehandelten Kontrolle bei 5 µg/ml sE-Cadherin signifikant aus, lag jedoch deutlich unterhalb der Positivkontrolle. Für die Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen konnte ein signifikanter Effekt auf die Apoptose

Ergebnisse

dokumentiert werden. 0,5 µg/ml sE-Cadherin führte zu keiner Veränderung, wohingegen es durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose kam. Die Docetaxel resistenten DU145 Zellen zeigten von allen untersuchten Zelllinien die deutlichsten Veränderungen unter sE-Cadherin. So kam es bereits bei 0,5 µg/ml sE-Cadherin zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose Ereignisse. Dieser Effekt wurde durch die höhere 5 µg/ml sE-Cadherin Konzentration noch einmal verstärkt. Außer bei den beiden Taxan resistenten DU145 Zellen, bei denen es zu reduzierten apoptotischen Effekten kam, zeigten sich keine signifikanten Effekte durch sE-Cadherin.

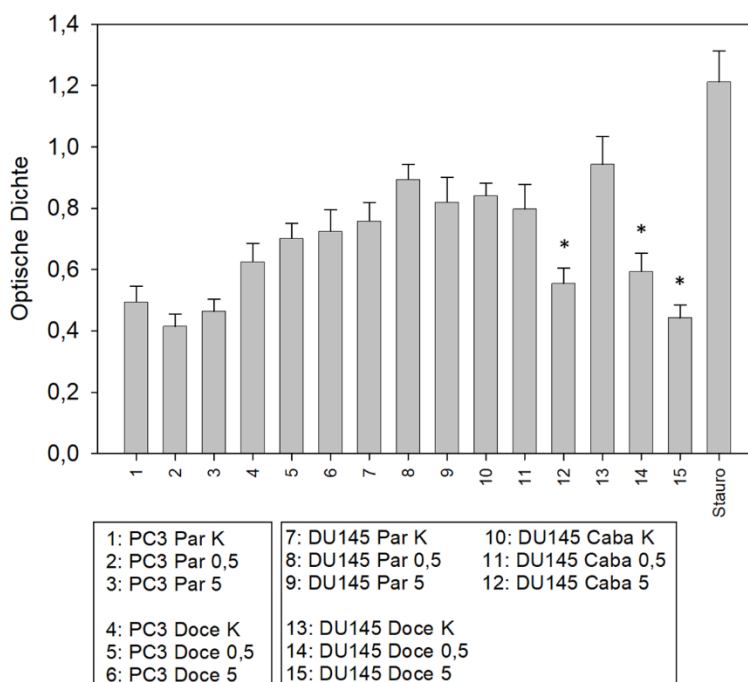


Abbildung 36: Ergebnisse für die CDD-Experimente mit den Zelllinien PC3 und DU145. K: Kontrolle, Par: Parental, Caba: Cabazitaxel, Doce: Docetaxel. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von n = 3.

4.8 Adhäsion an extrazellulärer Matrix und Endothel

In Abbildung 37 – 41 sind die Ergebnisse für die Adhäsion Versuche mit PC3 und DU145 Zellen (Taxan sensitiv und resistent) mit 0,5 bzw. 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung dargestellt. Die Zellzahlen wurden auf Plastik, Kollagen und Fibronectin pro 0,25 mm² bestimmt.

PC3 Parental (Abb.37)

Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es in den parentalen PC3 Zellen zu einer Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen. Dabei konnte mit steigender sE-Cadherin Konzentration eine Verstärkung des reduzierenden Effektes beobachtet werden. Dieser Effekt konnte sowohl auf

Ergebnisse

Plastik als auch auf Kollagen und Fibronectin beobachtet werden. Auf Plastik konnte nur eine geringe Adhäsion beobachtet werden. Auf den beschichteten Untergründen konnten signifikant mehr Zellen adhären. Durch spezifische Anheftung an EZM konnten auf Kollagen gegenüber Plastik etwa vier Mal mehr und auf Fibronectin etwa drei Mal mehr Zellen in demselben Zeitraum adhären. Die Reduktion der adhären PC3 Zellen lag auf Kollagen bei einer sE-Cadherin Konzentration von 5 µg/ml bei etwa 31 % und auf Fibronectin bei etwa 38 % gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

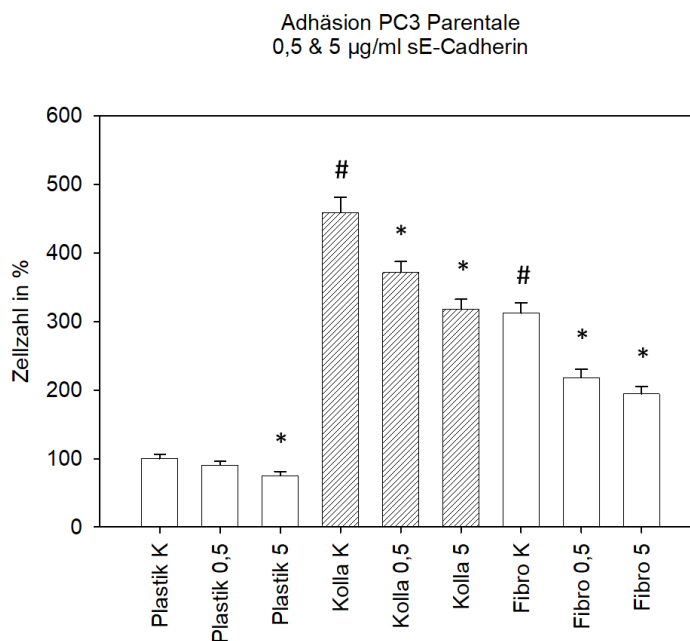


Abbildung 37: Ergebnisse für die Adhäsions-Versuche mit parentalen PC3. Untergrund: Plastik: unbehandelt; Kollagen: 400 µg/ml „Collagen G“; Fibronectin: 100 µg/ml Fibronectin. K = Kontrolle. Verwendete Konzentrationen: 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. # = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen auf Plastik. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 5.

PC3 Docetaxel resistent (Abb.38)

Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zu einer Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen. Auf Plastik konnte nur eine geringe Adhäsion beobachtet werden. Dabei konnte mit steigender sE-Cadherin Konzentration eine Verstärkung des reduzierenden Effektes auf den Kollagen und Fibronectin beschichteten Wells beobachtet werden. Auf Kollagen konnten gegenüber Plastik etwa dreieinhalb Mal mehr und auf Fibronectin fast vier Mal mehr Zellen in demselben Zeitraum adhären. Die Anzahl adhärenter Zellen lag auf Kollagen bei einer sE-Cadherin Konzentration von 5 µg/ml etwa 34 % und auf Fibronectin etwa 37 % niedriger gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Ergebnisse

Adhäsion PC3 Docetaxel Resistente
0,5 & 5 µg/ml sE-Cadherin

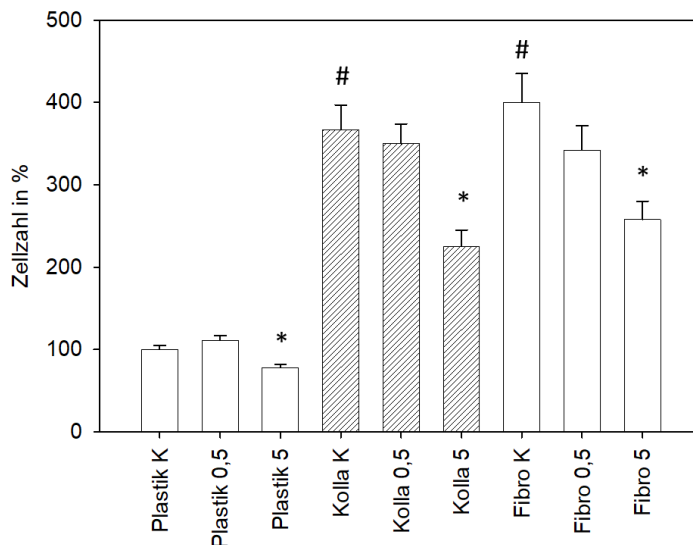


Abbildung 38: Ergebnisse für die Adhäsions-Versuche mit Docetaxel resistenten PC3. Untergrund: Plastik: unbehandelt; Kollagen: 400 µg/ml „Collagen G“; Fibronectin: 100 µg/ml Fibronectin. K = Kontrolle. Verwendete Konzentrationen: 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. # = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen auf Plastik. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 5.

DU145 Parental (Abb. 39)

Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es in den parentalen DU145 Zellen zu einer Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen. Dabei konnte mit steigender sE-Cadherin Konzentration eine Verstärkung des reduzierenden Effektes auf den Kollagen und Fibronectin beschichteten Wells beobachtet werden. Auf Plastik konnten nur eine geringe Adhäsion beobachtet werden. Auf Kollagen und Fibronectin fiel der Effekt mit einer Reduktion adhärenter Zellen um 47 % bzw. 37 % gegenüber den unbehandelten Kontrollen signifikant aus. Im Vergleich zur Anzahl an angewachsenen Zellen auf dem unbeschichteten Plastik konnten auf den beschichteten Untergründen signifikant mehr Zellen adhäreren. Auf Kollagen konnten gegenüber Plastik etwa vier Mal mehr und auf Fibronectin etwa fünf Mal mehr Zellen in demselben Zeitraum adhäreren.

Ergebnisse

Adhäsion DU145 Parentale
0,5 & 5 µg/ml sE-Cadherin

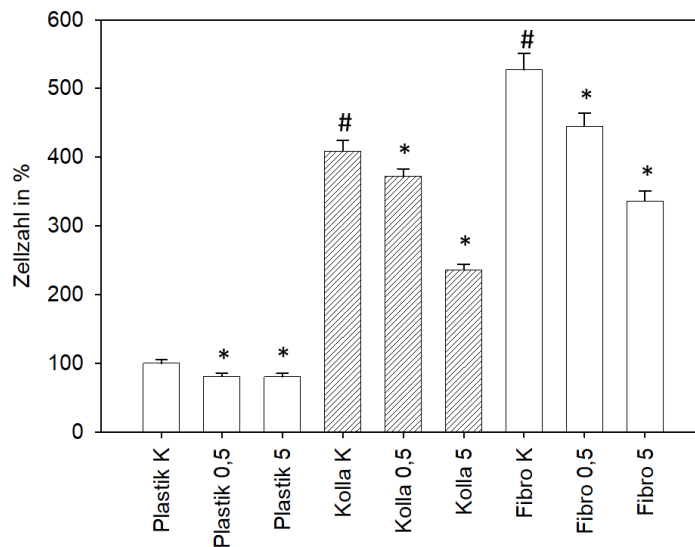


Abbildung 39: Ergebnisse für die Adhäsions-Versuche mit parentalen DU145. Untergrund: Plastik: unbehandelt; Kollagen: 400 µg/ml „Collagen G“; Fibronektin: 100 µg/ml Fibronektin. K = Kontrolle. Verwendete Konzentrationen: 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. # = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen auf Plastik. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 5.

DU145 Cabazitaxel resistent (Abb.40)

Auf Plastik konnte nur eine geringe Adhäsion beobachtet werden. Die Anzahl adhärenter Zellen auf Kollagen war etwa fünf Mal und auf Fibronektin etwa viereinhalb Mal höher als auf Plastik. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es in den Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen zu einer Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen. Dabei konnte mit steigender sE-Cadherin Konzentration kein einheitlicher Effekt auf den verschiedenen Untergründen beobachtet werden. Auf dem unbehandelten Plastik Untergrund kam es bei 0,5 µg/ml sE-Cadherin zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenter DU145 Zellen. Bei 5 µg/ml sE-Cadherin konnte hingegen keine signifikante Veränderung in der Anzahl adhärenter Zellen beobachtet werden. Auf Kollagen konnte ein zum Plastik vergleichbarer Effekt festgestellt werden. Durch 0,5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen. Durch die höhere Konzentration von 5 µg/ml sE-Cadherin wurde eine verminderte Zellzahl gezählt, jedoch viel dieser Effekt nicht signifikant aus. Auf Fibronektin kam es durch 0,5 µg/ml zu einem leichten Anstieg der Adhäsion wohingegen 5 µg/ml sE-Cadherin eine signifikante Reduktion der Adhäsionsaktivität für die Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen induzierte.

Ergebnisse

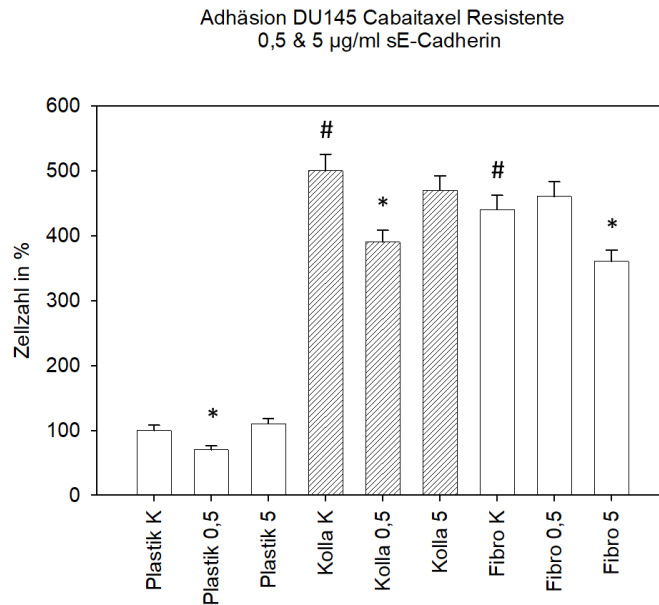


Abbildung 40: Ergebnisse für Adhäsions-Versuche der Cabazitaxel resistenten DU145. Untergrund: Plastik: unbeschichtet; Kollagen: 400 µg/ml „Collagen G“; Fibronektin: 100 µg/ml Fibronektin. K = Kontrolle. Verwendete Konzentrationen: 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. * = Signifikante Differenz zu unbeschichteten Kontrollzellen. # = Signifikante Differenz zu unbeschichteten Kontrollzellen auf Plastik. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 5.

DU145 Docetaxel resistent (Abb. 41)

Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es in den Docetaxel resistenten DU145 Zellen zu einem Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen. Auf Plastik konnte nur eine geringe Adhäsion beobachtet werden. Auf Kollagen und Fibronektin war die Adhäsion deutlich stärker und wurde durch eine sE-Cadherin Behandlung weiter verstärkt. Auf Kollagen gestaltete sich der Anstieg adhärenter Zellen in Relation zur steigenden sE-Cadherin Konzentration. Auf Fibronektin stieg die Anzahl adhärenter Zellen durch 0,5 µg/ml sE-Cadherin stärker an als durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin. Auf dem unbeschichteten Plastikuntergrund konnte durch die Behandlung mit 0,5 µg/ml sE-Cadherin ein Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen beobachtet werden. Die Konzentration von 5 µg/ml sE-Cadherin konnte hingegen keine signifikante Veränderung bewirken. Im Vergleich zur Anzahl an angewachsenen Zellen auf dem unbeschichteten Plastik konnten auf den beschichteten Untergründen signifikant mehr Zellen adhären. Auf Kollagen konnten gegenüber Plastik etwa vier Mal mehr und auf Fibronektin etwa zweieinhalb Mal mehr Zellen in demselben Zeitraum adhären.

Ergebnisse

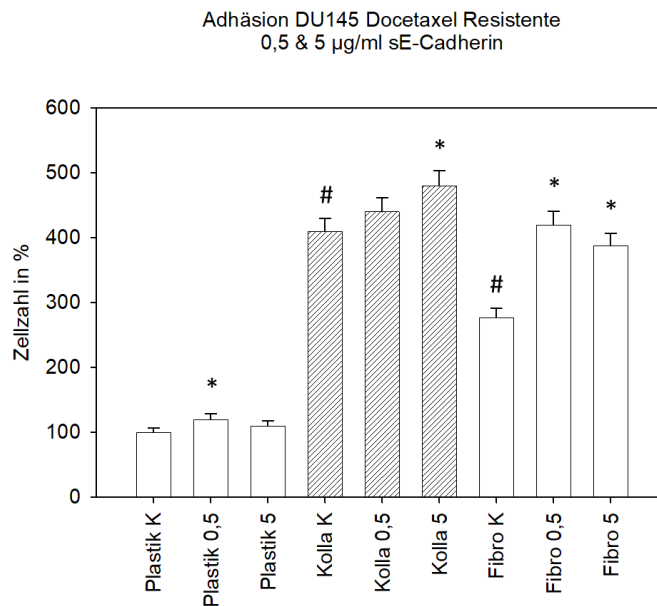


Abbildung 41: Ergebnisse für Adhäsions-Versuche der Docetaxel resistenten DU145. Untergrund: Plastik: unbehandelt; Kollagen: 400 µg/ml „Collagen G“; Fibronectin: 100 µg/ml Fibronectin. K = Kontrolle. Verwendete Konzentrationen: 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. # = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen auf Plastik. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 5.

PC3 und DU145 Zellen auf Endothel

In Abbildung 42 sind die Ergebnisse für Adhäsionsversuche mit den Zelllinien PC3 und DU145 und den entsprechenden Taxan resistenten Zelllinien auf HMEC-1 (Endothelzellen) dargestellt. Die parentalen PC3 und DU145 Kontrollzellen wurden jeweils als 100 % Wert angesetzt und anschließend alle anderen Zellzählungen der entsprechenden Zelllinie ins Verhältnis dazu gesetzt. Bereits ohne eine sE-Cadherin Behandlungen konnten durch die Taxan Resistenzen unterschiedliche adhärenzte Zellzahlen beobachtet werden. Die Docetaxel resistenten PC3 Zellen konnten im gleichen Zeitraum mit etwa 15 % mehr Zellen am Endothel adhäreren. Die parentalen und Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen konnten mit etwa 25 % mehr Zellen anheften. Lediglich die Docetaxel resistenten DU145 Zellen wiesen eine um etwa 20 % niedrigere Anzahl an adhärenzten Zellen auf. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es in allen untersuchten Zelllinien zu einer reduzierten Adhäsionsaktivität. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Intensität des reduzierenden Effekts zwischen den einzelnen Zelllinien variierte. Sowohl in den parentalen als auch in den Docetaxel resistenten PC3 kam es durch die 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung zu einer signifikanten Reduktion. Für die parentalen und Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen konnte eine nicht signifikante Reduktion der Anzahl adhärenzten Zellen dokumentiert werden. Für die Docetaxel resistenten DU145

Ergebnisse

Zellen konnte eine reduzierte Anzahl adhären Zellen gegenüber parentalen DU145 beobachtet werden, welche durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin signifikant reduziert wurde.

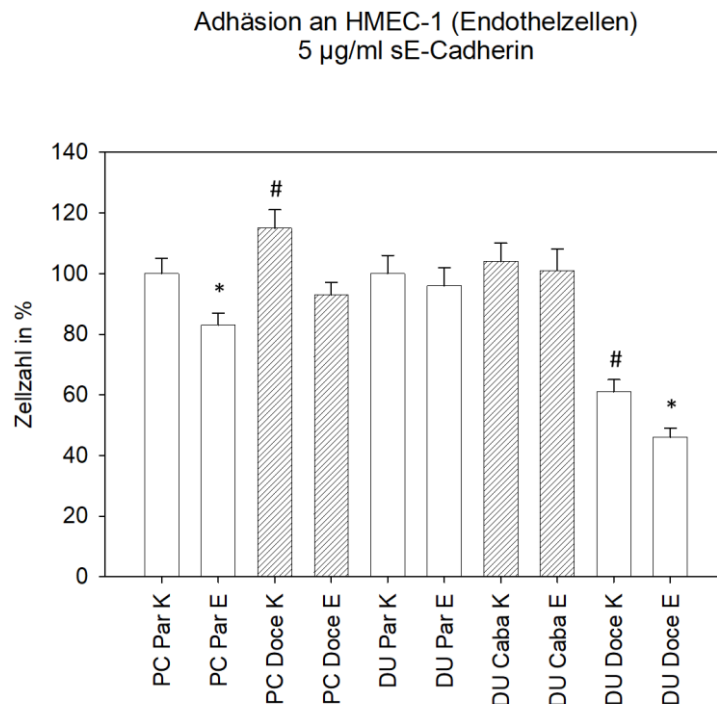


Abbildung 42: Ergebnisse für Adhäsions-Versuche mit PC3 und DU145 auf Endothel (HMEC-1). Alle Zellen wurden in 6-Well-Platten, welche konfluent mit HMEC-1 bewachsen waren ausgesät. K = Zellen ohne sE-Cadherin Behandlung. E = Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin. # = Signifikante Differenz zu unbehandelten, parentalen Kontrollzellen. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

4.9 Chemotaxis

PC3

Abbildung 43 (A) präsentiert die Ergebnisse für die Chemotaxis-Versuche mit der Zelllinie PC3, welche mit einer 5 µg/ml sE-Cadherin Konzentration behandelt wurden. Durch eine 72stündige Inkubation mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es in den parentalen PC3 Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Chemotaxis. Die Docetaxel resistenten Zellen wiesen gegenüber den parentalen Zellen bereits ohne sE-Cadherin eine leicht geringere Chemotaxis auf. Diese geringere Chemotaxis wurde durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin ebenfalls signifikant gesteigert.

Ergebnisse

DU145

In Abbildung 43 (B) sind die Ergebnisse für die Chemotaxis-Versuche mit der Zelllinie DU145, welche mit einer 5 µg/ml sE-Cadherin Konzentration behandelt wurden illustriert. Durch eine 72 Stunden Inkubation mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es in allen DU145 Zellen zu einem Anstieg der Chemotaxis. Dieser Effekt fiel jedoch nur bei den parental und Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen signifikant aus.

