

Aus der Klinik für Urologie der Medizinischen Fakultät Mannheim

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Maurice Stephan Michel -

Funktionelle Charakterisierung neuer Genkandidaten exosomaler Proteine im Prostatakarzinom

Inauguraldissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Frank Waldbillig

aus
Düdelingen

2017

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Sergij Goerdts
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Philipp Erben

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
• 1. Einleitung	4
• 1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	4
• 1.2. Symptomatik, Diagnostik und Therapie	5
• 1.2.1 Kurative Therapie.....	6
• 1.2.2 Supportiv- und Palliativtherapie	6
• 1.3 Metastasierung, Invasion und Exosomen	7
• 1.4 Genkandidaten	8
• 1.4.1 EEF1A2.....	8
• 1.4.2 FABP5	9
• 1.4.3 GNAI1	9
• 1.4.4 MPP6	9
• 1.4.5 SMPDL3B	9
• 1.5 Zielsetzung der Arbeit	9
• 2. Material und Methoden	11
• 2.1 PCR Methoden	11
• 2.1.1 RNA Isolation.....	11
• 2.1.2 cDNA Synthese.....	12
• 2.1.3 PCR zur Überprüfung der Primerqualität.....	13
• 2.1.4 Quantitative PCR mit TaqMan Sonden	14
• 2.2 Kohorte	15
• 2.3 Zellkultur und Zellassays	16
• 2.3.1 Allgemeine Zellkultur.....	16
• 2.3.2 Verwendete Zelllinien.....	18
• 2.3.3 Verwendete Zusätze	21
• 2.3.4 MTT Proliferationsassay	21
• 2.3.5 MDCK-C7 Invasionsassay	22
• 2.4 Small interfering (si) RNA Transfektion und siRNA Assays	26
• 2.4.1 siRNA Transfektion	26
• 2.4.2 siRNA MTT Proliferationsassay	27
• 2.4.3 siRNA Scratch Assay	28
• 3. Ergebnisse	31

Inhaltsverzeichnis

• 3.1 Etablierung der PCR-Methodik	31
• 3.1.1 Verifikation der Primerqualität	31
• 3.1.2 Intraassayvarianz bei Pipettiervorgängen	31
• 3.1.3 Optimierung der Primerkonzentration	32
• 3.1.4 Etablierung von Multiplex PCRs	33
• 3.2 Kohorte	34
• 3.2.1 Klinische Daten der Kohorte	34
• 3.2.2 Ergebnisse des Expressionsprofilings	35
• 3.3 Eigenschaften der Zelllinien	41
• 3.3.1 MTT Proliferationsassay	41
• 3.3.2 MDCK-C7 Invasionsassay	42
• 3.4 siRNA Assays	45
• 3.4.1 Unpooling der siRNA.....	45
• 3.4.2 siRNA MTT Proliferationsassay	46
• 3.4.3 siRNA Scratch Assay	47
• 4. Diskussion	51
• 4.1 Intention der Arbeit.....	51
• 4.2 Expression der Gene.....	52
• 4.3 Charakterisierung der Gene	57
• 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	63
• 5. Zusammenfassung	64
• 6. Literaturverzeichnis	65
• 7. Eigene Publikationen	71
• 8. Lebenslauf	72
• 9. Danksagung	73
• 10. Anhang	74

Abbildungsverzeichnis

• Abb. 1	PC3 Zellen im Lichtmikroskop	19
• Abb. 2	DU145 Zellen im Lichtmikroskop	19
• Abb. 3	PNT1A Zellen im Lichtmikroskop	19
• Abb. 4	MDCK-C7 Zellen im Lichtmikroskop	20
• Abb. 5	Schematische Darstellung des MDCK-C7 Invasionsassays.....	23
• Abb. 6	Einzelwiderstände am MDCK-C7 Monolayer.....	25
• Abb. 7	Schematische Darstellung des siRNA MTT Proliferationsassay.....	28
• Abb. 8	Schematische Darstellung des siRNA <i>Scratch Assay</i>	30
• Abb. 9	Exemplarische scratch Auswertung mittels tscratch Software.....	30
• Abb. 10	Qualitative Expression von MPP6 bei verschiedenen Zelllinien	31
• Abb. 11	Intraassayvarianz der Primerpaare in DU145-Zellen	32
• Abb. 12	cT-Werte bei unterschiedlichen Primervolumina.....	33
• Abb. 13	Vergleich der Duplex- und Einzel-PCRs	34
• Abb. 14	Genexpression der Kandidaten nach T-Stadium.....	36-37
• Abb. 15	Genexpression der Kandidaten nach Gleason-Score	38-39
• Abb. 16	GNAI1 Expression bei Patienten > 65 Jahren	41
• Abb. 17	Proliferation der Zelllinien DU145, PC3 und PNT1A.....	42
• Abb. 18	Resistenzentwicklung der MDCK-C7 Zellen	43
• Abb. 19	Resistenzentwicklung nach Zugabe von TGF β	43
• Abb. 20	Resistenzentwicklung nach Zugabe von DU145, PC3, PNT1A.....	44
• Abb. 21	Invasionskoeffizient 24 h, 48 h und 72 h nach Kokultivierung	45
• Abb. 22	Unpooling der siRNA.....	46
• Abb. 23	siRNA MTT Proliferationsassay nach 96 h Gen Knockdown	47
• Abb. 24	siRNA <i>Scratch Assay</i>	48
• Abb. 25	Belegte Fläche 24 h nach ‚ <i>scratch</i> ‘	49
• Abb. 26	Belegte Fläche 48 h und 72 h nach ‚ <i>scratch</i> ‘	50

Tabellenverzeichnis

• Tab. 1	Reaktionsvolumen bei der cDNA Synthese.....	12
• Tab. 2	Reaktionsgemisch der qualitativen PCR	13
• Tab. 3	Protokoll der qualitativen PCR.....	14
• Tab. 4	Reaktionsgemisch der quantitativen PCR mit Taq-Polymerase	14
• Tab. 5	Zusammensetzung des EDTA-Puffers	21
• Tab. 6	Mengenangaben der siRNA Transfektion.....	27
• Tab. 7	Einteilung der Patientenproben in klinische Gruppen	34-35
• Tab. 8	Übersicht der Genexpression Normalgewebe vs.Tumorgewebe	35
• Tab. 9	P-Werte nach T-Stadium	37
• Tab. 10	P-Werte nach Gleason-Score.....	39
• Tab. 11	Proliferation der Zelllinien DU145, PC3 und PNT1A.....	41
• Tab. 12	Invasionskoeffizient mit entsprechendem p-Wert.....	45
• Tab. 13	Belegte Fläche nach ‚scratch‘ in Prozent	49

Abkürzungsverzeichnis

ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der wiss. med. Fachgesellschaften
BMI	<i>Body Mass Index</i> , Körpermassenzahl
BPH/BPS	Benigne Prostatahyperplasie / benignes Prostatasyndrom
CT	Computertomographie
cT-Wert	<i>cycle treshold</i> , Zyklusschwellenwert
DTT	Dithiothreitol
DRU	Digital-rektale Untersuchung
EAU	<i>European Association of Urology</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HWI	Harnwegsinfekt
IGF	<i>Insulin-Like Growth Factors</i>
IK	Invasionskoeffizient
MDCK-C7	<i>Mardine Darby canine kidney - clone 7</i>
MK	Migrationskoeffizient
M-MLV RT	Moloney Maus-Leukämievirus Reverse Transkriptase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
PCa	Prostatakarzinom
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PSA	<i>Prostate Specific Antigene</i>
RCT	<i>Randomized Controlled Trial</i> , randomisiert kontrollierte Studie
RKI	Robert-Koch-Institut

RNA	Ribonukleinsäure
m, mi, r, siRNA	<i>messenger-, micro-, ribosomal, small interfering-RNA</i>
RPE	Radikale Prostatektomie
STABW	Standardabweichung
TEER	<i>Transepithelial Electrical Resistance</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNM-Klass.	Akronym für „T“umor, „N“odus (Lymphknoten), „M“etastase
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata
UICC	<i>union internationale contre le cancer</i> , Internationale Vereinigung gegen den Krebs
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

• 1. Einleitung

• 1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Mit ungefähr 64.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland stellt das Prostatakarzinom (PCa) seit vielen Jahren die häufigste Krebserkrankung der Männer dar^[1]. Die Inzidenz liegt bei 106,7 Personen pro 100.000 Einwohner und 25,3% aller Karzinomneuerkrankungen des männlichen Geschlechts sind Karzinome der Prostata.

Zudem liegt das PCa an Platz drei der häufigsten Krebstodesursachen mit einer seit einigen Jahren stabilen altersstandardisierten Sterberate von 10,8 %. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren. Die absolute Überlebensrate der Patienten beträgt nach 10 Jahren ca. 60 %. Für das Jahr 2016 rechnet das Zentrum für Krebsregisterdaten am RKI mit 66.900 neuerkrankten Patienten. Die Inzidenz und Prävalenz des PCa sind stark länder- und regionenabhängig. So ist in Europa zum Beispiel die Schweiz in den Inzidenzraten führend mit über 150 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Selbst innerhalb Deutschlands sind große regionale Unterschiede zu erkennen. Hier steht Niedersachsen mit einer Inzidenz von 117,9/100.000 in starkem Gegensatz zu Berlin, wo bei 100.000 Einwohnern nur knapp 57,8 Neuerkrankungen zu verzeichnen sind^[1].

Überwiegend werden epitheliale Adenokarzinome der Prostata diagnostiziert. Andere Tumorentitäten, wie beispielsweise Basalzell- oder Plattenepithelkarzinome, sind seltener^[2].

Alter, ethnische Herkunft und genetische Prädisposition sind als gesicherte PCa Risikofaktoren bekannt. Zahlreiche weitere Risikofaktoren werden diskutiert oder sind Gegenstand der Forschung^[3].

Die stärkste Korrelation für das Auftreten von PCa besteht mit einem hohen Alter. Nur 25 % aller Neuerkrankungen in Europa werden vor dem 65. Lebensjahr diagnostiziert^[4]. Studien aus den USA belegen, dass Personen mit afrikanischem Migrationshintergrund eine 58 % höhere Inzidenzrate sowie eine 144 % höhere Mortalitätsrate aufzeigen als Kaukasier. Im Gegenzug konnte bei Amerikanern mit lateinamerikanischem Migrationshintergrund eine 14 % niedrigere Inzidenz nachgewiesen werden als bei einer vergleichbaren kaukasischen Kohorte^[4].

Beachtlich ist auch die bei jüngeren Patienten signifikantere genetische Komponente. So besteht bei erstgradigen Verwandten ein zweieinhalbfach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne familiäre Häufung^[4].

Allerdings können nur 35 % der familiär gehäuften Prostatakarzinome bis dato durch bekannte Genmutationen erklärt werden. Zu nennen wären hier unter anderem Veränderungen der Gene Breastcancer 1 und 2 (BRCA1 u. 2), Homebox B13 (HOXB13) oder Nibrin (NBS1)^[4].

Hinweise auf eine Beziehung zum PCa gibt es bei ionisierender und UV-Strahlung, Rauchen, erhöhtem Body Mass Index (BMI) und hohen IGF-Spiegeln^[4]. Die Höhe des Testosteronspiegels korreliert allenfalls geringfügig mit dem PCa-Risiko. Dieser Zusammenhang benötigt jedoch weiterer Evidenz^[5].

• 1.2. Symptomatik, Diagnostik und Therapie

In frühen Karzinomstadien verläuft das PCa-Wachstum zumeist asymptomatisch^[6]. Erst mit der Größenzunahme des Karzinoms ist mit einer anatomisch bedingten, symptomatischen Harnabflussstörung zu rechnen. Dies kann sich durch Harnverhalt mit Restharnbildung und Dysurie äußern. Zudem sind ein verzögerter Miktionsbeginn, ein abgeschwächter Harnstrahl oder das Nachträufeln von Urin typisch. In lokal fortgeschrittenen Stadien sind Nervenläsionen bis zur Impotenz möglich. Metastasiert, wird die Erkrankung begleitet von Knochenschmerzen und Allgemeinsymptomen wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Schmerzen oder auch Anämie.

Da für das PCa nur im lokalisierten Stadium eine Heilung möglich ist, kommt der Früherkennung bei dem anfänglich stummen Verlauf eine große Bedeutung zu. Die interdisziplinäre Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen, medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) empfiehlt bei Männern ohne Risikofaktoren ein erstes Screening ab 45 Jahren^[2]. Großer Bestandteil ist die Serumbestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA). Nach der Einführung des PSA-Tests 1986 konnten prostatakarzinombedingte Metastasierungen und deren Komorbiditäten um 75% reduziert werden^[7]. Neben seinem Einsatz als Verlaufskontrolle oder als Marker für das Therapieansprechen nimmt das PSA seine wohl prominenteste Rolle in der Früherkennung des PCa ein. Allerdings ist die Interpretation eben dieser PSA-Früherkennungswerte eine der meist diskutiertesten Fragen der gesamten Humanmedizin^[4]. Selbst groß angelegte Studien kommen teilweise zu gegensätzlichen Ergebnissen bezüglich der Mortalitätsreduzierung durch das PSA-Screening^[8, 9]. Zusätzlich zur benignen PSA-Elevation (durch u.a. BPH, Prostatitis)^[10], addieren sich die geringe Sensitivität und Spezifität des PSA-Screenings^[11]. Diese Schwächen führen zu einer hohen Zahl an Überdiagnosen und damit verbundenen Übertherapien^[12]. Ein überdies enormer volkswirtschaftlicher Aufwand^[13] befeuert das Bestreben effizientere Parameter zu etablieren; bisher fehlt jedoch ein klinischer Durchbruch^[14].

Zum PCa-Screening gehören außerdem die digital-rektale Untersuchung (DRU) sowie, bei einem auffälligen Befund, eine ultraschallgesteuerte transrektale Biopsie mit typischerweise 10-12 Stanzzylindern.

Die histologische Aufbereitung erlaubt die Unterscheidung zwischen benignen Zellen bei Prostatitis oder Hyperplasie und Karzinom. Im Karzinomfall wird der Gleason-Score anhand der Differenzierung des Gewebes bestimmt. Dieser Wert ist sowohl prognose- als auch therapiebestimmend^[15]. Zusätzliche bildgebende Verfahren erlauben die Einteilung des Malignoms in das entsprechende TNM-Sta-

dium nach der *Union internationale contre le cancer* (UICC). Dieses beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors (T) sowie eventuell bestehende Lymphknoten- (N) und Fernmetastasen (M).

Durch die Kombination aus PSA-Wert, Gleason-Score und TNM-Klassifizierung werden den Patienten unterschiedliche Risikoprofile (*low risk, intermediate risk, high risk*) zugeordnet^[16]. So erfolgt die Abschätzung des Progressions- und Rezidivrisikos des Tumors, um ein stadiengerechtes, individuelles Therapiemanagement zu ermöglichen. Unterschieden werden primär kurative und palliative Therapieansätze. Zudem nehmen Komorbiditäten, das Alter, bzw. die geschätzte Lebenserwartung des Patienten, der Wunsch nach Therapie sowie das Nebenwirkungsprofil der einzelnen Behandlungen Einfluss auf die Therapieentscheidung.

• 1.2.1 Kurative Therapie

Ungeachtet der Häufigkeit und Relevanz des PCa sind wenige belastbare vergleichende Daten zu den etablierten kurativen Therapieoptionen *Active Surveillance*, Radikale Prostatektomie (RPE), perkutane Strahlentherapie oder Brachytherapie vorhanden^[2]. Die deutsche *PREFERE*-Studie, die das Ziel verfolgte, die kurativen Therapien bei Patienten mit niedrigem Risikoprofil zu vergleichen, scheiterte beispielsweise kürzlich bereits in der Rekrutierungsphase^[17].

Bei der *Active Surveillance* Therapie werden Niedrigrisikoprofilpatienten engmaschig überwacht, um Übertherapien zu vermeiden^[18] und bei fortschreitendem Karzinomwachstum einzugreifen^[2]. Die primäre RPE mit Lymphknotendisektion ist die einzige operativ-kurative Therapieoption beim PCa. Alternativ besteht die Möglichkeit einer primären Radiatio bei allen Risikogruppen^[2]. Komplettiert werden die anwendbaren Therapieoptionen durch die Brachytherapie. Diese sollte als Monotherapie jedoch nur bei niedrigem Risikoprofil eingesetzt werden^[2]. Nach der aktuellen Testphase und Auswertung langfristiger onkologischer Daten, könnten fokale Therapien, bei denen das Karzinom mittels hoher Energie innerhalb der Prostatakapsel abgetragen wird, zusätzliche Behandlungsansätze bieten^[19].

Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem PCa kommen prinzipiell auch die oben genannten Therapieoptionen kombiniert oder als Monotherapie in Frage. Allerdings sollte vor der Festlegung einer definitiven Therapie eine interdisziplinär diskutierte, multimodale Vorgehensweise angeraten werden^[20].

• 1.2.2 Supportiv- und Palliativtherapie

Ist eine kurative Therapie nicht gewünscht oder möglich, wird der Patient palliativ versorgt. Diese individuelle Behandlung hat nicht die radikale Tumorreradikation als Ziel, sondern den Erhalt größtmöglicher Lebensqualität bei gleichzeitig minimaler Einschränkung. Hierzu zählen beispielsweise das Vermeiden von Schmerzen und pathologischen Frakturen sowie die Therapie weiterer häufiger

Symptome wie Fatigue, Gewichtsabnahme oder Harnabflussstörungen^[2, 21]. Neben palliativ-chirurgischen (z.B. transurethrale Resektion der Prostata) oder interventionellen (u.a. Pigtail-Katheter-Einlage) Eingriffen werden hormoneprivierende Substanzen zur Reduktion des Wachstumsstimulus auf das PCa verwendet. Bei deren Versagen kommen Enzyminhibitoren, wie Abirateron oder zytotoxische Substanzen, hier bevorzugt Taxane, zum Einsatz^[22]. Begleitend spielen Schmerztherapie^[23], Osteoprotektion, palliative Radiotherapie^[20] und eine psychologische Betreuung eine große Rolle^[24].

• 1.3 Metastasierung, Invasion und Exosomen

Die Überlebensprognose nahezu aller Krebspatienten wird nicht vom Primärtumor selbst, sondern von dessen metastatischen Absiedlungen bestimmt^[25]. Die Einschätzung und idealerweise Eindämmung des metastatischen Potentials eines Tumors ist somit von entscheidender Bedeutung. Das Prostatakarzinom metastasiert primär lymphogen in die regionalen Lymphknoten und sekundär hämatogen, überwiegend ossär^[2]. Um sich einzeln oder im Zellverbund fortzubewegen und Metastasen zu bilden, brauchen invasive Zellen Zugang zum systemischen Kreislauf. Besagtes gelingt mithilfe invasiver Mechanismen und der Degradation der extrazellulären Matrix (ECM). Zu den Stabilisatoren der ECM zählen die *tight junctions*, zellzwischenraumverschließende Membranproteine, welche als eine der ersten Hürden von entarteten Zellen überwunden werden müssen^[26]. Werden sie zerstört, verliert das Epithel seine physiologische Barriere. In diesen hochkomplexen Prozessen scheinen neben anderen Faktoren sogenannte Exosomen eine wichtige Rolle einzunehmen^[27]. Sie helfen außerdem bei der frühen Tumorausbreitung (early invasion) durch die Vorbereitung prämetastatischer Nischen auf die Ankunft maligner Zellen^[28].

Exosomen sind 30-100 nm große, extrazelluläre Vesikel, die zu den wichtigsten Entdeckungen der Zellbiologie der letzten 30 Jahre gehören^[29]. Sie werden im Zellinneren aus Endosomen gebildet und von sogenannten *multivesicular bodies* nach einer komplexen Mediatorenkaskade, mittels Exozytose in das Interstitium ausgeschleust. Exosomen enthalten unter anderem Proteine, RNA-Fragmente, Transkriptionsfaktoren, Lipide und deren Bestandteile wie Cholesterolf^[29]. Sie werden sowohl von benignen als auch von maligne entarteten Zellen zahlreicher Gewebe ausgeschieden und spielen eine große Rolle bei der zellulären Kommunikation. So können sie über verschiedene Mechanismen ihre Zielzelle exakt ansteuern und ihren Inhalt an diese abgeben. Obwohl nicht endgültig geklärt ist, wie lange Exosomen stabil zirkulieren können, konnte gezeigt werden, dass neben der parakrinen Kommunikation auch eine Zell-Zell-Kommunikation über den Blutstrom stattfindet^[29].

Die Exosomfreisetzung wird durch zellulären Stress bei Genotoxizität oder Hypoxie gefördert, einem Milieu, das sich speziell um Karzinomzellen entwickelt^[28]. Dementsprechend ist die Anzahl sezernierter Vesikel von malignen Zellen oft höher.

Zudem unterscheiden sich die Vesikel benigner und maligner Zellen auch durch ihren Inhalt. Die Exosomen maligner Zellen verfügen über einen hohen Anteil an mRNA und miRNA. Außerdem sind Wachstumsfaktoren wie VEGF hochreguliert^[29]. Zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie TGF β oder Matrixmetalloproteasen modulieren sie so das Tumorstroma, um günstige Wachstumsbedingungen zu schaffen^[29].

Exosomen bergen somit sowohl für grundlagenwissenschaftliche, als auch für klinische Fragestellungen großes Potential. So könnten die Analysen von Tumorexosomen in Zukunft dazu beitragen, die Biologie des Tumors besser zu verstehen. Auch könnten bestimmte Exosomensignaturen bei der Früherkennung, in der Verlaufsbeobachtung, der Einschätzung der Metastasierungspotenz und im Therapiemonitoring genutzt werden. Zudem ist ein therapeutischer Nutzen beispielsweise durch das Beladen der Exosomen mit pharmakologischen Substanzen vorstellbar^[30, 31].

• 1.4 Genkandidaten

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden massenspektrometrisch ermittelte Proteinsignaturen der Exosomen der Prostatakarzinomzelllinie PC3 und der benignen Zelllinie PNT1A miteinander verglichen. Proteine, die sich lediglich in Exosomen der malignen Zellen fanden, wurden einer *in silico* Analyse in verschiedenen Datenbanken unterzogen. Die Auswertung externer Microarray- und Sequenzierungsdatensätze legten nahe, dass manche der Proteine im Prostatakarzinomgewebe, signifikant höher exprimiert sind als mit Normalgewebe. Als vielversprechende Kandidatengene wurden u.a. EEF1A2 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2), FABP5 (fatty acid binding protein 5), GNAI1 (guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1), MPP6 (membrane protein, palmitoylated 6) und SMPDL3B (sphingomyelin phosphodiesterase acid like 3B) identifiziert. Diese bezüglich ihrer Funktion beim PCa wenig oder nicht beschriebenen Proteine und ihre zugehörigen Gene wurden zur weiteren Charakterisierung *in vitro* und in PCa Gewebe ausgewählt. Ihre Eigenschaften werden nachfolgend genauer beschrieben.

• 1.4.1 EEF1A2

EEF1A2 ist eine der beiden Isoformen des eukariotischen Elongationsfaktor 1- α , einem Mitglied der G-Proteinfamilie^[32]. Anders als seine ubiquitär vorkommende Isoform ist EEF1A2 im gesunden Organismus nur in spezialisiertem Gewebe wie in Herz- und Skelettmuskelzellen oder dem Nervensystem nachweisbar. Seine physiologischen Aufgaben sind u.a. die Reorganisation des Zytoskeletts, die Proteindegradation sowie die Kontrolle von Wachstum und Apoptose des Zellzyklus. Außerdem ist das Gen an der Modulierung von Signalwegen wie dem PI3K/Akt-Signalweg beteiligt^[33].

- **1.4.2 FABP5**

Das Fettsäuren bindende Protein 5 ist Mitglied der Familie intrazellulärer Lipidbindner, die hydrophobische Liganden wie langkettige Fettsäuren binden, speichern und durch die Zellen transportieren^[34]. Durch seine Funktion im Lipidstoffwechsel wird ihm eine wichtige Rolle bei der Entstehung inflammatorischer und metabolischer Erkrankungen wie Psoriasis, Insulinresistenz oder Atherosklerose nachgesagt.

Weiter konnte gezeigt werden, dass FABP5 bei verschiedenen Malignomen wie dem Mamma-, Kolon- oder auch Prostatakarzinom überexprimiert ist^[35].

- **1.4.3 GNAI1**

Das Guanin Nucleotid bindende Protein G der Untereinheit α -1 (GNAI1, $G_{\alpha 1}$) gehört zur G-Proteinfamilie und ist somit ein Protein, das maßgeblich bei der Transduktion von intrazellulären Signalwegen beteiligt ist. Die Mitglieder der α -1 Untergruppe fungieren hauptsächlich als Adenylatzyklaseinhibitoren. Zudem konnten präklinische Assays ihre wichtige Rolle bei der Zellproliferation und -differenzierung zeigen^[36].

- **1.4.4 MPP6**

Das palmitoylierte Membranprotein 6 gehört zur Familie der membranassoziierten Guanylatzyklasen (MAGUK). Eine detaillierte Charakterisierung von MPP6 liegt bis dato noch nicht vor, allerdings konnte eine immunhistochemische Färbung des Proteins im Mäusedünndarm ein Gewicht von 55-kDa und eine morphologische Ähnlichkeit zu E-Cadherin aufdecken. Außerdem wurde MPP6 eine Rolle bei der Ausbildung der *tight junction* nachgewiesen. Zudem spielt es auch eine Rolle bei der Bildung von rRNA^[37-41].

- **1.4.5 SMPDL3B**

Die säureähnliche Sphingomyelin Phosphodiesterase 3B ist in die katabolischen Prozesse des Sphingomyelinstoffwechsels involviert. Hierbei wird ihr Einfluss auf die Membranstabilität der Zellen sowie die zelluläre Lipidkomposition attestiert. Zudem ist bekannt, dass das membranassoziierte SMPDL3B eine Rolle bei Nierenerkrankungen wie der fokal segmentalen Glomerulonephritis oder auch der diabetischen Nephropathie spielt^[42].

- **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Aufgrund ihrer Bedeutung bei der Metastasierung von Karzinomerkrankungen und im Hinblick auf potentielle Markereigenschaften erscheint die Untersuchung sowie

Charakterisierung von Exosomen und ihren Bestandteilen vielversprechend. Hierfür ist die genauere Prüfung der Expression und Funktion exosomaler Gene im Tumor notwendig. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit nachfolgende Fragestellungen beleuchtet:

1. Kann die in silico ermittelte Überexpression der Gene EEF1A2, FABP5, GNAI1, MPP6 und SMPDL3B beim PCa an einer unabhängigen Kohorte mit einer spezifischen Methode validiert werden?
2. Besteht eine Assoziation der Genexpression mit klinischen und histopathologischen Parametern?
3. Welche Beziehung besteht zwischen der Expression der Gene und dem Wachstums- und Migrationsverhalten von Prostatazelllinien?
4. Lassen sich durch eine gezielte Inhibition der Gene Wachstums- und Migrationsverhalten von PCa-Zellen modifizieren?

• 2. Material und Methoden

• 2.1 PCR Methoden

• 2.1.1 RNA Isolation

Die RNA-Extraktion erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Vor dem Extraktionsprozess wurden die Zellen in einen mit 2-Mercaptoethanol versetzten RLT-Lysepuffer aufgenommen. Dieser bewirkte das Aufschließen der Zellen und das Denaturieren der Proteine. Durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol wurden die im Gemisch vorhandenen RNasen mittels Reduktion der Disulfidbrücken denaturiert, um eine Degradation von RNA zu vermeiden.