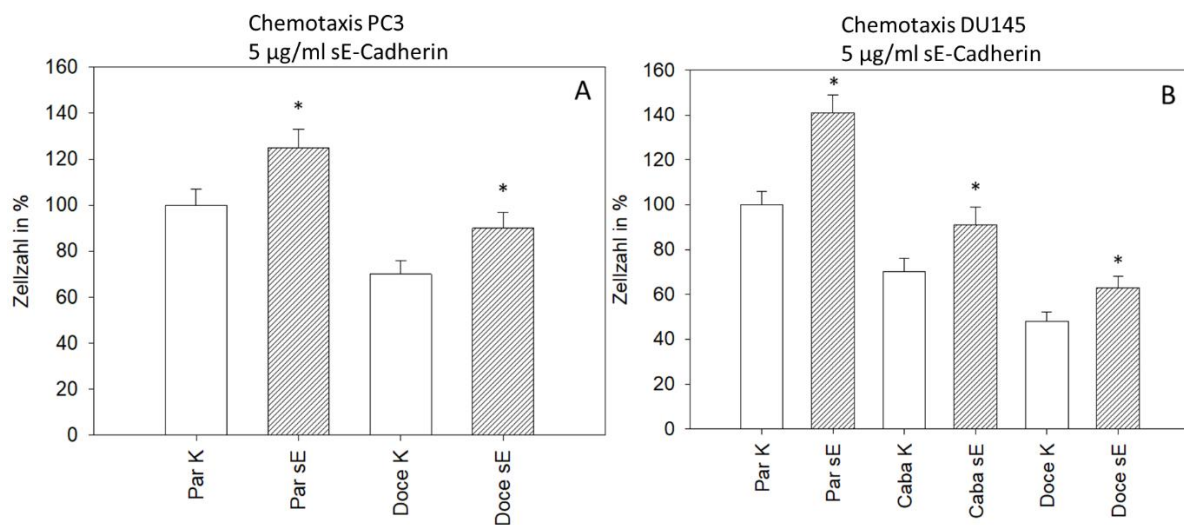


Abbildung 43: Ergebnisse für die Chemotaxis-Experimente mit PC3(A) und DU145(B) Zellen. K = Zellen ohne sE-Cadherin Behandlung. sE = Zellen mit 5 µg/ml sE-Cadherin. Par: Parental, Caba: Cabazitaxel, Doce: Docetaxel resistent * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 7.

4.10 Scratch-Versuch

In den Abbildungen 44 bis 56 sind Aufnahmen eines eingekratzten Zellrasens zu sehen, um das Schließen der Lücken zu demonstrieren. Dabei wurden Aufnahmen derselben Positionen nach bestimmten Zeitintervallen erstellt. Abgebildet werden je drei Messzeitpunkte: „Startzustand“, ein halb verschlossener und ein sich verschließender „Scratch“. Am Ende dieses Kapitels werden alle Ergebnisse des Scratch Versuches grafisch in einer quantitativen Auswertung veranschaulicht.

PC3 Parental: Unbehandelt (Abb.44)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter und von Zellen freier Kanal zu identifizieren. Die seitlich an den Kanal angrenzenden Zellen bildeten eine klare Kante. Nach sechs Stunden hatte sich der Scratch nur minimal verjüngt. Die vorher deutliche Kante stellte sich zu diesem

Ergebnisse

Zeitpunkt weiterhin klar zum Scratch abgetrennt dar. Nach 12 Stunden konnte sich der Scratch-Kanal nur minimal zum vorherigen Messzeitpunkt verschmälern.

PC3 Parental: 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt (Abb.44)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter und von Zellen freier Kanal zu identifizieren. Die seitlich an den Kanal angrenzenden Zellen bildeten eine klare Kante. Nach sechs Stunden hatte sich der Scratch leicht verjüngt, jedoch deutlicher als in den parentalen ohne sE-Cadherin Behandlung. Die vorher deutliche Kante stellte sich zu diesem Zeitpunkt weiterhin klar zum Scratch abgetrennt dar. Nach 12 Stunden konnte sich der Scratch-Kanal bereits deutlicher verschmälern als bei parentalen PC3 Zellen ohne 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung.

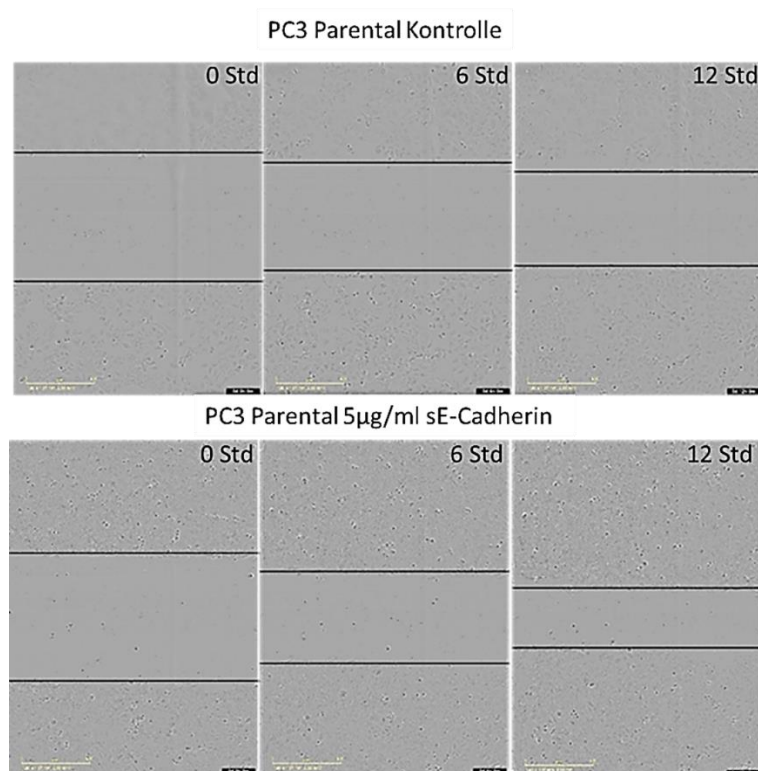


Abbildung 44: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit parentalen PC3. Mit und ohne 5 µg/ml sE-Cadherin behandelte, parentale PC3. Abgebildet sind von links nach rechts die drei Messzeitpunkte: 0, 6 und 12 Stunden. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

PC3 Docetaxel resistent: Unbehandelt (Abb.45)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter und von Zellen freier Kanal zu identifizieren. Bei den Docetaxel resistenten PC3 Zellen kam es im Gegensatz zu den unbehandelten, parentalen PC3 Zellen zu einem eher ausgefranzten Rand des Scratch-Kanals. Dieses Phänomen konnte sowohl in den Triplett Ansätzen innerhalb eines Versuches als auch in den Wiederholungen beobachtet werden. Zudem konnte beobachtet werden, dass sich lediglich ein subkonfluent

Ergebnisse

Zellrasen im Gegensatz zu den unbehandelten, parentalen PC3 Zellen ausbildete. Nach 6 Stunden hatte sich der Scratch deutlich weniger verkleinert als in den unbehandelten, parentalen PC3 Zellen. Der bereits zuvor ungleiche Rand des Scratches wurde mit voranschreitender Zeit nicht geschlossener und im Gegenteil durch einzelne Zellen im Scratch-Kanal noch mehr aufgelöst. Nach 12 Stunden war der Scratch noch immer deutlich geöffnet und nur von einigen wenigen Zellen bewachsen.

PC3 Docetaxel resistent: 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt (Abb.45)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter Kanal zu identifizieren. Zu diesem Zeitpunkt konnten, vergleichbar zu den unbehandelten, Docetaxel resistenten PC3, einzelne Zellen im Scratch-Kanal beobachtet werden. Die sE-Cadherin behandelten, Docetaxel resistenten PC3 Zellen bildeten im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen einen deutlichen Rand zum Scratch-Kanal. Nach 6 Stunden hatte sich der Scratch vergleichbar zu den Kontrollen verkleinert. Der zuvor deutliche Rand des Scratches wurde mit voranschreitender Zeit durch einzelne Zellen im Scratch-Kanal weniger deutlich. Nach 12 Stunden war der Scratch-Kanal deutlich mit Zellen durchzogen.

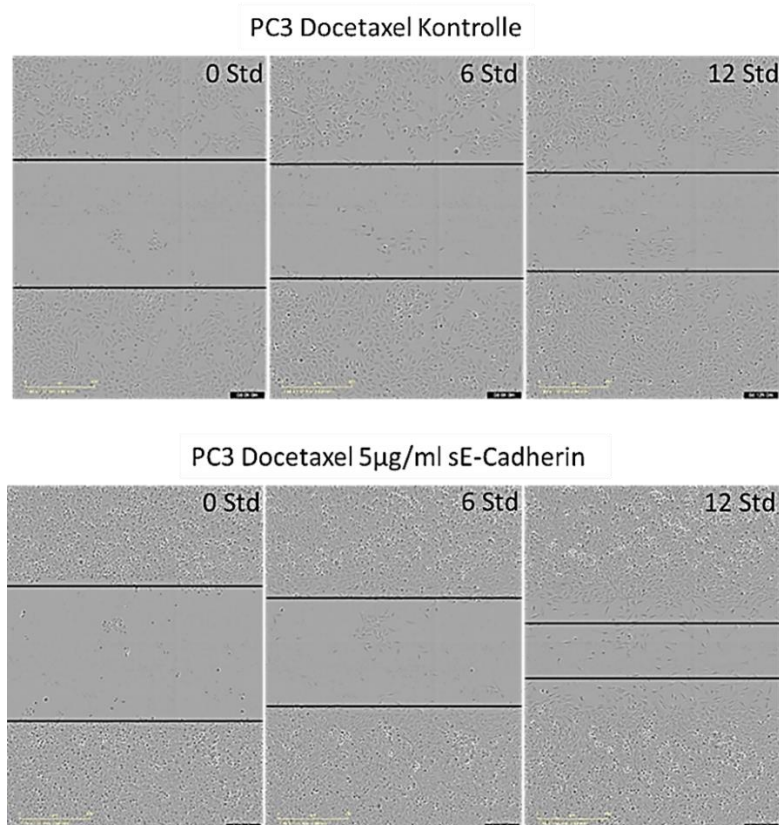


Abbildung 45: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit Docetaxel resistenten PC3. Mit und ohne 5 µg/ml sE-Cadherin behandelte, Docetaxel resistente PC3 Zellen. Abgebildet sind von links nach rechts die drei Messzeitpunkte: 0, 6 und 12 Stunden. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

Ergebnisse

Ergänzung

In Abbildung 46 ist eine Übersicht der Ergebnisse der Scratch-Versuche mit der parentalen und Docetaxel resistenten Prostatakarzinomzelllinie PC3 zu sehen. Im Abgleich mit den zuvor präsentierten Abbildungen der Scratch-Versuche ist zu erkennen, dass der Prozess des sich verschließenden Scratches gleichmäßig über den 12-stündigen Beobachtungszeitraum abläuft. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin war eine signifikant beschleunigte horizontale Migration sowohl bei parentalen als auch Docetaxel resistenten Zellen zu beobachten. Darüber hinaus fällt auf, dass die Intensität des Effekts nicht durch eine Docetaxel induzierte Resistenz verändert wird.

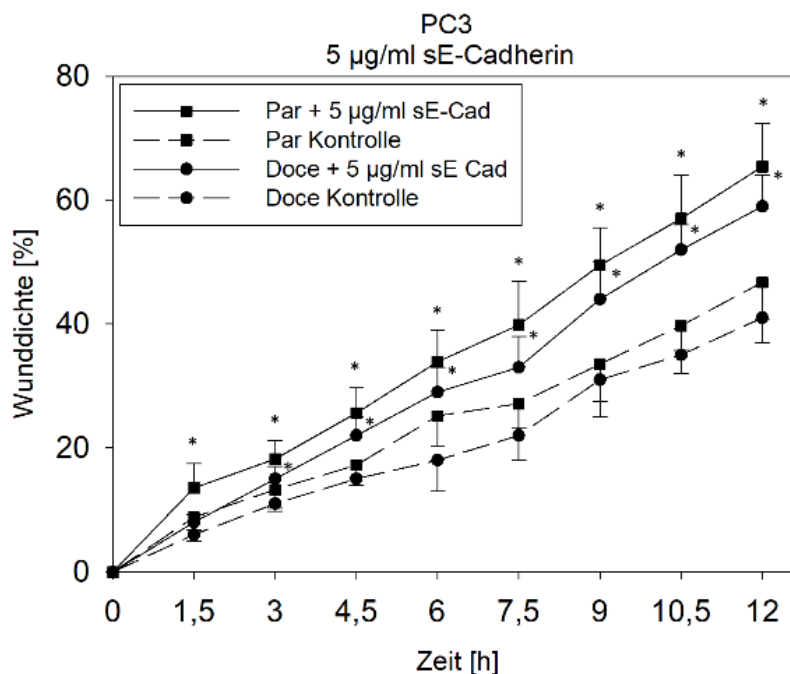


Abbildung 46: Zusammenfassende Grafik der „Wunddicke in %“ bei PC3. Parentale und Docetaxel resistente PC3. Die Abszisse zeigt die Messzeitpunkte Stunden [h]. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen.

DU145 Parental: Unbehandelt (Abb. 47)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter, zellfreier Kanal zu identifizieren. Die Zellen bildeten einen konfluenten Zellrasen, welcher sich durch einen klaren Rand zum Scratch-Kanal abtrennte. Nach 6 Stunden hatte sich der Scratch-Kanal nur minimal verkleinert. Der zuvor deutliche Rand des Scratches war auch nach dieser Zeit gut zu erkennen und wurde lediglich durch einige, wenige Zellen im Scratch-Kanal aufgelöst. Nach 12 Stunden war weiterhin ein deutlicher Scratch-Kanal zu beobachten.

Ergebnisse

DU145 Parental: 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt (Abb.47)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter, zellfreier Kanal zu identifizieren. Die Zellen bildeten einen konfluenten Zellrasen, welcher sich durch einen klaren Rand zum Scratch-Kanal abzeichnete. Nach 6 Stunden hatte sich der Scratch-Kanal bereits deutlich verkleinert. Der zuvor deutliche Rand des Scratches war auch nach dieser Zeit noch klar abgegrenzt. Nach 12 Stunden war der Scratch fast geschlossen.

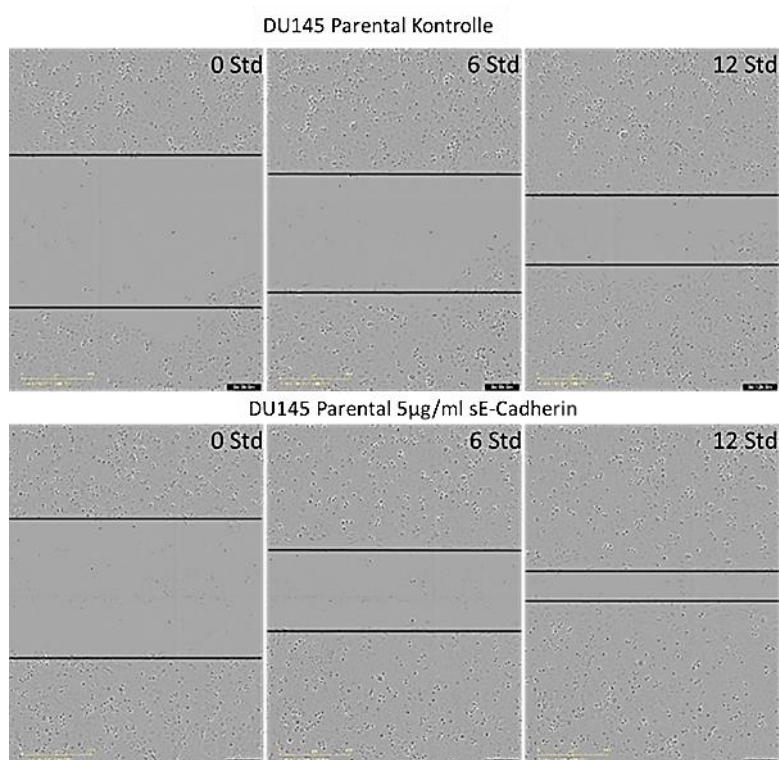


Abbildung 47: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit parentalen DU145. Mit und ohne 5 µg/ml sE-Cadherin behandelte, parentale DU145. Abgebildet sind von links nach rechts die drei Messzeitpunkte: 0, 6 und 12 Stunden. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

DU145 Cabazitaxel: Unbehandelt (Abb.48)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter Kanal zu identifizieren. Im Kanal waren nur wenige einzelne Zellen zu beobachten. Die Zellen bildeten einen konfluenten Zellrasen, welcher sich durch einen klaren Rand zu dem von Zellen freigekehrzten Bereich abtrennte. Nach 12 Stunden hatte sich der Scratch-Kanal nur minimal verkleinert. Es muss bei den Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen auf die doppelt so lange Wachstumszeit hingewiesen werden. Der zuvor deutliche Rand des Scratches war auch nach dieser Zeit gut zu erkennen und wurde lediglich durch einige, wenige Zellen im Scratch-Kanal aufgelöst. Nach 24 Stunden war noch immer ein deutlicher Scratch-Kanal vorhanden.

Ergebnisse

DU145 Cabazitaxel: 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt (Abb.48)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter Kanal zu identifizieren. Vereinzelt konnten jedoch Zellen im Bereich des Kanals festgestellt werden. Die Zellen bildeten größtenteils einen konfluenten Zellrasen, welcher sich durch einen klaren Rand zum Scratch-Kanal abzeichnete. Nur in wenigen Bereichen präsentierten sich subkonfluente Zellareale. Nach 12 Stunden hatte sich der Scratch-Kanal bereits deutlich verkleinert. Der zuvor deutliche Rand des Scratches war auch nach dieser Zeit auch weiterhin klar vom Scratch Kanal abgegrenzt. Nach 24 Stunden war der Scratch-Kanal noch immer vergleichbar zu den unbehandelten, Cabazitaxel resistenten DU145 geöffnet.

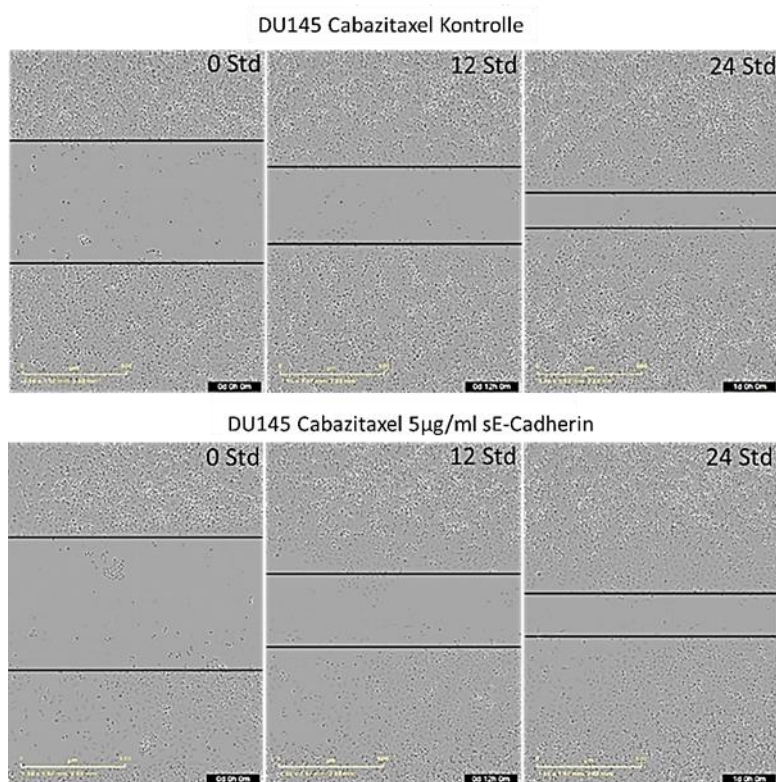


Abbildung 48: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit Cabazitaxel resistenten DU145. Mit und ohne 5 µg/ml sE-Cadherin behandelte, Cabazitaxel resistente DU145. Abgebildet sind von links nach rechts die drei Messzeitpunkte: 0 h, 12 h und 24 h. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

DU145 Docetaxel: Unbehandelt (Abb.49)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter, zellfreier Kanal zu identifizieren. Die Zellen bildeten einen konfluenten Zellrasen, welcher sich durch einen klaren Rand zu dem von Zellen freige kratzten Bereich abtrennte. Nach 12 Stunden hatte sich der Scratch-Kanal nur minimal verkleinert. Der zuvor deutliche Rand des Scratches war auch nach dieser Zeit gut zu erkennen.

Ergebnisse

Die letzte Messung wurde nach 24 Stunden durchgeführt und wies noch immer einen deutlichen Scratch-Kanal auf.

DU145 Docetaxel: 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt (Abb.49)

Nach Null Stunden war ein deutlicher, breiter, zellfreier Kanal zu identifizieren. Die Zellen bildeten einen konfluenten Zellrasen, welcher sich durch einen klaren Rand zu dem von Zellen freigelegten Bereich abtrennte. Nach 12 Stunden hatte sich der Scratch-Kanal bereits signifikant verjüngt. Der zuvor deutliche Rand des Scratches war auch nach dieser Zeit gut zu erkennen. Die letzte abgebildete Messung wurde nach 18 Stunden durchgeführt, da sich der Scratch-Kanal zu diesem Zeitpunkt bereits nahezu vollständig verschlossen hatte. Nach 24 Stunden war der Scratch-Kanal bereits verschlossen und Zellen wuchsen im Bereich der aufeinander gestoßenen Scratch-Kanal Ränder bereits übereinander. Die sE-Cadherin Behandlung führte im Vergleich zu den unbehandelten, Docetaxel resistenten DU145 Zellen, welche auch nach 24 Stunden noch einen deutlichen Scratch-Kanal aufwiesen, zu einem signifikanten Anstieg der horizontalen Migration.

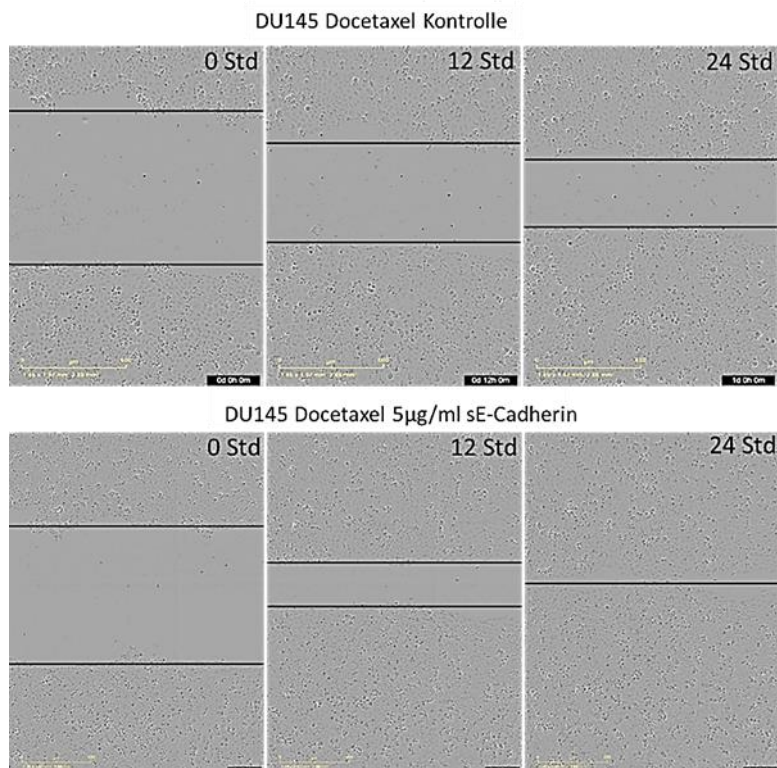


Abbildung 49: Ergebnisse für die Scratch-Versuche mit Docetaxel resistenten DU145. Mit und ohne 5 µg/ml sE-Cadherin behandelte Docetaxel resistente DU145. Abgebildet sind von links nach rechts die drei Messzeitpunkte: 0 h, 12 h und 24 h. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 6.

Ergebnisse

Ergänzung

In Abbildung 50 ist eine Übersicht der Ergebnisse der Scratch-Versuche mit der Prostatakarzinomzelllinie DU145 zu sehen. Im Abgleich mit den zuvor präsentierten Abbildungen der Scratch-Versuche ist zu erkennen, dass der Prozess des sich verschließenden Scratches gleichmäßig über den 24-stündigen Beobachtungszeitraum ablief. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin war eine signifikant beschleunigte horizontale Migration sowohl bei parentalen und Docetaxel resistenten DU145 Zellen zu beobachten. Für die Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen konnte kein signifikanter Anstieg der horizontalen Migration festgestellt werden.

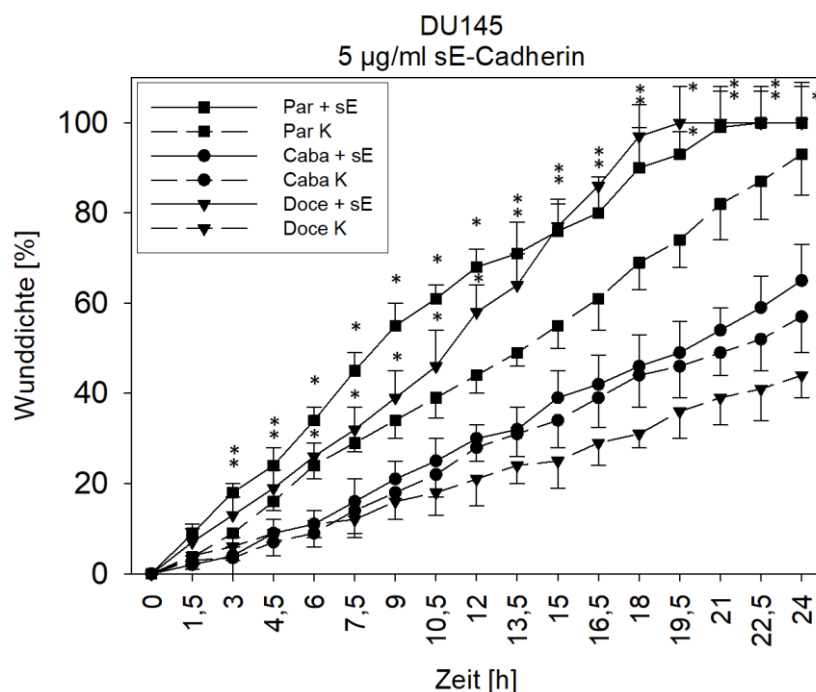


Abbildung 50: Ergebnisse der „Relative Wound Density in %“ von DU145. Parentale, Cabazitaxel und Docetaxel resistente DU145. Die Abszisse zeigt die Messzeitpunkte in Stunden [h]. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen.

4.11 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot-Experiments konnte sowohl die intrazelluläre als auch die membranständige Expression verschiedener Proteine untersucht werden. Da es durch die Behandlung mit sE-Cadherin zu Verschiebungen der prozentualen Anteile des Zellzyklus kam, wurden verschiedene, für den Zellzyklus entscheidende Proteine untersucht. In Abbildung 51 sind repräsentative Banden für die einzelnen Messungen zu sehen. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es zu einer Reduktion der CDK 1 und CDK 2 Expression bei parentalen

Ergebnisse

und Docetaxel resistenten PC3 Zellen. Bei den DU145 Zellen konnte, außer bei den Cabazitaxel resistenten Zellen, ebenfalls eine Reduktion von CDK 1 beobachtet werden. CDK 2 wurde hingegen nur in den parentalen DU145 Zellen reduziert, hingegen in den beiden Taxan resistenten DU145 Zellen erhöht. In den parentalen und Docetaxel resistenten PC3 Zellen induzierte die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin eine reduzierte Expression der beiden Proteine Cyclin A und Cyclin B. Bei den DU145 Zellen zeigte sich für diese beiden Proteine kein einheitlicher Effekt durch sE-Cadherin. Sowohl die parentalen als auch die Docetaxel resistenten DU145 Zellen veränderten die Expression von Cyclin A und B nicht. In den Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen konnte sich jedoch eine erhöhte Expression von Cyclin A und B nachweisen lassen, welche vergleichbar zur Veränderung von CDK 1 und 2 ist. Die Detektion der phosphorylierten Varianten von CDK 1 und 2 war für die Zelllinie PC3 nicht möglich. Lediglich DU145 zeigte ein Signal für die Expression von pCDK 1. Außer bei den Cabazitaxel resistenten DU145 konnte keine Veränderung der Expression dokumentiert werden. Bei diesen Zellen konnte eine kräftigere pCDK 1 Bande unter einer 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung beobachtet werden.

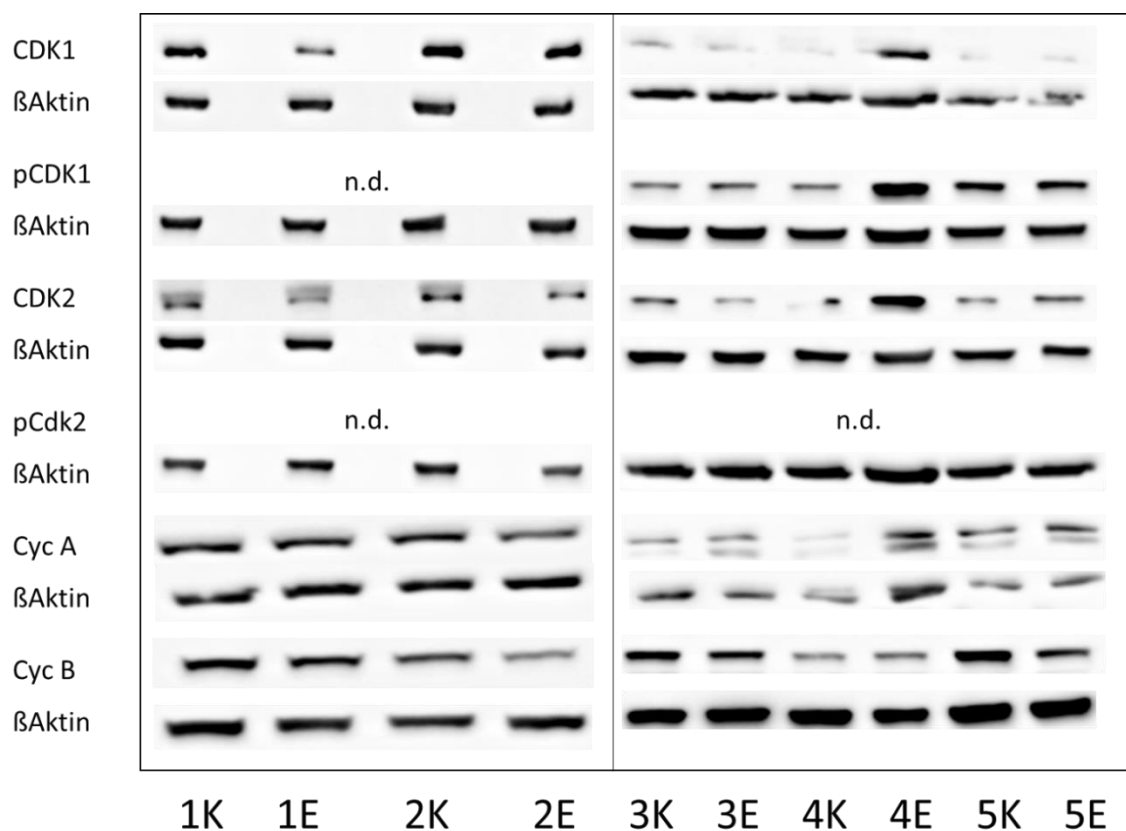


Abbildung 51: Western Blot Ergebnisse für PC3 und DU145. Sowohl unbehandelte Zellen (K), als auch mit 5 µg/ml sE-Cadherin (E) für 72 Stunden behandelte Zellen. 1 = PC3 Parental; 2 = PC3 Docetaxel; 3 = DU145 Parental; 4 = DU145 Cabazitaxel; 5 = DU145 Docetaxel. n.d = Nicht detektierbar. n = 4

4.12 Konfokale Mikroskopie

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse für die Vimentin Verteilung mittels konfokaler Laser-Mikroskopie illustriert. Die folgenden Abbildungen sind im oberen Bereich aufgetrennt in die beiden Färbungen mit einer jeweiligen Einzelkanalanzeige. Darunter ist eine übereinander gelegte Darstellung zu sehen, aus der exemplarisch ein Ausschnitt vergrößert dargestellt wird. Auf der linken Seite der Abbildungen sind PC3 bzw. DU145 Zellen ohne und auf der rechten Seite mit sE-Cadherin Behandlung abgebildet. In Blau sind die mittels DAPI markierten Zellkerne und in Grün die mittels „Alexa488 Vimentin Antikörper“ markierten Vimentin Strukturen zu erkennen.

PC3 parental (Abb.52)

Die Gesamtansicht veranschaulicht, dass sich die Vimentin Strukturen entweder kreisförmig oder leicht in die Länge gezogen anordneten. Zwischen den unbehandelten und den mit sE-Cadherin behandelten Zellen konnte kein Unterschied im Aufbau der Vimentin Strukturen beobachtet werden. Allerdings fällt auf, dass sich die Verteilung des Vimentins um den Zellkern herum veränderte. Bei den unbehandelten PC3 Zellen waren etwa ein Drittel aller Zellen in einer langgezogenen Struktur angeordnet. Die restlichen Zellen wiesen eine runde bzw. ovale Form auf. Die für 72 Stunden mit sE-Cadherin behandelten Zellen bildeten einen deutlich geringeren Anteil an lang gezogen Vimentin Strukturen aus.

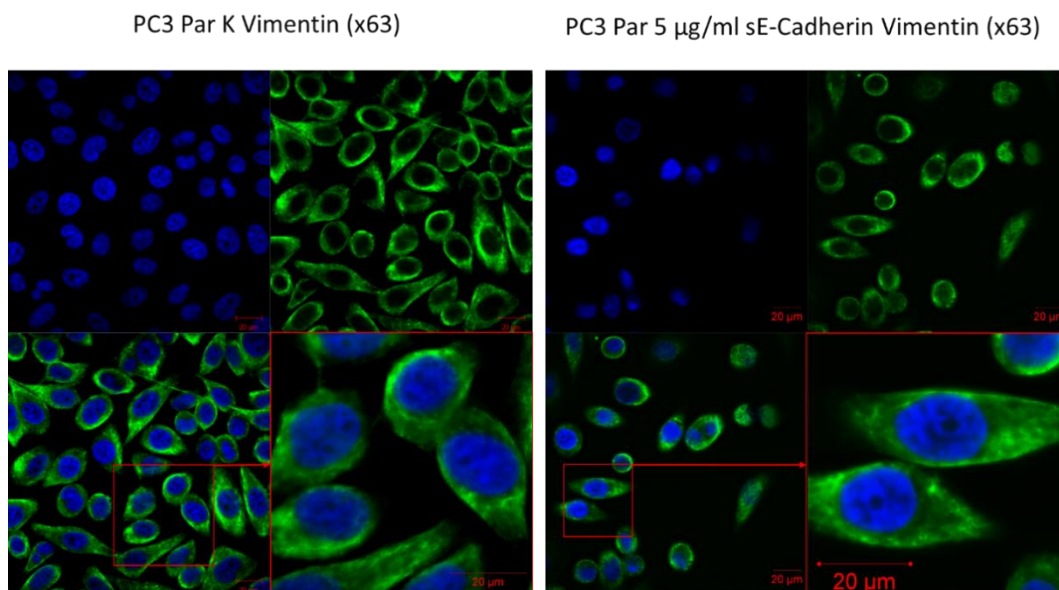


Abbildung 52: Konfokale Mikroskopie mit parentalen PC3. Links: parentale PC3 ohne sE-Cadherin Behandlung. Rechts: parentale PC3 mit 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung nach 72 Stunden Inkubationszeit. Die Zellen wurden mit DAPI (blau) und Alexa488 markiertem Vimentin Antikörper (grün) inkubiert und anschließend fixiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

Ergebnisse

PC3 Docetaxel resistent (Abb.53)

In der Gesamtansicht ist zu erkennen, dass sich die Vimentin Struktur in den meisten Fällen kreisförmig bzw. oval anordnet. Der Anteil lang gezogener Vimentin Strukturen ist im Vergleich zu den parentalen PC3 Zellen deutlich geringer. Bei den sE-Cadherin behandelten Zellen ordnete sich Vimentin ebenfalls meist kreisförmig bzw. oval um den Zellkern an. Im Vergleich konnte jedoch festgestellt werden, dass sich die Vimentin Struktur ohne eine sE-Cadherin Behandlung enger bzw. kompakter um den Zellkern anordnete. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin wurde die Vimentin Struktur weiter aufgefächert und bildete einen breiteren Ring um den Zellkern. Dadurch war zudem die Dichte der Struktur reduziert, weshalb einzelne Strukturelemente deutlicher zu erkennen waren als in den unbehandelten, Docetaxel resistenten PC3 Zellen.

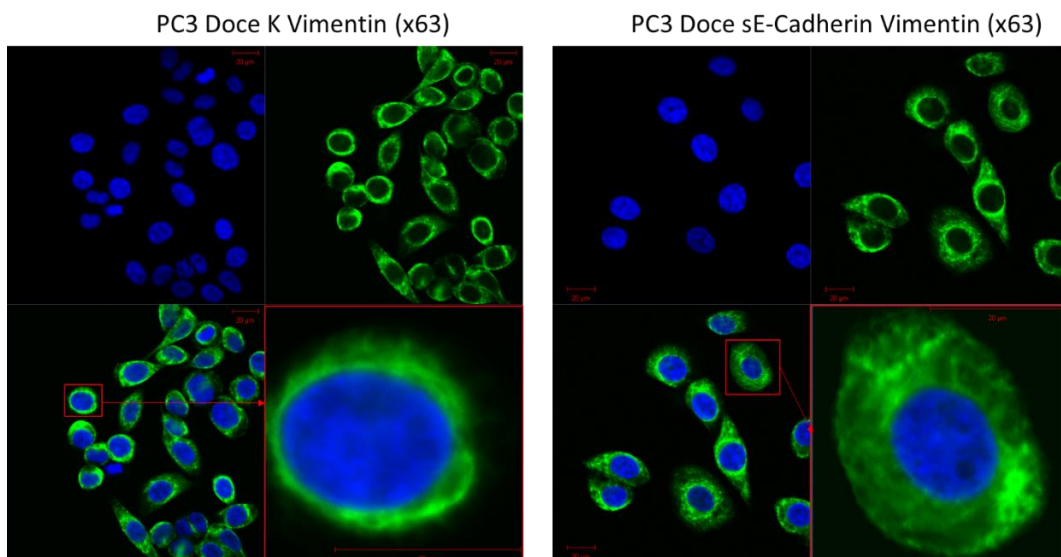


Abbildung 53: Konfokale Mikroskopie mit Docetaxel resistenten PC3. Links: Docetaxel resistente PC3 ohne sE-Cadherin Behandlung. Rechts: Docetaxel resistente PC3 mit 5 $\mu\text{g/ml}$ sE-Cadherin Behandlung nach 72 Stunden Inkubationszeit. Die Zellen wurden mit DAPI (blau) und Alexa488 markiertem Vimentin Antikörper (grün) inkubiert und anschließend fixiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von $n = 3$.

DU145 parental (Abb.54)

In der Gesamtansicht ist zu sehen, dass sich Vimentin im Gegensatz zu der Zelllinie PC3 deutlich diffuser anordnet. Es konnte keine klare Struktur um den Zellkern herum beobachtet werden. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin veränderte sich die Anordnung der Vimentin Strukturen um den Zellkern herum erheblich. Die Vimentin Strukturen waren nicht mehr so diffus und bildeten einen deutlich klareren Rand an der Außenseite der Struktur. Insgesamt

Ergebnisse

muss festgestellt werden, dass sich Vimentin nicht einheitlich in den parentalen DU145 Zellen verteilt. Eine Behandlung mit sE-Cadherin führte zu einer kompakteren Verteilung, jedoch war für diese kein einheitlicher Effekt für die untersuchten Areale festzustellen.

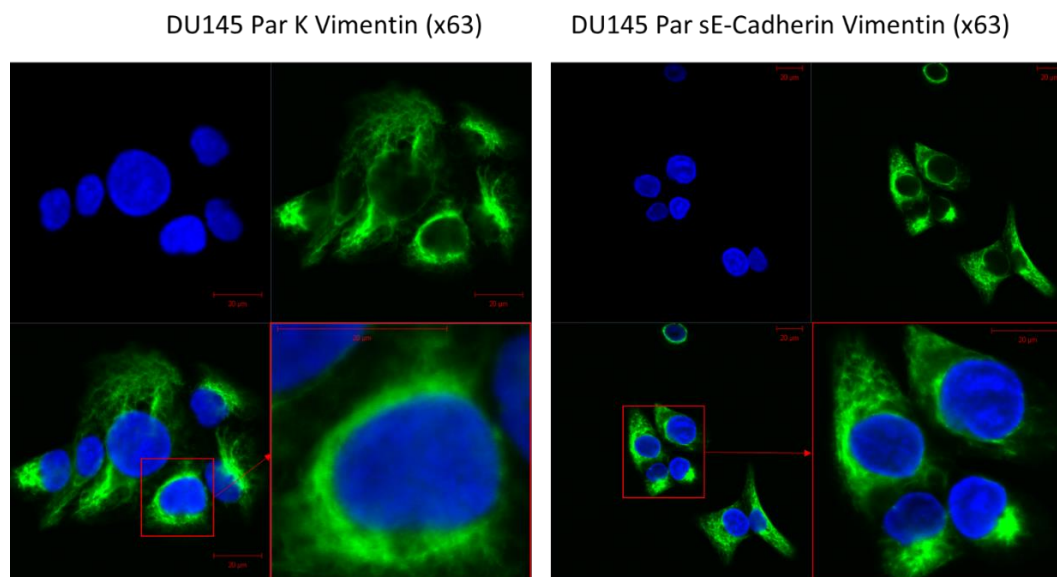


Abbildung 54: Konfokale Mikroskopie mit parentalen DU145. Links: parentale DU145 ohne sE-Cadherin Behandlung. Rechts: parentale DU145 mit 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung nach 72 Stunden Inkubationszeit. Die Zellen wurden mit DAPI (blau) und Alexa488 markiertem Vimentin Antikörper (grün) inkubiert und anschließend fixiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

DU145 Cabazitaxel resistent (Abb.55)

In der Gesamtansicht ist zu erkennen, dass sich Vimentin in den unbehandelten, Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen im Gegensatz zu den parentalen DU145 deutlich weniger diffus anordnet. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sich Vimentin ungleichmäßig um den Zellkern herum anordnet. Dadurch kam es zu einer Anhäufung von Vimentin auf einer Seite und zu einer Reduktion auf der anderen Seite des Zellkerns. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin konnten eine verminderte Vimentin Expression beobachtet werden. Das Verteilungsprofil um den Zellkern herum veränderte sich nicht signifikant. Insgesamt muss festgestellt werden, dass sich Vimentin nicht einheitlich in den Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen verteilt. Eine Behandlung mit sE-Cadherin führte zwar zu einer Veränderung der Anordnung, jedoch konnte für die untersuchten Areale kein einheitlicher Effekt festgestellt werden.

Ergebnisse

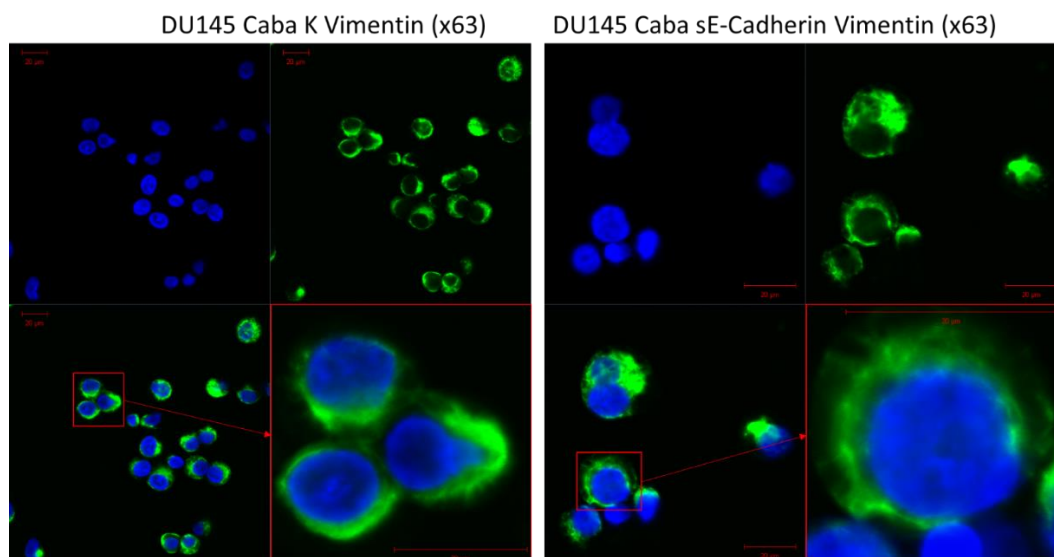


Abbildung 55: Konfokale Mikroskopie mit Cabazitaxel resistenten DU145. Links: Cabazitaxel resistente DU145 ohne sE-Cadherin Behandlung. Rechts: Cabazitaxel resistente D145 mit 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung nach 72 Stunden Inkubationszeit. Die Zellen wurden mit DAPI (blau) und Alexa488 markiertem Vimentin Antikörper (grün) inkubiert und anschließend fixiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

DU145 Docetaxel resistent (Abb.56)

In der Gesamtansicht ist zu erkennen, dass sich Vimentin in den unbehandelten, Docetaxel resistenten DU145 Zellen diffus und flächig um den Zellkern herum anordnet. Dabei kam es nur vereinzelt zu stärkeren Anhäufungen von Vimentin. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin kam es zu deutlichen Veränderungen in der Vimentin Expression und Verteilung innerhalb der Zellen. Vimentin war verteilt sich nicht mehr um den ganzen Zellkern, sondern lagerte sich verstärkt auf einer Seite der Zelle an. Dieser Effekt war sehr deutlich und konnte nahezu einheitlich für alle Zellen in den untersuchten Abschnitten beobachtet werden.