Die in 6-well Platten kultivierten Zellen wurden nach Entfernung des Mediums durch Zugabe von 600 µl RLT-Lysepuffer lysiert und nach mehrmaliger Aspiration durch eine 20-Gauge-Kanüle zu einer zähen Masse homogenisiert. Diese wurde dann im Verhältnis 1:1 mit 70 %igem Ethanol versetzt, per Vortexmischer gemischt, auf eine MinElute RNA SpinColumn (Qiagen, Hilden) aufgetragen und bei 13.000 rpm zwei Minuten in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Nach Entsorgung des Durchflusses wurde die Säule in drei weiteren Zentrifugationsschritten bei 13.000 rpm erst mit 600 µl RW1-Puffer und dann zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, um verunreinigende Fettsäuren, Kohlenhydraten, Proteinen und Salze aus dem Lysepuffer zu entfernen. Zur Eluierung der RNA wurde anschließend auf 65 °C vorgewärmtes, nukleasefreies Wasser (Promega, Mannheim) auf die Silica-Membran geträufelt, gefolgt von einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und dreiminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm. Die RNA wurde nachfolgend direkt in ein neues Mikroreaktionsgefäß übertragen und auf Eis gelagert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nano-Drop 1000 (PEQLAB, Erlangen) photometrisch bei 260 nm bestimmt und in ng/µl angegeben. Die berechneten Quotienten der Absorption bei 260/230 und 260/280 nm dienten der Qualitätskontrolle der extrahierten RNA. Der Idealbereich der Quotienten liegt bei 1,8-2,2. Anschließend wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

Um einer Degradation der RNA durch ubiquitär vorkommenden RNasen vorzubeugen, wurden bei der RNA-Isolation zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen ergriffen. Bei allen Arbeitsschritten wurden Einmalhandschuhe getragen und regelmäßig gewechselt. Zudem wurde der Arbeitsplatz vor Beginn der Extraktion mit RNase-Erase (MPB, FisherScientific, Waltham, USA) abgewischt. Des Weiteren wurden ausschließlich Filterpipettenspitzen benutzt, um Verschmutzungen durch die Pipetten selbst zu vermeiden.

• 2.1.2 cDNA Synthese

Das Umschreiben von mRNA in doppelsträngige, komplementäre DNA wird als cDNA-Synthese oder reverse Transkription bezeichnet und ist Voraussetzung zur Durchführung einer qRT-PCR (Kap. 2.1.4). Die mRNA Transkription wurde mithilfe eines kommerziellen cDNA Synthese Kits (Invitrogen, USA) und der M-MLV Reverse Transkriptase durchgeführt. In dem Kit enthalten sind ein Nukleotid-Mix, die M-MLV RT, ein entsprechender Reaktionspuffer, ein RNase Inhibitor sowie der Stabilisator DTT. Zusätzlich wurden pdN6 Random Primer (Roche, Diagnostics Mannheim) verwendet, um alle proteincodierenden Sequenzen der RNA zu erfassen. Die Primer binden zufällig an sechs Nukleotide messende Basenpaarsequenzen und sichern so eine gleichmäßige reverse Transkription. Die genauen Volumina der Komponenten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Da der RNase-Inhibitor und die M-MLV Reverse Transkriptase hitzeempfindlich sind, wurden sie bis zur unmittelbaren Verwendung bei -20°C gelagert. Alle anderen Zusätze wurden während der Durchführung des Protokolls auf Eis belassen. In folgenden Mengen pro RNA-Probe wurden die Reagenzien für die Reaktion gemischt:

Tab.1: Reaktionsvolumen bei der cDNA Synthese

4 μl	5 mg/ml pdN6 (Random primer, Roche, Diagnostics Mannheim)
4 μl	10 mM dNTP Mix
16 μl	5 x M-MLV-Puffer (First Strand-Buffer)
8 μl	0,1 M DTT
4 μl	RNaseOUT
4 μl	M-MLV Reverse Transkriptase
40 μl	Gesamtvolumen

Um ihre Degradation zu vermeiden, wurde die RNA erst nach Ansetzen der Reagenzien aufgetaut. Zunächst wurde sie mit nukleasefreiem H_2O im Verhältnis 1:10 auf 40 μl verdünnt, dann 10 Minuten bei 65°C erhitzt, und auf Eis abgekühlt sowie zentrifugiert.

Anschließend wurde die verdünnte RNA im Verhältnis 1:1 mit dem oben beschriebenen Reaktions-Mix gemischt. Es resultierte ein Reaktionsvolumen von 80 μl .

Die cDNA-Synthese wurde dann in einem Inkubationsmischer (Grant Instruments, Cambridgeshire, UK) während 2 Stunden bei 37°C durchgeführt. Abschließend wurde die M-MLV RT durch eine fünfminütige Erhitzung auf 65°C deaktiviert und die cDNA bei -20°C gelagert.

Um bei nachfolgenden Versuchen Aussagen über die Reinheit der Proben sowie des Reaktionsgemischs treffen zu können, wurden Negativkontrollen, bei denen anstelle der RNA nukleasefreies Wasser in die Reaktion eingesetzt wurde, erstellt.

• 2.1.3 PCR zur Überprüfung der Primerqualität

Primer sind kurze Initiatorsequenzen, die im Rahmen der Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt werden, um bestimmte DNA-Sequenzen gezielt zu amplifizieren. Die Reaktion basiert auf den katalysatorischen Fähigkeiten der 1969 in Bakterien entdeckten, hitzestabilen Taq-Polymerase^[43]. Das Primer-Design ist hierbei einer der entscheidenden Qualitätsfaktoren. Die Effizienz der entworfenen Primer wurde anhand qualitativer PCR's überprüft, die bei korrekt bindenden Primern, stark amplifizierte, kurzkettige Abschriften der ursprünglichen cDNA-Moleküle produzierten.

Nach der abgelaufenen PCR wurde das Reaktionsgemisch auf ein Agarosegel aufgetragen und die Genprodukte mittels Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V während 20 min entsprechend der Größe aufgetrennt. In einem UV-Lichtscanner (Biometra, Göttingen) konnten die Genabschriften dann als angefärbte Bande visualisiert werden. Merkmale der Primerqualität waren die Größe, Dichte, Schärfe und Exklusivität der Bande. Zur Überprüfung der Reinheit des Reaktionsmixes sowie der cDNA wurden Negativproben mit nukleasefreiem Wasser bei jedem Lauf mitgeföhren.

Rückschlüsse auf die Menge der zugrundeliegenden RNA in der ursprünglichen Probe sind mit dieser Methode nicht möglich. Die genaue Zusammensetzung des Versuchsansatzes findet sich in Tabelle 2. Die Reagenzien wurden von Life Technologies (Carlsbad, USA) bezogen.

Tab.2: Reaktionsgemisch der qualitativen PCR

5 µl	10 x PCR Puffer ohne MgCl ₂
3 µl	MgCl ₂
0,5 µl	dNTPs
0,5 µl	Taq Polymerase
1 µl	Forward Primer (100 pmol/µl)
1 µl	Reverse Primer (100 pmol/µl)
37 µl	destilliertes H ₂ O
2 µl	cDNA Template
50 µl	Gesamtvolumen

Die Polymerasekettenreaktion selbst wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tab.3: Protokoll der qualitativen PCR

95 °C	2 Minuten	1 x
95 °C	30 Sekunden	35 Zyklen
60 °C	45 Sekunden	
72 °C	60 Sekunden	
72 °C	5 Minuten	1 x
4 °C	Unendlich	

• 2.1.4 Quantitative PCR mit TaqMan Sonden

Die quantitative PCR (qPCR oder *Real Time Quantitative PCR*) ermöglicht es, die Menge des in der Probe analysierten Genproduktes im Vergleich zu einem oder mehreren stabil exprimierten Referenzgenen, auch *house keeping genes* genannt, zu bestimmen^[44].

Die Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgt durch wiederholte Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen. Damit Fluoreszenzsignale abgegeben werden, müssen dem PCR-Mix Sonden (*probes*) hinzugefügt werden, die sich, ähnlich den Primern, an die Zielsequenz anlegen. Diese werden dann von der Taq-Polymerase abgebaut, wonach ein daran gekoppeltes Fluorphor ein messbares Signal abgibt. Mittels sogenannter Quencher werden die Fluorphor-Signale von nicht gebundenen Sonden unterdrückt.^[45]

Für den Versuchsaufbau wurden 96-*well* Platten verwendet, sodass die gleichzeitige Analyse einer größeren Menge an Proben und Kontrollen möglich war. Die Konzentrationsverhältnisse des PCR-Mix sind in Tabelle 4 beschrieben. In manchen Versuchen wurden zur Optimierung der Versuchsbedingungen Änderungen an der Primerkonzentration vorgenommen. Das geänderte Volumen wurde durch eine Anpassung der Menge an nukleasefreiem H₂O ausgeglichen.

Tab.4: Reaktionsgemisch der quantitativen PCR mit Taq-Polymerase

10 µl	TaqMan Fast Universal PCR Mastermix (Life Technologies)
0,75 µl	Forward Primer (300 nM)
0,75 µl	Reverse Primer (300 nM)
0,5 µl	Probe (200 nM)
6 µl	Nukleasefreies Wasser
2 µl	cDNA Template
20 µl	Gesamt

Zunächst wurde der PCR-Mix ohne cDNA entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Proben angesetzt. Hierbei wurden alle Proben in Duplikaten oder Triplicaten untersucht. Anschließend wurden jeweils 18 µl des PCR-Mix' und 2 µl cDNA in die entsprechenden *wells* pipettiert. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die Pipettenspitzen nach jeder Probe gewechselt. Für die Negativkontrollen wurden anstelle der cDNA je 2 µl nukleasefreien Wassers hinzugegeben. Die 96-*well* Platte wurde anschließend in das StepOnePlus Real Time PCR System von Applied Biosystems (Foster City, USA) eingespannt und das TaqMan Fast Advanced Real Time PCR Programm gestartet. Dieses bestand aus 40 repetitiven Zyklen, bei denen jeweils zunächst für 1 Sekunde auf 95 °C erhitzt wurde. Dann wurde die Temperatur für 20 Sekunden auf 60 °C heruntergefahren. Die Fluoreszenzmessungen, also die indirekten Messungen des vorhandenen Genmaterials, fanden während der Plateauphase bei 60 °C statt. Die Basensequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet.

• 2.2 Kohorte

Um die Expression bezüglich der oben beschriebenen Kandidatengene in unterschiedlichen Stadien des PCa quantifizieren zu können, bedienten wir uns der käuflich erwerblichen Prostatakarzinom Kohorte *TissueScan™ Prostate Cancer cDNA Array II* (Bstnr. HPRT502, OriGene Technologies, Rockville, USA). Die Kohorte umfasst 40 auf β-Aktin normalisierte cDNA-Proben von Prostatakarzinomgewebe sowie 8 als Normalkontrolle dienende Patientenproben mit benigner Prostatahyperplasie. Die Auswahl der Kohorte erfolgte aufgrund ihrer soliden Varianz in Bezug auf Tumorstadium, TNM-Klassifikation und Gleason-Score. Die detaillierte klinische Einteilung der Kohorte ist in Tabelle 7 aufgezeigt.

Die 48 cDNA Proben waren in 96 *well* Platten in den *wells* C1 bis F12 vorgelegt. Die verbleibenden freien *wells* erlaubten im gleichen qPCR-Lauf bekannte Vergleichsproben, wie z.B. eine gut charakterisierte Zelllinie, mitzuführen. Um den Material- und Kostenaufwand zu reduzieren, wurde bei einigen Platten eine Duplex PCR durchgeführt. Hierbei werden in einer Probe zwei Gene amplifiziert. So wurde in einer Reihe von Vorexperimenten die optimale Konzentration der beiden benutzten Primerpaare ermittelt, um eine Reduktion der Sensitivität der Duplex-PCR zu vermeiden. Eine erhöhte Anzahl an Primern und Sonden kann zu Wechselwirkungen zwischen den Oligonukleotiden und nicht selten zur Bildung sogenannter Primerdimeren führen, welche die Resultate verfälschen. Dies galt es in Vorversuchen zu objektivieren und auszuschließen^[43].

Zum Ausgleich von Assayschwankungen zwischen den Platten wurden die cT-Werte erst auf die als Standard mitgeführte Zelllinie PC3 normalisiert. Anschließend erfolgte die Auswertung nach der etablierten Formel $2^{-(\Delta\Delta cT)}$ ^[46], normalisiert auf das Housekeeping Gen CALM und referenziert auf die mediane Expression in Kontrollpatienten mit BPH.

• 2.3 Zellkultur und Zellassays

• 2.3.1 Allgemeine Zellkultur

Die Arbeiten in der Zellkultur erfolgten im urologischen S1 Forschungslabor der Universitätsmedizin Mannheim nach den internationalen Richtlinien für mikrobiologisches Arbeiten. Die notwendigen Bedingungen garantierte ein entsprechend ausgestatteter Zellkulturraum mit einer Werkbank und konstant laminar absaugendem Luftstrom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) sowie einem Brutschrank (Hera-Cell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zur Inkubation der Zelllinien bei Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit).

Die verschiedenen Zelllinien wurden nach dem Auftauen (vgl. Kap. 2.3.1.3) in speziell beschichteten 75 cm² großen Zellkulturflaschen (BD, New Jersey, USA) kultiviert. Sie wurden sie regelmäßig, ihrem jeweiligen Wachstumsverhalten angepasst, passagiert (subkultiviert).

2.3.1.1 Die Subkultivierung der Zellen

Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurde nach Absaugen der verbrauchten Nährlösung eine vorgewärmte phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS, Life Technologies, Waltham, USA) hinzugegeben, um letzte Mediumreste abzuspülen. Nach dem Entfernen der DPBS-Lösung wurde der Flaschenboden mit 3 ml 0,25 % Trypsin/1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA, Life Technologies, Waltham, USA) bedeckt. Trypsin greift die Zell-Matrix-Verbindungen an und löst die Zellen vom Kunststoffboden, während EDTA als Ca²⁺-Chelator die Zell-Zell-Verbindungen zerstört^[47].

Dieser Vorgang wurde durch kurzes Inkubieren der Zellkulturflaschen im Brutschrank unterstützt. Der Ablösungsprozess wurde regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert, um den zellintegritätsschadenden Effekt des Trypsins zu vermeiden. Nachdem die adhärent wachsenden Zellen vollständig abgelöst waren, wurde die Zellsuspension je nach Wachstumsgeschwindigkeit in unterschiedlichen Konzentrationen in sterile 75 cm² Zellkulturflaschen überführt.

2.3.1.2 Das Einfrieren der Zellen

Zwecks Erhalt niedriger Passagen wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung eingefroren. Hierfür wurde die Suspension mit den abgelösten Zellen in 50 ml Falcon-Röhrchen (BD, New Jersey, USA) überführt. Nach anschließender fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in einer entsprechenden Menge (pro Zellkulturflasche 10 ml) Medium resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde dann mit 10 % des Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt. So wurde die Bildung von Eiskristallen verhindert, die zur Schädigung von Zellorganellen führen^[48]. In der Folge wurde die Zellsuspension in 1 ml große Kryoröhrchen überführt und 24 h bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen zur permanenten Lagerung in einen Stickstofftank transferiert.

2.3.1.3 Das Auftauen der Zellen

Zur Minimierung von strukturellen Zellschäden soll der Vorgang des Auftauens rasch erfolgen. Deshalb wurden die zum Aussäen benutzten 25 cm² Zellkulturflaschen (BD, New Jersey, USA) mit dem entsprechenden Medium (6 ml) befüllt und vorgewärmt.

Anschließend wurden die Kryoröhrchen im 37 °C warmen Wasserbad zwei Minuten aufgetaut. Nach gründlicher Desinfektion des Röhrchens wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert und in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Nach einer Anwuchsphase von 24 h wurde das Medium in der Zellkulturflasche zur Hälfte durch frisches ersetzt. Bei entsprechender Konfluenz wurden die Zellen in größere Kulturflaschen überführt.

2.3.1.4 Die Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Auf diese wurde nach leichtem Behauchen ein geeichtes Deckglas aufgebracht, sodass zwischen den Glasschichten ein Hohlraum mit definiertem Volumen entstand.

Aus einer abzentrifugierten und auf 10 ml eingestellten Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 90 µl isotonischer Natriumchlorid-Lösung Delta Select (AlleMan Pharma, Rimbach) sowie 100 µl Trypanblau (Life Technologies, New Jersey, USA) in einem 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß vermengt. Das Trypanblau, ein Diazofarbstoff, penetriert die Zellmembran von abgestorbenen oder perforierten Zellen und färbt diese durch Proteinbindung dunkelblau. Vitale, intakte Zellen werden nicht angefärbt und sind von einem hellen Ring umgeben^[49].

Von dieser Lösung wurden 10 µl unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert. Das Auszählen der intakten Zellen erfolgte in allen vier Quadranten nach dem gleichen Ableseschema. Hierfür wurden nur die vitalen Zellen innerhalb der Quadranten und jene, die links und unten die Abgrenzung berührten als Gesamtzellzahl zusammengezählt. Aufgrund der definierten Kantenlänge der kleinen Gruppenquadrate und der Kammerhöhe von 0,1 mm konnte die Gesamtzellzahl der ursprünglichen Suspension durch folgende vereinfachte Formel pro Milliliter errechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Gesamtzellzahl} \times 50.000$$

Wegen der anfänglichen Suspensionsmenge von 10 ml ergab sich die absolute Zellzahl aus der Multiplikation der Zellzahl pro ml mit 10.

• 2.3.2 Verwendete Zelllinien

Die verwendeten Medien (Life Technologies, New Jersey, USA) wurden steril mit keimfreiem fetalem Kälberserum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) vermengt und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Vor jedem Zellkontakt wurde das Medium in einem Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland) auf 37 °C erwärmt. Ein Mediumwechsel erfolgte regelhaft drei Mal pro Woche.

Für die verschiedenen Assays wurden zwei unterschiedlich aggressive PCa Zelllinien, eine Zelllinie aus Gewebe benigner Prostatahyperplasie sowie eine konfluent wachsende Zelllinie aus Nierenepithel verwendet.

2.3.2.1 PC3

Die Zelllinie PC3 (Abbildung 1) wurde 1979 aus einer Knochenmetastase eines an einem fortgeschrittenen Prostatakarzinom erkrankten, 62jährigen Kaukasiers isoliert^[50]. Ihr wird hohes metastatisches Potential zugeschrieben; so ist sie in der Lage in immundefizienten Mäusen Tumore zu bilden. Sie gehört zweifelsohne zu den am meisten untersuchten und verwendeten Zellmodellen beim Prostatakarzinom und wächst in einer adhärennten Einzelzellschicht. Zudem ist sie PSA-negativ und ähnelt morphologisch einem Grad IV Adenokarzinom^[50, 51]. Die PC3 Zelllinie wurde von ATCC (Wesel) bezogen und in D-MEM- Medium mit 10 % FBS-Zusatz (Life Technologies, New Jersey, USA) kultiviert.

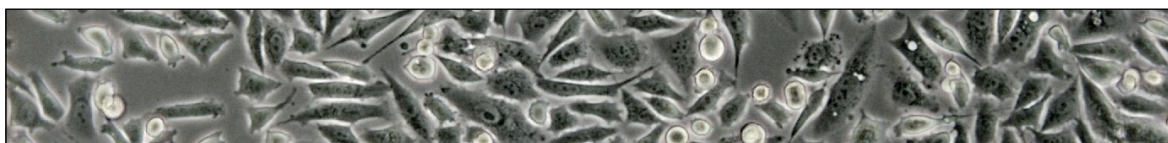


Abb.1: Die adhärennt wachsende Zelllinie eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms (PC3) im Lichtmikroskop (10-fache Vergrößerung).

2.3.2.2 DU145

Die DU145 Zelllinie (Abbildung 2) gehört, wie die PC3 Zelllinie, zu den „klassischen Zelllinien“ der Prostatakarzinomforschung. Sie wurde 1978 erstmals beschrieben und entstammt einer Hirnmetastase eines 69jährigen, an PCa Grad IV erkrankten Kaukasiers^[52]. Im Vergleich zu den PC3-Zellen ist das metastatische Potential als moderat zu beschreiben^[51]. Die DU145 Zellen sind tumorigen in Mäusen, haben ein epitheliales Aussehen und wachsen als adhärennter Monolayer.

Sie sind PSA-negativ^[52]. Die DU145 Zelllinie wurde ebenfalls von ATCC (Wesel) bezogen und in D-MEM- Medium mit 10 % FBS-Zusatz kultiviert.

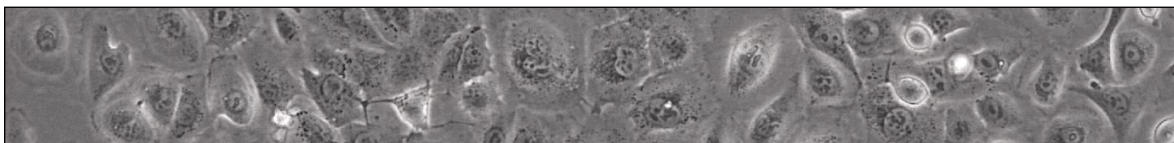


Abb.2: Die adhären wachsende Zelllinie eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms (DU145) im Lichtmikroskop (10-fache Vergrößerung).

2.3.2.3 PNT1A

Die PNT1A-Zelllinie (Abbildung 3) wurde 1991 aus benignem humanem Prostatagewebe postmortem bei einem 35jährigen Kaukasier isoliert^[53]. Morphologisch ähneln die Zellen differenziertem lumbalem Prostatagewebe, wachsen in einem adhären Monolayer und sind nicht tumorigen in Mäusen. Aus diesem Grund werden die PNT1A-Zellen vielfach als Modell für gesundes Prostatagewebe in wissenschaftlichen Arbeiten verwendet. PNT1A-Zellen sind zudem PSA-negativ^[54]. Die PNT1A-Zelllinie wurde von Sigma Aldrich (Hamburg) bezogen und in RPMI- Medium mit 10 % FBS-Zusatz (Life Technologies, USA) kultiviert.

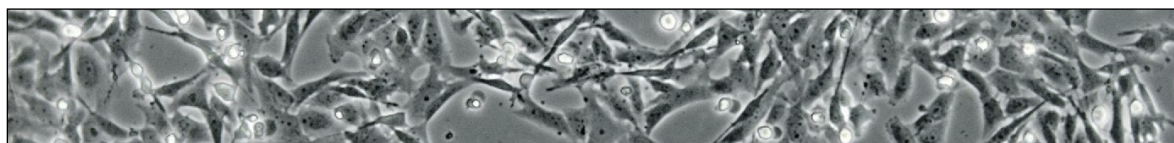


Abb.3: Die adherent wachsende benigne Prostatazelllinie (PNT1A) im Lichtmikroskop (10-fache Vergrößerung).

2.3.2.4 MDCK-C7

Die MDCK Zelllinie (Abbildung 4) wurde 1958 aus dem Sammelrohr einer Niere eines weiblichen Cockerspaniels isoliert und etabliert. 1994 konnte eine Arbeitsgruppe einen MDCK-C7 genannten Subklon differenzieren^[55]. Phänotypisch wachsen die MDCK-C7 Zellen adhären als einschichtiger Monolayer mit schmalen Interzellularspalten. Die Zellen ähneln in ihrer flachen, polygonalen Form den Hauptzellen des Sammelrohrepithels der menschlichen Niere. Dank ihrer speziellen Morphologie sind sie, in einem Verbund wachsend, in der Lage stabile und konstant hohe transepitheliale Widerstände aufzubauen. Diese können mit elektrophysiologischen Methoden valide und einfach gemessen werden^[56]. Aus diesem Grund wird die Barrierefunktion des MDCK-C7 Subklons als Modell einer Epithelschicht im unten beschriebenen *in vitro* Invasionsassays benutzt.

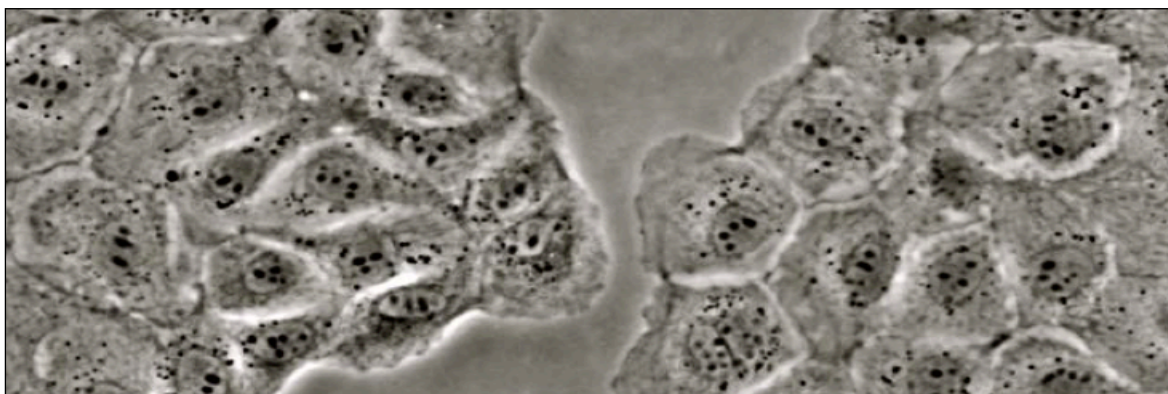


Abb.4: Die adherent wachsende Urothelzelllinie (MDCK-C7) im Lichtmikroskop (34-fache Vergrößerung).

Die MDCK-C7 Zellen wurden aus der experimentellen Dermatologie der Universitätsmedizin Mannheim von der Forschungsgruppe um Herrn Prof. Dr. med. Stefan W. Schneider bezogen. Sie wurden in MEM-Medium mit zusätzlich 2mM Glutamin, 10 % FBS und 1 % Penicillin Streptomycin (Life Technologies, New Jersey, USA) kultiviert. Eine Subkultivierung erfolgte bei 80 %iger Konfluenz, wobei ein normaler Mediumwechsel dreimal pro Woche stattfand. Durch ihr festes Anhaften am Boden der Kulturflasche und den starken Zellverbund erforderte die Subkultivierung der MDCK-C7 Zelllinie ein modifiziertes Protokoll im Vergleich zum oben beschriebenen Passagieren der Zelllinien.

Nachfolgend an das Absaugen des verbrauchten Mediums und an den Waschvorgang mit DPBS, wurde der Flaschenboden großzügig mit 4 ml EDTA-Puffer bedeckt und im Brutschrank inkubiert um durch Komplexbildung der Kalziumionen die Zelladhäsionen aufzubrechen. Tabelle 5 zeigt die Komponenten des EDTA-Puffers.

Tab.5: Zusammensetzung des EDTA-Puffers

0,2 g	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Merck, Darmstadt)
8 g	Natriumchlorid (NaCl, Merck, Darmstadt)
0,2 g	Kaliumchlorid (KCl, Merck, Darmstadt)
1,15 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 , Merck, Darmstadt)
0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 , Merck, Darmstadt)
→	aufgelöst in 1 l destilliertem H_2O

Die Inkubationsdauer variierte je nach Wachstumsdauer und Konfluenz der Zellen in der Flasche zwischen 15-60 Minuten. Abgesaugt wurde das EDTA, wenn im Lichtmikroskop hell leuchtende Interzellularspalten zu erkennen waren; ein Zeichen für das sogenannte „Abkugeln“ der C7-Zellen, dem Aufbrechen der Zell-Zell-Kontakte. Anschließend sorgten 3 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung und eine erneute, kurze Inkubationszeit von wenigen Minuten für das vollständige Ablösen

der Zellen vom Flaschenboden. Die Wirkung des Trypsins wurde durch den Transfer der Zellsuspension in ein Zellkulturröhrchen mit mindestens äquivalentem Volumen an Medium gestoppt. Daraufhin konnte der Transfer der MDCK-C7 in, mit 10-15 ml C7-MEM-Medium vorbereitete 75 cm² Zellkulturflaschen in der gewünschten Verdünnung erfolgen.