Ergebnisse

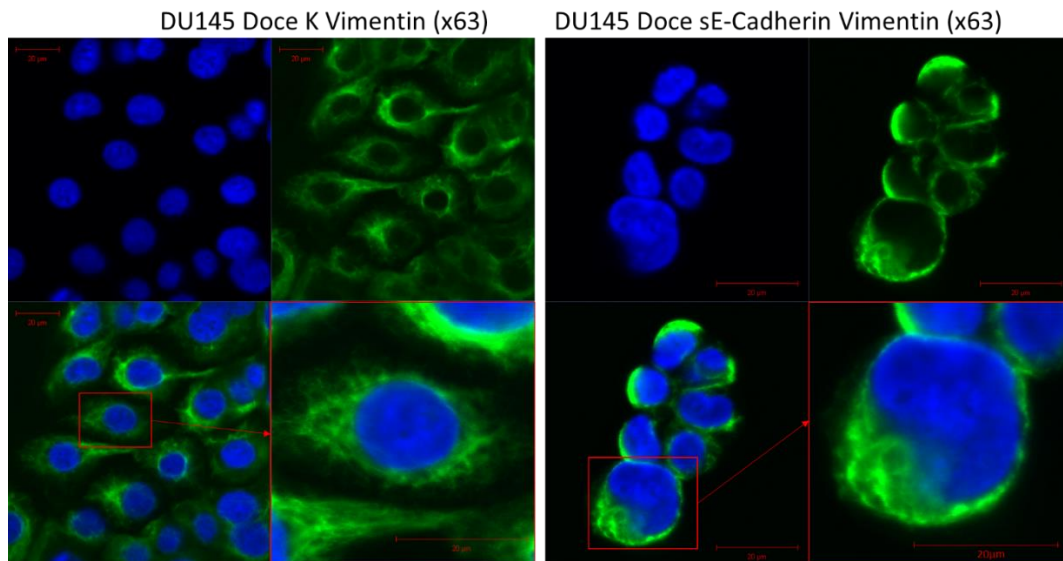


Abbildung 56: Konfokale Mikroskopie mit Docetaxel resistenten DU145. Links: Docetaxel resistente DU145 ohne sE-Cadherin Behandlung. Rechts: Docetaxel resistente D145 mit 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung nach 72 Stunden Inkubationszeit. Die Zellen wurden mit DAPI (blau) und Alexa488 markiertem Vimentin Antikörper (grün) inkubiert und anschließend fixiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

4.13 Durchflusszytometrie

4.13.1 Integrine

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Durchflusszytometer (FACS)-Experimente für verschiedene Integrine abgebildet. Dabei wurden Zellen entweder mit 0 (Kontrolle) oder mit 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt.

PC3

In Abbildung 57 sind die Ergebnisse für die Untersuchungen der Integrin Expression der parentalen und Docetaxel resistenten Prostatakarzinomzelllinie PC3 mittels Durchflusszytometer (FACS), in Relation zu den unbehandelten Kontrollen dargestellt. Nach einer 72 Stunden Inkubation mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es bei allen vier untersuchten Integrinen $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 4$ zu einer Reduktion der Expression. Dieser Effekt war sowohl in den parentalen als auch Docetaxel resistenten PC3 Zellen zu beobachten, fiel jedoch für die Docetaxel resistenten PC3 Zellen deutlich stärker aus. Lediglich die parentalen PC3 Zellen zeigten nach einer 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung keine signifikant reduzierte Expression von $\beta 1$.

Ergebnisse

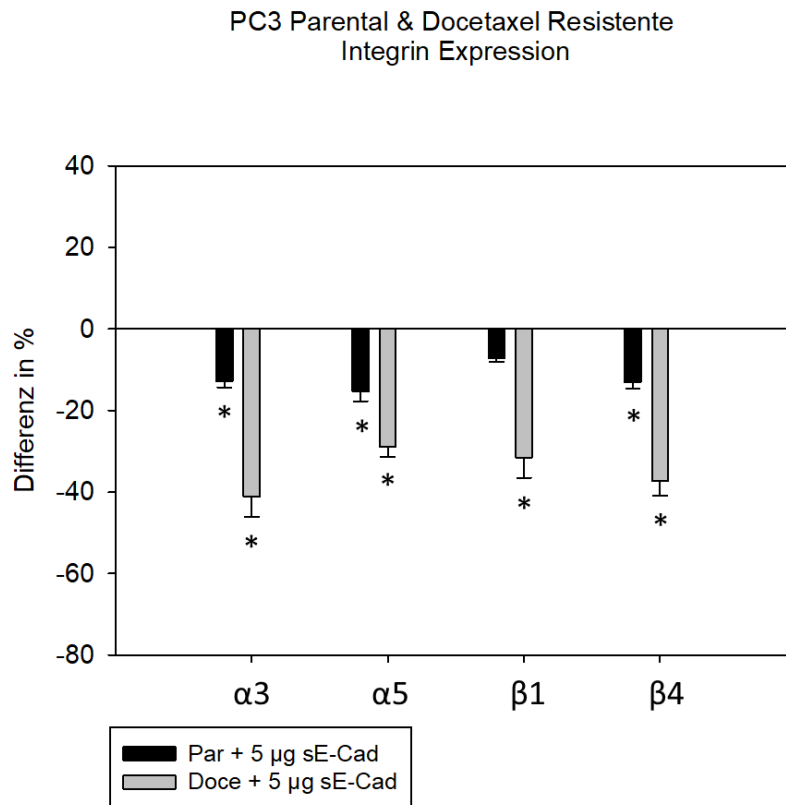


Abbildung 57: Ergebnisse für Integrin-Versuche PC3. Parentale und Docetaxel resistente PC3 nach einer Inkubation mit 5 µg/ml sE-Cadherin über 72 Stunden. Die Ergebnisse sind in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 8.

DU145

In Abbildung 58 sind die Ergebnisse für die Untersuchung der Integrin Expression der parentalen, Cabazitaxel- und Docetaxel resistenten Prostatakarzinomzelllinie DU145 mittels Durchflusszytometer (FACS), in Relation zu den unbehandelten Kontrollen dargestellt. Nach einer 72 Stunden Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es bei den parentalen, Cabazitaxel- und Docetaxel resistenten DU145 Zellen zu einer signifikanten Zunahme der Expression von α3, α5 und β1 zeigten bei allen drei untersuchten Zelllinien leichte Veränderungen. Allerdings konnte für diese Verschiebungen keine Signifikanz beobachtet werden. Für β4 stellte sich ein gemischtes Bild in der Expression bei den untersuchten DU145 Zellen dar. Bei den Cabazitaxel resistenten Zellen führte die 5µg/ml sE-Cadherin Inkubation zu einer erhöhten Expression von β4 wohingegen sich diese bei Docetaxel resistenten DU145 Zellen signifikant reduzierte. Bei den parentalen DU145 Zellen konnte keine signifikante Veränderung der β4 Expression unter Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin beobachtet werden.

Ergebnisse

DU145 Parental, Cabazitaxel-, Docetaxel resistent
Integrin Expression

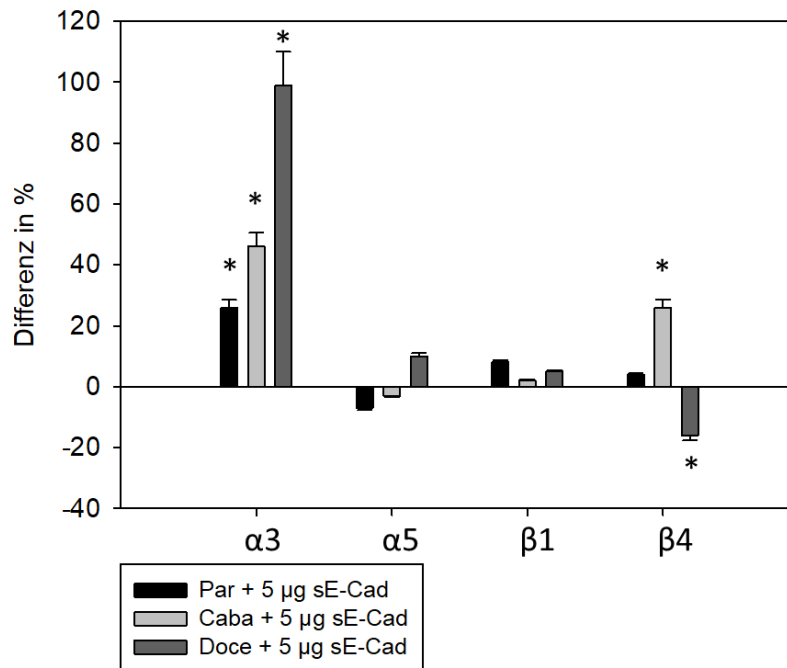


Abbildung 58: Ergebnisse für Integrin-Versuche DU145. Parentale, Cabazitaxel- und Docetaxel resistente DU145 nach einer Inkubation mit 5 µg/ml sE-Cadherin über 72 Stunden. Die Ergebnisse sind in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 9.

4.13.2 Wachstumsfaktoren

In diesem Abschnitt (Abbildung 59) werden die Ergebnisse der Durchflusszytometer (FACS)-Experimente für die Wachstumsfaktoren EGF und pEGF dargestellt. Dabei wurden Zellen entweder mit 0 oder mit 5 µg/ml sE-Cadherin behandelt.

Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es in den untersuchten Zelllinien zu minimalen Veränderungen. Lediglich die Docetaxel resistenten PC3 Zellen zeigten durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin einen signifikanten Anstieg der Expression von EGF. Die Behandlung mit sE-Cadherin führte in den parentalen Zellen zu einer nicht signifikanten Reduktion der EGF Expression. In den Taxan resistenten Zellen äußerte sich ein gegensätzliches Bild. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin erhöhte sich die Expression von EGF. Dieser Effekt war jedoch nur in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen signifikant. Die Expression von EGF wurde scheinbar durch eine Taxan Resistenz signifikant gegenüber den entsprechenden, parentalen Zellen reduziert. Die untersuchten Zellen zeigten weder ohne noch mit einer sE-Cadherin Behandlung eine Expression von pEGF.

Ergebnisse

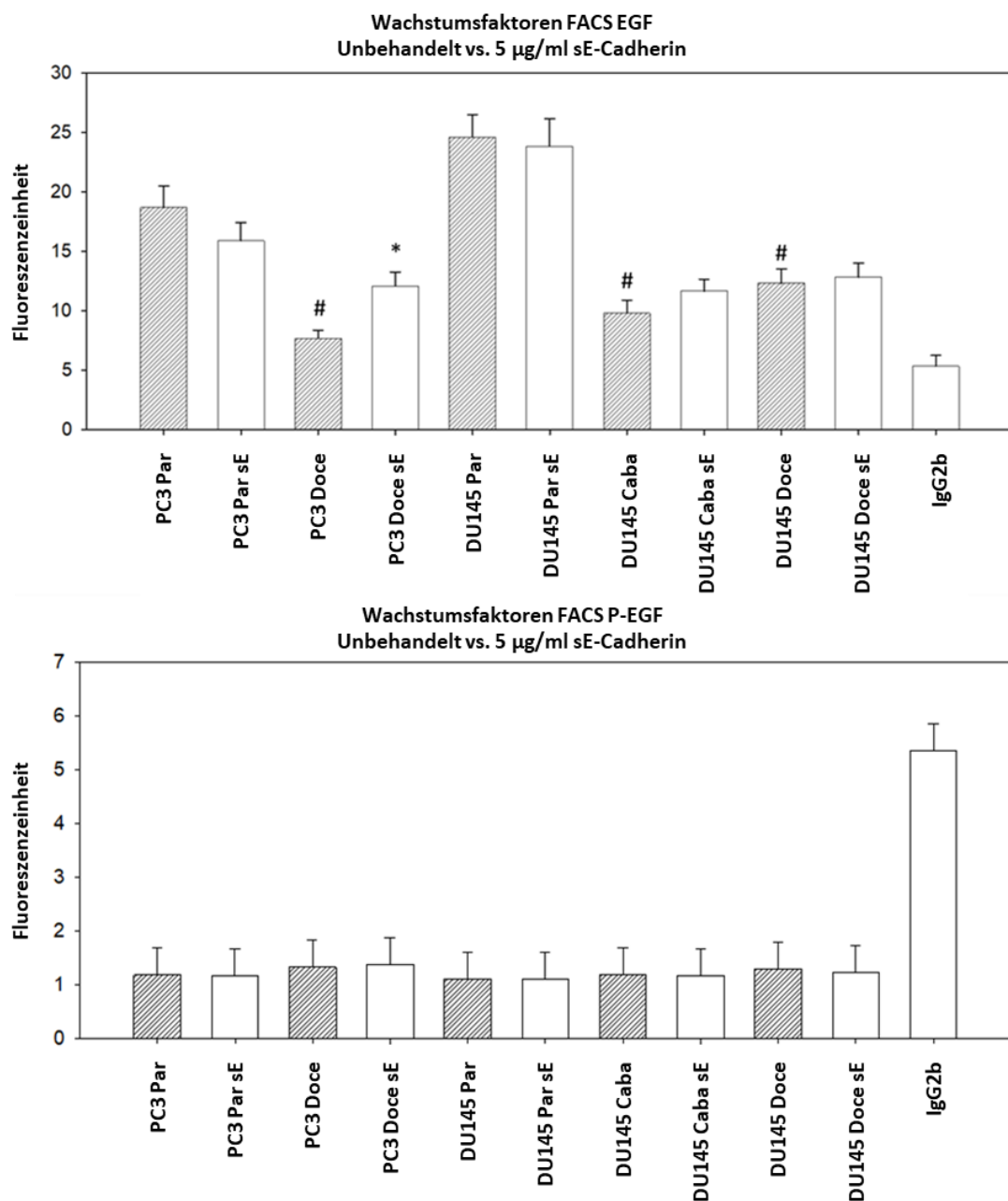


Abbildung 59: Ergebnisse für EGF und pEGF bei PC3 und DU145. Parentale, Cabazitaxel- und Docetaxel resistente DU145 und PC3 nach einer Inkubation mit 5 µg/ml sE-Cadherin über 72 Stunden. * = Signifikante Differenz zu unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von n = 3.

4.14 Blockadestudien mit PC3 und DU145

Um vertiefend die Frage zu klären, über welche Mechanismen sE-Cadherin Einfluss auf die Zellviabilität und das Metastasierungsverhalten der Prostatakarzinomzellen nimmt, wurden die zuvor mittels FACS untersuchten Integrine in Blockadestudien genauer beleuchtet. Die Abbildungen 60 bis 65 zeigen die Ergebnisse für die MTT-Versuche mit einer Blockade eines der drei Integrine $\alpha 3$, $\beta 1$ oder $\beta 4$. Auf der linken Seite der Abbildungen sind die Messwerte in absoluten Zahlen und auf der rechten Seite in Prozent mit dem 24 Stunden Wert als 100 % Ausgangspunkt zu sehen.

4.14.1 MTT-Test

PC3

Durch die Blockade des Integrins $\alpha 3$ kam es sowohl in den parentalen als auch in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl (Abb.: 60). Ohne die $\alpha 3$ Blockade konnten sich die parentalen PC3 Zellen im Verlauf von 72 Stunden vervierfachen, wohingegen sich die Docetaxel resistenten PC3 Zellen nur um den Faktor 2,5 vermehren konnten. Vergleicht man die prozentuale Veränderung der Zellzahl durch die Blockade zwischen den parentalen und Docetaxel resistenten PC3 Zellen zeigt sich, dass die Reduktion in den parentalen PC3 Zellen etwas schwächer als in den Resistenten ausfiel.

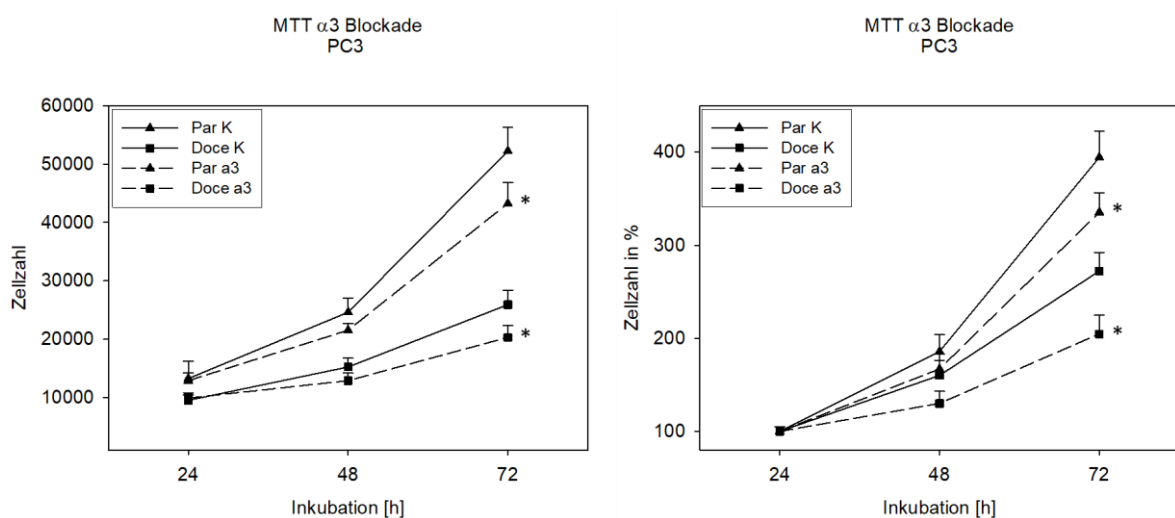


Abbildung 60: Blockadestudie: $\alpha 3$ Ergebnisse des MTT-Tests PC3. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse in absoluten Zahlen und auf der rechten Seite in Prozent dargestellt. Auf den Abszissen sind die Messzeitpunkte und auf den Ordinaten die Zellzahlen absolut bzw. prozentual abgebildet. *= Signifikant gegenüber Kontrolle. Ergebnisse sind repräsentativ für n=3.

Ergebnisse

In Abbildung 61 ist zu sehen, dass es durch die Blockade von $\beta 1$ in den parentalen PC3 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl gegenüber der parentalen PC3 Kontrolle kam. Während sich die Zellzahl in der parentalen PC3 Kontrolle im Verlauf von 72 Stunden etwa vervierfachen konnte, kam es unter der $\beta 1$ Blockade lediglich zu einer Verdreifachung der Zellzahl. In den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zeigte sich hingegen ein anderes Bild. Eine Blockade von $\beta 1$ hatte keine signifikant messbaren Effekte auf Docetaxel resistente PC3 Zellen. Auch nach 72 Stunden konnte keine signifikante Differenz beobachtet werden.

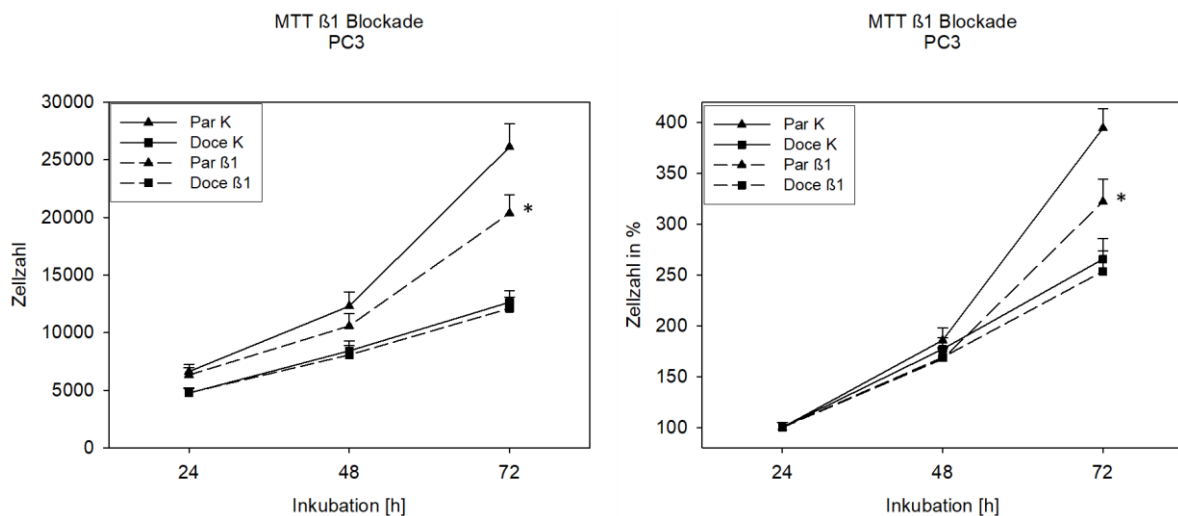


Abbildung 61: Blockadestudie: $\beta 1$ Ergebnisse des MTT-Tests PC3. Auf der linken Seite sind die Messungen in absoluten Zahlen und auf der rechten Seite in Prozent dargestellt. Auf den Abszissen sind die Messzeitpunkte und auf den Ordinaten die Zellzahlen absolut bzw. prozentual abgebildet. *= Signifikant gegenüber Kontrolle. Dargestellte Ergebnisse sind repräsentativ für n=3.

Durch die Blockade von $\beta 4$ kam es sowohl in den parentalen als auch in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl gegenüber den nicht blockierten Kontrollzellen (Abb.: 62). Während sich die Zellzahl der parentalen PC3 Kontrolle über 72 Stunden nahezu vervierfachen konnte, kam es unter der $\beta 4$ Blockade lediglich zu einem Anstieg der Zellzahl um den Faktor 2,7. In den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zeigte sich ein zu der Blockade in den parentalen PC3 Zellen vergleichbares Bild. Eine Blockade von $\beta 4$ führte auch in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zu einer signifikant reduzierten Zellzahl.

Ergebnisse

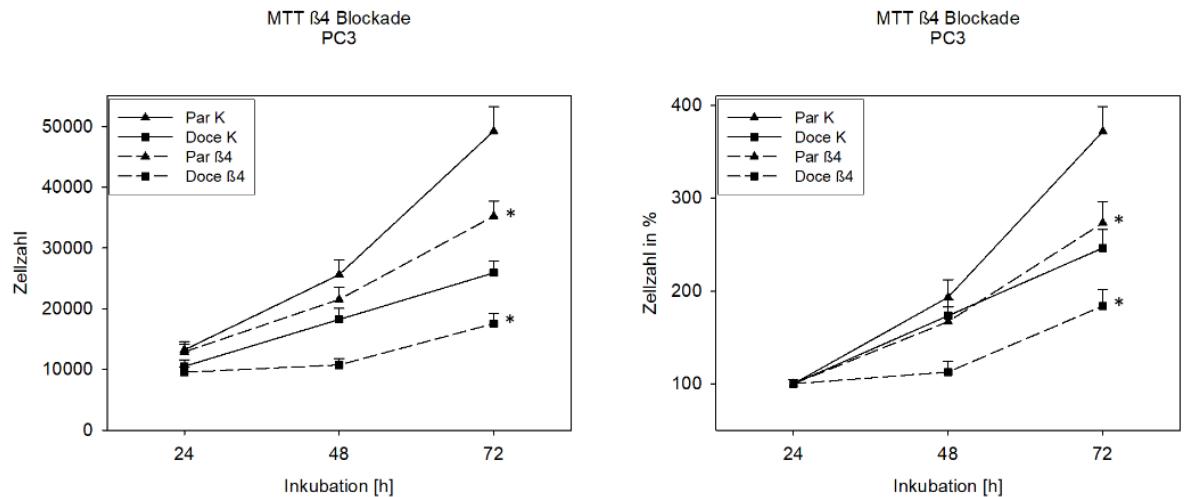


Abbildung 62: Blockadestudie: β_4 Ergebnisse des MTT-Tests PC3. Auf der linken Seite sind die Messungen in absoluten Zahlen und auf der rechten Seite in Prozent dargestellt. Auf den Abszissen sind die Messzeitpunkte und auf den Ordinaten die Zellzahlen absolut bzw. prozentual abgebildet. *= Signifikant gegenüber Kontrolle. Dargestellte Ergebnisse sind repräsentativ für n=3.

DU145

Durch die Blockade von α_3 kam es in allen untersuchten DU145 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl gegenüber den nicht blockierten Kontrollzellen (Abb.: 63). Dieser Effekt fiel bei den beiden Taxan resistenten Zelllinien nach 72 Stunden in seiner Intensität vergleichbar aus. Während sich die Zellzahl, der nicht blockierten DU145 Zellen über 72 Stunden um den Faktor 2,5 erhöhte, kam es unter der α_3 Blockade bei den beiden Taxan resistenten DU145 Zelllinien nur zu einer Verdopplung. Die Differenz der Zellzahl fiel bei den parentalen DU145 Zellen zwar geringer, jedoch signifikant aus.

Ergebnisse

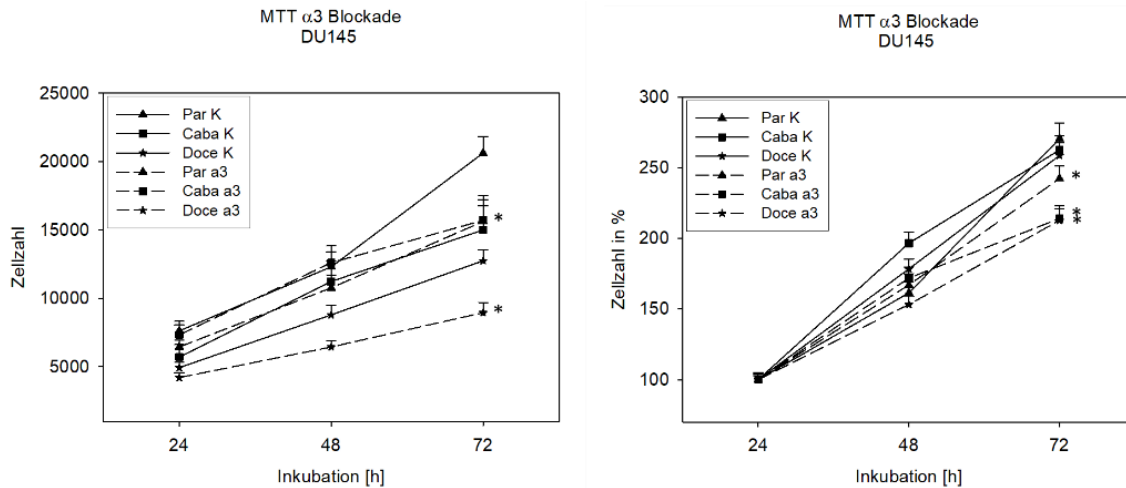


Abbildung 63: Blockadestudie: α_3 Ergebnisse des MTT-Tests DU145. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse in absoluten Zahlen und auf der rechten Seite in Prozent dargestellt. Auf der Abszisse sind in beiden Abbildungen die Messzeitpunkte abgebildet. *= Signifikant gegenüber Kontrolle. Ergebnisse sind repräsentativ für n=3.

Abbildung 64 zeigt die Ergebnisse für die Messungen einer β_1 Blockade im MTT-Test für die Zelllinie DU145. In der linken Abbildung, welche in absoluten Zahlen ist, kann man lediglich eine Signifikanz durch die β_1 Blockade in den parentalen DU145 feststellen. Ausgehend von dem 24 Stunden Wert als jeweiligem 100 % Ausgangswert zeichnete sich für den Effekt der β_1 Blockade ein gemischtes Bild. In den parentalen und Docetaxel resistenten DU145 Zellen kam es durch die β_1 Blockade nach 72 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl gegenüber der jeweiligen Kontrolle. Die Cabazitaxel resistenten DU145 wiesen keine signifikante Veränderung der Zellzahl durch eine β_1 Blockade auf.

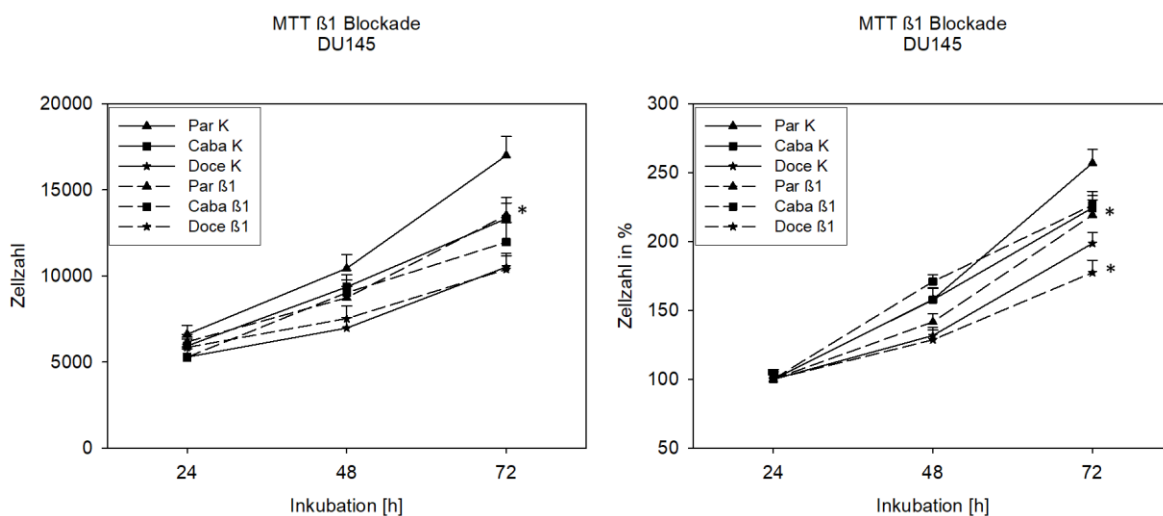


Abbildung 64: Blockadestudie: β_1 Ergebnisse des MTT-Tests DU145. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse in absoluten Zahlen und auf der rechten Seite in Prozent dargestellt. Auf der Abszisse sind in beiden Abbildungen die Messzeitpunkte abgebildet. *= Signifikant gegenüber Kontrolle. Ergebnisse sind repräsentativ für n=3.

Ergebnisse

Abbildung 65 zeigt die Ergebnisse für die Messungen einer $\beta 4$ Blockade im MTT-Test für die Zelllinie DU145. Für die parentalen DU145 Zellen konnten keine signifikanten Veränderungen der Zellzahl durch eine $\beta 4$ Blockade beobachtet werden. Ausgehend von dem 24 Stunden Wert als jeweiligen 100 % Ausgangswert zeichnete sich für den Effekt der $\beta 4$ Blockade ein gemischtes Bild. In den Docetaxel resistenten DU145 Zellen kam es durch die $\beta 4$ Blockade nach 72 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl gegenüber der entsprechenden Kontrolle. Die Cabazitaxel resistenten DU145 wiesen hingegen eine signifikante Reduktion der Zellzahl durch eine $\beta 4$ Blockade auf.

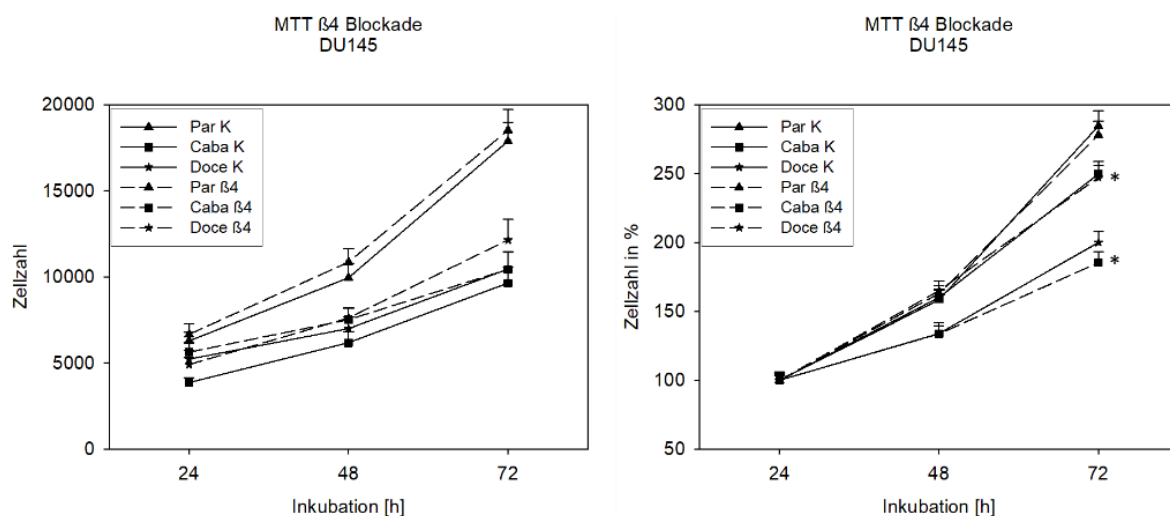


Abbildung 65: Blockadestudie: $\beta 4$ Ergebnisse des MTT-Tests DU145. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse in absoluten Zahlen und auf der rechten Seite in Prozent dargestellt. Auf der Abszisse sind in beiden Abbildungen die Messzeitpunkte abgebildet. *= Signifikant gegenüber Kontrolle. Ergebnisse sind repräsentativ für n=3.

4.14.2 Adhäsion

Das Adhäsionsverhalten an verschiedenen Oberflächen wie z.B. einer extrazellulären Matrix (Kollagen oder Fibronectin) spielt bei Tumorzellen im Rahmen der aggressiven Metastasierung eine bedeutende Rolle. Deshalb muss das Verhalten der Prostatakarzinomzellen hinsichtlich dieser Adhäsionsaktivität untersucht werden. Um den Wirkmechanismus von αE -Cadherin zu verstehen, müssen beobachtete Unterschiede in der Expression von verschiedenen Integrinen auf deren tatsächliche Bedeutung für die Adhäsion überprüft werden. Deshalb wurden die drei Integrine $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$ mit Hilfe von blockierenden Antikörpern blockiert, um deren Effekt auf die Adhäsion und somit eine wichtige Phase des Invasionsprozesses zu untersuchen. Die Abbildung 66 und 67 zeigen die Ergebnisse der Adhäsionsversuche im Rahmen der

Ergebnisse

Blockadestudien für die Prostatakarzinomzelllinien PC3 und DU145. Der schwarze Balken stellt jeweils die unbehandelte Kontrolle dar. Die in unterschiedlichen Graustufen dargestellten Balken repräsentieren Daten der entsprechenden Integrin blockierten Zellen.

Kollagen (Abb.:66)

Durch die Taxan Resistenzen konnten für die untersuchten PC3 und DU145 Zellen bereits Unterschiede im Adhäsionsverhalten auf Kollagen beobachtet werden. In den PC3 Zellen kam es durch eine Docetaxel Resistenz zu einer verminderten Anzahl adhärenter Zellen. Diese Differenz fiel jedoch nicht signifikant aus. In den DU145 Zellen zeigte sich ein gegensätzliches Bild. Sowohl durch die Cabazitaxel als auch die Docetaxel Resistenz kam es zu einem Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen auf Kollagen. Dieser Effekt fiel für die Docetaxel resistenten DU145 Zellen signifikant gegenüber den parentalen DU145 Zellen aus. Durch die Blockade der drei Integrine konnte deutliche Unterschiede im Effekt beobachtet werden. Eine $\alpha 3$ Blockade führte in allen untersuchten Zelllinien zu einer reduzierten Adhäsion auf Kollagen. Außer bei den Docetaxel resistenten DU145 Zellen konnte eine Signifikanz für diesen Effekt beobachtet werden. Bei $\beta 1$ konnten deutliche Unterschiede Effekte auf die Adhäsion beobachtet werden. Bei den Cabazitaxel resistenten PC3 Zellen führte die $\beta 1$ Blockade zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen, wohingegen es in den parentalen PC3 Zellen zu keinem Effekt kam. Bei den DU145 Zellen kam es durch die $\beta 1$ Blockade hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen. Durch die Taxan Resistenzen konnten unterschiedliche starke Varianten des Effekts beobachtet werden, welche jedoch stets einen vergleichbaren Trend mit einer deutlichen Signifikanz aufwiesen. Die Blockade des Intergrins $\beta 4$ führte zu einem uneinheitlichen Bild. In den PC3 Zellen konnte ein Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen beobachtet werden. Dieser fiel jedoch nur bei den Docetaxel resistenten Zellen signifikant aus. Für die DU145 Zellen zeigte sich in jeder der drei Zelllinien ein anderer Effekt. In den parentalen DU145 Zellen führte die $\beta 4$ Blockade zu einem signifikanten Anstieg, in den Cabazitaxel resistenten zu keinem und in den Docetaxel resistenten DU145 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen auf Kollagen.

Ergebnisse

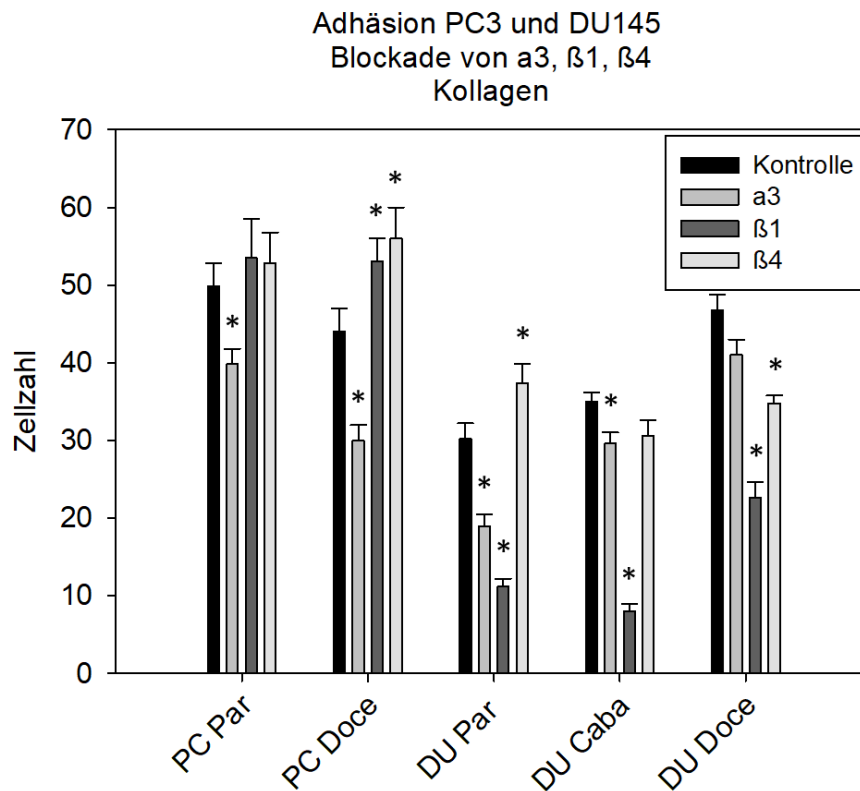


Abbildung 66: Blockadestudie Integrine: Adhäsion Kollagen. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Blockade von $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 4$ in den Prostatakarzinom Zelllinien PC3 und DU145. Die Ordinate zeigt die ausgezählte Zellzahl, die Abszisse die untersuchten Zelllinien. * = Signifikant gegenüber Kontrolle. Ergebnisse sind repräsentativ für n=3.

Fibronektin (Abb.:67)

Zwischen den parentalen und resistenten Zellen konnten Unterschiede im Adhäsionsverhalten auch ohne eine Blockade beobachtet werden. Durch eine Docetaxel induzierte Resistenz kam es in den PC3 und DU145 Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen auf Fibronektin. Zwischen den unbehandelten PC3 und DU145 Kontrollzellen konnten keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten festgestellt werden. Die Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen zeigten im Gegensatz zu den Docetaxel resistenten DU145 Zellen ein leicht erhöhtes Adhäsionsverhalten gegenüber den unbehandelten DU145 Kontrollen. Bedingt durch die Blockade der einzelnen Integrine kam es zu einem teils unterschiedlichen Bild. Durch die Blockade von $\alpha 3$ kam es in den parentalen PC3 und den Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen zu einem Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen. Dies fiel jedoch zu schwach aus, um eine Signifikanz festzustellen. In den restlichen drei Zelllinien kam es zu einer Reduktion der adhärenter Zellen gegenüber der entsprechenden Kontrolle. Über

Ergebnisse

alle fünf Zelllinien konnte lediglich für Docetaxel resistente PC3 Zellen eine signifikante Reduktion durch ein $\alpha 3$ Blockade beobachtet werden. Durch die Blockade des Integrins $\beta 1$ konnte in allen untersuchten Zelllinien eine signifikante Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen auf Fibronectin beobachtet werden. Dieser Effekt war so stark, dass etwa 90 % reduzierte Zellzahlen bestimmt wurden. Für die $\beta 4$ blockierten Zellen präsentierte sich ein gemischtes Bild. In den parental PC3 Zellen kam es zu einem Anstieg und in den Docetaxel resistenten PC3 Zellen zu einer Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen auf Fibronectin. Bei den parental und Docetaxel resistenten DU145 Zellen konnte kein Effekt auf das Adhäsionsverhalten durch eine $\beta 4$ Blockade beobachtet werden. Die Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen zeigten hingegen eine erhöhte Adhäsionsaktivität durch eine $\beta 4$ Blockade.

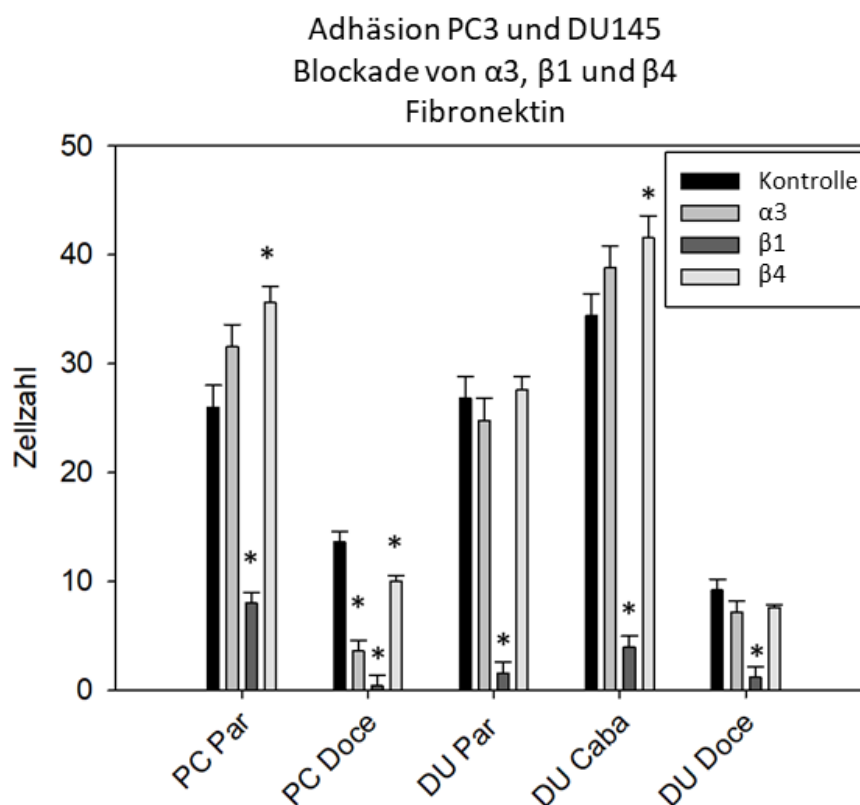


Abbildung 67: Blockadestudie Integrine: Adhäsion Fibronectin. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Blockade von $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 4$ in den Prostatakarzinom Zelllinien PC3 und DU145. Die Ordinate zeigt die gezählte Zellzahl, die Abszisse die untersuchten Zelllinien. * = Signifikant gegenüber Kontrolle. Ergebnisse sind repräsentativ für n=3.

4.14.3 Chemotaxis

Im vorherigen Abschnitt wurde die Frage nach der Bedeutung der drei Integrin Subtypen $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$ für das Adhäsionsverhalten untersucht. Im Rahmen des Metastasierungsprozesses folgt an eine erfolgreiche Adhäsion der Zellen an zum Beispiel eine Extrazelluläre Matrix der Invasionsprozess. Aus diesem Grund wurde weiterführend die Bedeutung der drei genannten Integrine mittels Antikörper Blockade untersucht.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind repräsentativ in Abbildung 68 dargestellt. Vergleichend zwischen den untersuchten Zelllinien fällt zunächst eine reduzierte chemotaktische Aktivität bedingt durch die Induktion einer Taxan Resistenz auf. Durch die Blockade der verschiedenen Integrin Subtypen wurde dieser Effekt noch verstärkt. In den parentalen PC3 und DU145 Zellen konnte eine signifikante Reduktion der Chemotaxis durch eine Blockade der drei Integrine beobachtet werden. Die Reduktion fiel in den parentalen PC3 Zellen durch die Blockade von $\beta 4$ am deutlichsten aus. Bei parentalen DU145 Zellen wurde für alle drei Integrine ein signifikanter, Chemotaxis reduzierender Effekt beobachtet, der in seiner Intensität vergleichbar deutlich ausfiel. Durch die Induktion einer Docetaxel Resistenz in den PC3 Zellen wurde gegenüber den parentalen PC3 Zellen eine reduzierte Chemotaxis beobachtet, welche noch einmal durch die Blockade von $\beta 1$ signifikant reduziert wurde. Für die Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen konnte durch die Blockade aller drei Integrine eine Reduktion der Chemotaxis beobachtet werden. Diese fiel bei allen drei Integrinen signifikant aus, wobei $\alpha 3$ bei einer Cabazitaxel Resistenz den deutlichsten Effekt hervorrief. Für die Docetaxel resistenten DU145 Zellen konnten zu den Ergebnissen aus dem Abschnitt „4.9 Chemotaxis“ vergleichbare Effekte durch eine induzierte Docetaxel Resistenz beobachtet werden. Die chemotaktische Aktivität war in Relation zu den parentalen DU145 Zellen höchst signifikant reduziert. Durch die Blockade der drei Integrine wurde die Chemotaxis nicht signifikant reduziert.