• 2.3.3 Verwendete Zusätze

2.3.3.1 TGFβ₃

TGFβ (*transforming growth factor beta*) ist ein Signalmolekül aus der Familie der Zytokine und reguliert somit das Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Bei Säugetieren konnten bisher 3 Isoformen (1-3) nachgewiesen werden. Dem TGFβ werden pleiotrope physiologische und pathophysiologische Effekte zugeschrieben. Bei der Karzinomentstehung ist TGFβ insbesondere in Angiogenese und Epithelial-mesenchymale Transition involviert. Mit dem Voranschreiten eines Tumors hat TGFβ vor allem eine hohe Bedeutung bei der Migration und Invasion entarteter Zellen^[57]. Zudem wurde sein Vorkommen in Exosomen nachgewiesen^[29]. Aufgrund dieser Eigenschaft haben wir uns dazu entschieden, TGFβ als Positivkontrolle unseres Invasionsassays einzusetzen. TGFβ₁ und TGFβ₂ konnten bereits als Produkt von PC3 Zellen nachgewiesen werden^[58]. Deshalb beschlossen wir, in unseren Versuchen die Isoform TGFβ₃ (R&D Systems, Minneapolis, USA) zu verwenden.

2.3.3.2 MTT

Das Tetrazoliumsalz (MTT) (Promega, Mannheim) wird in Versuchen zur Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt. Als wasserunlöslicher Redox-Farbstoff akkumuliert MTT nur in den Mitochondrien lebender Zellen, wird enzymatisch zu einem Formazan abgebaut und generiert einen violetten Farbstoff mit einem messbaren Absorptionsmaximum bei 492nm. Es besteht also eine direkte Korrelation zwischen der Absorption bei ca. 490nm und der Anzahl vitaler Zellen. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf die vorhandene Zellzahl und somit auf die jeweilige Wachstumsgeschwindigkeit bzw. Mitoserate der Zellen. Die MTT-Lösung musste vor Lichtexposition geschützt werden um die Farbintensität nicht vor der eigentlichen Messung zu beeinflussen^[59].

• 2.3.4 MTT Proliferationsassay

Mit dem MTT Proliferationsassay wurde das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Zelllinien objektiviert. Hierfür wurden die Zellen nach dem Lösen und Abzentrifugieren in der Konzentration von 60.000/ml beziehungsweise 4500 Zellen pro well in einem Gesamtvolumen von 100 µl in eine 96-well Platte ausgesät. Pro

Zelllinie und Versuch wurden 3 x 3 technische Replikate angelegt. Nach 48 h Wachstum wurden je 10 μl MTT zum ersten Triplet der untersuchten Zelllinie zugefügt und nach drei Stunden Inkubation in einem ELISA-Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz) ausgewertet. Weitere 72 h und 96 h später wurde diese indirekte Zellzahlauswertung wiederholt, um eine kontinuierliche Proliferationsentwicklung der Zelllinie über die Zeit darstellen zu können. Die unten dargestellten Ergebnisse wurden aus drei identisch ausgeführten biologischen Replikaten gemittelt.

• 2.3.5 MDCK-C7 Invasionsassay

Gängige Techniken zur Untersuchung der Invasion, wie beispielsweise die *Boyden Chamber*, basieren auf dem Prinzip des zellkontaktvermittelten Abbaus einer ECM-Barriere und der nachfolgenden linearen Migrationsmessung invasiver Zellen^[60]. Einen neuen Ansatz bietet ein erstmals bei Arbeiten zum invasiven Verhalten von Melanomzellen beschriebenes und in unsere Arbeitsgruppe weiterentwickeltes Testverfahren^[61]. Die nachfolgend als *MDCK-C7 Invasionsassay* bezeichnete Methode erfasst den durch Produkte von Tumorzellen verursachten, messbaren elektrophysiologischen Widerstandsverlust eines Epithelverbundes als Zeichen der Zerstörung seiner *tight junctions* und kann somit Rückschlüsse auf frühinvasive Prozesse liefern^[62].

Hierfür werden die zu untersuchenden Zellen in eine Filtertasse, fortan als *insert* (Corning Inc., Corning, USA) bezeichnet, ausgesät, an deren Boden eine 20 μm dicke, 4,2 cm^2 flächige, Membran mit einer Porengröße von 0,4 μm angebracht ist. Diese ist permeabel für sekretierte Moleküle, lässt jedoch direkte Interaktionen zwischen Zellen auf der Ober- und Unterseite nicht zu. An der Unterseite dieser Membran wachsen MDCK-C7 Zellen als adhärenter Monolayer und bilden in Abhängigkeit ihrer Konfluenz einen messbaren Widerstand aus. Durch wiederholtes Messen dieser Resistenz über mehrere Tage kann das invasive Potential anhand von Ausmaß und Geschwindigkeit eines Widerstandsverlustes quantifiziert werden. Die Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

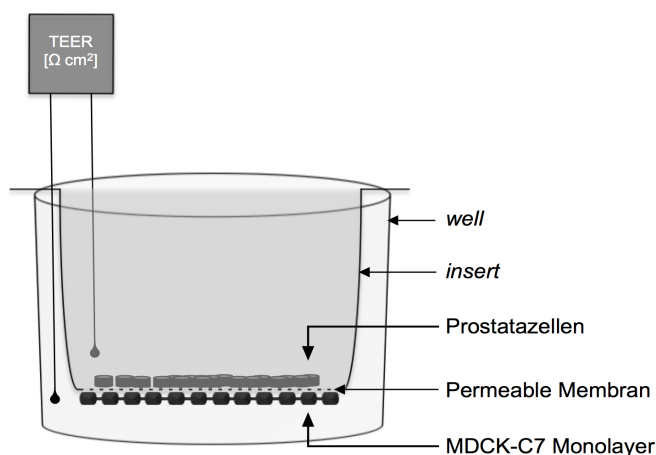


Abb.5: Schematische Darstellung des MDCK-C7 Invasionsassays. Die untersuchten Zellen wurden durch eine permeable Membran von dem MDCK-C7 Monolayer getrennt. Anhand Widerstandsmessungen (TEER) wurde die Invasivität bestimmt.

2.3.5.1 Versuchsprotokoll

Die im Assay verwendeten *inserts* sind an die Einsenkungen von *6-well* Platten angepasst. In einem ersten Schritt wurden die *inserts* mithilfe von anatomischen Pinzetten unter sterilen Bedingungen mit den Flügeln nach unten in einer Petrischale (Sarstedt, Nümbrecht) positioniert. Anschließend wurde vom Membranrand aus 1 ml MDCK-C7 Medium auf die Membran pipettiert, um sie zu äquilibrieren. Abgedeckt mit einer zweiten Petrischale erfolgte eine 60 minütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank. Diese Zeit wurde für das Einstellen der MDCK-C7 Zellen auf 250.000 Zellen/ml genutzt. Ähnlich dem Kulturprotokoll, musste hier auch das Protokoll der Zellzahlbestimmung modifiziert werden. 10 µl der Zellsuspension wurden direkt in die Neubauer Zählkammer pipettiert und die Summe der Zellen in den ausgezählten 4 Quadranten als Mittelwert mit 10.000 multipliziert, um die Konzentration pro Milliliter zu errechnen:

$$\text{MDCK-C7 Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times 10000$$

Nach Ende der Äquilibrierungszeit wurden die Petrischalen vorsichtig aus dem Brutschrank gehoben, um ein Verschütten des Mediums zu vermeiden. Danach wurde das Medium wieder vom Rand abgesaugt, um die Integrität der Membran nicht zu beeinträchtigen. Nun konnte die eingestellte MDCK-C7 Zellsuspension tröpfchenweise auf die Membran geträufelt werden. Hierauf folgte eine 4-stündige Brutschrankinkubation, während der die Zellen auf die Membran absanken und anhafteten. Im Anschluss wurden die *inserts* ohne Absaugen des Mediums mithilfe einer Pinzetten in eine mit 3 ml Medium pro *well* vorbereitete *6-well* Zellkulturplatte transferiert. Hierbei zeigte die mit MDCK-C7 Zellen besiedelte Seite der Membran nach unten (vgl. Abb. 5). In die *inserts* wurden dann nochmals 3 ml Medium hinzugefügt und die *6-well* Platten in den Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag wurden sowohl aus den *wells* als auch den *inserts* je 2 ml Medium durch frisches ersetzt um einerseits ausreichend Nährstoffe bereitzustellen, aber auch um andererseits die von den Zellen bereits produzierten Wachstumsfaktoren nicht zu stark zu verdünnen. Die *6-well* Platten wurden nachfolgend für weitere 72 Stunden im Brutschrank inkubiert.

2.3.5.2 *6-well* Plattenwechsel

Nach der ersten TEER-Messung (96 h nach Aussaat der MDCK-C7) wurden die *inserts* in neue, mit frischem Medium befüllten *6-well* Platten überführt. 2 ml des sich in den *inserts* befindlichen Mediums wurden durch neues ersetzt. Hierdurch wurde eine Stabilisierung des Assays erzielt und Messungen über mehrere Tage ermöglicht.

2.3.5.3 Kokultivierung

Ein gemessener TEER-Wert um $8.500 \pm 1500 \Omega\text{cm}^2$ wurde als ausreichend hoher Widerstand für die Kokultivierung angesehen und als Zeitpunkt t_0 markiert. Anschließend wurden die Tumor- oder PNT1A-Zellen zur Aussaat vorbereitet und eine entsprechende Zellsuspension auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Hierbei wurde zur zellschonenderen Ablösung der Zellen anstatt Trypsin-EDTA Accutase (GE Healthcare, Chicago, USA) verwendet. Außerdem wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 75 % abgelöst, um eine Verringerung der Zellteilungsrate durch zu dichtes Wachstum zu vermeiden. Nachfolgend wurde 1 ml Medium aus den *inserts* abgesaugt und durch 1 ml der Zellsuspension ersetzt, welche langsam, kreisend in das *insert* geträufelt wurde, um die Membran gleichmäßig mit den Zellen zu bedecken. Bei einem *insert* pro Platte wurde anstelle von Zellsuspension Medium als Negativkontrolle eingesetzt. Schlussendlich wurden die 6-*well* Platten im Brutschrank inkubiert.

2.3.5.4 Widerstandsmessung

96 Stunden nach der Aussaat der MDCK-C7 Zellen wurde erstmals der Widerstand über der Membran bestimmt. Hierfür wurden an ein Voltmeter (WPI, Worcester, USA) angeschlossene Silber/Silberchlorid(Ag/AgCl)-Stabelektroden (WPI, Worcester, USA) gleichzeitig in *well* und *insert* getaucht (vgl. Abb. 5). Zwischen diesen Elektroden wurde ein $10 \mu\text{A}$ (I) starker, kontinuierlichen Stromfluss durch die Zellschicht gesandt, wodurch eine elektrische Spannungsdifferenz (U) entstand. Entsprechend dem Ohm'schen Gesetz ($R = \frac{U}{I}$) errechnete sich so der elektrische Widerstand (R) der MDCK-C7 Epithelzellschicht.

Genauer wurde die TEER (**trans-epithelial electric resistance**) des MDCK-C7 Monolayers nach dem ersten Kirchhoff'schen Gesetz aus den verschiedenen Einzelwiderständen berechnet (Abbildung 6). Der zelluläre Widerstand (R_z) setzte sich aus den in Serie geschalteten Widerständen der apikalen (R_a) und basolateralen (R_b) Zellmembranen zusammen. Den parazelluläre Widerstand (R_p) bildeten die in Serie geschalteten Widerstände der *tight-junctions* (R_t) und des interzellulären Raums (R_i).

$$R_z = R_a + R_b \text{ sowie } R_p = R_t + R_i \quad \longrightarrow \quad \frac{1}{R_{\text{gesamt}}} = \frac{1}{R_z + R_p}$$

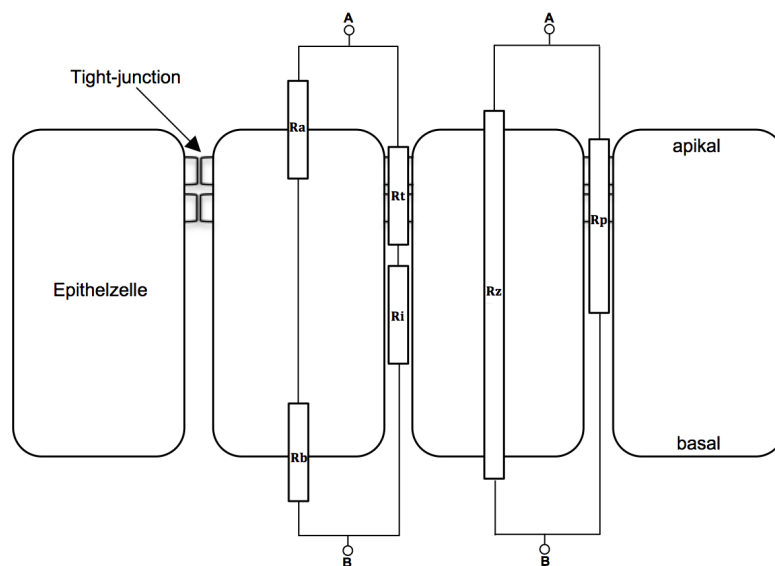


Abb.6: Einzelwiderstände am MDCK-C7 Monolayer. R steht jeweils für Widerstand; Ra(apikal), Rb(basal), Rt(tight junction), Ri(interzellulär), Rz(zellulär), Rp (parazellulär).

Bei der Messung galt zu beachten, dass die Elektroden ausreichend tief in das Medium getaucht wurden, jedoch keine Berührung der Membran oder den Wänden der *inserts* stattfand, um Beschädigungen und Verfälschungen von Messwerten zu vermeiden. Zudem mussten die *wells* und die Elektroden stabilisiert werden, um Schwankungen der Messwerte zu reduzieren.

Vor und nach jeder Messung durchliefen die Elektroden mehrere Waschschriffe. So wurden sie erst 20 Minuten in einer 70 %igen Ethanol-Lösung desinfiziert und dann zweimal für jeweils 20 Minuten in einem mit PBS-gefüllten Zellkulturrohrchen gewaschen. Die Messungen und Waschschriffe fanden unter der Sterilbank statt.

2.3.5.5 Berechnung des Invasionskoeffizienten

Der finale TEER-Wert [$\Omega \text{ cm}^2$] wurde als Produkt der Widerstandsmessung und der eigentlichen Membranfläche berechnet. Zur besseren Objektivierung wurden diese Werte in drei Rechenschritten in einen Invasionskoeffizienten umgewandelt. Zur Normalisierung der Anfangswiderstände (t_0) wurden die benutzten TEER-Werte durch die jeweils gemessenen Werte vor der Kokultivierung dividiert. Danach wurden die Werte durch die jeweiligen Negativkontrollen geteilt und so erneut normalisiert. Die reziproke Darstellung der Werte erlaubt eine intuitivere Beurteilung der unterschiedlichen Invasionskoeffizienten, so steht ein hoher Wert für ein hohes Invasionspotential.

• 2.4 Small interfering (si) RNA Transfektion und siRNA Assays

• 2.4.1 siRNA Transfektion

Die siRNA Transfektion dient dazu, die Translation bestimmter proteinkodierender mRNAs zu unterdrücken. Dieser Prozess wird auch RNA-Interferenz genannt und wird mithilfe eines RNA/Protein Komplexes, dem sogenannten RISC (RNA-induced silencing complex), realisiert. Der Komplex besteht aus mehreren Proteinen wie beispielsweise der Argonautproteinfamilie oder dem Dicer, der der Rnase III-Familie zugehört. Zudem beinhaltet er einen Strang der ausgewählten, komplementär zur Ziel-mRNA entworfenen siRNA.

Die Endoribonuklease Dicer zerkleinert dsRNA in 21-23 Nukleotide messende Fragmente, welche, falls komplementär, vom RISC aufgenommen und durch Argonauteproteine abgebaut werden.

So wird also die Produktion des entsprechenden Proteins über die Ausschaltung der jeweiligen mRNA verringert^[63], was auch als posttranskriptionaler *Gen-Knock-down* bezeichnet wird.

Die verschiedenen siRNAs wurden mithilfe des Transfektionsreagenz' *Dharmafect*® (GE Lifescience, Chicago, USA) [hierbei handelte es sich um kleine liposomale Sphären die die siRNAs aufnehmen] in die Zellen geschleust. Zur Verwendung kamen siRNA Moleküle, welche die Translation von EEF1A2, MPP6, sowie SMPDL3B unterdrückten. Außerdem wurde als Negativkontrolle eine sogenannte *Silencer*® siRNA (Life Technologies, New Jersey, USA) benutzt, die kein mRNA Molekül bindet.

Die Transfektionen wurden nach einem standardisierten Protokoll in den für den jeweiligen Assay geeigneten Zellkulturplatten (*24-well* bzw. *96-well*) durchgeführt. Hierfür wurde FBS-freies (fetales bovines Serum) RPMI Medium in die verwendeten *wells* gegeben und mit der entsprechenden Menge siRNA für 10 Minuten inkubiert. Die genauen Mengenangaben sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Tab.6: Mengenangaben der siRNA Transfektion

	24-well Platten	96-well Platten
RPMI Ø FBS	125 µl + 125 µl	12,5 µl + 12,5 µl
siRNA	1,75 µl (target conc. 30nMol / stock conc. 20µM)	1 µl (target conc. 30nMol / stock conc. 20µM)
neg. siRNA	0,875 µl	0,5 µl
Dharmafect™	1,25 µl (target conc. 1:1000)	1 µl (target conc. 1:1000)
Suspension	750 µl	75 µl
Gesamt	≈1 ml	≈100 µl

Parallel dazu wurde das Transfektionsreagenz in FBS-freiem RPMI Medium inkubiert. Anschließend wurde der Mix aus Medium und Transfektionsreagenz in die *wells* überführt und weitere 30 min unter der Sterilbank inkubiert. Dieser Zeitraum wurde für das Einstellen der Zellsuspension auf die richtige Zellkonzentration benutzt, welche danach in einem vordefinierten Volumen in die *wells* gegeben wurde. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um nach Ablauf der Transfektion einer Zellschädigung durch verbleibendes Transfektionsreagenz vorzubeugen. Nach einem weiteren Tag im normalen Medium konnten 48 h nach der Transfektion die geplanten Assays ablaufen. Für qRT-PCR Untersuchungen wurden die Zellen 72 h nach Transfektion geerntet.

Zu Anfang des Projektes wurde bei der Transfektion für jedes Zielgen ein äquimolares Gemisch aus vier verschiedenen siRNAs (*Pool*) verwendet und die allgemeine Wirksamkeit des Knockdowns mittels qRT-PCR überprüft. Nachfolgend wurden diese siRNAs hinsichtlich des Ausmaßes des erzielten Knockdowns einzeln getestet und für die folgenden Versuche diejenige mit dem stärksten Effekt ausgewählt. Die verwendete siRNA-Konzentration lag für Pools und einzelne siRNA bei 30 nM.

• 2.4.2 siRNA MTT Proliferationsassay

Um den Einfluss der verschiedenen Zielgene auf die Proliferation im Prostatakarzinom zu untersuchen, wurden sie mithilfe von siRNA-Interferenz in PC3 Zellen ausgeschaltet und das resultierende Wachstumsverhalten mit dem kontrollbehandelter PC3 Zellen verglichen.

Der Assay wurde in einer 96-*well* Platte durchgeführt, eine Plattengröße, die ein optimales Verhältnis zwischen technischen und biologischen Replikaten sowie unterschiedlichen Messzeitpunkten ermöglicht.

Die äußeren *wells* wurden, um falsche Messergebnisse aufgrund von Verdunstungsartefakten zu vermeiden, nicht für Proben verwendet, sondern lediglich mit Medium befüllt. Das Gesamtvolumen in den verschiedenen *wells* betrug 100 µl. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 dargestellt.

gleichmäßiger und zellfreier Kratzer (*scratch*) zugefügt und das Medium erneut gewechselt. Um die Auswertung einerseits zu standardisieren aber auch zu objektivieren, wurde dieser Kratzer immer in der Mitte des *well*s entlang einer vorher angefertigten rückseitigen Markierung durchgeführt. Durch Verlaufsfotodokumentation 24 h, 48 h und 72 h nach dem Defekt und Ausmessen der zellfreien Fläche des Kratzers konnten Rückschlüsse auf das Migrationsverhalten der untersuchten Zellen gezogen werden.

Die Versuche wurden in drei technischen Replikaten mit je zwei Bildern pro Replikat durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 dargestellt.

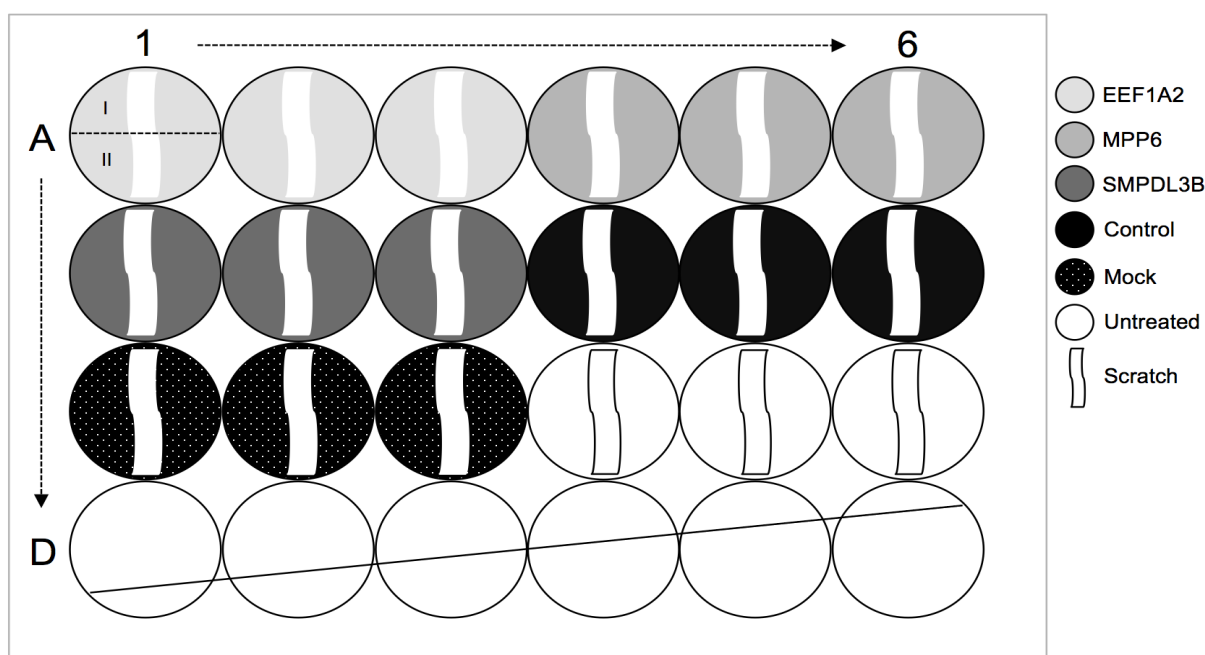


Abb.8: Schematische Darstellung des siRNA *Scratch Assay* mit 3 technischen Replikaten und 2 (I/II) Bildern pro Replikat.

Die Bilder wurden mit der an der ETH-Zürich entwickelten *tscratch* Software automatisch ausgewertet. Bei Ungenauigkeiten wurden manuelle Anpassungen des Schwellenwertes vorgenommen^[64]. Die Ergebnisse wurden statistisch und graphisch mit *GraphPad PRISM V.6* (Graphpad Software, La Jolla, USA) aufbereitet und dargestellt (Abbildung 9).

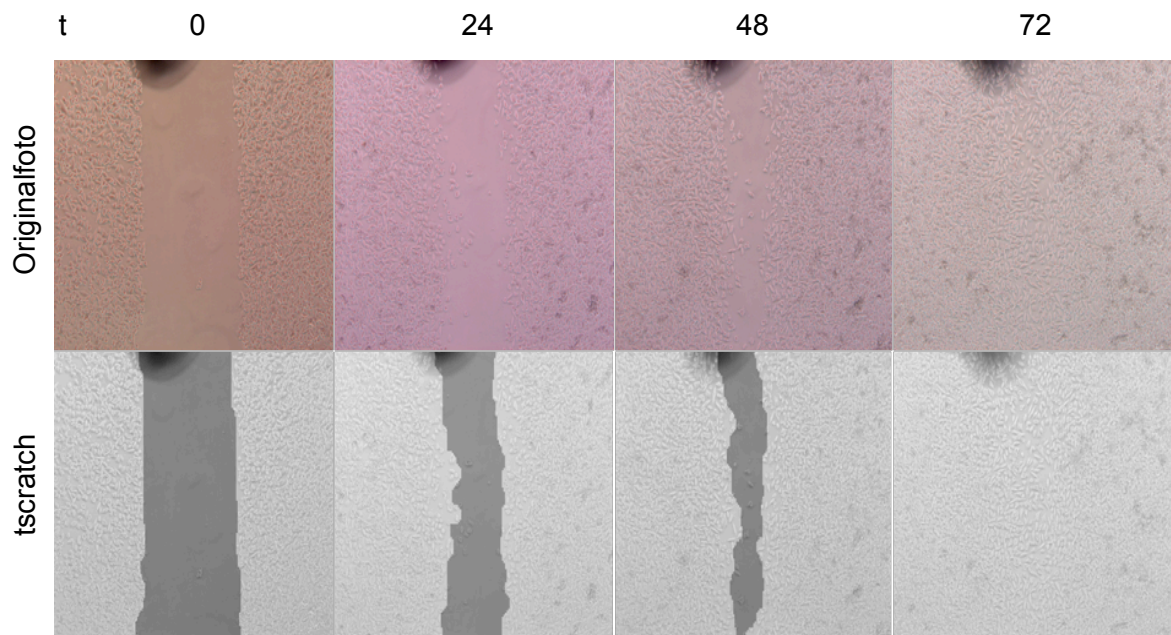


Abb.9: Exemplarische ‚scratch‘ Auswertung mittels tscratch Software. Oben dargestellt, die 24-stündliche Fotodokumentation der Probe SA11; MPP6_3_1 mit der orientierenden Punktmarkierung. $t_0 = \text{‘scratch’}$. Unten ist die entsprechende, anhand von tscratch ausgewertete Defektausdehnung dargestellt.

• 3. Ergebnisse

• 3.1 Etablierung der PCR-Methodik

• 3.1.1 Verifikation der Primerqualität

Um die Qualität der erstellten Primer zu überprüfen, wurden diese zusammen mit der cDNA verwendeter Zelllinien in einer qualitativen PCR verwendet und das resultierende Amplifikat auf einem Agarosegel sichtbar gemacht. Eine adäquate Größe, Dichte und Schärfe sowie das Vorhandensein einer einzigen Bande waren die Qualitätsmerkmale. Nachfolgend ist stellvertretend das Ergebnis der Transkriptionsamplifikation mit dem MPP6-Primerpaar dargestellt. Diese wurde an DU145, PC3 und PNT1A Zellen getestet. Zudem wurden sowohl Negativproben des PCR-Mix als auch der cDNA mituntersucht (Abbildung 10).

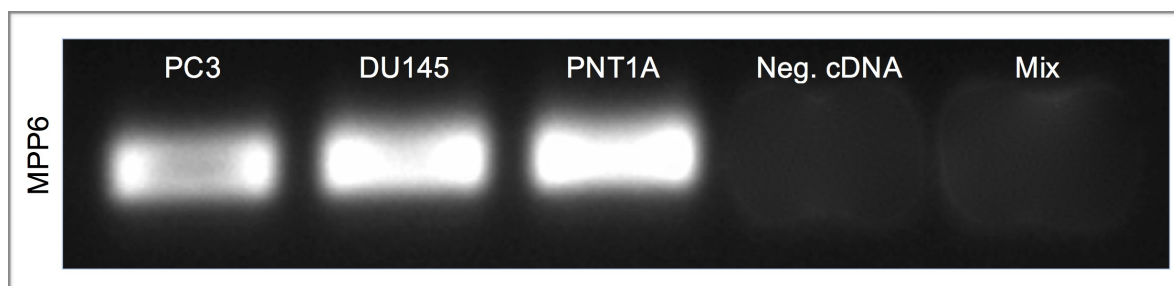


Abb.10: Beispielhafte qualitative Expression von MPP6 bei verschiedenen Zelllinien. Klar umrissene Banden (Produkte) in unterschiedlicher Stärke bei den Zelllinien; ohne Genprodukt in den Negativkontrollen.

• 3.1.2 Intraassayvarianz bei Pipettiervorgängen

Zur Überprüfung und Optimierung der Genauigkeit der Pipettiervorgänge wurde nach ausreichender Etablierung der Methodik die Intraassayvarianz bei einem PCR-Durchlauf anhand von 7 Primerpaaren mit jeweils 10 technischen Replikaten bestimmt. Als Ausgangsmaterial diente cDNA der Zelllinie DU145. Es zeigten sich primerabhängige Abweichungen. Die größte Ungenauigkeit zeigte sich für GNAI1 mit einer Standardabweichung (STABW) von 0,32 gefolgt vom Housekeeping Gen GUS mit 0,16 STABW. Die exaktesten Ergebnisse konnten beim Housekeeping Gen CALM mit einer Standardabweichung von 0,038 sowie bei SMPDL3B mit der STABW von 0,040 erzielt werden. Gemittelt zeigte sich für den kompletten PCR-Lauf eine STABW von 0,11. Mögliche Einflussgrößen sind unter anderem die Genauigkeit der verwendeten Pipetten und Pipettenspitzen, die Durchmischung der Lösungen und die Ausführung des Pipettiervorgangs selbst. Nachfolgenden sind die reinen cT-Werte des Intraassayversuchs als Punktwolken aufgezeigt (Abbildung 11).

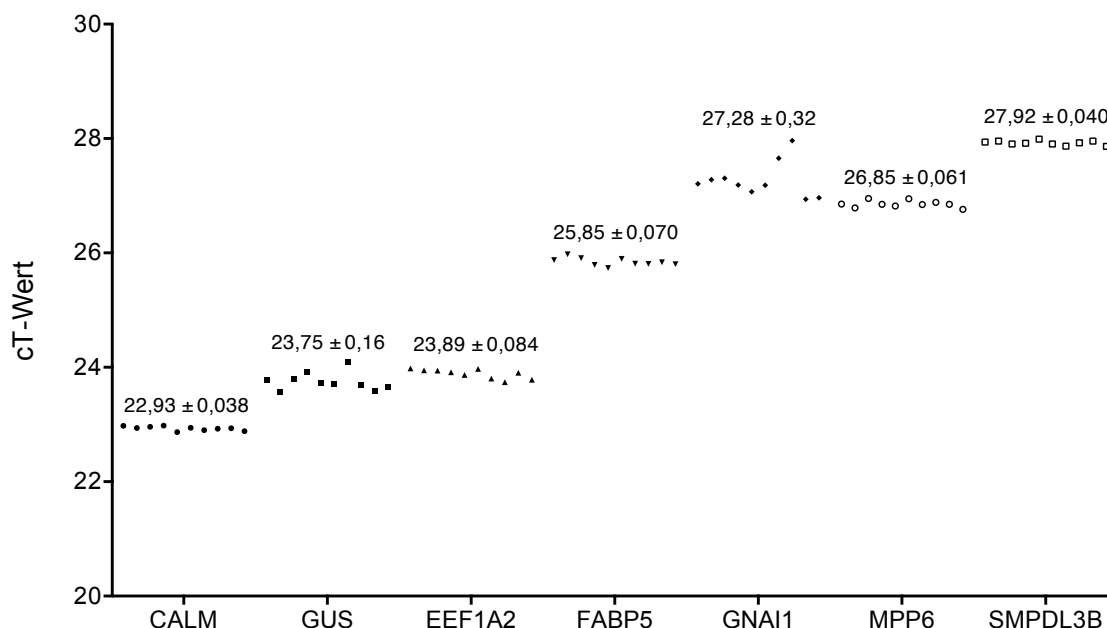


Abb.11: Intraassayvarianz der Primerpaare in DU145-Zellen. Der Zahlenwert stellt den Mittelwert (MW) ± STABW dar (n=10).

• 3.1.3 Optimierung der Primerkonzentration

Um die Kosten- und Materialeffizienz der PCR-Läufe zu steigern, wurden nachfolgend Multiplex PCRs durchgeführt, PCRs bei denen mehr als eine Genexpression in derselben Probe bestimmt wurde. Im Hinblick auf Wechselwirkungen zwischen den Primerpaaren galt es deren Konzentration so stark wie möglich zu reduzieren, ohne dabei Einfluss auf die cT-Werte zu nehmen. Aus dem Grund wurden im Vorfeld cT-Messungen der Housekeeping Gene CALM und GUS sowie der zu untersuchenden Gene EEF1A2, FABP5 und SMPDL3B mit unterschiedlichen Primerkonzentrationen durchgeführt. Die Auswahl der exosomalen Gene erfolgte aufgrund der initialen Verteilung der jeweiligen cT-Werte im unteren, mittleren und oberen Bereich.

Von dem standardmäßigen Ausgangsvolumen der Primer von 0,75 µl pro Lauf wurde die Primervolumina auf 0,50 µl, 0,25 µl sowie 0,10 µl reduziert und das entsprechende fehlende Volumen mit Wasser aufgefüllt, um das Reaktionsgesamtvolumen von 20 µl nicht zu verändern. Die cT-Werte aus cDNA von PC3, DU145 und PNT1A wurden in Duplikaten bestimmt und gemittelt.

Annähernd unveränderte cT-Werte konnten nur bis zu einem Primervolumen von 0,50 µl beobachtet werden. Die Abbildung 12 zeigt stellvertretend die cT-Werte von SMPDL3B und GUS bei den unterschiedlichen Volumina. Aus Übersichtsgründen sind repräsentativ die gemittelten Werte der Volumina 0,75 µl und 0,50 µl mit dem Standardfehler bei PC3-Zellen sowie die gemittelten Werte der Volumina 0,75 µl und 0,25 µl mit dem Standardfehler bei PNT1A-Zellen aufgeführt.

Die Standardabweichung des 0,75/0,50 µl Mittelwerts liegt unterhalb der oben errechneten Intraassayvarianz, also in einem akzeptablen und verwertbaren Bere-

ich. Die STABW des 0,75/0,25 μl Mittelwerts hingegen liegt deutlich oberhalb der Intraassayvarianz, weshalb ein Volumen von 0,25 μl nicht verwendet werden konnte.

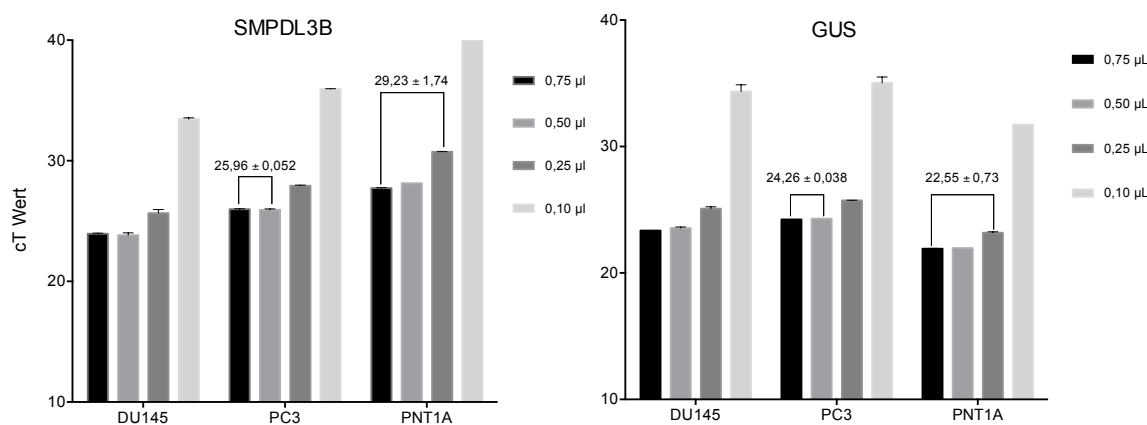


Abb.12: cT-Werte bei unterschiedlichen Primervolumina von SMPDL3B und GUS. Ausgerechnet ist jeweils der MW aus den angezeigten Balken mit der STABW (n=2).

• 3.1.4 Etablierung von Multiplex PCRs

Mit der Primerkonzentration nimmt die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Wechselwirkungen von Primern und cDNA sowie der Bildung von Primerdimeren zu^[43]. Deshalb haben wir uns auf die Durchführung von einzelnen und Duplex-PCRs beschränkt. Um das optimierte Primervolumen in einer Duplex-PCR bei geringer cDNA-Konzentration zu testen, wurden Verdünnungsreihen mit 6 unterschiedlichen cDNA Konzentrationen von PC3 und DU145 Zellen angelegt. Die cT-Werte wurden jeweils aus 3 technischen Replikaten gemittelt. Getestet wurden die Primerpaare für EEF1A2, FABP5 und SMPDL3B jeweils in Kombination mit GUS oder CALM. Als geeignete Duplex-Primerkombination wurden schließlich EEF1A2/GUS und SMPDL3B/Calm verwendet, da diese die stabilsten Werte in der Verdünnungsreihe produzierten. Die cT-Werte des Duplex-Gemischs entwickelten sich nahezu identisch zu denen der Einzelmessungen und blieben bis zu einer Verdünnung von 10^4 der cDNA bei geringer Standardabweichung stabil (Abbildung 13). Stellvertretend sind die cT-Werte der Verdünnungsreihe der Multiplex-PCR mit SMPDL3B/Calm bei DU145-Zellen dargestellt. Je geringer die Konzentration des Genmaterials, desto störanfälliger sind die cT-Messungen. Deshalb wurden die cT-Werte des 10^4 cDNA-Volumens als Mittelwerte mit STABW, als niedrigste verwertbare Volumina hervorgehoben.

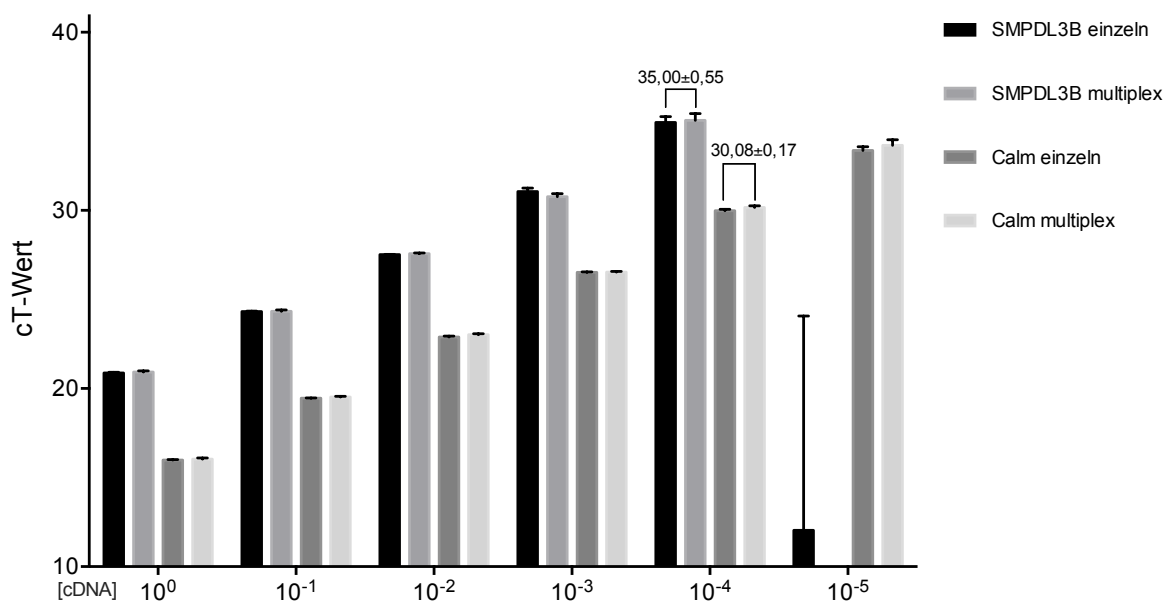


Abb.13: Vergleich der Duplex- und Einzel-PCRs von SMPDL3B und CALM Genprodukten in DU145-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei technischen Replikaten mit STABW (n=3).

• 3.2 Kohorte

• 3.2.1 Klinische Daten der Kohorte

Die Einteilung der Patienten entsprechend der zugehörigen klinischen Daten ist in der Tabelle 7 dargestellt. Aufgrund lückenhafter klinischer Daten ist nicht jede der 40 Tumorproben in allen Untergruppen wiederzufinden. Zudem bleiben die Untergruppen der T-Stadien T1 und T4 unbesetzt.

Tab.7: Einteilung der Patientenproben in klinische Gruppen

	Patienten mit Prostatakarzinom	Normalkontrollen
Anzahl	40	8
Alter (MW ± STABW)	62,75 ± 8,15	64 ± 10,9
Alter (Median)	62	68
Risikoprofil	Niedrig:	10
	Intermediär:	22
	Hoch:	8

Tab.7: Einteilung der Patientenproben in klinische Gruppen

	Patienten mit Prostatakarzinom	Normalkontrollen
T-Stadium	T1:	-
	T2:	22
	T3:	12
	T4:	-
	Unklar:	6
Gleason-Score	Gleason 5:	2
	Gleason 6:	8
	Gleason 7a:	14
	Gleason 7b:	8
	Gleason 8:	3
	Gleason 9:	4
	Unklar:	1

• 3.2.2 Ergebnisse des Expressionsprofilings

Die Ergebnisse aus den Genanalysen der Patientenkohorte sind nachfolgend zusammengefasst. Die Normalisierung der Werte erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta cT}$ Methode^[46]. Als Housekeeping Gen fungierte jeweils Calmodulin (CALM). Die Referenzprobe zum Ausgleich von Variationen zwischen den Platten wurde aus je 6 Einzelmessungen von PC3-Zellen gemittelt. In einem nächsten Schritt wurden diese Werte dann zum Median der 8 Normalkontrollen normalisiert. Die nachfolgende Tabelle liefert einen Überblick der Resultate, die nach normalen Patientenproben und Tumorproben aufgeteilt sind (Tabelle 8).

Tab.8: Übersicht der Genexpression Normalgewebe vs. Tumorgewebe

	n	CALM	EEF1A2	FABP5	GNAI1	MPP6	SMPDL3B
		Median ± STABW	Median ± STABW	Median ± STABW	Median ± STABW	Median ± STABW	Median ± STABW
„Roher“ cT-Wert	48						
Normal	8	25,68 ± 0,44	32,00 ± 2,49	28,96 ± 0,72	29,81 ± 0,51	28,85 ± 0,34	32,00 ± 0,81
Tumor	40	25,67 ± 0,53	29,10 ± 1,61*** p=0,0002	27,28 ± 2,21** p=0,0023	29,47 ± 1,20	28,20 ± 0,86* p=0,0465	29,60 ± 0,96*** p<0,0001
Normalisierung							
(2^{-ΔΔcT})/Med-Norm.	48		Median ± STABW	Median ± STABW	Median ± STABW	Median ± STABW	Median ± STABW
Normal	8	-	1,00 ± 4,11	1,00 ± 0,67	1,00 ± 0,41	1,00 ± 0,46	1,00 ± 0,73
Tumor	40	-	9,36 ± 24,34*** p=0,0008	2,97 ± 25,71** p=0,0042	1,35 ± 1,33	1,45 ± 1,25* p=0,0447	5,41 ± 3,98*** p<0,0001

Tab.8: Die signifikanten Daten sind per * gekennzeichnet und farblich hervorgehoben. Der entsprechende p-Wert ist rechtsseitig angeführt. Die p-Wert Berechnung erfolgte mittels Mann-Whitney-Testung.

Der Darstellung der rohen cT-Werte folgt die Normalisierung der untersuchten Gene. Die angeführten Sternchen spiegeln bei Signifikanz die p-Werte der malignen im Vergleich zu den benignen Proben wieder. Die p-Werte wurden mithilfe des unpaaren, nicht parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (U-Test) berechnet. Der Median der rohen cT-Werte des Housekeeping Gens CALM ist fast identisch bei normalem im Vergleich zu Karzinomgewebe. Dies spricht zum einen für die Genauigkeit der Pipettvorgänge, zum anderen für gleichmäßige cDNA-Konzentrationen in den verschiedenen *wells*. Signifikante Unterschiede der Genexpression zwischen normalem und tumorösem Gewebe waren bei *EEF1A2*, *FABP5*, *MPP6* und *SMPDL3B* auffindbar. Nachfolgend werden Subgruppenanalysen der Tumorproben in Bezug auf die jeweilige Genexpression dargestellt. Zunächst werden die Ergebnisse entsprechend der T-Stadien (Abbildung 14) und dem Gleason-Wert (Abbildung 15) dargestellt. Weitere Ergebnisse werden dann anschließend aufgezeigt.

3.2.2.1 Genexpression nach T-Stadium

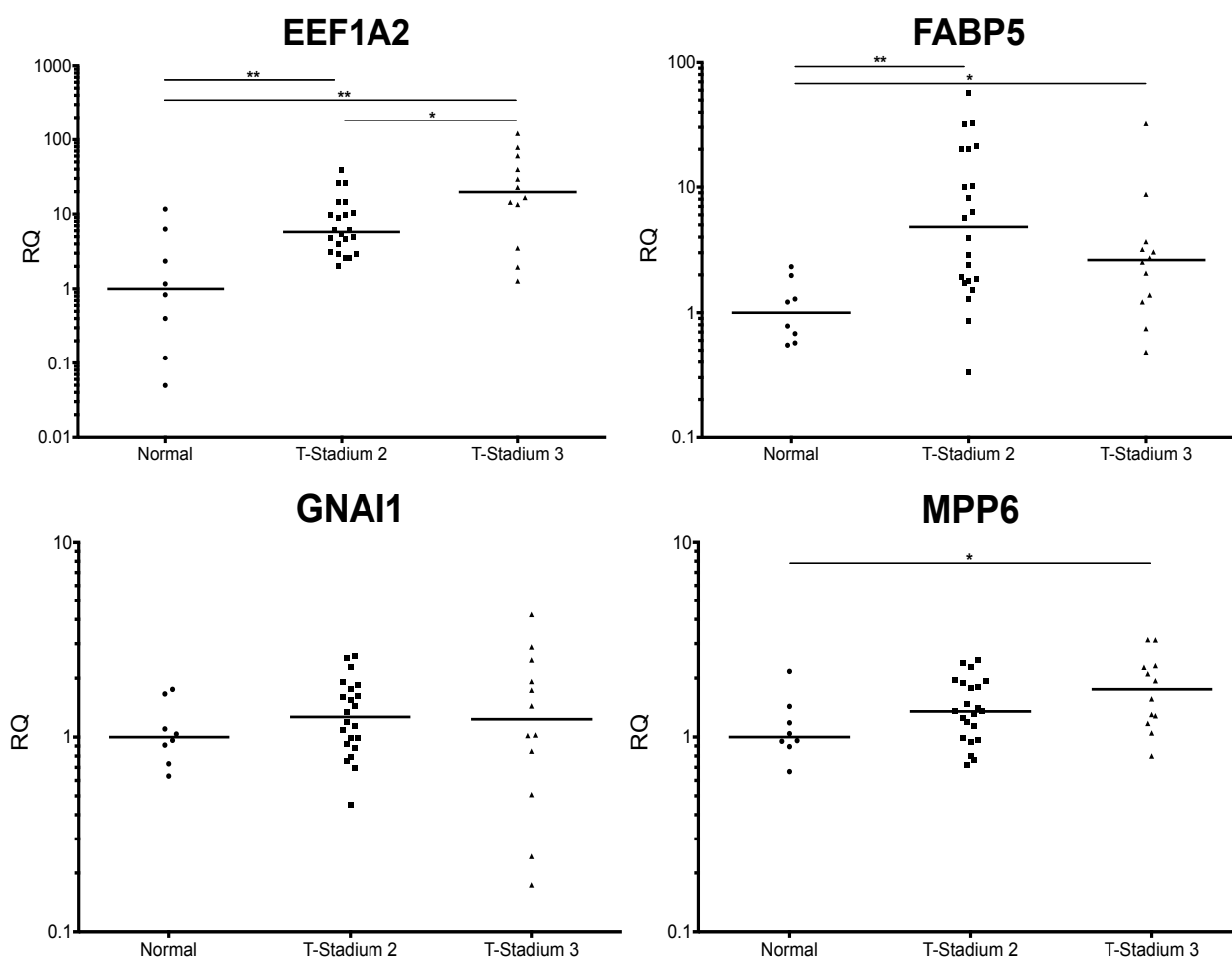


Abb. 14: Genexpression der Kandidaten nach T-Stadium. Weitere Ausführungen sind auf Seite 37 vorzufinden.

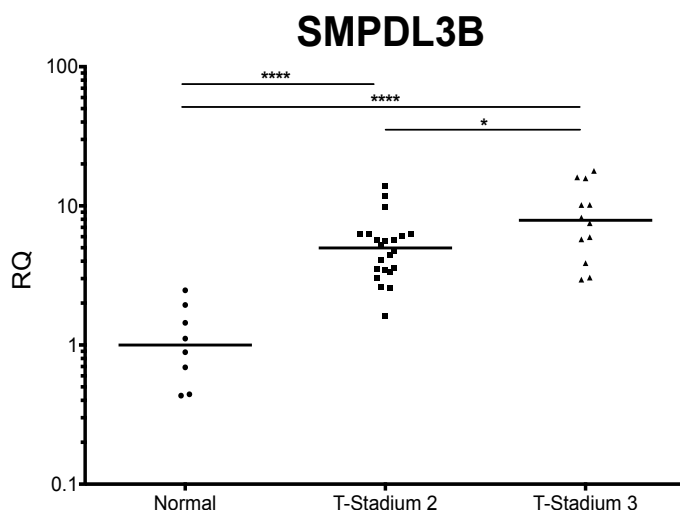


Abb.14: Genexpression der Kandidaten nach T-Stadium. Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch nach Log_{10} . RQ steht für die relative Genexpression. Als horizontale Linie ist der Median der jeweiligen Gruppe dargestellt. $n_{\text{Normal}}(8)$, $n_{\text{T2}}(22)$, $n_{\text{T3}}(12)$. Signifikante Unterschiede wurden mit * markiert. *p-Wert<0,5; **p-Wert<0,01; ****p-Wert<0,0001. Die p-Wert Berechnung erfolgte mittels Mann-Whitney-Testung.

Tab.9: P-Werte nach T-Stadium.

	EEF1A2	FABP5	GNAI1	MPP6	SMPDL3B
	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Normal vs. T 2	0,006	0,002	0,247	0,137	<0,0001
Normal vs. T 3	0,001	0,025	0,603	0,031	<0,0001
T 2 vs T 3	0,044	0,213	>0,999	0,230	0,040

Tab.9: Die signifikanten p-Werte sind hervorgehoben.

Der Vergleich der Expression der Gene nach dem T-Stadium (Abbildung 14) zeigte signifikante Unterschiede zwischen benignen und malignen Zellen bei EEF1A2, FABP5, MPP6 und SMPDL3B. Für GNAI1 konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden. Signifikant höher zeigte sich die Expression von EEF1A2 im Stadium T2 ($n=22$) mit einer medianen 5,78-fachen \pm (9,47) Expression im Vergleich zu den Kontrollen. Der Vergleich der normalen Zellen zu den Zellen im Stadium T3 ($n=12$) zeigte eine signifikant höhere Expression mit einem Median von $19,78 \pm 36,54$. Zudem war die Expression von EEF1A2 bei T3 im Vergleich zu T2 signifikant höher.

Die Expression von FABP5 zeigte sich signifikant höher im T2 Gewebe ($4,82 \pm 14,27$) im Vergleich zur Normalkontrolle ($1 \pm 0,67$). Zudem war die FABP5-Expression in T3 Tumoren ($2,63 \pm 8,77$) signifikant höher als bei normalem Gewebe. Ein signifikanter Unterschied der FABP5-Expression zwischen Stadium T2 und T3 konnte nicht festgestellt werden.

Die Werte von Median \pm STABW betragen für GNAI1 bei der Normalkontrolle ($1 \pm 0,41$) sowie für T2 ($1,27 \pm 0,6$) beziehungsweise T3 ($1,24 \pm 1,20$) und unterschieden sich nicht signifikant.

Bei der Genexpression von MPP6 zeigten sich signifikant höhere Werte bei T3 Tumoren ($1,75 \pm 0,78$) im Vergleich zur Normalkontrolle ($1 \pm 0,46$). Keine signifikanten Unterschiede konnten beim Vergleich T2 ($1,35 \pm 0,53$) zur Normalkontrolle festgestellt werden.

Die Expressionsunterschiede mit der stärksten Signifikanz zeigten sich bei der Genexpression von SMPDL3B. So war die Genexpression im Stadium T2 ($4,99 \pm 2,00$) signifikant höher im Vergleich zur Normalkontrolle ($1 \pm 0,73$). Auch war die SMPDL3B Genexpression im Stadium T3 ($7,88 \pm 5,19$) signifikant höher als die Normalkontrolle. Zudem waren signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Stadien T2 und T3 bei der Expression von SMPDL3B zu verzeichnen.

Beim Vergleich der Genexpression der Kandidaten im Stadium pT3a (n=4) zum Stadium pT3b (n=8) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 9).

3.2.2.2 Genexpression nach Gleason-Score

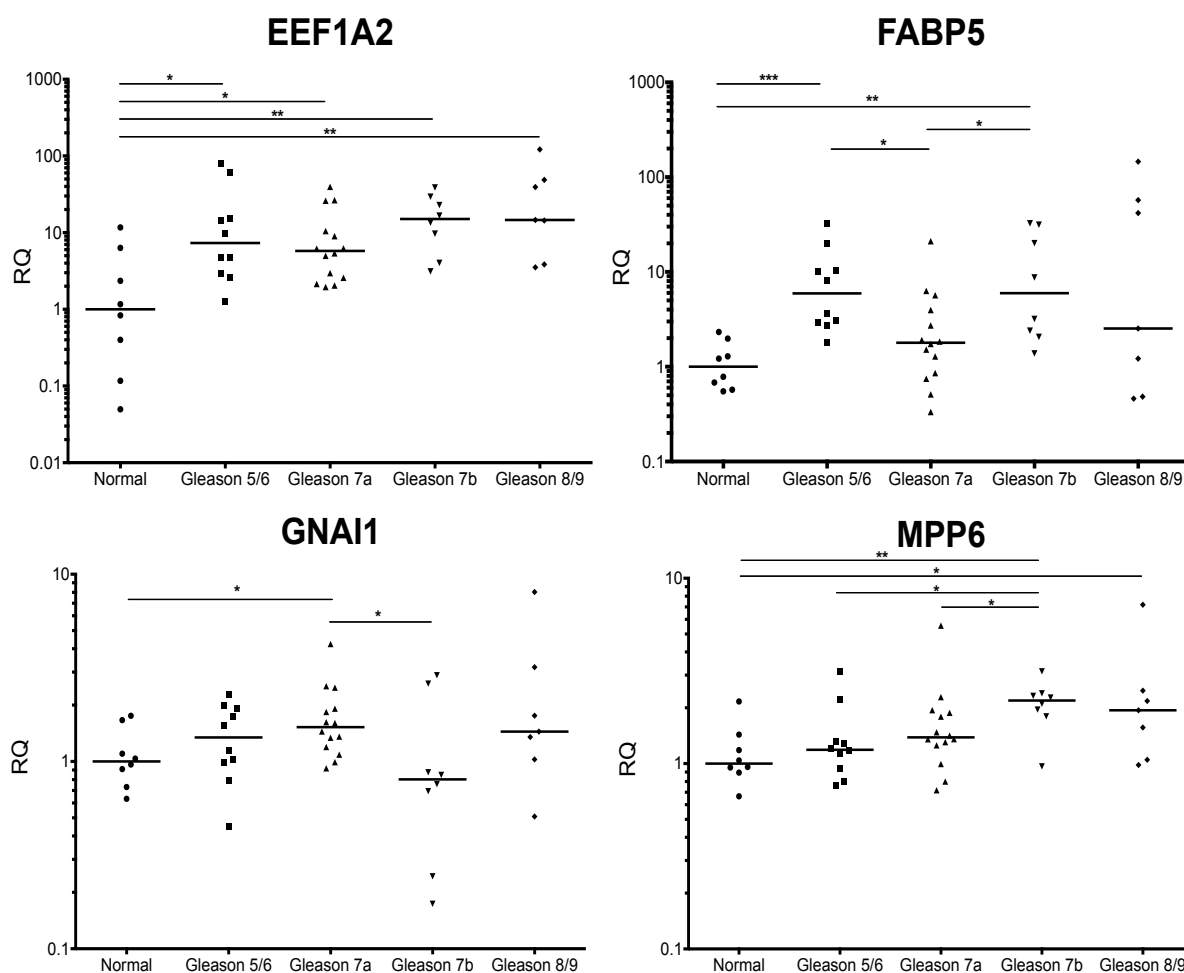


Abb.15: Genexpression der Kandidaten nach Gleason-Score. Weitere Ausführungen sind auf Seite 39 vorzufinden.