Ergebnisse

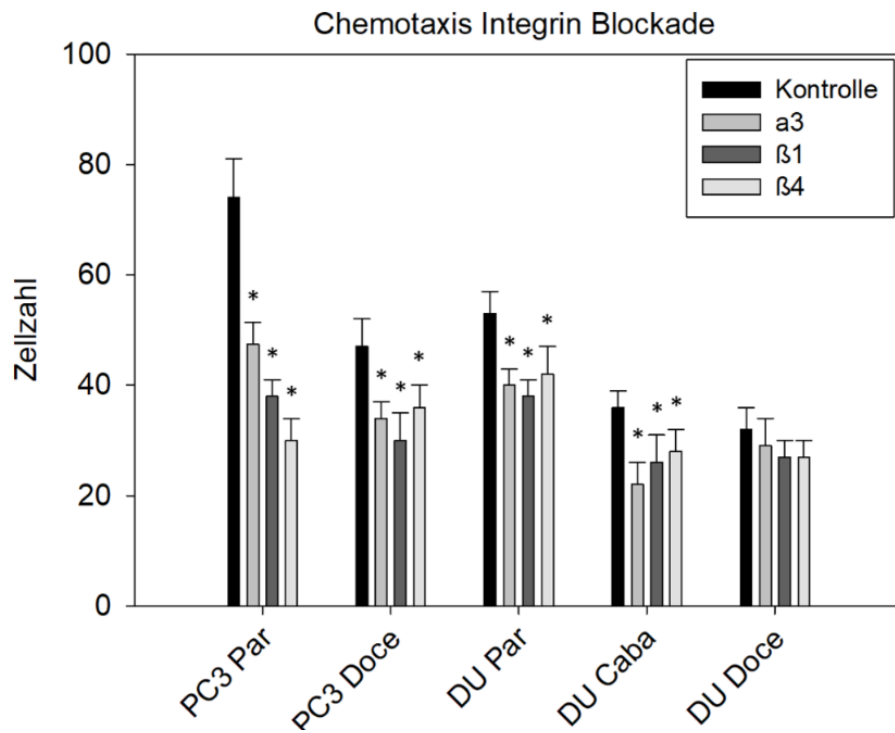


Abbildung 68: Blockadestudie Integrine: Chemotaxis. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Blockade von $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 4$ in den Prostatakarzinom Zelllinien PC3 und DU145. Die Ordinate zeigt die gezählte Zellzahl, die Abszisse die untersuchten Zelllinien. * = Signifikant gegenüber Kontrolle. Ergebnisse sind repräsentativ für n=4.

5. Diskussion

Im Rahmen der Früherkennung eines Prostatakarzinoms und der Abschätzung der Malignität stellte lange Zeit der PSA Wert das Mittel der Wahl dar. Da dieser Wert jedoch eine hohe Quote falsch positiver Resultate aufweist, ist es für eine personalisierte Therapie wichtig verlässliche Biomarker zu identifizieren. An dieser Stelle kommt das zu Beginn dieser Dissertation besprochene sE-Cadherin zum Tragen. Wie bereits in vorhergegangenen Studien durch das urologische Forschungslabor der Uniklinik Frankfurt am Main belegt wurde, sind bei Patienten mit einem Prostatakarzinom erhöhte Serumkonzentrationen von sE-Cadherin messbar. Auch wenn keine direkte Korrelation zwischen dem PSA- und sE-Cadherin-Serumspiegel hergestellt werden konnte, so zeigte sich, dass durch sE-Cadherin aggressive Prostatatumore mit Gleason-Score ≥ 7 , nach radikaler Prostatektomie, präziser als durch den PSA Wert nachgewiesen werden konnten [44, 58]. Ob sE-Cadherin jedoch selbst eine aktive Rolle bei der Tumorentwicklung spielt oder ob dessen Expression lediglich als Epiphänomen einzuordnen ist, sollte durch verschiedene *in vitro* Experimente mit den Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP aufgeklärt werden. In den durchgeführten Experimenten konnte für die untersuchten PCa-Zellen ein durch sE-Cadherin bedingtes Umschalten in Form eines reduzierten Wachstums bei einer gleichzeitig erhöhten Motilität und Invasivität beobachtet werden. Dabei spielen viele Faktoren wie z. B. Verschiebungen der Zellzyklus-Phasen oder Veränderungen der Expression von Adhäsions-Proteinen eine wichtige Rolle. Es wird postuliert, dass sE-Cadherin die PCa-Zellen von einem proliferativen hin zu einem disseminativen Zellverhalten umschaltet. Die Ergebnisse sollen in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert werden.

5.1 Tumorwachstum und Proliferation

Tumorwachstum

Da für die Behandlung von PCa-Zellen (*in vitro*) in der Literatur keine standardisierte sE-Cadherin Arbeitskonzentration definiert ist, wurden in initialen Wachstumsexperimenten verschiedene Konzentrationen und deren Effekte auf die PCa-Zellen untersucht. In MTT-Studien (4.1 MTT-Test) wurden diesbezüglich Veränderungen der Zellzahl der drei Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP analysiert (Abb.:19-21). Die Analysen beinhalteten auch Dosis-

Diskussion

Wirkungsbeziehungen Taxan resistenter (Cabazitaxel und Docetaxel) Tumorzellen. Hierzu wurden die Zellen vor Beginn der Wachstumsstudien über mehrere Monate mit stetig steigenden Konzentrationen der entsprechenden Taxane inkubiert. Anschließend wurde die Sensitivität gegenüber den Taxanen ebenfalls mittels MTT überprüft (Abb.: 14-18). Alle chronisch mit Taxanen behandelte Zelllinien wiesen einen deutlichen Verlust des Ansprechens gegenüber Cabazitaxel und Docetaxel auf, was eine signifikante Resistenzinduktion belegt. Durch eine Kontamination der PC3 Zellen kurz vor erfolgreicher Cabazitaxel Resistenz Induktion (Nach ca.1 Jahr), konnten diese nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, weshalb sich auf Docetaxel resistente PC3 Zellkulturen beschränkt wurde.

Bei den DU145- und LNCaP-Zellen lagen Cabazitaxel resistente Zellen vor, welche chronisch mit 3 ng/ml (3,58 nmol/l; PC3) bzw. 10 ng/ml (11,96 nmol/ml; LNCaP) behandelt wurden. Auch Hiroshi Hong et al. konnten in ihren Studien zu Cabazitaxel durch chronische Behandlung mit steigenden Cabazitaxel Konzentrationen eine Resistenz bei den Prostatakarzinomzellen PC3 und DU145 mit einer maximalen chronischen Behandlungskonzentration von 3 nmol/l hervorrufen [76]. Hishida et al. konnten bei 22Rv1 Zellen ebenfalls durch stetiges Erhöhen der Behandlungskonzentration eine Resistenz gegen eine finale Cabazitaxel Konzentration von 18,8 nmol/l hervorrufen. Mit dem gleichen Vorgehen konnte sie auch gegen Docetaxel (200 nmol/l) eine Resistent ausgebildet werden [77]. Auch Zhu et al induzierten in einer anderen Studie durch steigende Docetaxel Behandlungskonzentrationen eine Resistenz mit einer finalen Konzentration von 5 nmol/l Docetaxel bei der Prostatakarzinomzelllinie C4-2B [78]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellen wurden 12 Monate lang chronisch mit steigenden Docetaxel Konzentrationen behandelt bis zu den finalen Konzentrationen von 20 ng/ml (24,75 nmol/ml; PC3), 7,5 ng/ml (9,3 nmol/ml; DU145) und 10 ng/ml (12,37 nmol/l; LNCaP). Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen bestätigen, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Taxan Konzentrationen eine Resistenz der PCa-Zellen initiieren. Durch die Behandlung mit sE-Cadherin konnte in allen drei untersuchten PCa-Zelllinien, inklusive der resistenten Zelllinien eine signifikante Reduktion der Zellzahl beobachtet werden. Dieser Effekt war bereits bei Konzentration von 0,5 µg/ml sE-Cadherin signifikant und steigerte sich deutlich dosisabhängig mit 1 und 5 µg/ml sE-Cadherin. Ein dazu vergleichbarer, Zellzahl reduzierender Effekt konnte von Tsaur et al. am Nierenzellkarzinom belegt werden. Hier wurde ein Konzentrationen von 0,1 bis 5 µg/ml verwendet, was sich mit dem in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationsbereich deckt [58]. Es wird postuliert, dass sE-Cadherin

Diskussion

dosisabhängig das Wachstum von parentalen und Taxan resistenten PCa-Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP zu reduzieren vermag. Übereinstimmend mit diesem Postulat belegten Tsauro et al. anhand ihrer Studien an PCa-Zellen eine Korrelation zwischen dem sE-Cadherin-Spiegel und der Suppression des Tumorwachstums [44]. Es zeigt sich in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass sE-Cadherin vergleichbar zu den Ergebnissen von Tsauro et al. bei parentalen Prostatakarzinomzellen ein deutlich reduziertes Wachstum bedingt. Auch Brouxhon et al. verweisen auf den Wachstum reduzierenden Effekt von sE-Cadherin auf neoplastische Zellen bei einem Lungen-, Kolon- und Mammakarzinom [79]. Dies lässt auf einen generellen Wirkmechanismus von sE-Cadherin schließen, was allerdings mit der Hypothese von sE-Cadherin als spezifischer Biomarker nicht im Einklang steht.

Proliferation

Im Rahmen von BrdU-Studien wurde die Proliferation der verschiedenen PCa-Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP unter 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin Behandlung untersucht. Durch die sE-Cadherin Behandlung reduzierte sich die 48stündige Proliferationsdynamik bei allen untersuchten PCa-Zellen, wobei signifikante Effekte erst ab einer Konzentration von 5 µg/ml sE-Cadherin beobachtet wurden. Es liegen keine Publikationen vor, die einen Effekt von sE-Cadherin speziell auf die Proliferation von PCa-Zellen untersucht haben. Anhand der vorliegenden Ergebnisse wird postuliert, dass eine sE-Cadherin bedingte Wachstumsblockade in unmittelbarem Zusammenhang mit der Suppression der proliferativen Aktivität der Tumorzellen steht.

Klonogenes Wachstum

Bei diesem Zellwachstumstest wird die Fähigkeit einzelner Zellen zu einer Zellkolonie auszuwachsen und somit auch die Fähigkeit sich unbegrenzt oft zu teilen untersucht [67]. Sowohl parentale als auch Taxan resistente PC3 und DU145 Zellen bildeten nach starker Vereinzelnung bereits nach wenigen Tagen Klone aus. Es zeigte sich, dass die Fähigkeit dieser Zelllinien zum Ausbilden von Tochterzellen signifikant durch 5 µg/ml sE-Cadherin vermindert wurde. Die beschriebenen Ergebnisse scheinen somit die im vorangegangenen Kapitel aufgestellte Hypothese einer direkten Korrelation zwischen sE-Cadherin-Konzentration und Wachstumssuppression zu bestätigen. Anzumerken bleibt, dass sowohl die parentalen als auch die Taxan resistenten LNCaP Zellen keine Klone ausbildeten und daher nicht den

Diskussion

entsprechenden Experimenten zugeführt werden. Die Ursachen für dieses Phänomen konnten im Rahmen der Untersuchungen nicht geklärt werden.

Apoptose

Nicht nur eine verminderte Proliferation, sondern auch ein Anstieg der Apoptose bzw. der Nekrose kann zu einer verminderten Zellzahl führen. Die hier durchgeführten Versuche konnten jedoch keinen signifikanten Effekt von sE-Cadherin auf die apoptotischen Aktivitäten der Karzinomzellen belegen. Ausgehend von den Resultaten des Annexin V-Testsystems scheint sE-Cadherin im Rahmen von apoptotischen Ereignissen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl zu nehmen. Im Gegensatz zu den hier beobachteten Ergebnissen konnten Zhou et al., welche einen Anstieg der sE-Cadherin Expression bei Magenkrebspatienten beobachteten, einen Anstieg der Apoptose verzeichnen [80]. Auch Inge et al. zeigten, dass sE-Cadherin die Apoptose Aktivität bei Nierenkarzinompatienten erhöht. [81]. Um mögliche apoptotische Effekte detaillierter zu untersuchen, wurden Cell Death Detection-Versuche durchgeführt. Darüber hinaus sollte mittels LDH-Tests die Frage geklärt werden, ob möglicherweise nekrotische Effekte für das reduzierte Wachstum der Tumorzellen unter sE-Cadherin verantwortlich sind.

LDH

Beim Vorgang der Zellnekrose wird die Zellmembran beschädigt und die Zellorganellen treten unkontrolliert aus der Zelle aus [82]. Die LDH-Versuche wurden mit den parentalen und Taxan resistenten Zelllinien PC3 und DU145 durchgeführt. Außer bei den DU145 Cabazitaxel resistenten Zellen zeigte sich für alle untersuchten Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollen ein verminderter LDH-Wert nach Inkubation mit 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Menge an nekrotischen Ereignissen durch sE-Cadherin reduziert wird. Bodnar et al. konnten in multivariaten Studien an Patienten mit Nierenzellkarzinomen hingegen einen inversen Zusammenhang zwischen einer sehr geringen sE-Cadherin (ca. 72 pg/ml) Serum-Konzentration und einem zugleich erhöhten LDH-Spiegel beobachten [83]. Demnach würde sE-Cadherin auch nekrotische Ereignisse auslösen. Anhand der eigenen Ergebnisse lässt sich eine solche Assoziation nicht ableiten. Vielmehr ist zu schlussfolgern, dass sE-Cadherin keine Nekrose auslöst, zumindest am Modell des PCa.

CDD

Die durchgeführten Experimente zeigten keine einheitliche Veränderung der Apoptose durch die Behandlung mit 0,5 und 5 µg/ml sE-Cadherin. Lediglich Docetaxel resistente PC3 und parentale DU145 Zellen reagierten auf die Behandlung im Sinne einer signifikanten Zunahme der Apoptose Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse wird postuliert, dass eine durch sE-Cadherin Behandlung verringerte Zellzahl nicht auf apoptotischen Effekte zurückzuführen ist, was ebenfalls die vorhergegangenen Apoptose Studien bekräftigt. Im Einklang stehen Beobachtungen von Zhou et al., demnach ein erhöhten sE-Cadherin Spiegel nicht mit der Induktion apoptotischer Ereignisse einhergeht [80]. Weiterführende Detailuntersuchungen zu apoptotischen Abläufen mittels Proteinexpressions-Studien an z.B. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) oder Bax (Bcl-2-associated X protein) sind notwendig. Diese Proteine sind an der Regulation der Apoptose beteiligt und könnten die aufgestellte Hypothese vertiefend bekräftigen.

5.2 Veränderungen des Zellzyklus

Veränderungen des Wachstums neoplastischer Zellen gehen in der Regel mit Variationen des Zellzyklus Hand in Hand. Gesteuert durch eine Vielzahl von regulierenden Molekülen setzt sich der Zellzyklus aus den vier Phasen G0/G1, S, G2 und M zusammen. Durch die Behandlung der drei Zelllinien mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es außer bei den Docetaxel resistenten LNCaP Zellen zu einem Anstieg der G0/G1-Phase. Mit den zur Verfügung stehenden Messmethoden war es nicht möglich, direkt zwischen G0- und G1-Phase zu unterscheiden. Im Abgleich mit den Ergebnissen der Zellwachstum-Studien (siehe 4.1 MTT-Test) wird postuliert, dass es durch die Behandlung mit sE-Cadherin entweder zu einem Arrest der Zellen in der G1-Phase kommt oder diese in die G0-Phase übergehen. Diese Hypothese wird zudem durch die deutliche Reduktion der S-Phase, bei relativ gleichbleibender G2/M-Phase bekräftigt. In den Abbildungen unter „4.13.2 Wachstumsfaktoren“ sind die Ergebnisse für EGF und die aktivierte Variante pEGF dargestellt. Der Wachstumsfaktor EGF wird von Zellen zum Passieren des Restriktionspunkts in der späten G1-Phase benötigt und ist dadurch in der Zellzyklus-Steuerung involviert [68]. EGF konnte im Gegensatz zu der phosphorylierten Variante (pEGF) in den parentalen und Taxan resistenten PC3 und DU145 Zellen detektiert werden. Die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin führte jedoch zu keinen signifikanten Veränderungen der Rezeptor Expression. Die Messwerte für die phosphorylierte EGF Variante lagen unterhalb der

Diskussion

Isotyp-Kontrolle, was für eine nicht vorhandene Expression von pEGF spricht. Zu diskutieren wäre auch eine möglicherweise ungenügende Bindungsspezifität des verwendeten Antikörpers. Zhang et al. konnten in ihrer Studie zur Wirkung von Trichostatin A bei der PCa-Zelllinie PC3 pEGF, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit eine Expression messen [84]. Diese Arbeitsgruppe führte die Messung jedoch nicht per FACS, sondern mittels Western Blot durch. Obwohl Wachstumsfaktoren an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind, können diese Ergebnisse keinen Aufschluss über eine mögliche Ursache der Zellzyklus Phasenverschiebung liefern. Neben Wachstumsfaktoren spielen Cycline und Cdks in der Regulation des Zellzyklus eine essenzielle Rolle. Cycline können mit Cdks Komplexe bilden, wodurch es zu einer Aktivierung derer Kinase-Funktion kommt [85]. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin kam es im Western Blot zu einer reduzierten Expression der Zellzyklusproteine CDK1 und CDK2. Darüber hinaus wurden auch Cyclin A und Cyclin B vermindert exprimiert. Diese vier Zellzyklusproteine können untereinander binden und dadurch Komplexe (Heterodimere) ausbilden. CDK1 und CDK2 sind strukturell sehr ähnlich, weshalb z.B. CDK1 bei einem Defekt von CDK2 dessen Funktion übernehmen kann [86]. Da jedoch beide Varianten vermindert exprimiert wurden und keine phosphorylierten Varianten detektiert werden konnten, ist auszuschließen, dass eine alternative Zusammensetzung der Heterodimere stattfindet. Die unter sE-Cadherin verminderten Expressionsprofile der Zellzyklusproteine stellen somit eine weitere mögliche Erklärung für einen Arrest der Zellen in der G1-Phase dar. CDK2 kann mit Cyclin E Komplexe bilden, welche in der späten G1-Phase den Übergang der Zellen von der G1- zur S-Phase vorbereiten [68]. Eine verminderte CDK2 Expression sorgt folglich zu einer verminderten Komplexbildung und einer dadurch reduzierten Anzahl an Zellen, denen der Übergang von der G1-Phase zur S-Phase vorbereitet wird. Ein weiterer Ansatzpunkt, um die Funktion von sE-Cadherin zu erklären, stellt die reduzierte Expression von Cyclin A dar. Cyclin A wird im Anschluss an Cyclin E aktiv und steuert in Kombination mit CDK2 die Signalaktivierung für die DNA-Replikation und somit den Übergang der Zellen in die S-Phase [68]. Darüber hinaus bleibt dieser Komplex im Rahmen der S-Phase erhalten, um die DNA-Replikation weiter voranzutreiben. Zur Regulation der DNA-Replikation während der S-Phase des Zellzyklus werden CDK1/2 und deren regulatorische Untereinheiten Cyclin A/B benötigt [87]. Der Komplex aus CDK1 und Cyclin B wird zum Ende der S-Phase gebildet. Dadurch werden weitreichende Veränderungen der Zellarchitektur (z. B. am Golgi-Apparat oder bei der Ausbildung des Spindelapparats) hervorgerufen, wodurch die Zelle zur Mitose befähigt wird

Diskussion

[68]. Da auch diese beiden Proteine in ihrer Expression durch 5 µg/ml sE-Cadherin vermindert wurden, wird postuliert, dass die Modulation von Cyclin A-CDK2 in Zusammenspiel mit der Cyclin B-CDK1 Achse durch sE-Cadherin zumindest in Teilen den Wirkmechanismus von sE-Cadherin auf das PCa-Wachstum zu erklären vermag. Der Übergang von G1- zur S-Phase wird zudem von weiteren Proteinen wie Cyclin D1, welches mit CDK4 und CDK6 Komplexe bilden kann, gesteuert [85]. Auch Li T. et al. konnten in einer Studie zu dem Phytoöstrogen (sekundäre Pflanzenstoffe mit Östrogen ähnlichen Effekten [88]) Formononetin eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl bei Prostatakarzinomzellen, bedingt durch einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase beobachten [89]. Vergleichbare Resultate präsentieren Wang A. und Zhang L. in ihrer Studie zu der Wirkung von Lycopin auf PC3-Zellen. Sie konnten ebenfalls einen dosisabhängigen Anstieg der G0/G1-Phase bei gleichzeitig reduziertem Anteil der G2/M-Phase beobachten, dies in engem Zusammenhang mit einem verminderten Wachstum [90]. Anhand der vorliegenden Ergebnisse und diskutierten Zusammenhänge zwischen den Zellzyklusproteinen, Zellzyklus-Phasen und Wachstumsfaktoren wird vermutet, dass sE-Cadherin direkten Einfluss auf das Wachstum der untersuchten Prostatakarzinomzellen mittels Modulation der Zellzyklus-Phasen in Form eines G1-Phasen Arrestes nimmt.

5.3 Bedeutung von sE-Cadherin für die Adhäsion und Migration

Eine charakteristische Eigenschaft von malignen Tumoren ist es, sich unkontrolliert über das normale Maß einer nicht Tumorzelle hinaus auszubreiten. Das Eindringen von Tumorzellen in das Lymph- und Blutgefäßsystem geschieht durch Infiltration, welche mit einer Destruktion des umgebenden Gewebes einhergeht [91]. Dieser Prozess bedingt eine rasche Metastasierung, welche die Chance auf eine Heilung des Patienten erheblich reduziert [92, 93]. Die Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen stellt einen wichtigen Faktor im Vorgang der Metastasierung dar. Nach dem Infiltrieren des Zielgewebes ist es für die Tumorzellen notwendig sich festzusetzen, um Metastasen auszubilden [51].