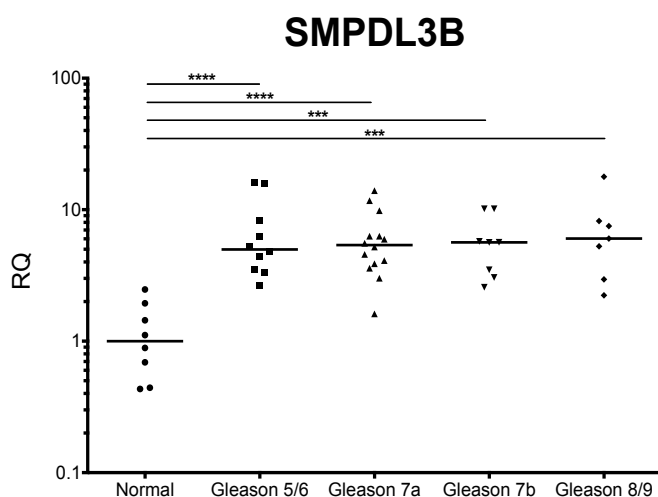


Abb.15: Genexpression der Kandidaten nach Gleason-Score. Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch nach Log_{10} . RQ steht für die relative Genexpression. Als horizontale Linie ist der Median der jeweiligen Punktwolke dargestellt.

$n_{\text{Normal}}(8)$, $n_{5/6}(10)$, $n_{7a}(14)$, $n_{7b}(8)$, $n_{8/9}(7)$. Signifikante Unterschiede wurden mit * markiert. *p-Wert<0,5; **p-Wert<0,01; ***p-Wert<0,001; ****p-Wert<0,0001. Die p-Wert Berechnung erfolgte mittels den Mann-Whitney-Testung.

Tab.10: P-Werte nach Gleason-Score.

	EEF1A2	FABP5	GNAI1	MPP6	SMPDL3B
	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert	p-Wert
Normal vs Gl 5/6	0,012	0,0002	0,268	0,500	<0,0001
Normal vs Gl 7a	0,024	0,182	0,029	0,107	<0,0001
Normal vs Gl 7b	0,003	0,001	0,375	0,007	0,0002
Normal vs Gl 8/9	0,004	0,332	0,188	0,029	0,0006
Gl 5/6 vs Gl 7a	0,660	0,011	0,426	0,208	>0,999
Gl 5/6 vs Gl 7b	0,454	>0,999	0,232	0,034	0,803
Gl 7a vs Gl 7b	0,126	0,035	0,041	0,035	0,840
Gl 8/9 vs 5/6	0,313	0,711	0,531	0,193	0,874
Gl 8/9 vs 7a	0,079	0,582	>0,999	0,287	0,739
Gl 8/9 vs 7b	0,527	0,920	0,120	0,671	0,845

Tab.10: Die signifikanten p-Werte sind hervorgehoben.

Die Einteilung nach Gleason-Score (Abbildung 15) zeigte, signifikante Expression-unterschiede beim Vergleich von Tumorgewebe und Normalkontrolle bei den Genen EEF1A2, FABP5, MPP6, SMPDL3B aber auch, anders als nach T-Stadium, bei der GNAI1 Expression. Die Probenstärke der Untergruppe betrug für die Normalkontrolle ($n=8$) sowie für die Gleasonwerte Gleason 5/6 ($n=10$), Gleason 7a ($n=14$), Gleason 7b ($n=8$) Gleason 8/9 ($n=7$).

Die Genexpression von EEF1A2 war in allen Gradingstufen im Vergleich zur Normalkontrolle ($1 \pm 4,11$) signifikant höher. Die Zahlenwerte betragen für Gleason 5/6

(7,32 ± 27,22), Gleason 7a (5,78 ± 11,69), Gleason 7b (15,07 ± 12,47) und Gleason 8/9 (14,64 ± 41,83). Gleason-Score Vergleiche untereinander waren nicht signifikant unterschiedlich.

Signifikante Expressionsunterschiede zeigten sich bei der FABP5 Expression bei einem Gleason-Score 5/6 (5,93 ± 9,72) im Vergleich zur Normalkontrolle (1 ± 0,67). Zudem war die Expression von FABP5 in der Gleason 7b Gruppe (5,98 ± 13,41) signifikant höher als die Expression in normalem Gewebe. Keine signifikanten Unterschiede konnten beim Gleason Score 7a (1,79 ± 5,36) und den höheren Gleason Werten 8/9 (2,53 ± 53,81) im Vergleich zur Normalkontrolle festgestellt werden. Allerdings waren signifikante Unterschiede der FABP5 Expression zwischen den Gleason Gruppen 7a und 7b festzustellen. Zudem zeigten sich die FABP5 Expressionen der Gleason 5/6 und Gleason 7a signifikant unterschiedlich. Die GNAI1 Expression in den Gleason 7a Proben (1,53 ± 0,87) war signifikant höher als die Normalkontrolle (1 ± 0,41). Dementgegen wurde eine signifikant niedrigere GNAI1 Expression bei Gleason 7b im Vergleich zu Gleason 7a festgestellt. Die GNAI1 Expressionswerte von Gleason 5/6 (1,35 ± 0,60), Gleason 7b (0,80 ± 1,03) oder Gleason 8/9 (1,45 ± 2,59) zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Normalkontrolle.

Für MPP6 war die Genexpression in der Gleason 7b Gruppe (2,19 ± 0,62) im Vergleich zur Normalkontrolle (1 ± 0,46) signifikant höher. Gleiches galt für die MPP6 Expression bei Gleason 8/9 (1,94 ± 2,15). Keine MPP6 Expressionsunterschiede gab es beim Vergleich Gleason 5/6 (1,19 ± 0,73) oder Gleason 7a (1,39 ± 1,19) zur Normalkontrolle. Zudem war die MPP6 Genexpression von Gleason 7b im Vergleich zu Gleason 5/6 signifikant höher.

Die stärksten Signifikanzen zeigten sich erneut beim Vergleich der SMPDL3B Genexpression der Normalkontrolle (1 ± 0,73) zu Gleason 5/6 (4,99 ± 4,95), Gleason 7a (5,38 ± 3,46), Gleason 7b (5,65 ± 2,96) und zu Gleason 8/9 (6,03 ± 5,19). Die Gegenüberstellung der einzelnen Gleason-Werte untereinander zeigten keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 10).

3.2.2.3 Weitere Unterschiede in der Genexpression

Zusätzlich zu den oben aufgezeigten Genexpressionsunterschieden fanden sich in Subgruppenanalysen weitere signifikante Unterschiede. So wurde bei Patienten über 65 Jahren eine signifikant höhere GNAI1 Expression im Tumorgewebe ((n=9) 1,84 ± 2,20) im Vergleich zum Normalgewebe ((n=5) 0,96 ± 0,14) (p-Wert 0,007) festgestellt (Abbildung 16).

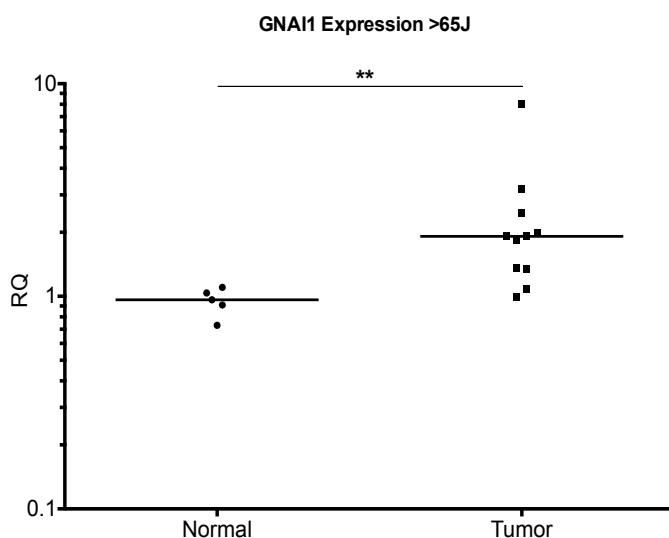


Abb.16: GNAI1 Expression bei Patienten > 65 Jahren. Die Skalierung der y-Achse ist logarithmisch nach Log_{10} . RQ steht für die relative Genexpression. Als horizontale Linie ist der Median der jeweiligen Punktwolke dargestellt. ** steht für einen $p\text{-Wert} < 0,01$.

Die Expression von SMPDL3B in der Kontrollgruppe der Patienten unter 65 Jahren ($n=3$) war signifikant höher ($1,94 \pm 0,52$) verglichen mit den Kontrollpatienten über 65 Jahren ($n=5$) mit einem Median von $0,69 \pm 0,29$ ($p\text{-Wert } 0,0357$).

Bei der Korrelation der Ergebnisse mit den anderen klinischen Parametern fanden sich keine weiteren signifikanten Zusammenhänge.

• 3.3 Eigenschaften der Zelllinien

• 3.3.1 MTT Proliferationsassay

Zur Objektivierung der Proliferation der benignen Zelllinie PNT1A sowie der PCa-Zelllinien DU145 und PC3 wurden im MTT Proliferationsassay Absorbionsmessungen 48 h, 72 h und 96 h nach Aussaat der Zellen durchgeführt (Abbildung 17). Die Messresultate (Mittelwert \pm STABW), als Maß der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinien, zeigten keine signifikanten Differenzen 72 h und 96 h nach Aussaat (Tabelle 11). Die Werte wurden auf den gemessenen Ausgangswert nach 48 h normalisiert.

Tab.11: Proliferation der Zelllinien DU145, PC3 und PNT1A.

	DU145	PC3	PNT1A
48 h	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$
72 h	$1,13 \pm 0,07$	$1,24 \pm 0,10$	$1,05 \pm 0,01$
96 h	$1,33 \pm 0,24$	$1,62 \pm 0,25$	$1,76 \pm 0,09$

Tab.11: Absorbionsmessung im Mittelwert \pm STABW.

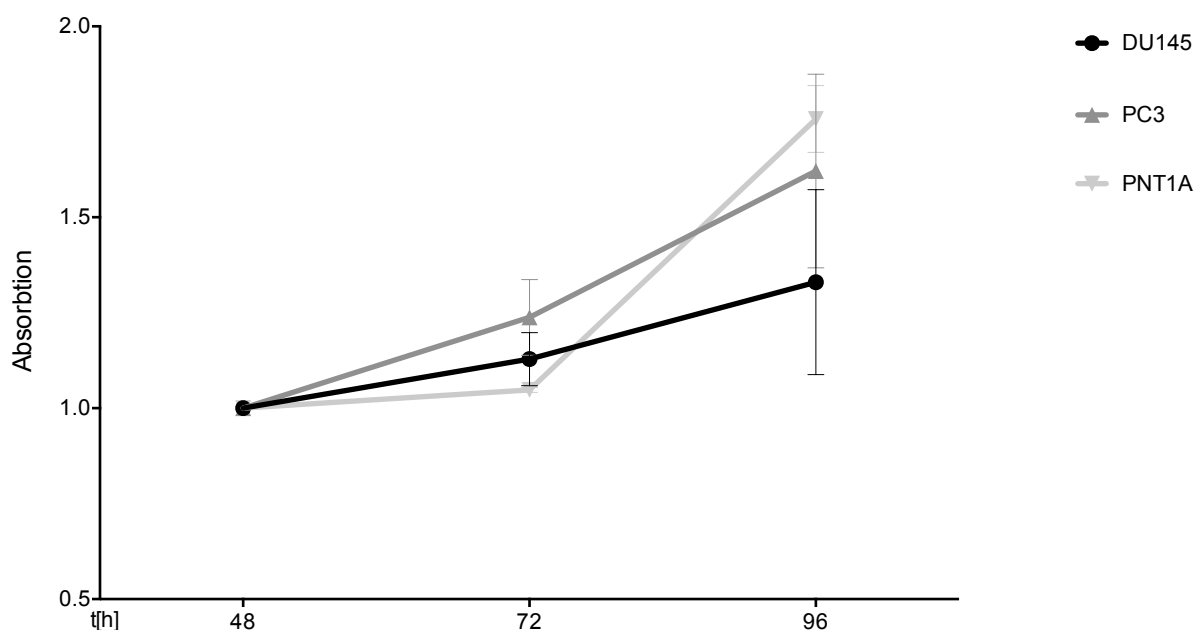


Abb.17: Proliferation der Zelllinien DU145, PC3 und PNT1A. (n=3) (MW \pm STABW).

• 3.3.2 MDCK-C7 Invasionsassay

3.3.2.1 Resistenzentwicklung der MDCK-C7

Der im Invasionsassay gemessene transepitheliale Widerstand der MDCK-C7 Zellen entwickelt sich innerhalb der ersten Tage exponentiell, um nach einer Phase mit annähernd linearem Anstieg in ein Plateau überzugehen (Abbildung 18). Die Plateau-Phase selbst ist in Abbildung 18 zwecks Übersichtlichkeit nicht dargestellt, konnte jedoch vielfach während der eigentlichen Invasionsmessungen bei den Negativproben beobachtet werden. Sie spiegelt den maximalen Widerstand bei einer kompletten Konfluenz der Zellen auf der limitierten Fläche von 4,2 cm² im *well* wider. Die Nährlösung wurde ab der Kokultivierung nicht mehr erneuert, um die gebildeten Wachstumsfaktoren und Exosomen nicht zu entfernen und den *assay* zeitlich zu limitieren.

Der Beginn der Kokultivierung wurde bei Erreichen eines TEER-Wertes von ca. 8.500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ festgesetzt. So konnten durchschnittlich 144 Stunden nach MDCK-C7 Aussaat die zu untersuchenden Zellen zugegeben werden.

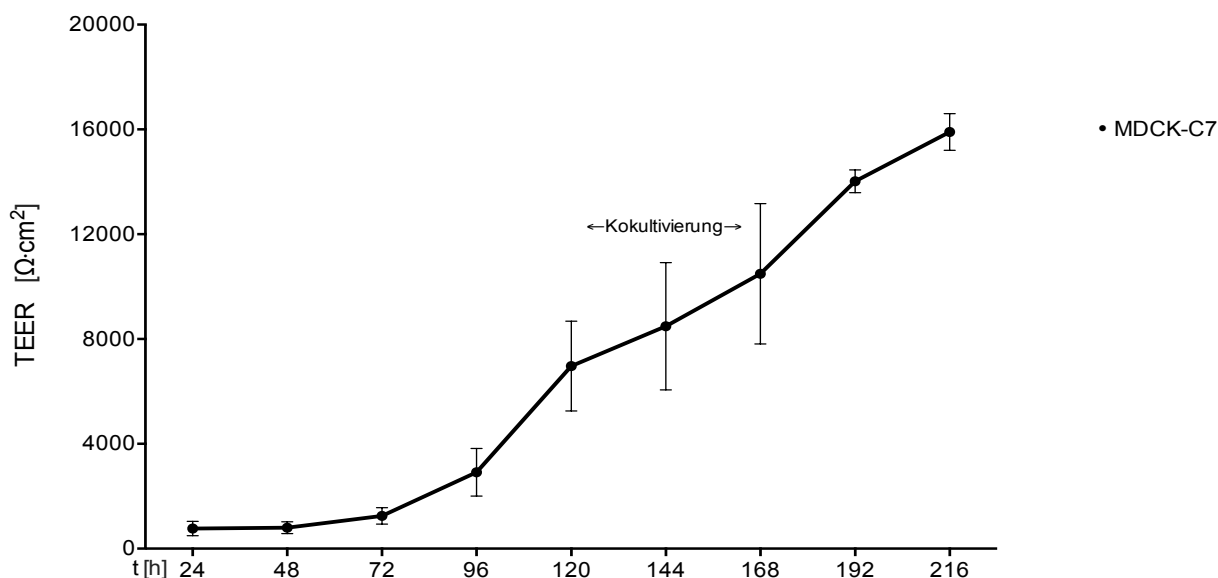


Abb.18: Resistenzentwicklung der MDCK-C7 Zellen in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ über einen Beobachtungszeitraum von 24 h bis 216 h nach Aussaat. Die Aussaat der Tumorzellen erfolgte bei $8.500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ($n=8$) (MW \pm STABW).

3.3.2.2 Validierung des Invasionsassays

Zur Überprüfung der Funktionalität des Invasionsassays wurde TGF β als wichtiger Auslöser der EMT in den Konzentrationen 0,1 ng/ml und 1 ng/ml zu den MDCK-C7 Zellen hinzugefügt (Abbildung 19). Im Vergleich zur Normalkontrolle entwickelt sich die TEER bei Zugabe von 0,1 ng/ml TGF β nahezu identisch. Die Zugabe von TGF β in einer Konzentration von 1 ng/ml hingegen bewirkte nach 24 h eine deutliche Reduktion der TEER um ca. $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (MW \pm STABW: $8763,3 \pm 978,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$, verglichen mit $9975,0 \pm 1101,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ vor Beginn der Behandlung). Nach weiteren 24 h hatte sich die TEER etwa halbiert ($4405,8 \pm 1914,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$).

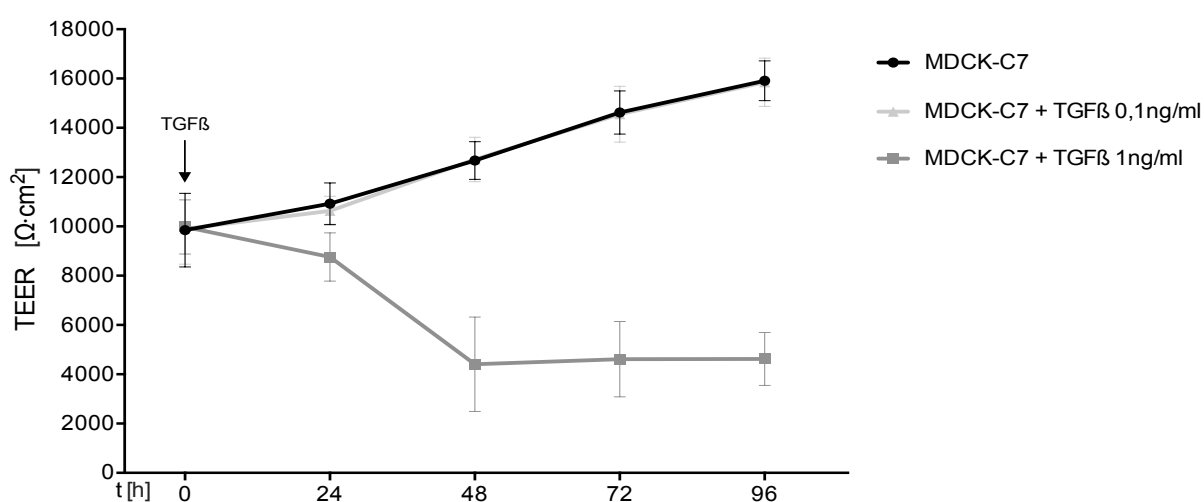


Abb.19: Resistenzentwicklung nach Zugabe von TGF β in 2 Konzentrationen. MDCK-C7 ($n=24$), TGF β (jeweils $n=8$).

3.3.2.3 Invasives Verhalten der verschiedenen Zelllinien

In ihrer Eigenschaft, die Integrität eines intakten Epithelverbundes ohne direkten Zell-Zell-Kontakt aufzulösen, unterscheiden sich die getesteten PCa-Zelllinien untereinander (Abbildung 20). So folgt die Resistenzentwicklung nach Zugabe von DU145-Zellen annähernd der TEER der Negativkontrolle bis zu einer geringen Abnahme 96 h nach Tumorzellaussaat. 48 h nach Zugabe der PC3-Zellen kam es zu einem Abfall der TEER, welcher sich bis 72 h nach Tumorzellaussaat fortsetzte, um dann wieder leicht anzusteigen. Die TEER nach Zugabe der PNT1A-Zellen verlief leicht oberhalb der Negativkontrolle, um 96 h nach Tumorzellaussaat auf Werte, vergleichbar der Negativkontrolle, abzusinken.

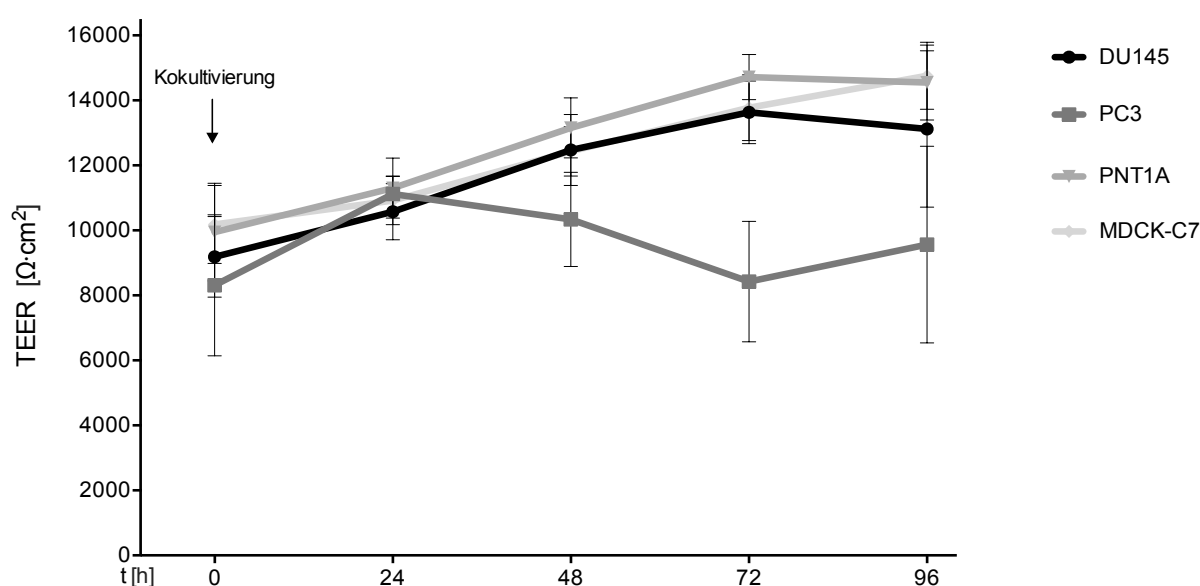


Abb.20: Resistenzentwicklung nach Zugabe von DU145 (n=32), PC3 (n=26), PNT1A (n=16), MDCK-C7 (n=50) über 4 Tage nach Tumorzellaussaat (MW ± STABW).

Die Umwandlung der kontinuierlich gemessenen TEER Werte in einen Invasionskoeffizienten (IK) (Tabelle 12 und Abbildung 21) erlaubt einen objektiveren Vergleich der invasiven Potenz der jeweiligen Zelllinie. Je größer der IK, desto höher das invasive Verhalten der Zelllinie. Werte um 1 stehen für ein geringes, beziehungsweise fehlendes invasives Potential. Die Ergebnisse der PCa-Zelllinien DU145 und PC3 wurden mit der benignen Zelllinie PNT1A zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Kokultivierung verglichen. Eine Untersuchung über 96 h nach Beginn der Kokultivierung hinaus war aufgrund einsetzenden Nährstoffmangels und der damit einhergehenden Verschlechterung der Wachstumsbedingungen der Zellen nicht möglich. Zu allen Untersuchungszeitpunkten zeigte sich ein signifikantes Invasionspotenzial für PC3 Zellen. Die DU145 Zellen wiesen hinsichtlich ihres invasiven Verhaltens keine Unterschiede zu PNT1A auf.

Tab.12: Invasionskoeffizient mit entsprechendem p-Wert

	DU145	p-Wert	PC3	p-Wert	PNT1A
48 h Kokult.	0,96 ± 0,03	0,5	1,23 ± 0,12**	0,002	0,98 ± 0,05
72 h Kokult.	0,98 ± 0,03	0,8	1,70 ± 0,27***	0,0004	0,97 ± 0,05
96 h Kokult.	1,09 ± 0,14	0,6	1,61 ± 0,27**	0,002	1,05 ± 0,06

Tab.12: Ein * markiert einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu PNT1A Zellen (MW ± STABW). ** steht für einen p-Wert < 0,01 und *** steht für einen p-Wert < 0,001. Die p-Wert Berechnung erfolgte mittels unpaarer t-Testung.

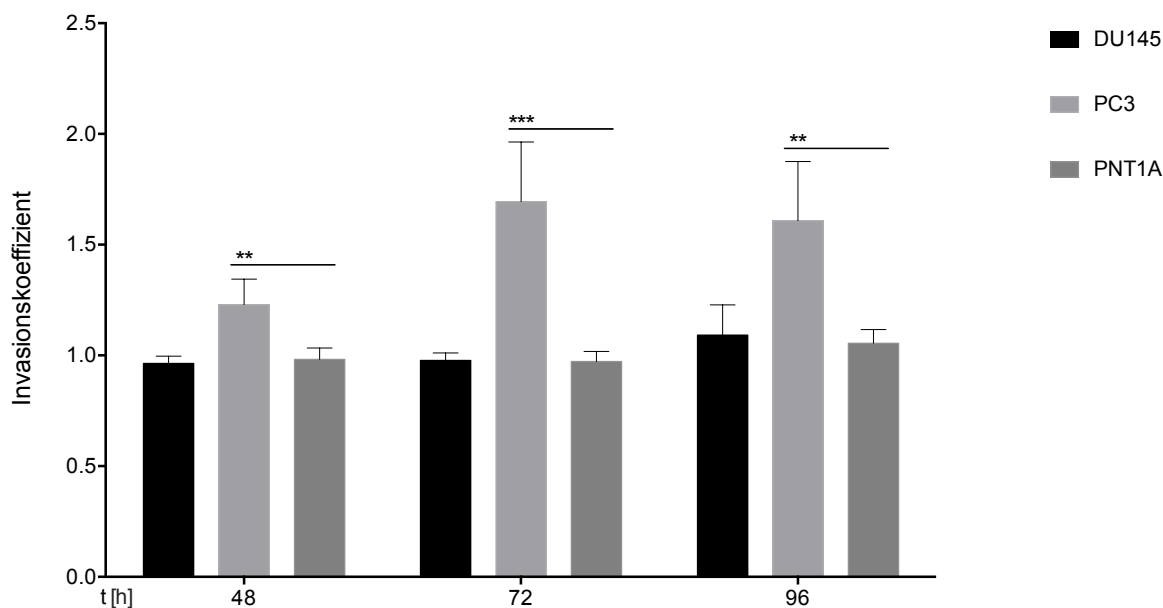


Abb.21: Invasionskoeffizient 24 h, 48 h und 72 h nach Kokultivierung. Die t-Testung bezieht sich jeweils auf die benigne Zelllinie PNT1A. ** steht für einen p-Wert < 0,01 und *** steht für einen p-Wert < 0,001 (MW ± STABW).

Aufgrund der Ergebnisse in den Invasionsmessungen und ihres höheren metastatischen Potentials^[51] entschieden wir uns mit den PC3 Zellen als Modellsystem für die Testung der Funktion unserer Zielgene fortzufahren.

• 3.4 siRNA Assays

• 3.4.1 Unpooling der siRNA

Um die Funktion der Zielgene im Tumorgewebe zu analysieren, wurden diese mit einer entsprechenden siRNA ausgeschaltet. Hierfür wurden sogenannte siRNA-Knockdown-Pools benutzt, in denen jeweils vier unterschiedliche siRNA zusammengemischt sind. Mithilfe einer qRT-PCR wurde die Knockdown-Effektivität des siRNA-Pools sowie der einzelnen siRNAs getestet. In Abbildung 22 wird der siRNA-Knockdown von MPP6 in PC3 Zellen exemplarisch dargestellt. Bei jedem Versuch wurden Negativkontrollen mit dem Transfektionsreagenz, einer silencer siRNA (Control) sowie Nativkontrollen der jeweiligen Genexpression mitgemessen.

Die Messungen der siRNA wurden als Vierfachmessung durchgeführt, die unbehandelten Zellen als Duplikate gemessen, die Negativkontrollen waren Einzelmessungen. Normalisiert wurde auf die MPP6-Genexpression der unbehandelten PC3 Zellen.

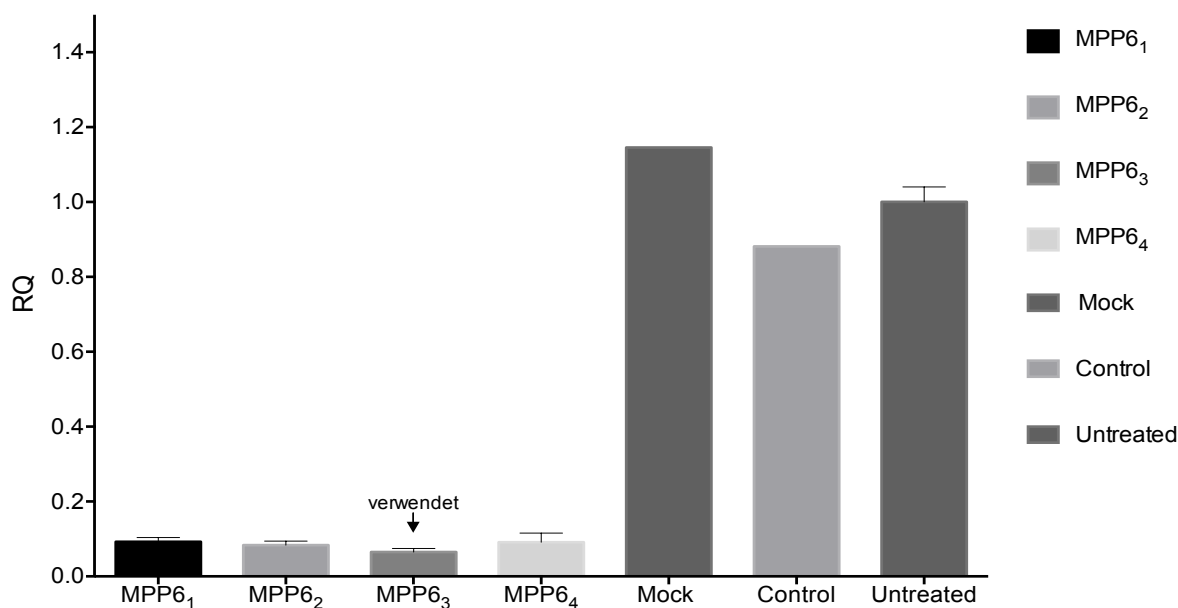


Abb.22: Unpooling der siRNA. Die unterschiedlichen siRNA sind mit MPP6₁ bis MPP6₄ gekennzeichnet. Bei Mock wurde nur das Transfektionsreagenz verwendet. Der durchschnittliche Knockdown betrug 91,7 %, für MPP6₃ konnte 93,5 % Gen-Knockdown erreicht werden (MW ± STABW).

• 3.4.2 siRNA MTT Proliferationsassay

Der siRNA MTT Proliferationsassay wurde nach oben beschriebenen Protokoll mit PC3 Zellen durchgeführt. Aufgezeigt sind fünf biologische Replikate mit je drei technischen Replikaten, also einer Gesamtzahl von 15 Einzelwerten pro Gen und Kontrolle. Die dargestellten Messwerte zeigen die Proliferation nach 96 h. Sie wurden auf den Wert nach 48 h, abzüglich der jeweiligen Mediumabsorption normalisiert. Die entsprechenden Signifikanzen sind in Bezug auf die Kontroll-siRNA berechnet (Abbildung 23). Der Knockdown von EEF1A2 führte zu einer Absorption bei $2,37 \pm 0,25$ (MW ± STABW). Diese war nicht signifikant verändert im Vergleich mit der Negativkontrolle ($p=0,14$), deren Absorption bei $2,10 \pm 0,27$ lag. Die Werte der Negativkontrolle selbst waren im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($2,35 \pm 0,18$) ebenfalls nicht signifikant verschieden ($p=0,12$).

Der Knockdown von MPP6 ging mit einem deutlichen Wachstumsrückgang der PC3 Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle einher. Der Mittelwert der Absorption lag bei $1,66 \pm 0,24$ ($p=0,0274$).

Beim SMPDL3B-Knockdown konnte im Schnitt ein Absorptionsmaximum von $2,17 \pm 0,31$ gemessen werden. Dies war im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant verändert ($p=0,74$).

Zusammenfassend führte der Knockdown von MPP6 zur Hemmung der Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Knockdowns von EEF1A2 und SM-

PDL3B hatten im Vergleich zur Negativkontrolle keine proliferationshemmende Wirkung.

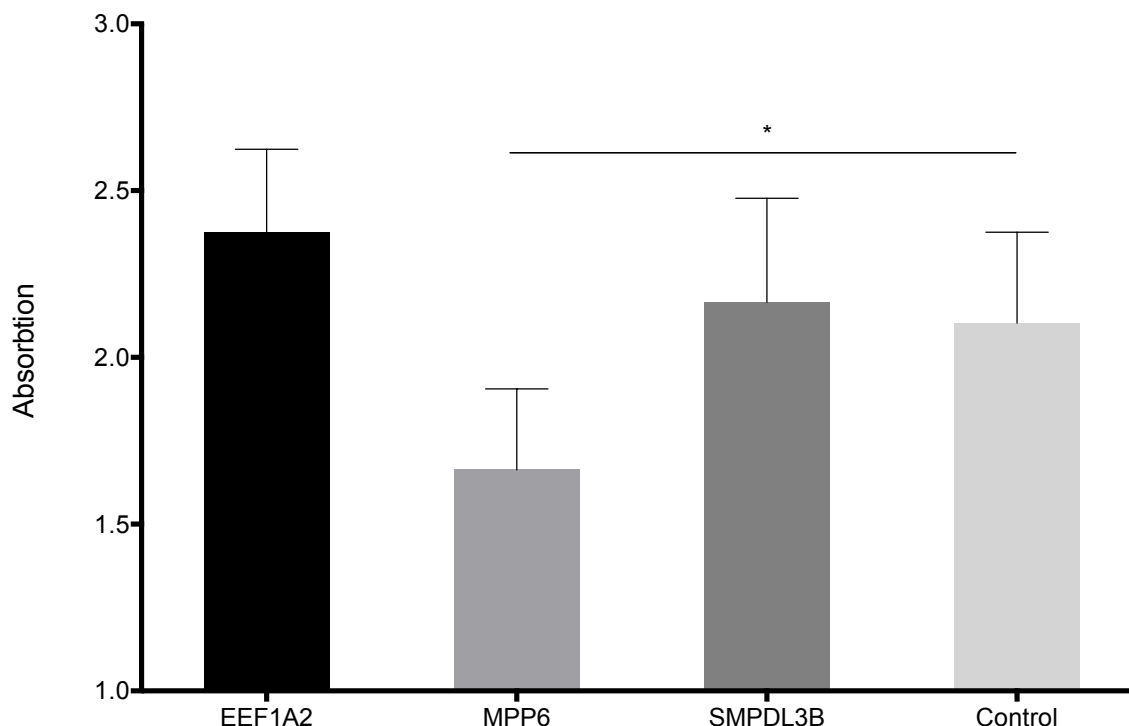


Abb.23: siRNA MTT Proliferationsassay nach 96 h Gen-Knockdown, im Vergleich zur Negativkontrolle (Control). * steht für einen p-Wert < 0,05; (n=15) (MW ± STABW).

• 3.4.3 siRNA Scratch Assay

Der siRNA *Scratch Assay* wurde nach Ausschalten der Gene EEF1A2, MPP6 und SMPDL3B in PC3 Zellen durchgeführt. Zur Vermeidung der fehleranfälligen manuellen Auswertung wurde die *tscratch* Software verwendet. Um etwaige Varianzen des manuell zugefügten Defektes auszugleichen, wurden pro Ansatz drei biologische Replikate mit je zwei technischen Replikaten pro Gen und Versuch durchgeführt. Nachfolgend sind 4 *Scratch Assays* zusammengefasst, die 24 einzelnen Datenpunkten pro Gen sowie den Zeitpunkten t_0 - t_{48} entsprechen. Für t_{72} betrug die Probenstärke n=12. Die Evaluation der Migrationsgeschwindigkeit erfolgte durch den Vergleich der freien Fläche in Prozent. Abbildung 24 zeigt die dynamische Abnahme der freien Fläche für den jeweiligen Genkandidaten nach zugeführtem Kratzer über den Beobachtungszeitraum von 72 Stunden. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Werte auf 1 entsprechend der Ausgangsgröße des Defektes bei t_0 normalisiert.

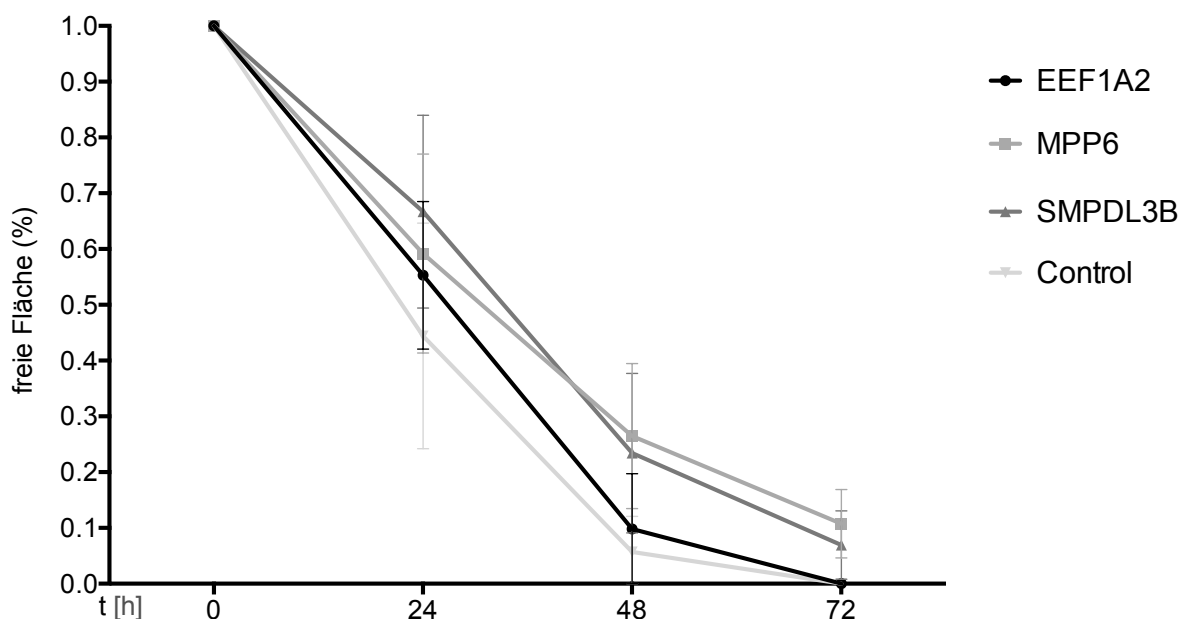


Abb.24: siRNA *Scratch Assay*. Dargestellt ist die freie Fläche des zugeführten Defektes in Prozent an den jeweiligen Messzeitpunkten (t_0 - t_{48} : $n=24$; t_{72} : $n=12$) (MW \pm STABW).

Die größten Migrationsunterschiede zeigten sich 24 h nach dem Zuführen des Zellrasendefektes. Die Ergebnisse zu diesem und den späteren Untersuchungszeitpunkten werden in den Abbildungen 25 und 26 veranschaulicht. Im Unterschied zur Abbildung 24 zeigen die hier dargestellten Balken die belegte Fläche als Mittelwerte \pm STABW in Prozent nach dem zugeführten Defekt. Die Normalisierung erfolgte parallel zu den oberen Daten zum Zeitpunkt (t_0). Als Kontrolle ist die Migrationsgeschwindigkeit der mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen dargestellt. Die entsprechende Signifikanz wurde mit * angegeben.

Für EEf1A2 zeigte sich 24 h nach dem Kratzer eine reduzierte Migration bei einem normalisierten Wert von $0,45 \pm 0,13$ (MW \pm STABW) % belegter Fläche mit signifikantem Unterschied ($p=0,0325$) im Vergleich zur Negativkontrolle ($0,56 \pm 0,20$). Nach dem MPP6-Knockdown konnte eine signifikante Reduktion der Migration ($p=0,0101$) erreicht werden ($0,41 \pm 0,18$). Weiter konnte auch ein Knockdown von SMPDL3B die Migration der PC3 Zellen 24 h nach dem Defekt deutlich erniedrigen ($p=0,0002$). Der normalisierte Wert der belegten Fläche lag hier bei $0,33 \pm 0,17$.

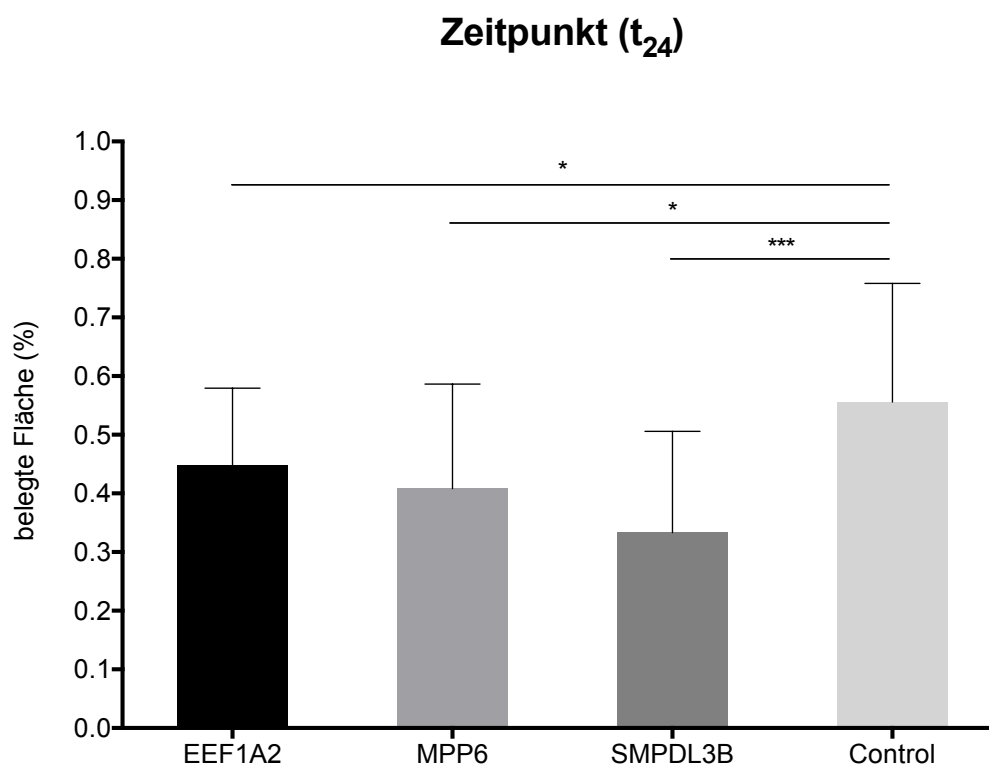


Abb.25: Belegte Fläche 24 h nach ‚scratch‘, normalisiert zur Negativkontrolle. * steht für einen p-Wert < 0,05 und *** steht für einen p-Wert < 0,001 (n=24) (MW ± STABW).

Für die Zeitpunkte (t₄₈) und (t₇₂) konnten signifikante Migrationsunterschiede ausschließlich nach Knockdown von MPP6 und SMPDL3B berechnet werden. Der Knockdown von EEf1A2 führte im Vergleich zur Kontroll-siRNA zu keinem Geschwindigkeitsunterschied in der Fortbewegung der PC3 Zellen. Die Mittelwerte ± STABW der belegten Fläche für alle Zeitpunkte sind in Tabelle 13 aufgeführt. Die p-Werte wurden im Vergleich zur Kontroll-siRNA ermittelt.

Tab. 13 Belegte Fläche nach ‚scratch‘ in Prozent

	EEf1A2	p-Wert	MPP6	p-Wert	SMPDL3B	p-Wert	Control
t ₂₄	0,45 ± 0,13*	0,032	0,41 ± 0,18*	0,010	0,33 ± 0,17***	0,0002	0,56 ± 0,20
t ₄₈	0,91 ± 0,10	0,092	0,74 ± 0,13****	<0,0001	0,77 ± 0,14****	<0,0001	0,94 ± 0,06
t ₇₂	1 ± 0,00	>0,999	0,89 ± 0,06****	<0,0001	0,81 ± 0,06***	0,0007	1 ± 0,00

Ein * markiert einen signifikanten Unterschied zur Kontroll-siRNA. (MW ± STABW) * steht für einen p-Wert < 0,05, *** steht für einen p-Wert < 0,001 und **** steht für einen p-Wert < 0,0001

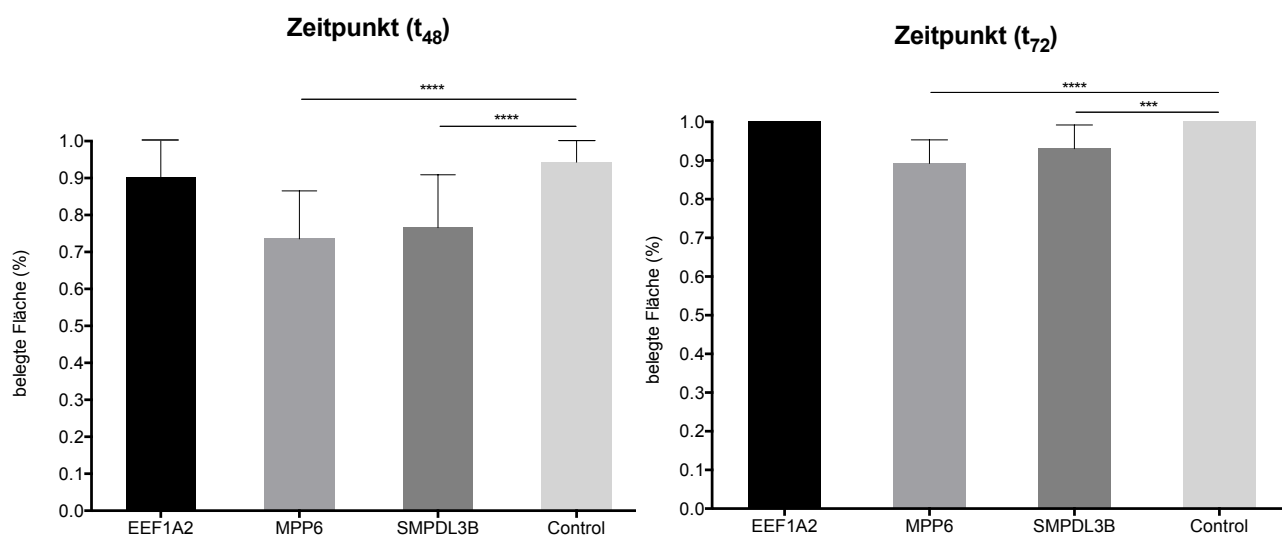


Abb.26: Belegte Fläche 48 h und 72 h nach ‚scratch‘, normalisiert zur Negativkontrolle. *** steht für einen p-Wert <0,001 und **** steht für einen p-Wert < 0,0001. (t₄₈: n=24; t₇₂: n=12) (MW ± STABW)

• 4. Diskussion

• 4.1 Intention der Arbeit

Die weltweit überragende Relevanz des PCa in der Beeinträchtigung der männlichen Gesundheit ist unbestritten. Speziell in Populationen mit einer hohen Lebenserwartung nimmt die Prävalenz des PCa zu. Als Lebenszeit limitierender Faktor spielt das PCa selbst nur eine Nebenrolle. Erkrankte Patienten versterben an den Karzinommetastasen bzw. nachfolgenden Funktionsausfällen in befallenen Organen. In der Ausbreitungskaskade der Metastasen scheinen Exosome wichtige Teilarbeit zu leisten. Von Tumorzellen vermehrt ausgestoßen, sind sie in allen Körperflüssigkeiten nachzuweisen, enthalten Bestandteile (u.a. mRNA, miRNA, DNA) der jeweiligen Ursprungszelle und sind in der Lage diese in einer Zielzelle zu entladen und somit beispielsweise ihre Proteinproduktion zu beeinflussen. So scheinen Exosome sowohl die Vorbereitung der prämetastatischen Nischen als auch die Absiedlung der eigentlichen Metastasen mitzusteuern und bieten somit interessante Ziele möglicher neuer Therapiestrategien.

Außerdem sind die bisher vorhandenen Parameter für Screening und Diagnostik des PCa störanfällig und nicht spezifisch genug, um den wachsenden Anforderungen im Hinblick auf die individuelle Risikoabschätzung und Therapieplanung gerecht zu werden. Insbesondere die Identifikation therapiebedürftiger Erkrankungen und die Vermeidung von Übertherapien sind zentrale Gegenstände der aktuellen klinischen und wissenschaftlichen Debatte. Vieles deutet darauf hin, dass die kombinierte Betrachtung mehrerer Parameter die genaueste Abschätzung des weiteren Verlaufs und der Therapiebedürftigkeit im Einzelfall ermöglicht. Auch hierbei scheinen Exosome großes Potential zu besitzen^[65]. Ihr möglicher Einsatz als Screening- oder Verlaufsparmter wird verheißungsvoll diskutiert.

Zuvor gilt es jedoch die Funktion der Exosomen besser zu verstehen, ihren jeweiligen Inhalt zu charakterisieren und einzelne Komponenten genauer zu untersuchen^[29].

In Vorarbeiten unserer Forschungsgruppe konnten mehrere Gene (EEF1A2, FABP5, GNAI1, MPP6 und SMPDL3B) identifiziert werden, deren zugehörige Proteine *in vitro* in PCa-Exosomen exprimiert sind. Zu zwei dieser Gene (EEF1A2, FABP5) sind erste Untersuchungen im PCa sowohl auf Gewebeebene als auch *in vitro* vorbeschrieben^[33, 34]. Für GNAI1, MPP6 und SMPDL3B existieren hierzu bis dato keine Daten. In dieser Arbeit sollte die Genexpression in Prostatkarzinomproben und die Rolle der Kandidatengene *in vitro* für Proliferation und Migration untersucht werden.

• 4.2 Expression der Gene

Die Genexpressionsanalysen wurden nach T-Stadium oder Gleason-Score aufgeteilt.

Das T-Stadium der TNM-Klassifikation ist in verschiedene Stufen und Unterstufen von 1a bis 4 gegliedert und beschreibt die Ausdehnung, genauer den Befall und die Eindringtiefe des Primärtumors in der Prostata. Die Unterscheidung zwischen Stadium T2 und T3 ist deshalb relevant, weil hier die Trennung zwischen lokal begrenzten, nur auf die Prostata beschränkten Tumoren (T1/T2) und lokal fortgeschrittenen, die Prostatakapsel überschreitenden Karzinomen (T3/T4) gezogen wird. So gehen die Karzinome der T-Stadien 3 und 4 mit einem höheren Risiko für ein Lokalrezidiv oder die Metastasierung einher^[2].

Der Gleason-Score basiert auf der skalierten Beschreibung der histologischen Architektur des PCa-Gewebes. Er wird gegenwärtig aus häufigstem und zweithäufigstem vorkommenden Entdifferenzierungsgrad des Karzinomgewebes gebildet^[66]. Aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit und Gefahr der Unterschätzung der Tumorbiologie werden die Gleason-Grade 1 und 2 kaum noch vergeben. So ist der niedrigste, dokumentierte Gleason-Grad heutzutage überwiegend Gleason 6 (3 + 3)^[66]. Nach *Pierorazio et al.* wurden die Proben in verschiedene prognostische Gruppen eingeordnet^[67]. Die erste Gruppe bildeten die Gleason-Werte 5 und 6, die zweite Gleason 7a (3 + 4). Die dritte Gruppe wurde aus Gleason 7b (4 + 3) Proben erstellt. Eine Aufteilung der Gleason 7 Gruppe in ein Stadium 7a und 7b ist deshalb entscheidend, weil gezeigt werden konnte, dass das rezidivfreie Überleben 5 Jahre nach RPE zwischen diesen Gruppen um 25 % von 88 % (7a) auf 63 % (7b) absinkt^[66]. Eine letzte Gruppe wurde mit Gleason-Stadium 8 und 9 Proben gebildet. Die von *Pierorazio et al.* empfohlene Unterscheidung zwischen Gleason 8 und Gleason 9/10 konnte bei zu geringer Probenstärke nicht erfolgen.

Die, auf *in silico* Vorarbeiten beruhenden Genexpressionsmuster wurden mittels qRT-PCR-Genanalysen der *TissueScan* Kohorte validiert. So konnten erste spezifische Expressionsdaten von GNAI1, MPP6 und SMPDL3B in Prostatakarzinomproben generiert werden. Zudem erlaubte die Untersuchung der Gene EEF1A2 und FABP5 die Überprüfung vorbeschriebener Befunde sowie das Einordnen der Ergebnisse in den Kontext der bestehenden Literatur.

Die in der Literatur beschriebene Überexpression der Gene EEF1A2 und FABP5 beim PCa wurde bestätigt^[32, 34]. Diese zeigte sich sowohl beim Vergleich der Tumorproben zu den Normalkontrollen als auch bei der differenzierten Aufteilung der Tumorproben nach histopathologischen Parametern. Weiterhin wurde eine signifikant höhere Expression von MPP6 und SMPDL3B im Tumorgewebe

nachgewiesen. Eine signifikant höhere GNAI1 Expression in PCa-Gewebe zeigte sich nach Subgruppenanalysen.

Die Genexpression von EEF1A2 korrelierte mit dem T-Stadium. So fanden sich sowohl signifikante Unterschiede zwischen dem Normal- und dem Karzinomgewebe als auch zwischen dem T2 und dem T3 Stadium. Dies spiegelte sich auch in der Aufteilung nach Gleason wider. So wurde die EEF1A2 Genexpression in jeder Gleason Gruppe signifikant höher gemessen als in den Normalkontrollen. Unterschiede zwischen den einzelnen Gleason Gruppen zeigten sich nicht. Tendenziell scheint die EEF1A2-Expression in fortgeschritteneren Gleason-Stadien ausgeprägter.

Die Rolle von EEF1A2 als Onkogen wurde in verschiedenen Tumorentitäten, wie dem MammaCa, LungenCa oder OvarialCa, nachgewiesen^[68]. Auch beim PCa wurde das Tumormarkerpotential von EEF1A2 bereits diskutiert^[33]. Bekannt ist, dass EEF1A2 über die PI3K/AKT/mTOR-Achse zur Stabilisierung und vermindertem Abbau von MDM4 führt. Das MDM4 wiederum bindet an p53 und hemmt die p53 abhängigen Translationen^[69]. So werden die tumorsuppressiven und immunmodulatorischen Qualitäten des p53 gehemmt^[70], was zu einer verstärkten Karzinomneubildung führt.

Die Expression von FABP5 war in den untersuchten T-Stadien signifikant höher gegenüber dem Normalgewebe. Innerhalb der T-Stadien wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen. Allerdings zeigte sich die Expression im Stadium T3 tendenziell niedriger als jene im Stadium T2. Die Einteilung nach Gleason Score zeigte eine signifikant erhöhte Expression von FABP5 in den Gleason Gruppen 5/6 sowie 7b im Vergleich zum Normalgewebe. Zudem wurden signifikante FABP5-Genexpressionsunterschiede zwischen den Gleason-Gruppen 7a und 7b gemessen. So waren die Expressionsdaten in der 7b Gruppe höher. Die, in den fortgeschrittenen Gleason Stadien 8/9 tendenziell niedrigere FABP5 Genexpression, korreliert mit den Daten der T-Stadium Einteilung.

Die wichtige Rolle des FABP5 in der Entstehung des PCa wurde bereits mehrfach beschrieben^[34, 71, 72]. In einer rezenten Arbeit konnte zudem nachgewiesen werden, dass FABP5 über eine Aktivierung von PPAR γ zur Hochregulierung von VEGF führt. VEGF selbst spielt eine entscheidende Rolle bei der Neoangiogenese im Rahmen der Tumorprogression und kann auch aufgrund autokriner Mechanismen direkt zu einer erhöhten Malignität der PCa Zellen beitragen^[73].

Interessanterweise ist der FABP5-PPAR γ -VEGF Signalweg beim kastrationsresistenten PCa bedeutender als beim androgenabhängigen PCa^[74]. Eine mögliche Erklärung könnte der Verlust der Androgenrezeptoren bei zunehmender Dedifferenzierung und die damit verbundene Umstellung des Zellstoffwechsels von der Glykolyse auf die Lipolyse liefern. Die Zellen der späten PCa-Stadien würden ausschließlich den FABP5-PPAR γ -VEGF Signalweg zur Angiogenese benutzen^[74]. FABP5 könnte also einerseits als Marker zur Einschätzung der Malignität des

PCa, andererseits als Therapieansatzpunkt im kastrationsrefraktären Stadium verwendet werden. Allerdings besteht hier ein Paradoxon zu der von uns gemessenen tendenziell niedrigeren Expression in den höheren Tumorstadien. Hierzu konnte eine Arbeitsgruppe feststellen, dass Unterschiede zwischen der zytoplasmatischen und nukleären Expression von FABP5 bestehen. Während die Höhe der zytoplasmatischen FABP5 Expression mit erhöhter Gleason Gruppe und einem schlechteren Patientenüberleben einhergeht, besteht dieser Zusammenhang bei der nukleären FABP5 Expression nicht^[71]. Dies könnte als Erklärung für die von uns bei T3 und Gleason 8/9 Tumoren gemessenen unveränderten FABP5 Expressionsspiegel dienen.

Bei der GNAI1 Genexpression konnte sowohl in der Gleason Gruppe 7a als auch bei Patienten über 65 Jahren eine Überexpression in PCa-Proben im Vergleich zur Normalkontrolle festgestellt werden. Nach aktuellem Wissensstand ist dies die erste Kohorte, bei der ein Zusammenhang zwischen der GNAI1 Genexpression und dem Auftreten von PCa dokumentiert werden konnte. Interessanterweise zeigte sich zudem beim Vergleich der Gleason-Gruppen untereinander eine signifikante Differenz zwischen der Gleason-Gruppe 7a und 7b. Anders als erwartet war die Expression von GNAI1 in der Gruppe der 7b-Tumore signifikant zu den 7a-Tumoren erniedrigt. Unsere Ergebnisse dokumentieren somit eine Gleason-Stadium- sowie altersabhängige Genexpression von GNAI1 in PCa-Proben und stärken gleichzeitig die Ergebnisse einer Studie im HCC in der GNAI1 eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben wird^[36].

GNAI1 wird weiterhin mit Pertussis und der Entstehung der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht^[75, 76]. Außerdem wurde sein Mitwirken bei der Plättchenaggregation, der Taxolresistenzentwicklung beim OvarialCa und der durch Wasserstoffperoxid induzierten Apoptose bei LungenCa beschrieben^[36].

Vor der Subgruppenanalyse dokumentierten die Daten eine generelle MPP6 Überexpression in Tumorgewebe. Die T-Stadium-Unterteilung zeigte eine signifikante MPP6 Genüberexpression im Vergleich zum Normalgewebe ab dem T3-Stadium. Die MPP6 Genexpression der Gleason Gruppen 7b und 8/9 war signifikant erhöht im Vergleich zum Normalgewebe. Zudem zeigte sich eine signifikant höhere MPP6 Genexpression in der Gleason Gruppe 7b im Vergleich zu den Gruppen 5/6 und 7a. Nach unserem Wissen ist dies die erste PCa-Kohorte, in der die MPP6-Genexpression untersucht wurde.

Das Gen MPP6 und sein zugehöriges Protein sind bislang wenig beschrieben oder charakterisiert. Eine Arbeitsgruppe konnte MPP6 zusammen mit den Proteinen 4.1G und CADM4 als Teil eines dreiteiligen, adhäsiven Zellproteinkomplexes identifizieren. Dieser wurde in Schmidt-Lantermann-Einkerbungen der Myelinscheiden und dem Darmepithel von Mäusen gefunden und scheint wichtig bei der Ausbildung der *tight junctions* zu sein^[77]. Interessanterweise konnte CADM4 in diversen Studien bei verschiedenen Karzinomtypen (u.a. KolonCa, MammaCA) als

Tumorsuppressor identifiziert werden; seine erniedrigte Expression ging einher mit einer schlechteren Prognose^[78, 79]. Weiterhin wurde MPP6 in *Tubuli seminiferi* (Hodenkanälchen) von Mäusen als alleinstehendes Membranprotein nachgewiesen^[40]. Seine Struktur in Prostatazellen gilt es noch zu determinieren. Vor dem Hintergrund der tumorsuppressiven Funktion von CADM4 und dem erhöhten MPP6 Vorkommen in aggressiveren Tumorstadien beim PCa könnte das MPP6 in der Prostata, analog zum Vorkommen in den Hodenkanälchen solitär oder aber in einem anderen Membranproteinkomplex vorkommen.

Ähnlich wie bei MPP6 ist auch über SMPDL3B wenig bekannt. Seine Genexpression wurde bisher nicht in Karzinomproben untersucht. In der vorliegenden Kohorte korreliert die Höhe der SMPDL3B Genexpression mit der Höhe des T-Stadiums. So war die Expression von SMPDL3B sowohl in T2, als auch in T3 Tumoren, verglichen mit Normalgewebe, signifikant erhöht. Zudem zeigten Tumoren im niedrigeren Stadium T2 eine signifikant geringere SMPDL3B Genexpression im Vergleich zu T3 Tumoren. Nach der Aufteilung der Patientenproben in die verschiedenen Gleason Gruppen war die SMPDL3B Genexpression aller Gruppen signifikant höher verglichen mit dem Normalgewebe. Zudem wurden hier bei der statistischen Auswertung die stärksten Signifikanzen berechnet. Beachtlicherweise unterschieden sich die Genexpressionsstufen innerhalb der verschiedenen Gleason Gruppen nicht. So scheint die SMPDL3B Genexpression beim PCa mit der Tumorausbreitung zu korrelieren, sich jedoch bei den verschiedenen Entdifferenzierungsgraden des PCa nicht zu unterscheiden.

Ein Mitwirken von SMPDL3B in der Karzinomentwicklung ist bislang nicht beschrieben. Eine geringe SMPDL3B Genexpression führt zum Remodeling des Zytoskeletts von Podozyten und erhöht ihre Verletzungsanfälligkeit, umgekehrt führt eine SMPDL3B Überexpression zu einem stabileren Podozyten-Zytoskelett^[80]. So könnte eine erhöhte SMPDL3B Expression generell zu einem robusteren Zytoskelett führen und damit auch die Widerstandsfähigkeit von Tumorzellen erhöhen.

Außerdem wurde festgestellt, dass die Expression von SMPDL3B durch entzündliche Stimuli hochreguliert wird und die TLR (toll-like-receptor)-vermittelte Immunantwort hemmt^[81]. Die TLR-vermittelte Immunantwort selbst ist bei der PCa Entstehung je nach Rezeptortyp sowohl karzinomfördernd als auch -hemmend^[82]. Aufgrund der zu den T-Stadien korrelierenden signifikanten Überexpression von SMPDL3B in PCa Zellen wäre davon auszugehen, dass SMPDL3B die karzinomhemmenden TLR (beim PCa u.a. TLR 3,4,5,7) negativ reguliert. Diesen möglichen Zusammenhang gilt es jedoch in späteren Arbeiten noch zu belegen.

Wie oben beschrieben charakterisiert der Übergang vom Stadium T2 auf T3 ein Überschreiten der Prostatakapsel durch den Tumor als wichtigen Schritt beim Vorschreiten des PCa. Die signifikanten Unterschiede zwischen ebendiesen Stadien bei der Genexpression von EEF1A2 sowie SMPDL3B zeugen also nicht nur

vom Tumormarkerpotential der beiden Gene, sondern bergen durch die Korrelation der Expressionsstärke mit der aggressiveren Tumorbilogie, das Potential eines Prognoseparameters. Ebenso Potential als Tumormarker und Prognoseparameter hat auch MPP6 durch seine signifikante Expressionserhöhung in T3 Tumoren ohne signifikanten Unterschied zwischen Normalgewebe und Stadium T2. Zudem konnte nach der Aufteilung in die Gleason Gruppen eine signifikante Überexpression von MPP6 in den höheren Gleason Stadien 7b und 8/9 im Vergleich zum Normalgewebe sowie Gleason Gruppen 5/6 und 7a berechnet werden.

Den offensichtlichen Vorteilen der Verwendung der TissueScan Kohorte, wie die schnelle Verfügbarkeit, die Zeitersparnis gegenüber der Zusammenstellung eines eigenen Patientenkollektivs, oder die exzellente Reproduzierbarkeit der Daten, stehen einige limitierenden Faktoren entgegen. So wurden die Patienten in den USA rekrutiert. Eingedenk regionaler Unterschiede besteht somit nur eine beschränkte Übertragbarkeit auf die europäische oder deutsche Situation. Zudem handelt es sich mit einem Altersmedian von 62 Jahren um ein eher jüngeres Patientenkollektiv. Zum Vergleich lag die Altersverteilung aller Patienten die im Jahr 2015 an unserer Klinik eine RPE erhielten im Median bei 66,68 Jahren mit einer Standardabweichung von $\pm 7,56$. Außerdem ist die verwendete Kontrollgruppe mit einem Altersmedian von 68 Jahren deutlich älter. Altersbedingte Effekte auf die Genexpression sind somit nicht auszuschließen. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass sich früh manifestierende Tumore tendenziell eine aggressivere Tumorbilogie aufweisen^[83], ist eine mögliche Selektion von Tumoren, die unabhängig von T-Stadium und Gleason-Score ein aggressiveres Verhalten zeigen, zu diskutieren.

Weiterhin existieren keine Follow-Up Daten der Patienten, was Aussagen über mögliche Zusammenhänge von Genexpressionen und harten Outcome-Parametern wie dem tumorspezifischen Überleben unmöglich macht. Zudem ist die Kohortengröße mit ihren 40 Tumorproben zwar ausreichend, um erste Erkenntnisse über die Genexpressionen der Zielgene zu sammeln, doch sind weitere Untersuchungen an größeren, ethnisch repräsentativen Kohorten mit klinischen Follow-Up Daten unabdinglich, um den Wert der fünf hier beschriebenen Zielgene genauer beurteilen zu können.

Der alleinige Nachweis der Überexpression der Zielgene in Tumorgewebe erlaubt keine Aussage über deren Funktionalität, weshalb eine genauere Charakterisierung derselben in unterschiedlichen Assays erforderlich war. Besonders bedeutend bezüglich des Tumorfortschreitens und der Metastasierung sind die Prozesse der Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen^[25]. Ob und wie stark die Produkte der Gene in diese Vorgänge involviert sind, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

• 4.3 Charakterisierung der Gene

Angesichts der Expressionsdaten entschieden wir uns dazu, die *in vitro* Validierung auf EEF1A2, MPP6 und SMPDL3B zu fokussieren. Das Gen GNAI1 wurde aufgrund seiner gleichmäßigen Expression in den T-Stadien von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für FABP5 lagen zum Zeitpunkt der Planung der Experimente bereits publizierte *in vitro* Daten vor.

Zur Objektivierung der invasiven Fähigkeiten der Zelllinien und im Hinblick auf eine spätere Anwendung im Rahmen der Exosomenforschung wurde der von unserer Forschungsgruppe für das Urothelkarzinom etablierte^[62] MDCK-C7 Invasionsassay erstmalig beim Prostatakarzinom verwendet. Trotz der großen Relevanz der Metastasierung und ihren vorgeschalteten invasiven Prozessen ist eine exakte Reproduktion ihrer integralen Komplexität in *in vitro* Modellen bisher nicht möglich. So können nur isolierte Invasionsprozesse unabhängig voneinander nachgestellt, analysiert und modifiziert werden. Durch sein spezielles Design ist der MDCK-C7 Invasionsassay hervorragend zur Untersuchung von mediatorvermittelten Prozessen der *early invasion*, die mit einer Auflösung des epithelialen Zellverbundes einhergehen, geeignet. Die Insertmembran sorgt mit ihren 0,4 µm messenden Poren für eine Trennung von Karzinomzellen und dem als Barrieremodell dienenden dichten, einschichtigen Epithelverbund, indem sie das Durchdringen ganzer Zellen verhindert und die Einflüsse auf die TEER-Messung alleine auf frei diffundierende sekretorische Faktoren limitiert. Diese destabilisieren physiologische Barrieren wie die Basalmembran und begünstigen so die Migration maligner Zellen in der invasiven Spätphase^[84]. Die Integrität des Epithelverbundes wird anhand der Entwicklung der TEER abgeleitet, welche sich exponentiell aufbaut und bei einer Zerstörung des Zellverbundes einbricht. Die epithelialen *tight junctions* haben durch das Abdichten der Interzellularräume den stärksten Effekt auf den elektrischen Widerstand. Als Diffusionsbarriere beeinflussen diese die Epithelpermeabilität und auf physikalischer Ebene die parazelluläre Leitfähigkeit. Entsprechend sind Epithelverbände mit starken *tight junctions* in der Lage hohe, transepitheliale Widerstände zu erzeugen, welche als Indikator einer intakten Zellintegrität benutzt werden können^[56].

Die Effekte direkt proteolytischer Faktoren oder von Molekülen/Partikeln, die über eine Modulation der Epithelzellen einen Einfluss auf die Stärke der *tight junctions* haben, können also beim MDCK-C7 Invasionsassay gezielt untersucht werden. Durch Modifikationen der zu untersuchenden Zellen sollte so auch die Untersuchung der Effekte, die eine Änderung der Expression bestimmter Gene nach sich zieht, möglich sein.

Ähnliche Verfahren, die ebenfalls auf einem elektrophysiologischen Funktionsprinzip beruhen, wie beispielsweise das auf einer Impedanzmessung aufbauende xCELLigence- System^[85], ermöglichen keine strikte Trennung der Tumor- und Epithelzellen. Diese lassen somit keine Abgrenzung zwischen invasiven Effekten

durch direkten Zell-Zell-Kontakt und solchen durch sekretorische Faktoren zu. Eine andere Technik zur Objektivierung von Invasion ist die seit Jahrzehnten verwendete Boyden-Kammer, bei der die Karzinomzellen direkt eine basalmembranähnliche Schicht zerstören müssen, um durch ein Polycarbonatgeflecht zu migrieren. Die Zellen werden anschließend in einer Kammer ausgezählt, um über deren Summe pro Zeit Rückschlüsse auf deren Invasivität zu ziehen^[86]. Allerdings bewirkt der direkte Kontakt zu dem, der extrazellulären Matrix ähnlichen Geflecht selbst, die Ausbildung von u.a. proliferations-, migrations- und tumorigenese-fördernden Adhäsionsmolekülen sowie die Rekrutierung von Proteasen, was die detaillierte alleinige Untersuchung von sezernierten Invasionsfaktoren unmöglich macht^[87].

Die beim MDCK-C7 Invasionsassay in der Kokultivierung verwendeten Zelllinien DU145, PC3 und PNT1A zeigten ein unterschiedliches Invasionsverhalten. So brach der transepitheliale elektrische Widerstand der MDCK-C7 Zellen nach 48 h Kokultivierung mit den malignen PC3 Zellen ein und verringerte sich kontinuierlich bis zum Messzeitpunkt 72 h. Im Gegensatz hierzu verliefen die gemessenen TEER-Werte der PCa Zelllinie DU145 und der BPH Zelllinie PNT1A analog zur Negativkontrolle. Somit zeigte sich ein signifikant höherer Invasionskoeffizient der PC3 Zellen. Weiterhin konnte durch TGF β ein Einbruch des Widerstandes schon nach 24 h mit einer nachfolgend niedrig-stabilen TEER bei einem Drittel der Werte der Negativkontrolle beobachtet werden. Beide Versuche bestätigen die prinzipielle Funktionalität des MDCK-C7 Invasionsassays. Beim Prostatakarzinom könnte er so ergänzend zu etablierten Verfahren von Nutzen sein. Insbesondere für die in nachfolgenden Projekten geplanten Untersuchungen der direkten Wirkungen von Exosomen auf den transepithelialen Widerstand erscheint er wertvoll. Nichtsdestotrotz sind weitere Modifizierungen und Anpassungen des MDCK-C7 Assays durchzuführen, um gezielt den Effekt bestimmter sekretorischer Komponente erfassen zu können und begleitende oder verstärkende Nebeneffekte zu reduzieren. Schwachpunkte des etablierten MDCK-C7 Invasionsassays sind der hohe Zeit- und Materialaufwand, die begrenzte Zahl der Messzeitpunkte sowie die noch nicht bis ins Detail verstandenen Prozesse im Epithelzellverband während des Aufbaus der TEER. Dass die TEER u.a. temperatur- sowie mediumabhängig und bei höheren Zellpassagen weniger valide ist, ist bekannt^[88], sodass mit Beginn der Experimente darauf geachtet wurde, derartige Störfaktoren zu minimieren. Dennoch zeigten sich immer wieder unerklärliche und unvorhersehbare Schwankungen der Messwerte. Dies und die zunehmende Komplexität des Assays bei Erweiterung und Modifikationen wie beispielsweise die siRNA Interferenz, ließen uns das Verfahren nach der Etablierungsphase als ungeeignet für die weitere Validierung unserer Kandidaten erscheinen. Dennoch bieten die hierzu geleisteten Arbeiten wertvolle Ansatzpunkte für die weitere wissenschaftliche Arbeit in unserem Labor. Insbesondere mit Hinblick auf die Charakterisierung einzelner Zelllinien und

die direkte Untersuchung der Einflüsse von Exosomen verschiedener prostaticher Tumorentitäten auf die Integrität einer Epithelbarriere.

Um die Auswirkungen der Zielgene (EEF1A2, MPP6 u. SMPDL3B) auf Proliferation und Migration von Prostatakarzinomzellen zu untersuchen, führten wir unter Manipulation mit siRNA-Interferenz zwei weitere Versuche durch. Mittels MTT-Assays wurde ihr Einfluss auf das Wachstumsverhalten von PCa-Zellen durch Absorptionsmessung erfasst.

Bei dem in unserem Labor erstmals verwendeten und somit neu etablierten *Scratch Assay* wurde nach Ablauf der siRNA Transfektion in standardisierter Weise ein Defekt definierter Größe in den Zellrasen eingebracht und photographisch verlaufsdokumentiert. Die Migration der Zellen in diesen Defekt wurde mithilfe einer Software^[64] ausgewertet. Als Zellmodell diente die PC3 Zelllinie. Sie wurde aufgrund ihres im MDCK-C7 Invasionsassay dokumentierten invasiven Verhaltens und des im Vergleich zur DU145 Zelllinie größeren metastatischen Potentials ausgewählt^[51].

Im MTT Proliferationsassay zeigte sich verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ein signifikanter Effekt der Kontroll-siRNA auf die PC3 Zellen (ca. 24%, $p=0,0002$). Ein toxischer Effekt für das Transfektionsreagenz konnte nicht nachgewiesen werden.

Trotz dieser Einschränkung bei der Auswertung konnte ein ausgeprägter Effekt auf die Proliferation von PC3 Zellen nach Knockdown von MPP6 gezeigt werden. Verglichen mit der Negativkontrolle zeigte sich kein signifikanter Einfluss von SMPDL3B und EEF1A2 auf die Proliferation. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle findet sich für alle drei Gene eine Reduktion der Proliferation. Für EEF1A2 ist ein entscheidender Einfluss auf die Proliferation und Apoptoseinhibition von Prostatakarzinomzellen beschrieben^[32]. MPP6 ist bezüglich seiner direkten Auswirkung auf die Proliferation ebenso wenig charakterisiert wie SMPDL3B. Allerdings konnte CADM4 aus dem MPP6-4.1G-CADM4 Komplex proliferationsfördernde Effekte über den VEGF Rezeptor zugeschrieben werden^[89]. SMPDL3B konnte als Regulator der suPAR induzierten Aktivierung des $\alpha\beta_3$ Integrin-Signalweges in Podozyten identifiziert werden^[80]. Der $\alpha\beta_3$ Integrin-Signalweg ist gut charakterisiert und führt zur Auslösung diverser proliferationsfördernden Kaskaden^[90].

Im *Scratch Assay* zeigte sich kein negativer Effekt auf die Migration durch die Kontroll-siRNA, was sich in einer nur geringfügig zu den unbehandelten Zellen veränderten Migrationsgeschwindigkeit widerspiegelt.

Die auf den Zeitpunkt t_0 normalisierten Daten des *Scratch Assays* zeigten nach dem Knockdown von EEF1A2, MPP6 und SMPDL3B signifikante Hemmungen der Migrationsgeschwindigkeit der PC3 Zellen im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Hierbei ergaben sich Unterschiede je nach analysiertem Zeitpunkt. 24 Stunden nach zugeführtem Zellrasendefekt wurde bei den Zellen mit SMPDL3B Knockdown die stärkste Migrationsbeeinträchtigung gemessen. Wie oben beschrieben, aktiviert

SMPDL3B den $\alpha\beta_3$ Integrin-Signalweg. Dieser wurde kürzlich als wichtiger Baustein bei Migration, Adhäsion und Invasion der Zellen während der Metastasierung des PCa identifiziert^[90, 91]. Zu den Zeitpunkten t_{48} und t_{72} wurden ebenfalls signifikant hemmende Einflüsse auf die Migrationsgeschwindigkeit nach SMPDL3B Knockdown im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

Zum Zeitpunkt t_{48} zeigten die Zellen mit MPP6 Knockdown die stärksten signifikanten Effekte auf die Migration. Gleichwohl wurden zu allen Zeitpunkten eine signifikant langsamere Zellmigration nach MPP6 Knockdown im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Einem verwandten Bestandteil des MPP6-4.1G-CADM4 Komplexes, nämlich dem Protein 4.1 B, konnte als Teil der FERM-Domäne migrationsfördernde Effekte im Rahmen der Wundheilung und Metastasierung nachgewiesen werden. Der FERM-Komplex kann in etlichen Proteinen nachgewiesen werden und spielt bei der Befestigung von Membranproteinen eine bedeutende Rolle. Nach dem Ausschalten von 4.1 B wurde eine kompensatorisch erhöhte 4.1 G Expression beobachtet^[92]. Diese frühe Migrationsfähigkeit soll zudem Integrin-vermittelt ablaufen^[93]. Im PCa wurde bislang einzig die Rolle von 4.1 B untersucht und ein inverser Zusammenhang zur tumorigenen ERG Überexpression festgestellt^[94]. Außerdem scheint das CADM4 Einfluss auf die Migration von Zellen zu nehmen^[89].

Eine signifikante Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit konnte bei den PC3 Zellen nach EEF1A2 Knockdown für den Zeitpunkt t_{24} festgestellt werden. Bei den späteren Zeitpunkten migrierten die Zellen in einer vergleichbaren Geschwindigkeit zur Kontrolle. Das Protein EEF1A2 führt zur Stimulation von Akt abhängigen Signalwegen und somit zu einer verstärkten Zellmigration^[95]. Dieser Effekt war in unseren Versuchen jedoch weniger stark ausgeprägt als die Einflüsse von MPP6 und SMPDL3B auf die Migration.

Zusammenfassend konnten wir die signifikante Hemmung von Proliferation und Migration durch die Ausschaltung von MPP6 nachweisen. Das Gen MPP6 und sein Proteinprodukt scheinen also entscheidenden Einfluss auf diese biologischen Zellprozesse zu nehmen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von EEF1A2 und SMPDL3B einen Einfluss auf die Migration von PCa Zellen hat, denn nach deren Ausschalten verringerte sich die Migrationsgeschwindigkeit der PCa Zellen signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle.

Eines der Hauptprobleme beim Einsatz der RNA Interferenz ist die Unfähigkeit der siRNA passiv durch die zelluläre Membran zu diffundieren^[96]. Ihr hohes Molekulargewicht und die starke negative Ladung der Nukleinsäure verhindern hierbei das Durchdringen der mit Polyglykanen und anderen Modifikatoren bestückten Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Vektoren entwickelt, die den Transport der siRNA in das Zytosol ermöglichen sollen. Einen Vektor stellen die kationischen Lipide dar, zu denen auch das von uns verwendete Transfektionsreagenz *DharmafectTM* zählt^[97]. Sie bilden zusammen mit der siRNA sogenannte Lipokomplexe, welche sich an die Zellmembran

anlagern können, per Endozytose in das Zytosol geschleust werden und die siRNA freisetzen. Allerdings interferieren diese Transfektionsreagenzien auch mit dem Zellzyklus und unterscheiden sich in Ihrer Toxizität und Effizienz. Wenngleich vom Hersteller Dharmacon (Lafayette, USA) als gering angegeben, wurde die von Dharmafect verursachte Zelltoxizität in einer Arbeit als bedeutend eingestuft^[98]. Zudem sind die genauen Vorgänge der siRNA Einschleusung sowie deren exakte Wirkungsweise nicht vollständig verstanden^[99], weshalb Wechselwirkungen der Transfektionsreagenzien mit beispielsweise der siRNA verschiedener Hersteller Probleme bereiten können. Vor diesem Hintergrund wurde die Inkubation mit dem Transfektionsreagenz zeitlich begrenzt. Um negative, zellintegritätsschädigende Effekte zu erfassen, wurden neben unbehandelten und den mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen, auch solche untersucht die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden.

Weiterhin ist auch eine Beeinflussung der Zellen durch die Behandlung mit siRNA allgemein, unabhängig davon, ob sie zu einem Gen-Knockdown führen oder nicht, möglich. In den hier durchgeführten Proliferationsversuchen deutete sich ein unspezifischer negativer Effekt der Kontroll-siRNA auf das Zellwachstum an. Hierdurch ist schwieriger zu differenzieren, ob die detektierten Veränderungen bei der Behandlung mit den Target-siRNAs auf einen allgemeinen Effekt bei der Transfektion oder einen spezifischen Gen-Knockdown verursacht sind. Somit wird die Sensitivität der Untersuchungsmethode für tatsächliche Unterschiede geringer.

Letztlich sind nicht alle Auswirkungen der siRNA Transfektion auf die Zielzellen erfassbar und hinterlassen somit immer eine gewisse Unschärfe der Ergebnisse.

Der MTT Proliferationsassay stellt nur eine von vielen Methoden zur Erfassung des Zellwachstums dar. Aufgrund seiner einfachen Handhabung und der damit einhergehenden weiten Verbreitung gilt er jedoch gemeinhin als Goldstandard. Seit seiner Entwicklung in den 1980er Jahren führten einzelne Modifikationen zu einer noch einfacheren und direkten Anwendung^[59]. Eine Vergleichsstudie kommt zum Ergebnis, dass der MTT Assay gegenüber anderen Testverfahren eine recht hohe Ungenauigkeit aufweist. Zudem wurden Interferenzen des MTT mit bestimmten Substanzen, die zur Modifikation von Zellkulturbedingungen eingesetzt werden, beschrieben^[59]. Zwar wurde in der vorliegenden Studie versucht durch die Anzahl der Replikate diese Fehlerrate zu minimisieren, allerdings schließt dies nicht mögliche Wechselwirkungen zwischen dem MTT und den transfizierten Zellen aus.

Der *Scratch Assay* bietet prinzipiell die Möglichkeit der direkten Visualisierung des komplexen Phänomens der Wundheilung. Somit können die Effekte einzelner Gene auf das Zusammenspiel von u.a. Signaltransduktion und zytoskelettaler Reorganisation beleuchtet werden^[100]. Bei der Verwendung von Tumorzellen ist er über die Erfassung des migratorischen Verschlusses des Defektes Surrogat für eine erhöhte Motilität und Invasivität der Tumorzellen. Aus technischer Sicht

müssen bei der Durchführung einige entscheidende Schritte beachtet werden. Die Zellkonzentration sollte so ausgewählt sein, dass die Zellen bei Einbringung des Defektes einen dicht besiedelten Monolayer bilden. So verschließen sie nachfolgend den Defekt, ohne bestehende Lücken innerhalb des Monolayers zu füllen. Eine zu dichte Besiedlung wiederum führt zur Hemmung der Migrationswilligkeit der Zellen^[101]. Die in früheren Arbeiten oft verwendeten wiederholten Einmalmessungen der Distanz zwischen den Zellrändern resultierten in großen Variationsunterschieden. Das Problem wurde in dieser Arbeit durch eine automatisierte Softwareauswertung beseitigt^[64]. Für den objektiven Vergleich der unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten bedurfte es eines annähernd gleich großen Defektes in den *wells*. Die Zellen migrieren entlang eines Gradienten chemotaktisch wirksamer Substanzen (u.a. Zytokine), welche von den gegenüberliegenden Zellen produziert werden^[102]. Selbstredend geht eine Größenvarianz des Kratzers mit einer Veränderung des Gradienten und somit einer unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeit einher. Sind die Zellen an einem Punkt angekommen, an dem die Zytokinkonzentration einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat, verändern sie sich von einem eher migratorischen in einen proliferierenden Phänotyp und beginnen sich zu vermehren^[102], was wiederum zu einem schnelleren Verschluss des Defektes beiträgt. So gehen die beiden für die Metastasierung essentiellen Vorgänge Migration und Proliferation in diesem experimentellen Setting Hand in Hand.

Generell ist die Aussagekraft von *in vitro* Untersuchungen limitiert. Trotz zahlreicher Versuche der Anpassung an die biologische Realsituation, wie z.B. 3D Zellkulturen oder Organoide^[103], bleiben sie lediglich modellhafte Annäherungen, deren Ergebnisse letztendlich *in vivo* oder an Patientenmaterial validiert werden müssen. Ein gutes Assaydesign vorausgesetzt, können sie spezifische Vorgänge beleuchten, nicht aber deren Rolle in der Integrität eines menschlichen Körpers, mit u.a. der Aktivierung des Immunsystems oder anderen Heilungsprozessen, einschätzen. Außerdem gilt es standardisierte Methoden zu entwickeln, um Ergebnisse valide und untersucherunabhängig reproduzieren zu können. Einem für die Methodenerlernung nicht unerheblichen zeitlichen Aufwand stehen zudem biologische Komponenten entgegen, die durch geringe, oft nicht verstandene und ungewollte Modifikationen ihrer Umwelt teils gegensätzliche Ergebnisse liefern können. Liegt aber ein gut funktionierendes und robustes Testsystem vor, können vergleichsweise schnell unter standardisierten Bedingungen Untersuchungen mit zahlreichen Modifikationen vorgenommen werden.

• 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit ist ein Baustein zur Charakterisierung von bestimmten Genen, deren zugehörige Proteine Bestandteil der exosomalen Fraktion beim PCa sind.

Es zeigte sich eine stadien- und teilweise altersabhängige Überexpression von EEF1A2, FABP5, MPP6, SMPDL3B und GNAI1 in PCa-Gewebe. Außerdem wurde der Einfluss von EEF1A2, MPP6 und SMPDL3B auf Proliferation und Migration metastatischer PC3 Zellen beleuchtet. Die Ergebnisse legen einen positiven Einfluss von MPP6 auf die Proliferation und Migration von Tumorzellen nahe. Für EEF1A2 und SMPDL3B zeigte sich ein signifikanter Einfluss auf die Migration, nicht jedoch auf die Proliferation von PC3 Zellen.

Weiterhin konnte mit dem Invasionsassay ein *in vitro* Verfahren beim Prostatakarzinom etabliert werden, welches für die notwendigen weiterführenden Arbeiten auf exosomaler Ebene ein wertvolles Werkzeug darstellen wird.

Aufgrund ihres vielversprechenden Potentials für die Forschung und die klinische Anwendung sollten die Expressionen der Zielgene in Exosomen von PCa Patienten (z.B. aus dem Blut, Urin oder Seminalflüssigkeit im Sinne einer „liquid biopsy“) genauer untersucht werden. Weiterhin sollte geklärt werden, welchen Einfluss diese auf Synthese, Sekretion und Funktion von Exosomen haben.

Auch sind Überprüfungen der Expressionsdaten an umfangreicheren Kohorten mit klinischen Follow-up Daten erforderlich, um den Wert der hier untersuchten Gene als Marker auf Gewebeebene genauer zu bestimmen.

In vitro sind weiterhin Untersuchungen in komplexeren Modellsystemen, z.B. mittels stabiler Knockout-Zelllinien denkbar. Dies würde auch eine Übertragung in das tierexperimentelle Setting erleichtern.

• 5. Zusammenfassung

Ungeachtet der hohen Relevanz des Prostatakarzinoms bezüglich Morbidität und Mortalität von männlichen Patienten sind einerseits die bislang etablierten Screening- und Verlaufsparemeter störanfällig, andererseits die Mechanismen der Tumorprogression nur unzureichend bekannt. Zudem fehlen Marker, die eine differenzierte Risikostratifizierung des einzelnen Prostatakarzinoms und somit die Entwicklung individualisierter Therapiekonzepte ermöglichen.

Vielversprechendes Potential zur Lösung dieser Herausforderungen bieten Exosome. Diese, mit organischem Material der Ursprungszelle beladenen extrazellulären Vesikel werden vermehrt von Tumorzellen ausgestoßen und stehen u.a. im Verdacht in die frühen Schritte der komplexen Metastasierungskaskade verwickelt zu sein. Exosome können aus nahezu allen Körperflüssigkeiten extrahiert werden, um ein hochaktuelles komplettes Bild der biologischen Potenz des Tumors zu erstellen.

Die *in silico* Validierungen massenspektrometrisch gewonnener Proteinexpressionsprofilen von PCa Exosomen führten zur Identifizierung von fünf, im Prostatakarzinom überexprimierten Genen. Die nachfolgende Untersuchung einer Kohorte mit Prostatakarzinompatienten bestätigte die Überexpression von EEF1A2, FABP5, GNAI1, MPP6 und SMPDL3B in PCa Gewebe. Eine dezidierte Evaluation der Ergebnisse zeigte zudem die stadienabhängige Genexpression von EEF1A2, MPP6 und SMPDL3B im PCa-Gewebe. Diese Ergebnisse geben erste Anhaltspunkte für einen möglichen Einsatz oben genannter exosomenassoziierten Gene sowohl im Rahmen der Karzinomsubtypisierung als auch in der Risikostratifizierung des PCa. Nachfolgend schlossen sich funktionelle Analysen im Hinblick auf, im Rahmen der Metastasierung relevante Prozesse an. Hier konnten proliferationsfördernde Eigenschaften von MPP6 sowie ein positiver Einfluss von EEF1A2, MPP6 und SMPDL3B auf die Migration von Tumorzellen nachgewiesen werden.

Weitere Validierungs- und Charakterisierungsarbeiten zu den PCa-Exosomen vorausgesetzt, könnten EEF1A2, MPP6 und SMPDL3B in Zukunft im Rahmen multifaktorieller Modelle eine Rolle bei der individuellen Charakterisierung des Prostatakarzinoms im Hinblick auf Risikostratifizierung und möglicherweise als Therapieansatzpunkt in einer individualisierten Karzinomtherapie spielen.

• 6. Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch Institut (RKI), G.d.e.K.i.D.G., *Prostata, wichtigste epidemiologische Maßzahlen für Deutschland*. Krebs in Deutschland (2011-2012), 2015. 10. Ausgabe: p. 94-97.
2. DKG, D.K., AWMF, Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie, 2014. 3.1.
3. Attard, G., et al., *Prostate cancer*. Lancet, 2015. 387: p. 70-82.
4. Cuzick, J., et al., Prevention and early detection of prostate cancer. Lancet Oncol, 2014. 15(11): p. e484-92.
5. Morgentaler, A. and I.W. Connors, Testosterone therapy in men with prostate cancer: literature review, clinical experience, and recommendations. Asian J Androl, 2015. 17(2): p. 206-11.
6. Ilic, D., et al., *Screening for prostate cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. 1: p. Cd004720.
7. Obort, A.S., M.B. Ajadi, and O. Akinloye, Prostate-specific antigen: any successor in sight? Rev Urol, 2013. 15(3): p. 97-107.
8. Andriole, G.L., et al., Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. J Natl Cancer Inst, 2012. 104(2): p. 125-32.
9. Schroder, F.H., et al., Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. N Engl J Med, 2012. 366(11): p. 981-90.
10. Jaiswal, S., et al., Prostate Cancer for the Internist. N Am J Med Sci, 2015. 7(10): p. 429-35.
11. Louie, K.S., et al., Do prostate cancer risk models improve the predictive accuracy of PSA screening? A meta-analysis. Ann Oncol, 2015. 26(5): p. 848-64.
12. Gulati, R., et al., Individualized estimates of overdiagnosis in screen-detected prostate cancer. J Natl Cancer Inst, 2014. 106(2): p. djt367.
13. Tawfik, A., Prostate-Specific Antigen (PSA)-Based Population Screening for Prostate Cancer: An Economic Analysis. Ont Health Technol Assess Ser, 2015. 15(11): p. 1-37.
14. Sedelaar, J.P.M. and J.A. Schalken, The need for a personalized approach for prostate cancer management. BMC Med, 2015. 13.
15. Kryvenko, O.N. and J.I. Epstein, Changes in prostate cancer grading: Including a new patient-centric grading system. Prostate, 2015.
16. Heidenreich, A., et al., EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. Eur Urol, 2014. 65(1): p. 124-37.
17. Wiegel, T., et al., [PREFERE - the German prostatic cancer study: questions and claims surrounding study initiation in January 2013]. Urologe A, 2013. 52(4): p. 576-9.

18. Salman, J.W., et al., Prostate Specific Antigen as a Tumor Marker in Prostate Cancer: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol*, 2015. 867: p. 93-114.
19. Kasivisvanathan, V., et al., [Focal therapy for prostate cancer: German version]. *Urologe A*, 2015. 54(2): p. 202-9.
20. Boyer, M.J., J.K. Salama, and W.R. Lee, *Palliative radiotherapy for prostate cancer*. *Oncology (Williston Park)*, 2014. 28(4): p. 306-12.
21. Sountoulides, P., I. Mykoniatis, and N. Dimasis, Palliative management of malignant upper urinary tract obstruction. *Hippokratia*, 2014. 18(4): p. 292-7.
22. Heidenreich, A., et al., EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*, 2014. 65(2): p. 467-79.
23. Rabow, M.W. and M.X. Lee, Palliative care in castrate-resistant prostate cancer. *Urol Clin North Am*, 2012. 39(4): p. 491-503.
24. Ernst, J., et al., [Psychosocial support care wanted and actually received by patients with cancer. Gender-specific differences]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2009. 134(31-32): p. 1567-72.
25. Jiang, W.G., et al., Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol*, 2015. 35 Suppl: p. S244-75.
26. Tracey A. Martin, L.Y., Andrew J. Sanders, Jane Lane, and Wen G. Jiang, *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective*. Landes Bioscience, 2013.
27. Zhou, W., et al., Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*, 2014. 25(4): p. 501-15.
28. Webber, J., V. Yeung, and A. Clayton, Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015. 40: p. 27-34.
29. Milane, L., et al., Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release*, 2015. 219: p. 278-94.
30. Franzen, C.A., et al., Urinary Exosomes: The Potential for Biomarker Utility, Intercellular Signaling, and Therapeutics in Urologic Malignancy. *J Urol*, 2015.
31. Santoni, M., et al., The origin of prostate metastases: emerging insights. *Cancer Metastasis Rev*, 2015. 34(4): p. 765-73.
32. Sun, Y., et al., Up-regulation of eEF1A2 promotes proliferation and inhibits apoptosis in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014. 450(1): p. 1-6.
33. Scaggiante, B., et al., Dissecting the expression of EEF1A1/2 genes in human prostate cancer cells: the potential of EEF1A2 as a hallmark for prostate transformation and progression. *Br J Cancer*, 2012. 106(1): p. 166-73.
34. Morgan, E., P. Kannan-Thulasiraman, and N. Noy, Involvement of Fatty Acid Binding Protein 5 and PPAR β/δ in Prostate Cancer Cell Growth. *PPAR Res*, 2010. 2010.
35. Powell, C.A., et al., Fatty acid binding protein 5 promotes metastatic potential of triple negative breast cancer cells through enhancing epidermal growth factor receptor stability. *Oncotarget*, 2015. 6(8): p. 6373-85.

36. Yao, J., et al., GNAI1 Suppresses Tumor Cell Migration and Invasion and is Post-Transcriptionally Regulated by Mir-320a/c/d in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biol Med*, 2012. 9(4): p. 234-41.
37. Xia, W. and F. Liang, 4.1G promotes arborization and tight junction formation of oligodendrocyte cell line OLN-93. *J Cell Physiol*, 2012. 227(6): p. 2730-9.
38. Kamijo, A., et al., Immunohistochemical study of the membrane skeletal protein, membrane protein palmitoylated 6 (MPP6), in the mouse small intestine. *Histochem Cell Biol*, 2015.
39. Stangeland, B., et al., Combined expressional analysis, bioinformatics and targeted proteomics identify new potential therapeutic targets in glioblastoma stem cells. *Oncotarget*, 2015. 6(28): p. 26192-215.
40. Terada, N., et al., Involvement of membrane skeletal molecules in the Schmidt–Lanterman incisure in Schwann cells. *Medical Molecular Morphology*, 2015: p. 1-6.
41. Yoshikatsu, Y., et al., NVL2, a nucleolar AAA-ATPase, is associated with the nuclear exosome and is involved in pre-rRNA processing. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. 464(3): p. 780-6.
42. Heinz, L.X., et al., The Lipid-Modifying Enzyme SMPDL3B Negatively Regulates Innate Immunity. *Cell Rep*, 2015. 11(12): p. 1919-28.
43. Markoulatos, P., N. Siafakas, and M. Moncany, Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*, 2002. 16(1): p. 47-51.
44. Clementi, M., et al., Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods Appl*, 1993. 2(3): p. 191-6.
45. Smith, C.J. and A.M. Osborn, Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009. 67(1): p. 6-20.
46. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
47. Gstraunthaler, G., Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Vol. 7. 2013.
48. Slichter, S.J., et al., Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets. *Transfus Med Rev*, 2014. 28(4): p. 212-25.
49. Tennant, J.R., EVALUATION OF THE TRYPAN BLUE TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF CELL VIABILITY. *Transplantation*, 1964. 2: p. 685-94.
50. Kaighn, M.E., et al., Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*, 1979. 17(1): p. 16-23.
51. MuraliKrishna, P.S., et al., RNA Interference-Directed Knockdown of Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Inhibits Prostate Cancer Cell Invasion, Survival and Tumorigenicity In vivo. *J Biol Chem*, 2005. 280(43): p. 36529-40.
52. Stone, K.R., et al., Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*, 1978. 21(3): p. 274-81.
53. Berthon, P., et al., Functional expression of sv40 in normal human prostatic epithelial and fibroblastic cells - differentiation pattern of nontumorigenic cell-lines. *Int J Oncol*, 1995. 6(2): p. 333-43.

54. Mitchell, S., et al., Phenotypic and genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines. *BJU Int*, 2000. 85(7): p. 932-44.
55. Gekle, M., et al., Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch*, 1994. 428(2): p. 157-62.
56. Zak, J., et al., High-resistance MDCK-C7 monolayers used for measuring invasive potency of tumour cells. *Pflugers Arch*, 2000. 440(1): p. 179-83.
57. Loomans, H.A. and C.D. Andl, Intertwining of Activin A and TGF β Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion. *Cancers (Basel)*, 2015. 7(1): p. 70-91.
58. Konrad, L., et al., TGF-beta1 and TGF-beta2 strongly enhance the secretion of plasminogen activator inhibitor-1 and matrix metalloproteinase-9 of the human prostate cancer cell line PC-3. *Regul Pept*, 2009. 155(1-3): p. 28-32.
59. van Tonder, A., A.M. Joubert, and A.D. Cromarty, Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*, 2015. 8: p. 47.
60. Kramer, N., et al., In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat Res*, 2013. 752(1): p. 10-24.
61. Ludwig, T., et al., The electrical resistance breakdown assay determines the role of proteinases in tumor cell invasion. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. 283(2): p. F319-27.
62. Bolenz, C., et al., Assessing the invasive potential of bladder cancer: development and validation of a new preclinical assay. *J Urol*, 2013. 189(5): p. 1939-44.
63. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder, Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem*, 2003. 10(3): p. 245-56.
64. Geback, T., et al., TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques*, 2009. 46(4): p. 265-74.
65. Qu, M., S.C. Ren, and Y.H. Sun, Current early diagnostic biomarkers of prostate cancer. *Asian J Androl*, 2014. 16(4): p. 549-54.
66. Kryvenko, O.N. and J.I. Epstein, Changes in prostate cancer grading: Including a new patient-centric grading system. *Prostate*, 2016. 76(5): p. 427-33.
67. Pierorazio, P.M., et al., Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU International*, 2013. 111(5): p. 753-760.
68. Lee, M.H. and Y.J. Surh, eEF1A2 as a putative oncogene. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. 1171: p. 87-93.
69. Longerich, T., [EEF1A2 inhibits the p53 function in hepatocellular carcinoma via PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of MDM4]. *Pathologe*, 2014. 35 Suppl 2: p. 177-84.
70. Miciak, J. and F. Bunz, Long story short: p53 mediates innate immunity. *Biochim Biophys Acta*, 2016.
71. Forootan, F.S., et al., The expression of C-FABP and PPARgamma and their prognostic significance in prostate cancer. *Int J Oncol*, 2014. 44(1): p. 265-75.

72. Kawaguchi, K., et al., The cancer-promoting gene fatty acid-binding protein 5 (FABP5) is epigenetically regulated during human prostate carcinogenesis. *Biochem J*, 2016. 473(4): p. 449-61.
73. Jayson, G.C., et al., Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet*, 2016.
74. Forootan, F.S., et al., Fatty acid activated PPARgamma promotes tumorigenicity of prostate cancer cells by up regulating VEGF via PPAR responsive elements of the promoter. *Oncotarget*, 2016.
75. Silver, M., et al., Identification of gene pathways implicated in Alzheimer's disease using longitudinal imaging phenotypes with sparse regression. *Neuroimage*, 2012. 63(3): p. 1681-94.
76. Diehl, S.A., et al., G proteins Galphai1/3 are critical targets for Bordetella pertussis toxin-induced vasoactive amine sensitization. *Infect Immun*, 2014. 82(2): p. 773-82.
77. Terada, N., et al., Essential Function of Protein 4.1G in Targeting of Membrane Protein Palmitoylated 6 into Schmidt-Lanterman Incisures in Myelinated Nerves. *Mol Cell Biol*, 2012. 32(1): p. 199-205.
78. Jang, S.M., et al., Clinicopathological significance of CADM4 expression, and its correlation with expression of E-cadherin and Ki-67 in colorectal adenocarcinomas. *J Clin Pathol*, 2012. 65(10): p. 902-6.
79. Jang, S.M., et al., Clinicopathological significance of CADM4 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Clin Pathol*, 2013. 66(8): p. 681-6.
80. Yoo, T.H., et al., Sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b expression levels determine podocyte injury phenotypes in glomerular disease. *J Am Soc Nephrol*, 2015. 26(1): p. 133-47.
81. Heinz L , X., et al., The Lipid-Modifying Enzyme SMPDL3B Negatively Regulates Innate Immunity. *Cell Rep*, 2015. 11(12): p. 1919-28.
82. Zhao, S., et al., Toll-Like Receptors and Prostate Cancer. *Front Immunol*, 2014. 5.
83. Olumi, A.F.e.a., Commentary on "integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer." *Genome Biology Unit, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Germany.: Cancer Cell* 2013;23(2):159-70. *Urol Oncol*, 2014. 32(2): p. 212.
84. van Zijl, F., G. Krupitza, and W. Mikulits, Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res*, 2011. 728(1-2): p. 23-34.
85. Dowling Cí , M., C. Herranz Ors, and A. Kiely P Using real-time impedance-based assays to monitor the effects of fibroblast-derived media on the adhesion, proliferation, migration and invasion of colon cancer cells. *Biosci Rep*, 2014. 34(4).
86. Boyden, S., The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 1962. 115: p. 453-66.
87. Knauf, D., Die Bedeutung der Matrix-Metalloproteinasen 2, 7 und 9 bei der Metastasierung des Urothelkarzinoms der Harnblase. *Promotionsarbeit*, 2014: p. 52-53.
88. Srinivasan, B., et al., TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*, 2015. 20(2): p. 107-26.

89. Yamana, S., et al., The Cell Adhesion Molecule Necl-4/CADM4 Serves as a Novel Regulator for Contact Inhibition of Cell Movement and Proliferation. *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0124259.
90. Stucci, S., et al., Avbeta3 integrin: Pathogenetic role in osteotropic tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015. 96(1): p. 183-93.
91. Singh, R., et al., CXCR6-CXCL16 axis promotes prostate cancer by mediating cytoskeleton rearrangement via Ezrin activation and alphavbeta3 integrin clustering. *Oncotarget*, 2016.
92. Bosanquet, D.C., et al., FERM family proteins and their importance in cellular movements and wound healing (review). *Int J Mol Med*, 2014. 34(1): p. 3-12.
93. Jung, Y. and J.H. McCarty, Band 4.1 proteins regulate integrin-dependent cell spreading. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 426(4): p. 578-84.
94. Schulz, W.A., et al., Changes in cortical cytoskeletal and extracellular matrix gene expression in prostate cancer are related to oncogenic ERG deregulation. *BMC Cancer*, 2010. 10: p. 505.
95. Abbas, W., A. Kumar, and G. Herbein, The eEF1A Proteins: At the Crossroads of Oncogenesis, Apoptosis, and Viral Infections. *Front Oncol*, 2015. 5: p. 75.
96. Alagia, A. and R. Eritja, *siRNA and RNAi optimization*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016.
97. Borawski, J., et al., Optimization procedure for small interfering RNA transfection in a 384-well format. *J Biomol Screen*, 2007. 12(4): p. 546-59.
98. Jensen, K., J.A. Anderson, and E.J. Glass, Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation. *Vet Immunol Immunopathol*, 2014. 158(3-4): p. 224-32.
99. Ramsey, J.D. and N.H. Flynn, Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol Ther*, 2015. 154: p. 78-86.
100. Soderholm, J. and R. Heald, Scratch n' screen for inhibitors of cell migration. *Chem Biol*, 2005. 12(3): p. 263-5.
101. Liang, C.-C., A.Y. Park, and J.-L. Guan, In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protocols*, 2007. 2(2): p. 329-333.
102. De Donatis, A., F. Ranaldi, and P. Cirri, Reciprocal control of cell proliferation and migration. *Cell Communication and Signaling*, 2010. 8(1): p. 1-4.
103. Fennema, E., et al., Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol*, 2013. 31(2): p. 108-15.

• 7. Eigene Publikationen

Worst TS, **Waldbillig F**, Abdelhadi A, Weis CA, Gottschalt M, Steidler A, von Hardenberg J, Michel MS, Erben P., The EEF1A2 gene expression as risk predictor in localized prostate cancer. BMC Urology 2017; 17 : 86.

• 8. Lebenslauf

PERSONALIEN

Name und Vorname	Frank Waldbillig
Geburtsdatum	11.12.1988
Geburtsort	Düdelingen
Familienstand	Ledig
Vater	Michel Waldbillig
Mutter	Viviane Disiviscour

SCHULISCHER WERDEGANG

1993-2001	Dellhéischt Grundschule in Esch/Alzette
2001-2008	Lycée de Garçons (Gymnasium) in Esch/Alzette
28. Juni 2008	Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2008/2009	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Luxemburg
WS 2009/2010	Weiterführung des Studiums der Humanmedizin an der Universität Erlangen/Nürnberg
05. April 2011	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 2011/2012	Weiterführung des Studiums der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
09. Oktober 2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10. Dezember 2015	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21. Dezember 2015	Approbation als Arzt

• 9. Danksagung

Diese Dissertation entstand im Zeitraum von März 2013 bis Januar 2017 im Forschungslabor der Klinik für Urologie der Universitätsmedizin Mannheim (Direktor Univ.-Professor Dr. med. Maurice Stephan Michel) unter der Leitung von Herrn Privat-Dozent Dr. med. Philipp Erben.

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Professor Dr. med Maurice Stephan Michel für die exzellenten Bedingungen zur Durchführung meiner Promotionsarbeit an der urologischen Universitätsklinik Mannheim.

Ein großer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Privat-Dozent Dr. med. Philipp Erben für die jederzeit hervorragende und sympathische Betreuung während den unterschiedlichsten Phasen der Dissertation, die konsequenten Anregungen und Aufmunterungen in scheinbar festgefahrenen Situationen sowie für das stetige Bemühen einen roten Faden zu bewahren ohne die hierfür notwendigen Versuche ausufern zu lassen.

Ebenso bin ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. Thomas Worst zu großem Dank verpflichtet. Aufgrund seiner Vorarbeiten konnte das Konzept dieser Dissertation ausgearbeitet werden. Als permanenter Ansprechpartner, war er nicht zuletzt während der finalen Phase der Dissertationsarbeit durch seine unermüdlichen Verbesserungsvorschlägen und Anregungen eine große Hilfe bei ihrer Fertigstellung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Annette Steidler, die mich überaus kompetent und geduldig in das experimentelle Arbeiten einführte. Zudem stand sie jederzeit mit ebenso hilfreichen wie fachkundigen Ratschlägen zur Seite und war somit maßgeblich an der Weiterentwicklung der diversen Methoden beteiligt. Auch trug sie entscheidend zum positiven und harmonischen Arbeitsklima im urologischen Forschungslabor bei, für das ich mich bei der gesamten Forschungsgruppe bedanke.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Partnerin Frau Mara Flammang, sowie bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, welche durch ihre Aufmunterungen und ihr Verständnis dazu beitrugen, dass diese Dissertation fertiggestellt werden konnte und mich jederzeit nach Kräften unterstützen.

• 10. Anhang

Basensequenzen der verwendeten Primer:

Name	Primertyp	Basensequenz
CALM	Vorw. →	5'-GAGCGAGCTGAGTGGTTGTG-3'
	Rückw. ←	5'-AGTCAGTTGGTCAGCCATGCT-3'
EEF1A2	Vorw. →	5'-GGACCATTGAGAAGTTGCGAGA-3'
	Rückw. ←	5'-AGCACCCAGGCATACTTGAA-3'
FABP5	Vorw. →	5'-GCAGACCCCTCTCTGCAC-3'
	Rückw. ←	5'-TCGCAAAGCTATTCCCACTC-3'
GNAI1	Vorw. →	5'-GCCCTCTCACTATATGCTATCCAG-3'
	Rückw. ←	5'-TTGAGGTCTTCAAAGTACATTG-3'
GUS	Vorw. →	5'-GAAAATAYRTGGTTGGAGAGCTCATT-3'
	Rückw. ←	5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA-3'
MPP6	Vorw. →	5'-TGTAATAGAGAAGATCCAAATTGGTG-3'
	Rückw. ←	5'-ACTGGCTTGAATGAGACCAG-3'
SMPDL3B	Vorw. →	5'-CGCTGACAGCAGACATGG-3'
	Rückw. ←	5'-GTGGCCGACAATGTACACC-3'

Basensequenzen der verwendeten Sonden:

Name	Basensequenz
CALM	5'-TCGCGTCTCGGAAACCGGTAGC-3'
EEF1A2	UPL 60 (Roche, Diagnostics Mannheim)
FABP5	UPL 56 (Roche, Diagnostics Mannheim)
GNAI1	UPL 34 (Roche, Diagnostics Mannheim)
GUS	5'-YAK-CCAGCACTCTCGTCCGGTACTGTTCA-BBQ-3'
MPP6	5'-AGCCATGTAAAAGAGGGAGGAAGCGCTGGTC-3'
SMPDL3B	UPL 11 (Roche, Diagnostics Mannheim)