Adhäsion

In gesundem Gewebe spielen die Adhäsion und Interaktion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle, um ein Gleichgewicht (Homöostase) zu erhalten. Als Beispiel sind Epithelzellen zu nennen, welche nicht nur untereinander, sondern auch mit

Diskussion

der extrazellulären Matrix agieren, um die Gewebestruktur aufrecht zu halten [94]. E-Cadherin, welches extrazelluläre Ca^{2+} Bindungsstellen besitzt, ist maßgeblich über deren Aktivierung an der Zelladhäsion und somit der interzellulären Stabilität von z.B. Epithelzellen beteiligt [95].

Für die parentalen PC3- und Docetaxel resistenten DU145-Zellen konnte auf den mit Endothel (HMEC-Zellen) beschichteten Platten ein signifikanter Adhäsions-reduzierender Effekt durch sE-Cadherin festgestellt werden. Bei den anderen untersuchten Zelllinien waren keine signifikanten Veränderungen der Adhäsion zu beobachten. SE-Cadherin scheint somit den Adhäsionsprozess der Zellen an Endothel lediglich für einzelne Zelllinien zu beeinflussen, was möglicherweise auf unterschiedliche Wirkmechanismen (z.B. variierende Integrin Expression) von sE-Cadherin in den untersuchten Zellen hindeutet. Gegenüber Kollagen und Fibronectin banden die unbehandelten Kontrollzellen in wesentlich höherer Anzahl, verglichen zur Adhäsion an unbeschichtetes Plastik. Interaktionen hinsichtlich des Adhäsionsverhalten der Zellen gegenüber dem Plastikträger konnten somit als nicht relevant außer Acht gelassen werden. Unter sE-Cadherin reduzierte sich die Anheftung aller PC3- und der parentalen DU145-Zellen an Kollagen und Fibronectin dosisabhängig. Auffällig war der Unterschied der Docetaxel resistenten DU145 Zellen, welche im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zellen eine signifikant erhöhte Adhäsionsrate durch die Behandlung mit sE-Cadherin zeigten. Die Arbeitsgruppe von Parfiniewicz et al. berichtete von einer Reduktion des sE-Cadherin Spiegels und einem damit einhergehenden Anstieg der Adhäsion kolorektaler Tumorzellen nach Exposition mit TNF-alpha [96]. Dieser Effekt ist vergleichbar zur inversen Korrelation aus erhöhtem sE-Cadherin Spiegel (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sE-Cadherin Behandlung) und reduzierter Adhäsion in den Experimenten der vorliegenden Arbeit. Bei der Interpretation ist allerdings neben den verschiedenen Tumorentitäten die unterschiedliche Behandlung der Zellen zu berücksichtigen. Unter Vorsicht wird geschlussfolgert, dass sE-Cadherin zu einer reduzierten Adhäsionsaktivität verschiedener PCa-Zelllinien an Matrixproteine (Kollagen, Fibronectin) beizutragen vermag. Bezüglich der Interaktion der Tumorzellen mit Endothel lässt sich diese Schlussfolgerung nur eingeschränkt treffen. Hier gilt es herauszuarbeiten, warum Unterschiede in der Reaktion der Tumorzellen gegenüber sE-Cadherin bestehen und welche Mechanismen hierfür verantwortlich sind. In Bezug auf die verminderte Bindungskapazität (einzelner Zelllinien) wurde eine Zunahme der Zellbeweglichkeit spekuliert und dies in

Diskussion

Zusammenhang mit einer verstärkten migratorischen Aktivität gesehen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Migrationsstudien durchgeführt.

Chemotaxis

Roussos et al. verweisen in ihrem Artikel zur Chemotaxis von Tumorzellen auf einen direkten Zusammenhang zwischen einer verstärkten Metastasierung und einem gesteigerten chemotaktischen Potenzial der Tumorzellen [97]. Ein solches Bestreben der Tumorzellen erscheint naheliegend, da ein gesteigertes chemotaktisches Potential möglicherweise die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Migration einer Tumorzelle in ein Zielgewebe verbessert. Durch die Behandlung mit 5 µg/ml sE-Cadherin wurde für die parentalen Zelllinien PC3 und DU145 ein signifikanter Anstieg der chemotaktischen Aktivität beobachtet. Vergleichbare Beobachtungen machten Chunthapong et al. in ihren Studien zu der Bedeutung von sE-Cadherin bei Prostatakarzinomzellen. Bei DU145 Subtypzellen mit einem 0,1fach niedrigeren E-Cadherin Expressionsspiegel, verglichen zur DU145 Standard-Zelllinie, konnte sowohl eine erhöhte Migration beobachtet werden. Darüber hinaus gelang es Chunthapong et al., das 80 kDa große sE-Cadherin Fragment im Zellkulturüberstand nachzuweisen und in direkten Zusammenhang mit einer gesteigerten Invasion und Migration der DU145 Zellen zu bringen [98]. Bei genauerer Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass der Chemotaxis verstärkende Effekt von sE-Cadherin bei den parentalen DU145 Zellen stärker als bei den PC3 Zellen ausfiel. Auch bei den Docetaxel resistenten PC3 Zellen und den Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen kam es unter 5 µg/ml sE-Cadherin zu einer signifikant gesteigerten chemotaktischen Aktivität. Lediglich die Docetaxel resistenten DU145 Zellen wiesen eine leicht verminderte Chemotaxis auf. Dieser Effekt fiel jedoch nicht signifikant aus, was daraufhin deutet, dass sE-Cadherin für die chemotaktische Aktivität der Docetaxel resistenten DU145 von untergeordneter Bedeutung ist. Das Phänomen lässt sich nicht zufriedenstellend erklären. Da Docetaxel resistente PC3 Zellen in ihrem Migrationsverhalten unter sE-Cadherin beeinflusst wurden, scheint die Docetaxel-Resistenz per se als Ursache unwahrscheinlich zu sein. Vielmehr sind zellspezifische Differenzen in intrazellulären Signalabläufen zwischen PC3 und DU145 ursächlich für die unterschiedliche Reaktion gegenüber sE-Cadherin verantwortlich zu machen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch dieser Thematik nicht nachgegangen.

Diskussion

Einen möglichen Ansatz für eine Erklärung des Migrations-steigernden Effekts von sE-Cadherin liefern Brouxhon et al. in ihren Studien am Plattenepithelkarzinom. Sie schlussfolgerten, dass sE-Cadherin über Stimulation des MAPK und PI3K/AKT Signalweges die Expression von MMPs (Matrixmetalloproteasen) steigern und dadurch direkten positiven Einfluss auf die invasive Aktivität der Tumorzellen nimmt [79]. Interessanterweise sind DU145-Zellen PTEN-positiv, PC3-Zellen hingegen PTEN-negativ. PTEN (Phosphatase And Tensin Homolog) dient als Tumorsuppressor und ist über die Interaktion mit der AKT-Signalkaskade in Migrationsprozesse eingebunden. Tatsächlich scheint eine Kommunikation zwischen E-Cadherin und PTEN zu bestehen [99, 100], so dass möglicherweise das Vorhandensein von PTEN in DU145-Zellen das an PC3-Zellen (PTEN-negativ) ausgelöste Migrationsverhalten kompensiert wurde. Der Effekt ist aber ausschließlich in Zusammenhang mit der Docetaxel-Resistenz zu sehen, da nur hier die Chemotaxis durch sE-Cadherin nicht beeinflusst wurde. Unabhängig vom exakten Wirkmechanismus beobachteten auch Teng et al. beobachteten in ihren Studien an Oropharyngealkarzinomen, dass ein im Serum erhöhter sE-Cadherin Spiegel mit einem Anstieg der Migration der Tumorzellen einhergeht [101]. Auch Symowicz et al. und Davies et al. sahen in ihren in vitro Studien, dass eine Behandlung mit sE-Cadherin bei Eierstock- und Prostatakarzinomen zu einem Anstieg der Migrationsaktivität führt [102, 103].

Vertiefend wurde die horizontale Bewegung der Zellen im Scratch-Experiment untersucht. Im Gegensatz zur Boyden-Kammer liegt jedoch kein Stoffgradient vor. Bei den parentalen und Docetaxel resistenten PC3 und DU145 Zellen zeigte sich unter sE-Cadherin ein zur Boyden-Kammer vergleichbarer Effekt einer erhöhten Beweglichkeit der Tumorzellen. Lediglich die Cabazitaxel resistenten DU145 Zellen blieben in ihrem Bewegungsverhalten von sE-Cadherin unbeeinflusst, was sich nicht mit dem im Boyden-Kammer Experiment beobachteten Anstieg der Chemotaxis deckt. Qi-Ping Hu beschreiben in ihrer Arbeit ein Voranschreiten eines Tumors unter dem Einfluss von sE-Cadherin. Sie konnten bei Brust-, Eierstock- und Lungenkrebs feststellen, dass sE-Cadherin die Wnt/ β -cat-Signalübertragung aktiviert, wodurch die Transkription des für E-Cadherin kodierenden Gens CDH1 gehemmt und dadurch die Invasions- und Migrationsaktivität der Tumorzellen gefördert wird [104]. Es wird hypothetisiert, dass diese Signalübertragung durch eine Cabazitaxel Resistenz in ihrer Bedeutung für die Chemotaxis von DU145-Zellen reduziert. Die Annahme gilt nur für den Scratch-, nicht aber den Boyden-Kammer-Test, was die Komplexität des Migrationsvorgangs deutlich macht.

Diskussion

Eine grundlegende Eigenschaft von Tumorzellen ist deren Fähigkeit sich z.B. durch EMT an selektiven Druck anpassen zu können. Puisieux et al. zeigen, dass ein Verlust der E-Cadherin Expression maßgeblich an der EMT, einem wesentlichen embryonalen Prozess, beteiligt ist und dadurch die Metastasierung eines Tumors begünstigt [105]. Eastham et al. beobachteten darüber hinaus, dass während der EMT ein Umschalten von E-Cadherin zu N-Cadherin in Verbindung mit einer gesteigerten Vimentin-, E-Cadherin Repressormolekül (Snail, Slug) und Gelatinase (Matrix Metalloproteinase; MMP-2 und MMP-9) Expression einhergeht [106]. Aus diesem Grund wurde die räumliche Verteilung von Vimentin im konfokalen Lasermikroskop untersucht. Hierbei konnten große Veränderungen in der Anordnung der Vimentinstrukturen um den Zellkern herum dokumentiert werden. In manchen Zellen verschob sich Vimentin von einer runden zu einer ovalen Form um den Zellkern und in anderen war der Effekt genau entgegengesetzt. Eine Bestimmung der absoluten Menge an Vimentin war nicht möglich, allerdings konnte gezeigt werden, dass sE-Cadherin die Vimentinstrukturen beeinflusst und somit Einfluss auf die EMT nimmt. Anhand dieser Beobachtungen konnten keine spezifischen Schlussfolgerungen zur Bedeutung dieser Vimentin-Verschiebung getroffen werden. Die in diesem Kapitel besprochenen Beobachtungen der Migrationsstudien untermauern allerdings die am Ende des Kapitels „Adhäsion“ aufgestellte Hypothese, dass sE-Cadherin durch eine reduzierte Adhäsion bei einer zugleich erhöhten Migration die Metastasierungsaktivität von PCa-Zellen verstärkt.

5.4 Auswirkungen von sE-Cadherin auf die Integrin-Expression

In gesundem Gewebe spielt die Homöostase, welche von der Adhäsion zwischen Zellen und der Interaktion mit verschiedenen extrazellulären Matrices abhängt, eine bedeutende Rolle. Die für diese komplexen Interaktionen verantwortlichen Integrine bezeichnet man als Zelladhäsionsmoleküle [94]. Integrine wurde bereits 1987 durch Hynes et al. als Zelladhäsionsmoleküle beschrieben [107]. Bei diesen Molekülen handelt es sich um heterodimere Komplexe, welche aus einer α - und β -Untereinheit bestehen. Als Botenstoffe sind sie dazu in der Lage an einer Zielstruktur (EZM, Endothel) die Adhäsion, Migration und Invasion zu steuern. [108]. Durch die Behandlung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ sE-Cadherin wurde die Expression der Integrin Subtypen $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 4$ in allen PC3 Zellen signifikant reduziert. Für die DU145 Zellen stellte sich ein uneinheitliches Bild heraus. $\alpha 3$ wurde verstärkt

Diskussion

exprimiert, $\alpha 5$ und $\beta 1$ zeigten keine signifikanten Veränderungen und $\beta 4$ alternierte in der Expression je nach Taxan-Resistenz. Die Unterschiede stehen in teilweise Einklang zu den unterschiedlichem Adhäsions- und Migrationsverhalten beider Tumorzelllinien. Auch Desgrosellier und Cheresh beschreiben in einer Studie zu Integrinen einen Zusammenhang zwischen der Expression spezifischer Integrin-Subtypen wie $\alpha v\beta 3$ und einer verstärkten Entstehung von Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom [109]. Das Integrin System ist äußerst komplex und wird durch eine Vielzahl von Umstrukturierungen von Signalen und Mechanismen beeinflusst. Eine Mutation oder Veränderung der Expression kann häufig mit Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht werden [94]. Dabei bestimmt das initiale Integrinprofil das Ausmaß, in dem Anhaftung an Matrices und die anschließende Migration ablaufen [109]. Um zu klären, welche Bedeutung die unter sE-Cadherin veränderten Integrine für das Wachstum und die Metastasierung von PCa-Zellen hat wurden Blockadestudien durchgeführt.

5.5 Blockadestudie

5.5.1 Bedeutung von Integrinen für das Tumorwachstum

Um zu klären, ob der Wirkeffekt von sE-Cadherin auf Veränderungen der Integrine $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$ zurückzuführen ist, wurden diese mit blockierenden Antikörpern wie im Abschnitt „3.13 Blockadestudie“ beschrieben, behandelt. Anschließend wurden die Zellen MTT-, Adhäsion- und Chemotaxis-Studien zugeführt.

Die MTT- und Integrin-Experimente für die PC3 Zellen zeigten, dass es unter einer sE-Cadherin Behandlung sowohl zu einer Wachstumsreduktion als auch zu einer reduzierten Expression der Integrin Subtypen $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$ kam. Die Blockade dieser Integrine induzierte eine vergleichbare Reduktion des Wachstums, wie in den MTT-Experimenten unter sE-Cadherin. Für die DU145 Zellen präsentierte sich ein uneinheitliches Bild hinsichtlich der wachstumsreduzierenden Effekte der blockierten Integrine. Nur $\alpha 3$ führte in allen DU145 Zellen zu einer reduzierten Zellzahl nach 72 Stunden. Anhand dieser Beobachtungen wird postuliert, dass der durch sE-Cadherin in allen PC3 Zellen beobachtete, Zellwachstum reduzierende Effekt in Zusammenhang mit den drei untersuchten Integrin-Subtypen steht. Bei allen untersuchten DU145 Zelllinien scheint dieser Zusammenhang lediglich für $\alpha 3$ zu

Diskussion

bestehen. Gonzales et al. konnten in ihrer Studie an epithelialen Zellen zeigen, dass durch eine funktionelle Blockade von Laminin-5, welche über den Integrin Subtyp $\alpha 3$ induziert wurde, eine signifikante Reduktion der Proliferation eingeleitet wurde [110]. Auch Desgrosellier und Cheresch weisen in ihrer Studie zum Effekt ligationsabhängiger Integrine auf das reduzierte Wachstum von Tumorzellen unter Integrin Blockade hin. Dabei könnte die Art und Weise wie Integrine das Überleben von Tumorzellen beeinflussen ein entscheidender Faktor für die Wirksamkeit von Integrin-Antagonisten bei Krebs sein [109]. Aber auch andere Arbeitsgruppen wie Assoian und Klein demonstrierten in ihrer Publikation den direkten Zusammenhang zwischen Integrinen und dem Zellwachstum [111]. Die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen im Einklang mit diesen Studien hinsichtlich der Verknüpfung der Integrine und dem Wachstum der PCa-Zellen.

5.5.2 Blockade der Metastasierungsaktivität?

Adhäsion

Die Blockade von $\alpha 3$ induzierte auf Kollagen für alle untersuchten Zellen eine signifikante Reduktion der Adhäsion. Die Blockade von $\beta 1$ korrelierte bei allen Zellen auf Kollagen und Fibronectin mit einer signifikanten Reduktion der Adhäsion. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der adhäsionsreduzierende Effekt von sE-Cadherin auf Prostatakarzinomzellen mit einer reduzierten Expression der Integrin Subtypen $\alpha 3$ und $\beta 1$ assoziiert ist. Die Art des Effekts ist allerdings abhängig von Zelllinie, Resistenz und der EZM. Keine Blockade eines einzelnen Integrin Subtyps war mit einer Reduktion der Adhäsion in allen Zelllinien auf beiden EZM assoziiert. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass kein einzelnes Integrin für die unter sE-Cadherin beobachtete Reduktion der Adhäsion relevant ist. Ob und inwieweit sich die Funktion eines Integrins unter Resistenzinduktion verändert, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Morini et al. beschreiben in ihrer Studie am Mammakarzinom die Bedeutung von $\alpha 3$, $\beta 1$ und deren heterodimeren Komplex. Der $\alpha 3\beta 1$ -Integrin Komplex ist ein Rezeptor, der extrazelluläre Matrixproteine erkennt. Dazu zählen unter anderen Fibronectin und Kollagen. Dieser Komplex, welcher bei verschiedenen metastasierenden Tumoren erhöht zu finden ist, wird mit einer erhöhten Migration und Invasion in Verbindung gebracht [112].

Diskussion

Anhand der Integrin-Studien konnte veranschaulicht werden, dass sE-Cadherin die Expression der beiden Integrine $\alpha 3$ und $\beta 1$ reduziert. Da die Blockade dieser beiden Integrine zu vergleichbaren Reduktionen (ich denke, es gibt nicht DAS Integrin – siehe Deine Anmerkung oben – oder habe ich das jetzt falsch verstanden?) in den Adhäsions-Studien führte, wird postuliert, dass der Adhäsions-reduzierende Effekt von sE-Cadherin im Zusammenhang mit den beiden genannten Integrinen steht.

Chemotaxis

In den Blockade Studien zum Effekt der Integrine $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$ auf die Chemotaxis kam es in allen untersuchten Zelllinien, außer den Docetaxel resistenten DU145 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Chemotaxis. Der Effekt fiel jedoch nicht bei allen Zellen signifikant aus. Kwon et al. konnten in ihrer Studie zu *Smilax glabra* (Chinawurzel) ebenfalls einen Migrations-reduzierenden Effekt bei PC3 und LNCaP Zellen durch eine $\beta 1$ Blockade beobachten [113]. Auch Morini et al. konnten in ihren Studien am Mammakarzinom beobachten, dass eine $\alpha 3$ Blockade zu deutlich reduzierten Migration und Invasion der Zellen führt [112]. Dass Chemotaxis-Reduktionen jedoch nicht nur auf die Funktion einzelner Integrine beschränkt werden dürfen, haben Chen et al. in ihren Studien zu der Wirkung von Osthol beim Mammakarzinom nachgewiesen. Sie konnten belegen, dass ein Abschalten der Integrine $\alpha 3$ und $\alpha 5$ durch die Unterdrückung des FAK/Src/Rac1-Weges die Migration und Invasion abschwächen kann [114]. Die eigenen Ergebnisse der Integrin Blockadestudie belegen, dass alle untersuchten Integrine ($\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$) im Zusammenhang mit der Chemotaxis-Aktivität stehen. Da die Behandlung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ sE-Cadherin bei allen PC3 Zelllinien zu einer reduzierten Expression dieser drei Integrine führte wird postuliert, dass sE-Cadherin durch Reduktion dieser Integrine die Chemotaxis erhöht.

6. **Ausblick**

Die erarbeiteten Daten verweisen auf sE-Cadherin als ein wichtiges Steuerelement von PCa-Wachstum, Proliferation und Invasion. Mit Hilfe von sE-Cadherin als neuer Biomarker lassen sich möglicherweise prognostische Aussagen verfeinern und Therapieansätze optimieren. Es muss jedoch festgehalten werden, dass die Aussage auf in vitro Studien basiert. Um die im Zellkulturmodell gemachten Beobachtungen auf den Patienten übertragen zu können, sind weiterführende Tierversuche nötig. Es stellt sich zudem die Frage, ob die im zweidimensionalen Modell gemachten Beobachtungen mit den Abläufen in einem dreidimensionalen Zellkultur-Modell vergleichbar sind. Möglicherweise unterscheiden sich die Zell-Zell Interaktionen aufgrund der differenziellen räumlichen Anordnung der Zellen von den Zell-Zell Kommunikativen im 2D-Modell.

Weitere Arbeiten sollten zudem einen Fokus auf die epithelial-mesenchymale Transition legen, da unter sE-Cadherin ein Verlust der Zellverbindungen beobachtet werden konnte, was als möglicher Indikator für eine Veränderung hin zu mesenchymalen Stammzellen zu deuten ist. Zudem stellt sich die Frage, welche molekularbiologischen Veränderungen aufgrund der Taxan Resistenzen stattfinden und wie diese die Signalinduktion durch sE-Cadherin beeinflussen. Vertiefend bleibt zu eruieren, ob bereits das Ausgangs-Integrinprofil für die Variationen im Ansprechen auf sE-Cadherin verantwortlich zeichnet.

Neben den Integrinen sollten weitere Studien die Bedeutung der Wachstumsfaktoren, hier insbesondere der Akt-mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin)-Signalkaskade herausstellen, da die Aktivierung von Akt-mTOR wesentlich zum Tumorwachstum beiträgt. Möglicherweise löst sE-Cadherin Veränderungen im Signalweg aus.

7. Zusammenfassung

Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) dient der frühzeitigen Diagnose eines Prostatakarzinoms (PCa), ist jedoch in seiner Aussagekraft limitiert. Die vorliegende Promotionsarbeit hatte zum Ziel, die Bedeutung der 80 kDa großen Ektodomäne des Transmembranproteins E(-pithelial)-Cadherin (sE-Cadherin) als potentieller Biomarker zu evaluieren. Zur Anwendung kamen die PCa-Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP. Neben chemosensitiven Zellen wurden Docetaxel- und Cabazitaxel- resistente Zellen eingesetzt. Beide genannten Zytostatika kommen in der Erst- und Zweitlinien Therapie eines PCa's zur Anwendung, so dass die klinische Relevanz gegeben war.

Der Effekt von sE-Cadherin wurde sowohl auf die parentalen als auch auf die Taxan resistenten Tumorzellen gemessen und die Resultate in Relation zu den entsprechenden unbehandelten Zellen gesetzt. Konzentrationsabhängig induzierte sE-Cadherin in MTT- und klonogenen Wachstumstests eine signifikante Reduktion des Wachstums und der Proliferation, mit einer maximalen Suppression bei 5 µg/ml. Vertiefend wurde die Proliferation anhand der BrdU-Einbaurrate (ELISA) ermittelt. Mechanistisch wurden die Tumorzellen unter 5 µg/ml sE-Cadherin in der G0/G1-Phase arretiert (Durchflusszytometrie, FACS-Analyse). Distinkte apoptotische oder nekrotische Ereignisse wurden durch sE-Cadherin nicht ausgelöst (Annexin V-PI-Assay, Lactatdehydrogenase-Assay, Cell Death Detection-Assay). Die Adhäsion an Kollagen und Fibronectin erniedrigte sich unter sE-Cadherin, die chemotaktische Motilität hingegen erhöhte sich (Boyden-Kammer-Test; Scratch-Assay). Molekularbiologische Analysen demonstrierten Veränderungen von Wachstumsregulatoren der der CDK/Cyclin-Achse (Western Blot-Analyse). Auch modulierte sE-Cadherin signifikant die Oberflächen-Expression spezifischer Integrine des α - und β - Typs ($\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 4$; FACS-Analyse). Blockadestudien mit funktionsblockierenden Antikörpern bestätigten die Relevanz der veränderten Integrine für das Wachstum, die Adhäsion und die Chemotaxis.

sE-Cadherin führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion des Wachstums, was vermutlich auf eine verminderte Proliferationsaktivität zurückzuführen ist, ohne dabei toxische Effekte hervorzurufen. Reduktionen von Proteinen der CDK/Cyclin-Achse könnten eine mögliche Erklärung für die Arretierung der Zellen in der G0/G1-Phase liefern, mit einem dadurch ausgelösten Wachstumsstopp. Zudem konnten Veränderungen im Metastasierungsverhalten durch die reduzierte Adhäsion an die Matrixproteine Kollagen und

Zusammenfassung

Fibronektin bei zugleich erhöhter Chemotaxis durch sE-Cadherin beobachtet werden. Insbesondere die Reduktion der drei Integrin Subtypen $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 4$ scheinen für diesen Vorgang verantwortlich zu zeichnen. Es wird geschlussfolgert, dass sE-Cadherin das Zellwachstum bei parentalen und Taxan resistenten PCa Zellen *in vitro* vermindert, hingegen deren Fähigkeit zur systemischen Ausbreitung verstärkt. *In vivo* Analysen sind jedoch notwendig, um die Bedeutung von sE-Cadherin als potentiellen Biomarker zu verifizieren.

8. Summary

Prostate-specific antigen (PSA) is used for early diagnosis of prostate carcinoma (PCa), but is limited in its informative value. The present PhD thesis aimed to evaluate the significance of the 80 kDa ectodomain of the transmembrane protein E(-pithelial)-cadherin (sE-cadherin) as a potential biomarker. PCa cell lines PC3, DU145 and LNCaP were used. In addition to chemosensitive cells, docetaxel- and cabazitaxel-resistant cells were used. Both cytostatics mentioned are used in first- and second-line therapy of PCa, so the clinical relevance was given. The effect of sE-cadherin was measured on both parental and taxane resistant tumor cells and the results were put in relation to the corresponding untreated cells. In a concentration-dependent manner, sE-cadherin induced a significant reduction in growth and proliferation in MTT and clonogenic growth assays, with a maximum suppression at 5 $\mu\text{g/ml}$. In more detail, proliferation was determined by BrdU incorporation rate (ELISA). Mechanistically, tumor cells under 5 $\mu\text{g/ml}$ sE-cadherin were arrested in G0/G1 phase (flow cytometry, FACS analysis). Distinct apoptotic or necrotic events were not induced by sE-cadherin (Annexin V-PI assay, lactate dehydrogenase assay, cell death detection assay). Adhesion to collagen and fibronectin decreased under sE-cadherin, whereas chemotactic motility increased (Boyden chamber assay; scratch assay). Molecular biological analyses demonstrated changes in growth regulators of the CDK/cyclin axis (Western Blot analysis). Also, sE-cadherin significantly modulated the surface expression of specific α - and β -type integrins ($\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 4$; FACS analysis). Blockade studies with function-blocking antibodies confirmed the relevance of the altered integrins to growth, adhesion, and chemotaxis. SE-cadherin led to a significant reduction in growth in all cell lines examined, presumably due to reduced proliferation activity, without causing toxic effects. Reductions in CDK/cyclin axis proteins could provide a possible explanation for the arrest of cells in the G0/G1 phase, with a resulting growth arrest. In addition, changes in metastatic behavior could be observed due to reduced adhesion to the matrix proteins collagen and fibronectin with concomitant increased chemotaxis by sE-cadherin. In particular, the reduction of the three integrin subtypes $\alpha 3$, $\beta 1$, and $\beta 4$ appear to be responsible for this process. It is concluded that sE-cadherin decreases cell growth in parental and taxane-resistant PCa cells in vitro, in contrast, enhances their ability to spread systemically. However, in vivo analyses are necessary to verify the significance of sE-cadherin as a potential biomarker.

9. Literatur

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM et al. (2017) 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* 3:524–548. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>
3. Robert Koch Institut Krebs in Deutschland 2017/2018. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kiid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf;jsessionid=C90B2590DA930D3B22CDB540D282FEC7.internet082?__blob=publicationFile. Accessed 24 Feb 2022
4. Stiftung Deutsche Krebshilfe (ed) (2016) Die blauen Ratgeber - Prostata Krebs. Antworten. Hilfen. Perspektiven
5. Zhou CK, Check DP, Lortet-Tieulent J et al. (2016) Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group. *Int J Cancer* 138:1388–1400. <https://doi.org/10.1002/ijc.29894>
6. Zentrum für Krebsregisterdaten (2017) Prostatakrebs. <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs.html>. Accessed 23 Feb 2022
7. Coradduzza D, Cruciani S, Arru C et al. (2022) Role of miRNA-145, 148, and 185 and Stem Cells in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031626>
8. Grafik: altersstandardisierte Erkrankungsrate 2018/19. Seite 107. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kiid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf;jsessionid=C90B2590DA930D3B22CDB540D282FEC7.internet082?__blob=publicationFile. Accessed 24 Feb 2022
9. Zentrum für Krebsregisterdaten Prostatakrebs. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html. Accessed 20201104
10. Takeda Onkologie Prostata: Anatomie, Funktion, Sexualhormone und Beschwerden. <https://www.prostata.de/prostata#anatomie>
11. Djavan B Urologie und urologische Chirurgie 2006; Facultas
12. Zamecnik, P. and U. Müller-Lisse (2011) Prostata und Samenblasen, in Urogenitale Bildgebung. Springer p.179-207

Literatur

13. Steger K (2016) Anatomische und physiologische Grundlagen der Fertilität und der sexuellen Funktion. In: Michel MS, Thüroff J, Janetschek G et al. (eds) Retroperitoneum, Niere, Harnblase, Harnröhre, Tumorthherapie, vol 93. Springer, Berlin, Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1553–1560
14. Takeda Onkologie Entstehung und Formen des Prostatakarzinoms.
<https://www.prostata.de/prostatakrebs/was-ist-pca/entstehung-und-formen-des-prostatakarzinoms>. Accessed 03 Mar 2022
15. Edge SB AJCC cancer staging manual. 7. ed. [Internet] S.458.
<https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%207th%20Ed%20Cancer%20Staging%20Manual.pdf>. Accessed 23 Oct 2019
16. Hautmann R. (2010) Urologie: 4., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer-Verlag Berlin
17. Sobin, L. and C. Wittekind International Union Against Cancer: TNM: classification of malignant tumours 6th edition. New York: Wiley-Liss
18. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB et al. (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. JAMA 280:969–974.
<https://doi.org/10.1001/jama.280.11.969>
19. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M et al. (2017) EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. Eur Urol 71:618–629. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.003>
20. Krebsgesellschaft TNM-System nach P. Denoix 1946.
<https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/klassifikation-von-tumoren-tnm-.html>. Accessed 04 Mar 2022
21. Gleason DF (1966) Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother Rep 50:125–128
22. Heidenreich A, Aus G, Bolla M et al. (2008) EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol 53:68–80. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2007.09.002>
23. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms - Kurzversion 5.0 –April2018AWMF-Register-Nummer 043/022OL.
https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostata_Kurzversion_5.0.pdf
24. Onko Internetportal Klassifikation des Krankheitsstadiums
25. Prostatakrebs Selbsthilfe e.V. Die Lage der Prostata

Literatur

26. Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin Warum Früherkennung von Prostatakrebs? <https://www.patienten-information.de/mdb/downloads/kip/krebs/prostata-frueherkennung-kip.pdf>
27. Bul M, van den Bergh RCN, Zhu X et al. (2012) Outcomes of initially expectantly managed patients with low or intermediate risk screen-detected localized prostate cancer. *BJU Int* 110:1672–1677. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11434.x>
28. Preuß M Zelluläre und molekulare Charakterisierung der Docetaxel-Wirkung auf Prostatakarzinomzellen. Dissertation, Universität Greifswald
29. Fojo T, Meneffee M (2007) Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents. *Ann Oncol* 18 Suppl 5:v3-8. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm172>
30. Quinn M, Babb P (2002) Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 90:162–173. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2002.2822.x>
31. Verband Froschender Pharmafirmen e.V. Therapie Innovation 7: Individuell gegen den Tumor: Sechs Bäume für ein Menschenleben
32. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2017) *Molekularbiologie der Zelle*, 6. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim
33. van den Heuvel S (2005) Cell-cycle regulation. *WormBook*:1–16. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.28.1>
34. Bartsch V (2005) Wirkmechanismus der Taxane (Assault on the mitotic spindle. The action mechanism of taxane). *Pharm Unserer Zeit* 34:104–108. <https://doi.org/10.1002/pauz.200400109>
35. PubChem Strukturformel Docetaxel. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/docetaxel#section=2D-Structure>. Accessed 07 Mar 2022
36. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK et al. (eds) (2008) *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9., vollständig neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
37. Preiß J, Dornoff W, Schmieder A et al. (eds) (2014) *Taschenbuch Onkologie: Interdisziplinäre Empfehlungen zur Therapie 2014/2015*, 17. Aufl., rev. Ausg. Zuckschwerdt, Germering, Oberbay
38. PharmaWiki Strukturformel Cabazitaxel. <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Cabazitaxel>. Accessed 07 Mar 2022
39. Bouchet BP, Galmarini CM (2010) Cabazitaxel, a new taxane with favorable properties. *Drugs Today* 46:735–742. <https://doi.org/10.1358/dot.2010.46.10.1519019>

Literatur

40. Sulheim E, Mørch Y, Snipstad S et al. (2019) Therapeutic Effect of Cabazitaxel and Blood-Brain Barrier opening in a Patient-Derived Glioblastoma Model. *Nanotheranostics* 3:103–112. <https://doi.org/10.7150/ntno.31479>
41. Sanofi-Aventis (2014) Prescribing information. (Cabazitaxel) JEVTANA. <http://products.sanofi.us/jevtana/jevtana.html>
42. Bono JS de, Oudard S, Ozguroglu M et al. (2010) Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *The Lancet* 376:1147–1154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61389-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61389-X)
43. European Medicines Agency (2020) Biomarker. <https://www.ema.europa.eu/en/glossary/biomarker>
44. Tsaor I, Thurn K, Juengel E et al. (2015) sE-cadherin serves as a diagnostic and predictive parameter in prostate cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 34:43. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0161-6>
45. Damsky CH, Richa J, Solter D et al. (1983) Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 34:455–466. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90379-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90379-3)
46. Yoshida C, Takeichi M (1982) Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* 28:217–224. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90339-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90339-7)
47. David JM, Rajasekaran AK (2012) Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments. *Cancer Res* 72:2917–2923. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3498>
48. Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:622–634. <https://doi.org/10.1038/nrm1699>
49. Daniel JM, Reynolds AB (1995) The tyrosine kinase substrate p120cas binds directly to E-cadherin but not to the adenomatous polyposis coli protein or alpha-catenin. *Mol Cell Biol* 15:4819–4824. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.9.4819>
50. McCrea PD, Turck CW, Gumbiner B (1991) A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science* 254:1359–1361. <https://doi.org/10.1126/science.1962194>
51. Reymond N, d'Água BB, Ridley AJ (2013) Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer* 13:858–870. <https://doi.org/10.1038/nrc3628>
52. Tepass U, Truong K, Godt D et al. (2000) Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:91–100. <https://doi.org/10.1038/35040042>
53. Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119:1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>

Literatur

54. Ivanov AI, Naydenov NG (2013) Dynamics and regulation of epithelial adherens junctions: recent discoveries and controversies. *Int Rev Cell Mol Biol* 303:27–99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407697-6.00002-7>
55. Halbleib JM, Nelson WJ (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20:3199–3214. <https://doi.org/10.1101/gad.1486806>
56. Zhao H, Hu H, Chen B et al. (2021) Overview on the Role of E-Cadherin in Gastric Cancer: Dysregulation and Clinical Implications. *Front Mol Biosci* 8:689139. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.689139>
57. Iacopino F, Pinto F, Bertaccini A et al. (2012) Soluble E-cadherin and IL-6 serum levels in patients affected by prostate cancer before and after prostatectomy. *Oncol Rep* 28:370–374. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1785>
58. Tsaor I, Hüscher T, Jüngel E et al. (2019) sE-cadherin is upregulated in serum of patients with renal cell carcinoma and promotes tumor cell dissemination in vitro. *Urol Oncol* 37:355.e1-355.e9. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2019.03.001>
59. Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM et al. (1994) Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* 54:2577–2581
60. WPKoi LNCaP Cells: Transfection and Cell Culture Protocols. <http://www.lncap.com/>
61. ATCC DU145 Bezugsquelle. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-81.aspx?geo_country=de#characteristics
62. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y et al. (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16–23
63. Tai S, Sun Y, Squires JM et al. (2011) PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* 71:1668–1679. <https://doi.org/10.1002/pros.21383>
64. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E et al. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43:1809–1818
65. American Type Culture Collection LNCaP clone FGC (ATCC CRL-1740). https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1740.aspx?geo_country=de#
66. Mueller-Klieser W, Freyer JP, Sutherland RM (1986) Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids. *Br J Cancer* 53:345–353. <https://doi.org/10.1038/bjc.1986.58>
67. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J et al. (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1:2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
68. Schmitz S (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*, 3. Aufl. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Literatur

69. Nina Großer Endothelprotektion durch Acetylsalicylsäure: Stickstoffmonoxid und cGMP als antioxidative Mediatoren. <https://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/02/03H301/t4.pdf>. Accessed 02 Nov 2020
70. Jochen Rutz: Dissertation: Curcumin in Verbindung mit visuellem Licht hemmt Wachstum, Proliferation sowie motile Eigenschaften von Zellen des NZK. Frankfurt am Main; 2017
71. Sigma Aldrich Cell Death Detection ELISAPLUS. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/celldethro?lang=de®ion=DE>
72. Mani J, Neuschäfer J, Resch C et al. (2020) Amygdalin Modulates Prostate Cancer Cell Adhesion and Migration In Vitro. *Nutr Cancer* 72:528–537. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1637442>
73. Makarević J, Rutz J, Juengel E et al. (2018) HDAC Inhibition Counteracts Metastatic Re-Activation of Prostate Cancer Cells Induced by Chronic mTOR Suppression. *Cells* 7. <https://doi.org/10.3390/cells7090129>
74. Deryugina EI, Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* 25:9–34. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-7886-9>
75. Najy AJ, Day KC, Day ML (2008) The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J Biol Chem* 283:18393–18401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801329200>
76. Hongo H, Kosaka T, Oya M (2018) Analysis of cabazitaxel-resistant mechanism in human castration-resistant prostate cancer. *Cancer Sci* 109:2937–2945. <https://doi.org/10.1111/cas.13729>
77. Hishida S, Kawakami K, Fujita Y et al. (2021) Proteomic analysis of extracellular vesicles identified PI3K pathway as a potential therapeutic target for cabazitaxel-resistant prostate cancer. *Prostate* 81:592–602. <https://doi.org/10.1002/pros.24138>
78. Zhu Y, Liu C, Nadiminty N et al. (2013) Inhibition of ABCB1 expression overcomes acquired docetaxel resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 12:1829–1836. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0208>
79. Brouxhon SM, Kyrkanides S, Teng X et al. (2014) Soluble E-cadherin: a critical oncogene modulating receptor tyrosine kinases, MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Oncogene* 33:225–235. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.563>
80. Zhou Y, Ran J, Tang C et al. (2007) Effect of celecoxib on E-cadherin, VEGF, Microvessel density and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Biology & Therapy* 6:269–275. <https://doi.org/10.4161/cbt.6.2.3629>
81. Inge LJ, Barwe SP, D'Ambrosio J et al. (2011) Soluble E-cadherin promotes cell survival by activating epidermal growth factor receptor. *Exp Cell Res* 317:838–848. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.025>

Literatur

82. Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology* 16:663–669. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>
83. Bodnar L, Stec R, Cierniak S et al. (2018) Role of WNT/ β -Catenin Pathway as Potential Prognostic and Predictive Factors in Renal Cell Cancer Patients Treated With Everolimus in the Second and Subsequent Lines. *Clin Genitourin Cancer* 16:257–265. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.01.008>
84. Zhang H, Zhao X, Liu H et al. (2019) Trichostatin A inhibits proliferation of PC3 prostate cancer cells by disrupting the EGFR pathway. *Oncol Lett* 18:687–693. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10384>
85. Galderisi U, Jori FP, Giordano A (2003) Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22:5208–5219. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206558>
86. Satyanarayana A, Kaldis P (2009) A dual role of Cdk2 in DNA damage response. *Cell Div* 4:9. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-4-9>
87. Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R et al. (1995) Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood* 85:2870–2876
88. Sirotkin AV, Harrath AH (2014) Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol* 741:230–236. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.057>
89. Li T, Zhao X, Mo Z et al. (2014) Formononetin promotes cell cycle arrest via downregulation of Akt/Cyclin D1/CDK4 in human prostate cancer cells. *Cell Physiol Biochem* 34:1351–1358. <https://doi.org/10.1159/000366342>
90. Wang A, Zhang L (2007) Effect of lycopene on proliferation and cell cycle of hormone refractory prostate cancer PC-3 cell line. *Wei Sheng Yan Jiu* 36:575–578
91. Tumorzentrum Winterthur Fokus Tumorzentrum Winterthur - Engagierte Zusammenarbeit zum Wohl des Patienten. <https://www.ksw.ch/app/uploads/2018/11/fokus-tumorzentrum-ksw.pdf>. Accessed 27 Apr 2022
92. Eccles SA, Welch DR (2007) Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *The Lancet* 369:1742–1757. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60781-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60781-8)
93. Friedl P, Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3:362–374. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
94. Janiszewska M, Primi MC, Izard T (2020) Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem* 295:2495–2505. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007759>
95. van Roy F (2014) Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 14:121–134. <https://doi.org/10.1038/nrc3647>
96. Parfiniewicz B, Pendzich J, Kapral M et al. (2012) The influence of TNF-alpha on concentration of soluble adhesion molecules in cultures of HT-29 cells exposed to inositol hexaphosphate. *Acta Pol Pharm* 69:1291–1297

Literatur

97. Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A (2011) Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer* 11:573–587. <https://doi.org/10.1038/nrc3078>
98. Chunthapong J, Seftor EA, Khalkhali-Ellis Z et al. (2004) Dual roles of E-cadherin in prostate cancer invasion. *J Cell Biochem* 91:649–661. <https://doi.org/10.1002/jcb.20032>
99. Olson A, Le V, Aldahl J et al. (2019) The comprehensive role of E-cadherin in maintaining prostatic epithelial integrity during oncogenic transformation and tumor progression. *PLoS Genet* 15:e1008451. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008451>
100. Gharbi S, Mohammadi Z, Dezaki MS et al. (2022) Characterization of the first microRNA in human CDH1 that affects cell cycle and apoptosis and indicates breast cancers progression. *J Cell Biochem* 123:657–672. <https://doi.org/10.1002/jcb.30211>
101. Teng X, Ma L, Kyrkanides S et al. (2015) Modulation of RTK by sEcad: a putative mechanism for oncogenicity in oropharyngeal SCCs. *Oral Dis* 21:185–194. <https://doi.org/10.1111/odi.12235>
102. Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ et al. (2007) Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 67:2030–2039. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2808>
103. Davies G, Jiang WG, Mason MD (2001) 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* 7:3289–3297
104. Hu Q-P, Kuang J-Y, Yang Q-K et al. (2016) Beyond a tumor suppressor: Soluble E-cadherin promotes the progression of cancer. *Int J Cancer* 138:2804–2812. <https://doi.org/10.1002/ijc.29982>
105. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J (2014) Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol* 16:488–494. <https://doi.org/10.1038/ncb2976>
106. Eastham AM, Spencer H, Soncin F et al. (2007) Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* 67:11254–11262. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2253>
107. Hynes RO (2002) Integrins. *Cell* 110:673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)
108. Hood JD, Cheresh DA (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2:91–100. <https://doi.org/10.1038/nrc727>
109. Desgrosellier JS, Cheresh DA (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10:9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>

Literatur

110. Gonzales M, Haan K, Baker SE et al. (1999) A cell signal pathway involving laminin-5, alpha3beta1 integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation. *Mol Biol Cell* 10:259–270. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.2.259>
111. Assoian RK, Klein EA (2008) Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends Cell Biol* 18:347–352. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.05.002>
112. Morini M, Mottolese M, Ferrari N et al. (2000) The $\alpha 3\beta 1$ integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (mmp-9) activity. *Int J Cancer* 87:336–342. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(20000801\)87:3<336:AID-IJC5>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0215(20000801)87:3<336:AID-IJC5>3.0.CO;2-3)
113. Kwon OY, Ryu S, Choi JK et al. (2020) Smilax glabra Roxb. Inhibits Collagen Induced Adhesion and Migration of PC3 and LNCaP Prostate Cancer Cells through the Inhibition of Beta 1 Integrin Expression. *Molecules* 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25133006>
114. Chen Y-Q, Song H-Y, Zhou Z-Y et al. (2021) Osthole inhibits the migration and invasion of highly metastatic breast cancer cells by suppressing ITG $\alpha 3$ /ITG $\beta 5$ signaling. *Acta Pharmacol Sin*. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00757-7>

10. Lebenslauf

Lebenslauf

Lebenslauf

11. Danksagung

12. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sebastian Maxeiner, geboren am 24.08.1987 in Bad Kreuznach, dass ich diese Dissertation selbstständig angefertigt habe. Dabei habe ich die Hilfsmittel genutzt, die im Literaturverzeichnis und in den Bilderquellen angegeben wurden. Ausschnitte der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn aus anderen Arbeiten entnommen wurden, sind an entsprechender Stelle gekennzeichnet. Außerdem bestätige ich, dass diese Arbeit nicht an anderer Stelle als Prüfungsleistung vorgelegt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift