

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik-Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehem. Leiterin: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Marianne Jochum
Komm. Leiter: Prof. Dr. Christian Weber

Einfluss von lysosomalen Cysteinproteasen auf das Migrations-/Invasionsverhalten von Prostatakarzinomzelllinien

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thea Bunsen

aus
Gräfelfing

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dorit Nägler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Boris Schlenker
Prof. Dr. Heiko Hermeking

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2016

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Das Prostatakarzinom.....	3
2.2 Die metastatische Kaskade.....	4
2.2.1 Verlust von Zell-Zell-Kontakten.....	5
2.2.2 Änderung der Zell-Stroma-Interaktion.....	5
2.2.3 Migration der Tumorzellen.....	6
2.2.4 Degradation der extrazellulären Matrix und Basalmembran.....	7
2.3 Lysosomale Cysteinproteasen.....	8
2.4 Biologische Funktionen der Cathepsine.....	9
2.5 Pathologische Rolle der Cathepsine.....	10
2.6 MAPK-Signaltransduktion.....	12
2.7 Zelluläre Seneszenz.....	14
2.7.1 Charakterisierung des seneszenten Phänotyps.....	14
2.7.2 Regulation der Seneszenz durch Tumorsuppressorsignalwege.....	16
2.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit.....	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Geräte.....	20
3.1.1 Geräte in der Zellkultur.....	20
3.1.2 Geräte für die Molekularbiologie.....	20
3.1.3 Geräte für die Proteinchemie.....	20
3.2 Bioinformatische Hilfsmittel.....	21
3.3 Allgemeine Chemikalien.....	21
3.4 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Methoden.....	21
3.4.1 Oligonukleotide.....	22
3.4.2 Primer für die qRT-PCR.....	23
3.5 Zelllinien.....	23
3.6 Chemikalien und Materialien für zellbiologische Methoden.....	24
3.6.1 Proteine.....	25
3.6.2 Inhibitoren.....	25
3.7 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken.....	26
3.7.1 Antikörper.....	27

3.8 Zellbiologische Methoden.....	28
3.8.1 Kultivierung und Aufbewahrung der Zelllinien.....	28
3.8.2 Zellzahlbestimmung.....	28
3.8.3 Serumfreie Zellkultur und Stimulation der PC-3-Zellen.....	29
3.8.4 Stimulation der PC-3-Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix.....	29
3.8.5 Knock-Down der Cathepsine X, B und L durch siRNA-Transfektion.....	30
3.8.6 Invasionsassay.....	30
3.8.7 Bestimmung der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidase-Aktivität.....	31
3.8.7.1 Zytochemische SA- β -Galaktosidasefärbung.....	31
3.8.7.2 Quantitative Detektion der SA- β -Galaktosidase-Aktivität.....	32
3.8.8 Quantifizierung der Proliferation.....	32
3.9 Molekularbiologische Methoden.....	33
3.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Tumorzellen.....	33
3.9.2 cDNA-Synthese.....	33
3.9.3 Quantitative RT-PCR.....	34
3.9.4 cDNA-Array.....	35
3.10 Proteinchemische Methoden.....	36
3.10.1 Herstellung von Zelllysaten.....	36
3.10.2 Herstellung von Zelllysaten zur Analyse phosphorylierter Proteine.....	36
3.10.3 Isolierung des Zellkulturüberstandes.....	37
3.10.4 Quantitative Proteinbestimmung.....	37
3.10.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	37
3.10.6 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brillantblau.....	38
3.10.7 Westernblot und Immundetektion.....	38
3.10.8 Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von Cathepsinen.....	40
3.10.9 Abbau von EZM-Komponenten durch rekombinante Cathepsine.....	40
4 Ergebnisse.....	42
4.1 Vergleich der Transmigrationsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinien PC-3, LNCaP und DU145.....	42
4.2 Knock-Down der Cathepsine X, B und L mittels siRNA.....	43
4.3 Einfluss der Cathepsine X, B und L auf das Invasionsverhalten von PC-3-Zellen.....	46
4.4 Einfluss der Downregulation von Cathepsinen auf die MMP9-mRNA-Expression.....	48
4.5 Degradation von EZM-Komponenten durch die Cathepsine X, B und L.....	49
4.6 Einfluss von Procathepsin X und Vitronektin auf die Signaltransduktion.....	50
4.6.1 Identifizierung von aktivierten Signalwegen nach Stimulation mit Procathepsin X	

und Vitronektin.....	51
4.6.2 Analyse von MEK1/2 und ERK1/2 nach Stimulation mit Vitronektin und Procathepsin X.....	52
4.6.3 Analyse von PAK1 und Rac1 nach Stimulation mit Procathepsin X und Vitronektin	53
4.7 Einfluss von exogenem Cathepsin X, B und L auf Signaltransduktionswege.....	54
4.8 Einfluss von exogenen Cathepsinen auf die Aktivierung von p38.....	55
4.9 Einfluss des Knock-Downs von Cathepsin X und B auf die Aktivität des ERK-Signalweges.....	56
4.10 Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Expression der Cathepsine X, B und L.....	59
4.11 Einfluss der Cathepsin-Defizienz auf die zelluläre Seneszenz.....	61
4.11.1 Detektion der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidaseaktivität in PC-3-Zellen....	61
4.11.2 Proliferationsverhalten von Cathepsin X-defizienten PC-3-Zellen.....	63
4.11.3 Veränderung der Seneszenz-assoziierten Genexpression.....	64
4.11.4 Charakterisierung von Cathepsin-defizienten PC-3-Zellen mittels Gene Arrays....	65
5 Diskussion.....	68
5.1 Die verringerte Invasivität der Prostatakarzinomzellen nach Knock-Down von Cathepsin X, B und L.....	68
5.2 Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch Stimulation von PC-3-Zellen mit Cathepsinen und Vitronektin.....	72
5.3 Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Expression von Cathepsinen..	76
5.4 Auswirkungen der Cathepsin-Defizienz auf die zelluläre Seneszenz.....	77
6 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	81
7 Literaturverzeichnis.....	83
8 Danksagung.....	98
9 Eidesstattliche Versicherung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BM	Basalmembran
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4, 6-Diamidin-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Foetales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
hEZM	Humane extrazelluläre Matrix
JNK	c-Jun N-Terminal Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEKK	MEK Kinase Kinase
min	Minute
MKK	MAPK Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NHDF	normalen humanen dermalen Fibroblasten
NS	Non-silencing-siRNA
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase
VN	Vitronektin

1 Zusammenfassung

Die lysosomalen Cysteinproteasen (Cathepsine) wurden bereits bei verschiedenen Tumorentitäten untersucht und ihre Beteiligung bei der Tumorprogression, insbesondere der Tumorinvasion und der Metastasierung belegt. Während eine Überexpression der Cathepsine B und L nur bei invasiven Prostatakarzinomen zu beobachten ist, ist Cathepsin X auch in Präkanzerosen, einschließlich der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN), deutlich erhöht. Anders als bei Cathepsin B war zu Beginn der Arbeit über die Ursachen und Wirkung dieser erhöhten Cathepsin X-Expression nur wenig bekannt.

Um festzustellen, ob Cathepsine Invasions- oder Migrationsprozesse beim Prostatakarzinom beeinflussen, wurde mittels der siRNA-Technologie ein transients Knock-Down der Cathepsine X, B und L in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 etabliert. Die Effizienz des Knock-Downs wurde durch qRT-PCR und ELISA verifiziert. Das invasive Potential und die Migrationsfähigkeit der Cathepsin-defizienten PC-3-Zellen wurde *in vitro* in Transwell-Kammersystemen analysiert. Es wurde eine deutliche Verringerung der Invasions-/Migrationsfähigkeit gegenüber der Kontrolle festgestellt. Dies deutet auf eine Rolle dieser Cathepsine bei Invasionsprozessen hin. Cathepsin B und L, die über endoproteolytische Aktivität verfügen, sind wahrscheinlich an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt. Da Cathepsin X nur Carboxypeptidaseaktivität besitzt, ist ein direkter Abbau der extrazellulären Matrix unwahrscheinlich. Erste Studien belegen, dass diese Protease auch nicht-proteolytische Funktionen hat, zum Beispiel als Ligand bestimmter Zelloberflächenstrukturen.

Cathepsin X wird von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen sezerniert und könnte an *outside-in*-Signalkaskaden durch Bindung an die Zelloberfläche beteiligt sein. Um die potentielle extrazelluläre Rolle von Cathepsinen in der Signaltransduktion zu untersuchen, wurden PC-3-Zellen mit den Cathepsinen X, B und L stimuliert. Daraufhin wurde die Aktivierung von Signaltransduktionswegen, die bekanntermaßen Zellproliferation, Zellmotilität und Zellüberleben beeinflussen, untersucht. Es zeigte sich, dass die Interaktion von Cathepsin X und B mit PC-3-Zellen zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges durch Phosphorylierung von ERK führt.

Darüber hinaus wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression der Cathepsine X, B und L und dem Seneszenzverhalten von PC-3-Zellen untersucht. Hierfür wurden β -Galaktosidasefärbungen und die Untersuchung der Seneszenzmarker p16, p21 und p53 durchgeführt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass nach einem transienten Knock-Down der Cathepsine X, B und L der Anteil der seneszenten Zellen steigt.

Die Erkenntnis, dass Cathepsine auch in der Signaltransduktion und der zellulären Seneszenz eine Rolle spielen können, eröffnet für die Tumorforschung neue Ansatzpunkte, um effizientere Strategien zur Therapie des Prostatakarzinoms entwickeln zu können.

2 Einleitung

2.1 Das Prostatakarzinom

Mit einer Inzidenz von 164/100.000 pro Jahr in Deutschland ist das Prostatakarzinom mittlerweile die häufigste Tumorentität bei Männern in Deutschland (Krebsregister, 2010). Nach Bronchial- und Kolonkarzinomen stellt es mit 10 Prozent die dritthäufigste Todesursache der an Krebs erkrankten Männern dar. Die jährliche Prävalenz steigt mit dem Lebensalter rapide an. So sind 90 Prozent der Erkrankten älter als 60 Jahre, wohingegen das Prostatakarzinom bei Männern unter 50 Jahren nur selten auftritt. Anhand von Obduktionen konnte gezeigt werden, dass bei 80 Prozent der über 70-jährigen ein latentes Prostatakarzinom vorliegt (Dhom, 1983). Das Alter stellt somit den bedeutsamsten Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms dar. Die Inzidenz des Prostatakarzinoms ist im Allgemeinen in Asien wesentlich geringer als in Nordamerika. Epidemiologische Studien zeigen, dass Asiaten, welche in die USA ausgewandert sind, in der 2. Generation mit der selben Häufigkeit an einem Prostatakarzinom erkranken, wie die weiße amerikanische Bevölkerung (Whittemore et al., 1995). Dies deutet darauf hin, dass der Lebensstil und die Ernährung (insbesondere tierische Fette) eine Rolle spielen. Ein weiterer Risikofaktor ist die familiäre Prädisposition. Die familiäre Häufung der diagnostizierten Prostatakarzinome schwankt zwischen 9 Prozent bei den über 85-jährigen bis zu 40 Prozent bei den unter 50-jährigen (Carter et al., 1993). Es wurden bereits verschiedene Genloci wie zum Beispiel die Mutation des H(ereditary)-P(rostate)-C(ancer)-1-Gen auf Chromosom 1 (Steinberg et al., 1990) identifiziert.

Da die Erkrankung im heilbaren Frühstadium symptomlos ist, ist eine differenzierte Früherkennung entscheidend. Durch die jährliche digital-rektale Untersuchung werden allerdings nur 2–5 Prozent der Prostatakarzinome erkannt. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung des PSA (prostataspezifischen Antigen)-Wertes, der spezifisch für Prostatagewebe ist. Der PSA-Wert ist jedoch nicht spezifisch für das Prostatakarzinom, da er auch bei benigner Prostatahyperplasie, Entzündungen oder Normalbefund erhöht sein kann (Lilja et al., 2008). Somit ist der PSA-Wert nur ein Indiz für das Prostatakarzinom. Ab einem Wert von 4 ng/ml stellt sich die Indikation zur weiteren Diagnostik. Neben der Anamnese, der Sonographie und der MRT ermöglicht erst die Prostatabiopsie eine eindeutige Diagnose.

Die Therapie des Prostatakarzinoms richtet sich nach Stadium, Alter, allgemeinem Gesundheitszustand und der Lebenserwartung des Patienten. Bei einem organbegrenzten Prostatakarzinom hat sich neben radikaler Prostatektomie (komplette Entfernung der Prostata) und Strahlentherapie die Strategie des abwartenden Beobachtens etabliert. Im fortgeschrittenen und meist symptomatischen Stadium sind der Hormonentzug, die Strahlentherapie und bei

hormonrefraktärem Prostatakarzinom die Chemotherapie palliative Therapieformen.

Die Prognose des Prostatakarzinoms ist mit einem 5-Jahres-Überleben zwischen 40-80 Prozent abhängig von Tumorstadium (Tumorgroße, Metastasierung) und Differenzierungsgrad. Die Metastasierung des Prostatakarzinoms erfolgt zunächst lymphogen in die lokalen Lymphknoten und meist erst später hämatogen. Die hämatogene Streuung manifestiert sich überwiegend ossär. Bei 80 bis 90 Prozent der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom ist das Achsenskelett und hier insbesondere das Becken und die Wirbelsäule betroffen. Etwa 10-15 Prozent der Patienten weisen bereits bei Diagnosestellung ossäre Metastasen auf (Helpab et Rübben, 1998). Die zumeist osteoblastischen Knochenmetastasen sind die hauptsächliche Ursache für die Morbidität und Mortalität des Prostatakarzinoms (Apolo et al., 2008). Die Progression der Erkrankung von einem hormonabhängigen zu einem hormonunabhängigen Prostatakarzinom führt zu einer weiteren Verschlechterung der Prognose (Oka et al., 2005).

2.2 Die metastatische Kaskade

Nach Hanahan und Weinberg entwickeln fast alle Tumoren die folgenden sechs Eigenschaften: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Resistenz gegenüber Apoptose, Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumssignalen, unbegrenzte Replikation, Fähigkeit zur Angiogenese sowie Fähigkeit zur Invasion und Metastasenbildung. Obwohl diese Eigenschaften durch unterschiedliche Mechanismen entstehen können, sind sie alle für die Tumorgenese entscheidend (Hanahan et Weinberg, 2000).

Die beiden wichtigsten Merkmale von malignen Tumoren sind Invasion und Metastasierung. Der Prozess der Invasion umfasst das aktive Einwachsen von Tumorzellen in das umliegende Gewebe verbunden mit einer Zerstörung der normalen Gewebestruktur. Nach der initialen neoplastischen Transformation der Zellen und der lokalen Invasion erfolgt bei malignen Tumoren die Metastasierung. Diese ist ein komplexer mehrstufiger Prozess (Metastasierungskaskade), bei dem Tumorzellen aus dem Primärtumor nach Intravasation in die Blutbahn in andere Bereiche des Körpers verschleppt werden (Abb. 1). Zellen, die vom Immunsystem nicht erkannt werden, können sich nach Extravasation dort absiedeln und Metastasen bilden. Einer der grundlegenden Mechanismen, welche diesen Vorgang ermöglichen, ist die lokale Invasion, welche sich aus folgenden Schritten zusammensetzt: Verlust von Zell-Zell-Kontakten, Änderung der Zell-Matrix-Interaktion, Migration der Tumorzellen und Degradation der extrazellulären Matrix und Basalmembran. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Teilschritte der Metastasierungskaskade wird in den nächsten Kapiteln behandelt.

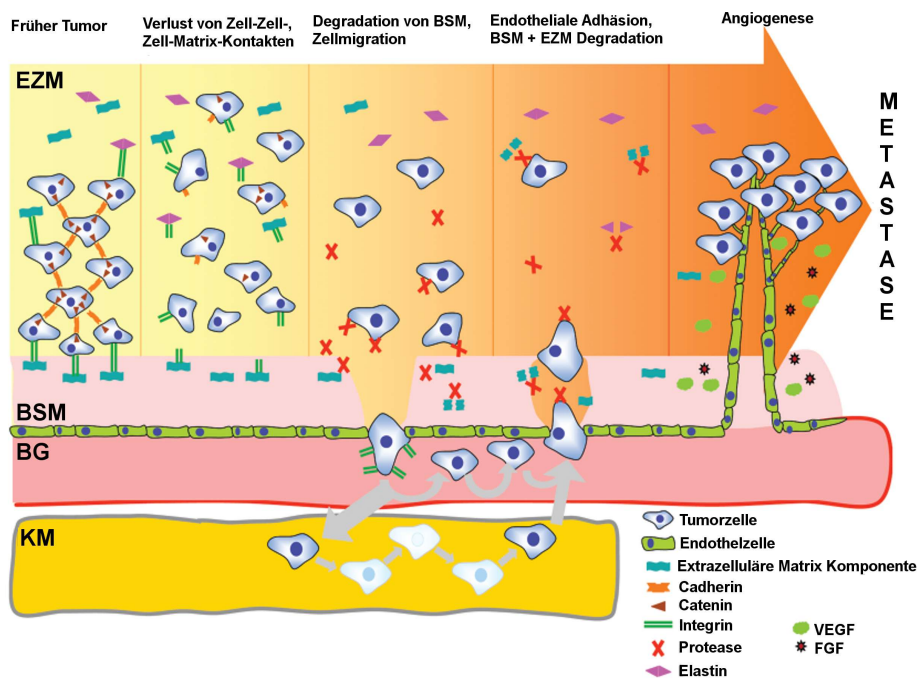


Abb. 1: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade.

Extrazelluläre Matrix (EZM), Basalmembran (BM), Blutgefäß (BG), Knochenmark (KM) (modifiziert nach Laufs et al., 2006).

2.2.1 Verlust von Zell-Zell-Kontakten

Der erste Schritt der Invasion ist der Verlust von Zell-Zell-Kontakten, dessen Schlüsselregulator im Prostatakarzinom der Cadherin-Catenin-Komplex ist (Cheng et al., 1996). Cadherine sind transmembranäre Glykoproteine, welche intrazellulär über die Catenine mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind. Die extrazelluläre Domäne hingegen bildet mit anderen Cadherinen interzelluläre Verbindungen und stabilisiert dadurch die Zell-Zell-Kontakte. Mit fortschreitendem Tumorstadium ist in primären Prostatakarzinomen eine reduzierte E-Cadherin-Expression zu beobachten. Dies führt zu einer Schwächung der interzellulären Bindung und kann letztendlich deren Verlust führen und somit die Bildung von Metastasen begünstigen (Cheng et al., 1996).

2.2.2 Änderung der Zell-Stroma-Interaktion

Die Zell-Stroma-Interaktion wird hauptsächlich durch Integrine vermittelt. Integrine sind heterodimere Zelloberflächenproteine, die aus zwei nicht-kovalent miteinander verknüpften Untereinheiten (α und β) bestehen. Bisher wurden 18 α - und 8 β -Untereinheiten identifiziert, die 26 verschiedene Integrine bilden (Ramsay et al., 2007). Die jeweilige Kombination der

Untereinheiten bestimmt die adhäsive Spezifität und die Signaleigenschaften der Integrine. So erkennen einige Integrine, wie $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ das RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp), wohingegen andere Integrine alternative Peptidsequenzen wie EILDV und REDV erkennen (Arnaout et al., 2002). Neben ihren adhäsiven Eigenschaften fungieren Integrine auch als wichtige Signalrezeptoren. Sie können Informationen bidirektional über die Plasmamembran übermitteln. Bei der sogenannten *outside-in*-Signaltransduktion aktivieren extrazelluläre Signale intrazelluläre Signalwege (Abb. 2). Diese Signalwege können die Proliferation, das Zellüberleben, die Zellmotilität und die Differenzierung regulieren (Hynes, 2002).

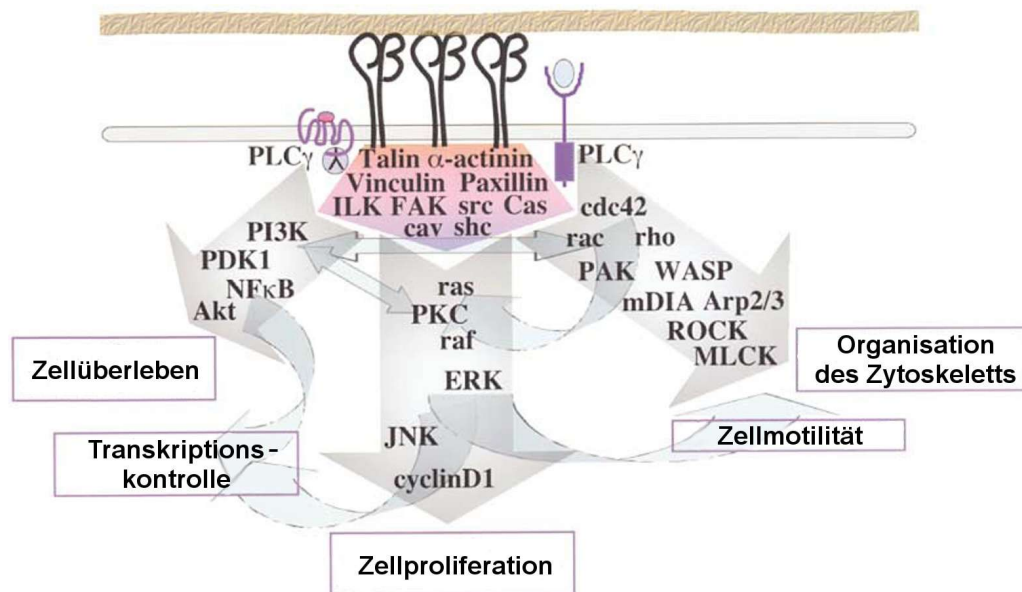


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signalwege, die durch Integrine aktiviert werden können. (modifiziert nach Hynes, 2002).

Bei der *inside-out*-Signaltransduktion hingegen regulieren intrazelluläre Signalmechanismen die Bindungseigenschaften der Integrine. Dies geschieht durch Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen und/oder Veränderung ihrer Verteilung auf der Zelloberfläche. Als Folge davon wird z.B. die Migrationsfähigkeit der Zelle verändert (Shimaoka et al., 2002). Untersuchungen zeigen, dass bestimmte Integrine wie das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auch bei der Progression des Prostatakarzinoms eine Rolle spielen (Zheng et al., 1999).

2.2.3 Migration der Tumorzellen

Nach Friedl und Wolf ist die Zellmigration ein 5-stufiger, zyklischer Prozess, bei dem sich die Tumorzelle mit Hilfe eines dynamischen Zytoskeletts aktiv durch die sie umgebende extrazelluläre Matrix bewegt (Friedl et Wolf, 2009). Initial führt eine Umstrukturierung des

Aktinzytoskeletts zu einer Polarisierung der Zelle mit Ausbildung von Pseudopodien in die Bewegungsrichtung. Diese haften sich mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen, insbesondere den Integrinen, an die EZM und bilden dort neue fokale Adhäsionspunkte. Die fakultative Rekrutierung von Transmembranproteasen führt zu einer Degradation der lokalen Gewebestrukturen einige Mikrometer hinter den führenden Pseudopodien. Somit erfolgt eine räumliche Trennung von Proteolyse und Adhäsion. Die lokale perizelluläre Proteolyse ist fakultativ und abhängig von Zelltyp und der Beschaffenheit der EZM. Die Interaktion von Aktinbindenden Proteinen wie Myosin II mit Aktinfilamenten führt zu einer Kontraktion des Zellkörpers. Durch gleichzeitiges Auflösen der hinteren Adhäsionskontakte wird die Zelle in Migrationsrichtung verschoben und hinterlässt einen schlauchförmigen Matrixdefekt (Friedl et Wolf, 2009). Die für die Migration essentielle Reorganisation des Aktinzytoskeletts und die intrazelluläre Signaltransduktion werden durch GTPasen wie Ras, Rho, Rac und Cdc24 reguliert (Yamazaki et al., 2005). Auch die Serine/Threoninkinase PAK1 spielt eine wichtige Rolle bei Migrationsprozessen, indem sie die Aktinpolymerisation reguliert. PAK1 dient dabei als Effektormolekül von Rac1. Darüber hinaus sind PAK1 und Rac1 noch an vielen anderen intrazellulären Signalwegen beteiligt, die *downstream* von Integrinen und Rezeptor-Tyrosinkinasen liegen und Zellüberleben und Wachstum beeinflussen (Schmitz et al., 2000; Knaus et Bokoch, 1998).

2.2.4 Degradation der extrazellulären Matrix und Basalmembran

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexer Verbund, welcher hauptsächlich aus Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Entaktin und Tenascin aufgebaut ist (Nagle et al., 1994). Gemeinsam mit der Basalmembran (Hauptbestandteil Kollagen IV) stellt sie eine Barriere für die Tumorzellen im Metastasierungsprozess dar. Verschiedene Proteasen bewirken im Verlauf der Tumorphprogression eine Degradation der extrazellulären Matrix und der Basalmembran. Proteasen sind Enzyme, die die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren und nach der Position der zu spaltenden Peptidbindung in Exo- und Endopeptidasen eingeteilt werden. Darüber hinaus wird zwischen einer relativ unspezifischen, allgemeinen Degradation und der limitierten Proteolyse unterschieden. Bei der allgemeinen Degradation kommt es zu einer unspezifischen Inaktivierung und dem Abbau von Proteinen. Dagegen wird durch die limitierte Proteolyse das Protein an einer definierten Position hydrolysiert. Durch diesen Prozess werden inaktive Proenzyme an ihrem Wirkungsort in aktive Enzyme transformiert, wodurch spezifische biologische Aktivitäten, wie zum Beispiel die Blutgerinnung in Gang gesetzt und reguliert werden.

2.3 Lysosomale Cysteinproteasen

Cysteinproteasen sind Proteasen, die die Thiolgruppe eines Cysteins als Nukleophil bei der Katalyse verwenden. Die in dieser Arbeit diskutierten Cathepsine X, B und L sind lysosomale Cysteinproteasen aus der Papain-ähnlichen Familie C1A des Cysteinproteasen-Clans (Rawlings, Morton et Barrett, 2006). Im humanen Genom sind 11 humane lysosomale Cysteinproteasen (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X) codiert, die alle in der Regel als inaktive Proformen synthetisiert werden. Diese verfügen neben der katalytischen Domäne noch über ein Signalpeptid und eine Proregion. Das Signalpeptid ist für den Transport durch das Endoplasmatische Retikulum verantwortlich. Neben der Aufgabe als Chaperon (korrekte Faltung und Stabilisierung des nativen Proteins), ist die Proregion ein hochaffiner, reversibler Inhibitor des Enzyms, der eine vorzeitige Aktivierung verhindert. Darüber hinaus wirkt die Proregion bei neutralem pH-Wert stabilisierend auf das Enzym (Tao et al., 1994). Die Länge der Proregion variiert stark unter den lysosomalen Cysteinproteasen: von nur 38 Resten bei Cathepsin X (Nägler et Menard, 1998) bis zu 251 Resten bei Cathepsin F (Nägler et al., 1999). Eine Besonderheit des kurzen Prosegments von Cathepsin X ist neben der fehlenden Sekundärstruktur das unter den lysosomalen Cysteinproteasen einzigartige Vorhandensein eines frei exponierten RGD-Motivs (Nägler et Menard, 2003), welches als Bindemotiv für bestimmte Integrin-Klassen bekannt ist (Hynes, 2002). Durch Zellexperimente mit HUVECs konnte tatsächlich eine RGD-abhängige Interaktion von Procathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ im Bereich der Lamellipodien nachgewiesen werden (Lechner et al., 2006).

Die meisten Cathepsine sind vorwiegend Endopeptidasen. Daneben finden sich auch Exopeptidasen, wie z.B. die Monocarboxypeptidase Cathepsin X und Enzyme wie Cathepsin B, die in aktiver Form als Endo- sowie als Exopeptidase fungieren (Turk et al., 2001). Bei Cathepsin B ist eine flexible, 18 Reste lange Struktur (sogenannter *occluding loop*) innerhalb des Enzyms für diese Doppelaktivität verantwortlich. In einem Milieu mit saurem pH-Wert blockiert der *occluding loop* teilweise das Aktivitätszentrum und daraufhin wirkt Cathepsin B als Carboxydipeptidase. Bei einem neutralem pH-Wert kommt es zu einer Konformationsänderung des *occluding loop* und das Aktivitätszentrum wird nicht mehr blockiert. Nun zeigt das Enzym Endopeptidaseaktivität (Illy et al., 1997).

Für die Aktivierung der meisten Cathepsine sind ein leicht saurer pH-Wert und reduzierende Bedingungen (vorzufinden in Lysosomen) notwendig (Pisoni et al., 1990). Es wurde gezeigt, dass lysosomale Proteasen sich bei saurem pH-Wert autokatalytisch aktiviert werden können (McQueney et al., 1997). Dies trifft jedoch nur auf die Endopeptidasen zu. Im Gegensatz dazu benötigen Exopeptidasen wie Cathepsin X und C andere (Endo-)Peptidasen wie z.B. Cathepsin L oder S für deren Aktivierung (Nägler et al., 1999; Dahl et al., 2001). Durch spezifische

extrazelluläre (Cystatine, Kininogene) sowie intrazelluläre (Stefine) Inhibitoren wird die Aktivierung von humanen Cathepsinen reguliert (Barrett et al., 1986).

2.4 Biologische Funktionen der Cathepsine

Die bekannten biologischen Funktionen der lysosomalen Cysteinproteasen sind vielfältig. Auf der einen Seite sind die ubiquitär exprimierten Cathepsine B, H und L intrazellulär am allgemeinen Proteinabbau und -turnover innerhalb des lysosomalen Systems beteiligt (Barrett, 1981). Dies wurde ursprünglich als die Hauptfunktion der Cathepsine angesehen. Auf der anderen Seite werden andere lysosomale Cysteinproteasen wie Cathepsin K (Osteoklasten), Cathepsin F (Makrophagen) oder Cathepsin S (Immunzellen) überwiegend zell- oder gewebespezifisch exprimiert (Mohamed et Sloane, 2006). Ebenso ist die Aktivität der Cathepsine nicht auf die Lysosomen beschränkt. Sie werden zum Teil auch sezerniert und können in der perizellulären Umgebung als lösliche Enzyme oder gebunden an Zelloberflächenmoleküle detektiert werden. Darüber hinaus konnten aktive Cathepsine sogar im Cytosol, den Mitochondrien sowie dem Zellkern nachgewiesen werden (Brix et al., 2008).

Versuche mit Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass einzelne Cathepsine eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen spielen. Die Endopeptidase Cathepsin K ist zum Beispiel am Knochenumbau beteiligt (Saftig et al., 1998), indem sie von Osteoklasten in spezielle Räume zwischen Zelle und Knochen (sogenannte „extrazelluläre Lysosomen“) sezerniert wird (Xia et al., 1999). *Loss-of-function*-Mutationen im humanen Cathepsin K-Gen führen zu Pyknodysostosis, einer erblichen Erkrankung, die zu Störungen im Knochenaufbau führt (Gelb et al., 1996). Einige Cathepsine spielen auch eine wichtige Rolle für das Immunsystem. Cathepsin S ist an der Antigenprozessierung und dem Abbau der invarianten Kette während der MHC-Klasse-II-Molekül-abhängigen Antigenpräsentation beteiligt (Rudensky et Beers, 2006; Shi et al., 1999). Eine selektive Inhibition von Cathepsin S blockiert die Antigenpräsentation und schwächt die Immunabwehr ab (Riese et al., 1998).

Überraschenderweise können auch ubiquitär exprimierten Cathepsinen spezifische Funktionen zugeordnet werden. Bei Cathepsin L-defizienten Mäusen kommt es zu Veränderungen der Haut und Muskeln, die sich durch Haarverlust, epidermale Hyperplasie (Roth et al., 2000) und dilatative Kardiomyopathie (Stypmann et al., 2002) manifestieren. Für Cathepsin B konnte eine Beteiligung an der Thyreoglobulinfreisetzung nachgewiesen werden (Friedrichs et al., 2003).

2.5 Pathologische Rolle der Cathepsine

Den lysosomalen Cysteinproteasen werden nicht nur physiologische Funktionen zugeschrieben. Sie werden auch mit pathologischen Prozessen wie der Osteoporose (Wang et al., 2004), der rheumatoiden Arthritis (Hummel et al., 1998) und insbesondere mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht.

Cathepsine werden in vielen und besonders in aggressiven Tumoren mit einer hohen Metastasierungsrate überexprimiert. Durch unterschiedliche Methoden wie zum Beispiel Inhibitorenstudien konnte ihnen eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum, -invasion, -migration, Angiogenese und Metastasierung zugeschrieben werden (Nomura et Katunuma, 2005). Dabei variiert das Expressionsmuster der einzelnen Cathepsine zwischen verschiedenen Tumor-entitäten, Tumor-assoziierten Zellen und Progressionsgrad (Abb. 3). Dies ist ein Hinweis auf die unterschiedlichen Aufgaben der einzelnen Cathepsine im Verlauf der Tumorgenese in verschiedenen Zelltypen des Tumors und der Tumorumgebung (Mohamed et Sloane, 2006).

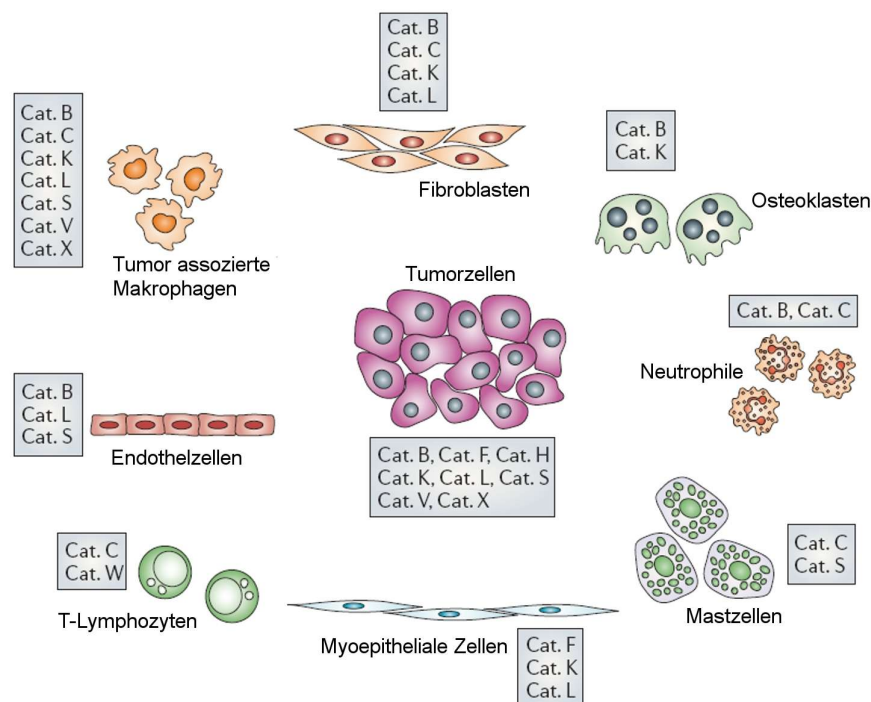


Abb. 3: Verteilungsmuster der Cathepsin-Expression in Tumorzellen und Tumor-assoziierten Zellen.

(modifiziert nach Mohamed et Sloane, 2006).

Während in normalen Zellen Cathepsine überwiegend in perinukleären Lysosomen lokalisiert sind, kommt es darüber hinaus im Laufe der Tumorprogression meist zu einer Translokation zum Zellrand oder zur Sekretion (Roshy et al., 2003 ; Frosch et al., 1999). Auch die häufig

beobachtete erhöhte Expression und besonders die Sekretion von aktiven und inaktiven Cathepsinen am Invasionsrand des Tumors ist ein deutliches Indiz für die Beteiligung an verschiedenen Invasionsprozessen wie der direkten und indirekten EZM-Degradation (Mohamed et Sloane, 2006). So ist beispielsweise Cathepsin B in Kolonepithelien am apikalen Pol vorzufinden, während es im Kolonkarzinom am basalen Pol, dem Invasionsrand exprimiert ist (Campo et al., 1994). Neben der direkten proteolytischen Degeneration von Matrixkomponenten wie zum Beispiel Laminin, Kollagen VI und Fibronectin durch Cathepsin B (Buck et al., 1992) können Cathepsine auch indirekt die Proteolyse verstärken, indem sie sich an proteolytischen Kaskaden auf der Tumorzelloberfläche beteiligen (Abb. 4). Cathepsin B und L können zum Beispiel Pro-uPA (Proform des Urokinasetyp-Plasminogen-Aktivators) aktivieren. Dessen aktive Form katalysiert zusammen mit seinem Rezeptor uPAR (uPA-Rezeptor) die Spaltung von Plasminogen in Plasmin, einer EZM-spaltenden Serinprotease (Kobayashi et al., 1992; Goretzki et al., 1992). Darüber hinaus kann Cathepsin B auch Matrixmetalloproteinasen wie MMP-1 und MMP-3 aktivieren, die ebenfalls stark zur Degradation der extrazellulären Matrix beitragen (Eeckhout et Vaes, 1977; Gocheva et Joyce, 2007). Cathepsine sind auch an der Inaktivierung von Zell-Adhäsionsmolekülen (Abb. 4) beteiligt und begünstigen damit die Migration und Invasion während der Tumorprogression (Cavallaro et Christofori, 2004). So kann der extrazelluläre Anteil von E-Cadherin durch die Cathepsine B, L und S gespalten werden (Gocheva et al., 2006).

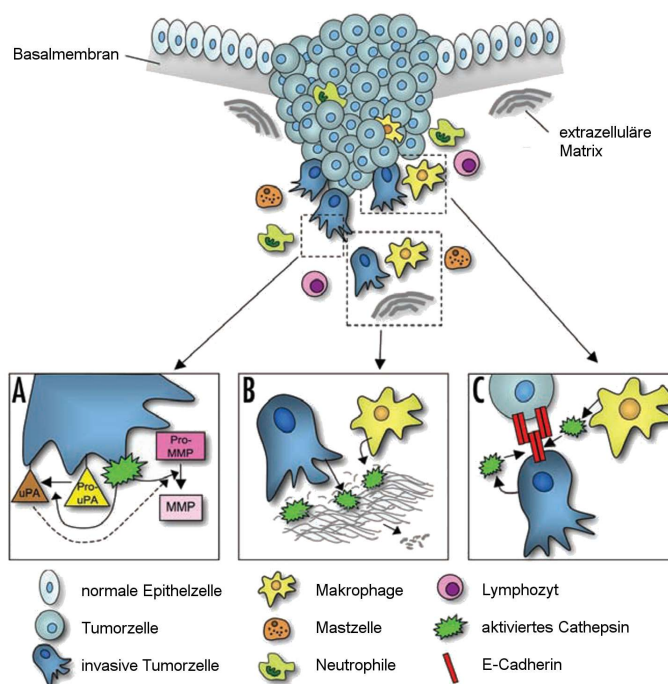


Abb. 4: Mögliche Mechanismen durch welche Cathepsine die Tumorinvasion erleichtern.

(A) proteolytische Kaskaden, (B) Degradation der EZM und/oder Basalmembran und (C) Inaktivierung von Zell-Adhäsionsmolekülen (modifiziert nach Gocheva et Joyce, 2007).

Im Prostatakarzinom wird neben den Cathepsinen B und L (Friedrich et al., 1999) besonders die Monocarboxypeptidase Cathepsin X in hohen Mengen überexprimiert (Nägler et al., 2004). Überraschenderweise wird Cathepsin X im Gegensatz zu Cathepsin B und L schon in den Vorstufen (sog. PINs) überexprimiert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Cathepsin X schon in frühen Stadien der Tumorgenese eine Rolle spielt. Die erhöhte Expression von Cathepsin X auf Proteinebene korreliert im Gegensatz zu Cathepsin B (Sinha et al., 1995) nicht mit dem Gleason-Score (Nägler et al., 2004).

2.6 MAPK-Signaltransduktion

Zellen reagieren auf extrazelluläre Signale durch Aktivierung von intrazellulären Signalwegen. Alle eukaryoten Zellen besitzen MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalwege, welche zahlreiche zelluläre Funktionen wie Mitose, Apoptose, Differenzierung, Proliferation und Motilität koordinieren. Die drei am besten beschriebenen MAPK-Signaltransduktionswege werden nach den zentralen Effektor-kinasen ERK1/2, p38 und JNK benannt. Die MAPK können auf verschiedene Stimuli reagieren, jedoch wird ERK1/2 meist durch Wachstumsfaktoren aktiviert, während JNK und p38 eher durch Stressstimuli oder Zytokine aktiviert werden (Pearson et al., 2001). Die genaue Koordination und Spezifität der MAPK-Kaskaden wird mit Hilfe von Verbindungsproteinen wie KSR und MP-1 und Modulatoren wie CNK und RKIP reguliert (Kolch, 2005).

Allen MAPK-Signalwegen liegt eine gemeinsame Aktivierungskaskade von drei Proteinkinasen (MAPKKK, MAPKK, MAPK) zugrunde (Abb. 5). Diese Anordnung von mehreren Kinasen in einer Kaskade erlaubt dabei eine Verstärkung und genaue Regulierung des Signals (Robinson et Cobb, 1997). MAPKKK sind Serin-/Threoninkinasen, welche durch Phosphorylierung oder Interaktion mit kleinen aktivierten GTP-bindenden Proteinen der Rho/Ras Familie aktiviert werden. Die MAPKKK-Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von MAPKK, welche daraufhin MAPK durch duale Phosphorylierung aktivieren. Zu den Substraten von MAPK zählen sowohl zytoplasmatische, sowie nukleäre Proteine (Lewis et al., 1998). Die MAPK regulieren die Genexpression, indem sie spezifische Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, wodurch diese an die DNA binden und den Promotor aktivieren oder hemmen (Roux et Blenis, 2004). Trotz ihrer strukturell ähnlichen Komponenten vermitteln die verschiedenen MAPK-Signaltransduktionswege weitestgehend unterschiedliche biologische Funktionen (Abb. 5). Im folgenden wird das ERK1/2 Modul näher erläutert.

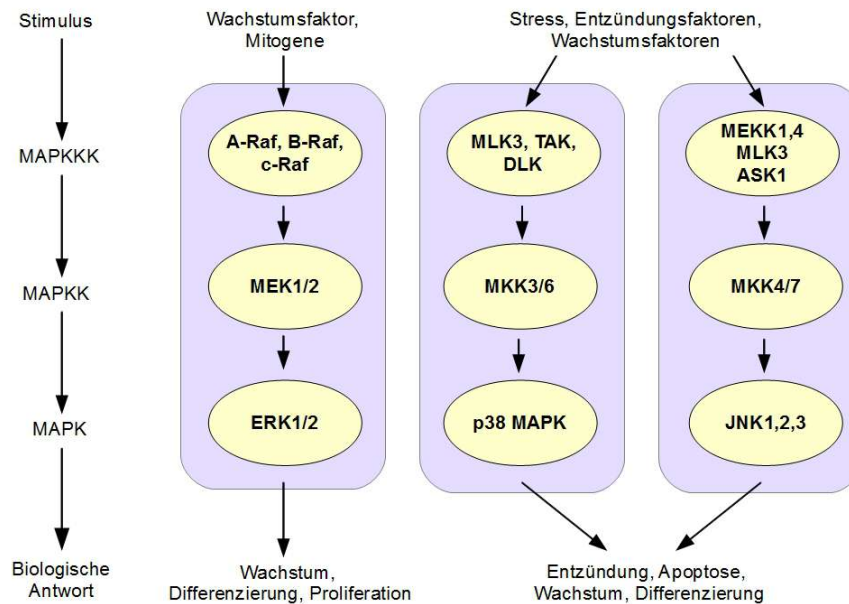


Abb. 5: Überblick über die drei gängigen MAPK-Signaltransduktionswege.

(modifiziert nach <http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>).

Der ERK1/2-Signalweg reguliert viele fundamentale zelluläre Prozesse wie die Zellproliferation, das Zellüberleben, die Differenzierung, die Apoptose und die Motilität (O'Neill et Kolch, 2004). Der klassische MAPK-Signalweg ERK1/2 besteht aus den MAPKKK A-Raf, B-Raf, und Raf-1, den MAPKK MEK1/2 und den MAPK ERK1/2 (Abb. 5). Die Aktivierung dieser Signalkaskade erfolgt hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren und Zytokine (Lewis et al., 1998), die an Zelloberflächenrezeptoren wie die Rezeptor-Tyrosinkinasen und die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren binden. Diese Rezeptoren übertragen das Signal durch verschiedene Isoformen des GTP-bindenden Proteins Ras überwiegend auf die Mitglieder der Raf-Familie. Die korrekte Regulierung von Ras und Raf ist entscheidend für eine physiologische Zellproliferation. Es konnte gezeigt werden, dass aktivierende Mutationen in den Ras- und Raf-Genen zur Tumorgenese führen können (Chong et al., 2003). Untersuchungen haben gezeigt, dass Ras in 30 Prozent aller humaner Tumoren (Repasky et al., 2004) und B-Raf in 60 Prozent aller malignen Melanome (Downward, 2003) mutiert sind. Interessanterweise werden nur in 3 Prozent der Prostatakarzinome Ras-Mutationen nachgewiesen (Clarke et al., 2009). Aktiviertes Raf bindet und phosphoryliert MEK1/2, welches ausschließlich ERK1/2 durch Phosphorylierung der Reste Threonin und Tyrosin innerhalb des charakteristischen Threonin-Glutamin-Tyrosin (TEY)-Motives aktiviert. Aktiviertes ERK1/2 hat mehr als 70 bekannte Substrate, die in allen zellulären Komponenten vorkommen, darunter nukleäre Transkriptionsfaktoren (SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc, STAT3), Proteine des

Zytoskeletts (Neurofilamente, Paxillin), Membranproteine (CD120a, Syk, Calnexin) und Kinasen (Pearson et al., 2001).

Der ERK1/2-Signaltransduktionsweg ist, wie bereits angedeutet, nicht nur bei physiologischen Prozessen entscheidend, sondern hat als Schlüsselregulator der Zellproliferation eine besondere Bedeutung bei der Tumorgenese (Kohno et Pouyssegur, 2003). Im Prostatakarzinom korreliert eine Erhöhung der MAPK-Aktivität positiv mit ansteigendem Gleason-Score und Tumorstadium (Oka et al., 2005). Umgekehrt führt die Hemmung der ERK1/2-Aktivität zu einer Reduktion der Invasionsrate von Prostatakarzinomzellen (Bessard et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass die Progression des Prostatakarzinom mit der ständigen bzw. verstärkten Aktivierung des Ras-Signalweges assoziiert ist (Weber et Gioeli, 2004).

2.7 Zelluläre Seneszenz

Der Begriff der zellulären Seneszenz wurde erstmals von Hayflick beschrieben (Hayflick, 1965). Er gründete sich auf der Beobachtung, dass normale humane Zellen in Kultur trotz ausreichendem Platz- und Nährstoffangebot nur über eine limitierte Proliferationsfähigkeit verfügen (sogenanntes *Hayflick limit*), die in einem permanenten Zellzyklusstopp endet. Intensive Forschung zeigte, dass die zelluläre Seneszenz an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen wie Altern und Krebsentstehung beteiligt ist. Einerseits fungiert sie als Tumorsuppressormechanismus, der die Proliferation und die Invasion von malignen Zellen unterdrückt (Sager, 1991; Campisi, 2001; Braig et Schmitt, 2006). Andererseits fördert sie die Alterung, indem die Regenerationsfähigkeit der Zellen reduziert wird (Campisi, 2005; Hornsby, 2002). Die zelluläre Seneszenz verfolgt somit das Prinzip der antagonistischen Pleiotropie, bei dem Prozesse, die in der Jugend durch die Vermeidung von Krebserkrankungen für den Organismus von Vorteil sind, in höheren Lebensjahren durch das schnellere Altern negative Wirkung entfalten (Kirkwood et Austad, 2000).

2.7.1 Charakterisierung des seneszenten Phänotyps

Die Hauptmerkmale des seneszenten Phänotyps sind ein permanenter Proliferationsstopp, eine veränderte Genexpression und Apoptoseresistenz. Darüber hinaus zeigt sich in der Zellkultur oft eine charakteristische Änderung der Zellmorphologie, die sich durch abgeflachte, vergrößerte Zellen und ein vakuolen-reiches Zytoplasma darstellt (Hayflick, 1965). Seneszente Zellen bleiben trotz des Wachstumsstopps weiterhin metabolisch aktiv und weisen meist den DNA-Gehalt der G1 Phase auf (DiLeonardo et al., 1994; Ogrzyzko et al., 1996). Einige

Tumorzellen, die sich üblicherweise in Kultur unendlich teilen, können insbesondere nach Einsatz bestimmter Krebstherapien einen Seneszenz-ähnlichen Zustand mit einem DNA-Gehalt entsprechend der G2- oder S-Phase erreichen (Shay et Roninson, 2004). Der permanente Verlust der Teilungsfähigkeit erfolgt hauptsächlich auf Grund einer stark veränderten Genexpression bekannter Zellzyklusinhibitoren und -aktivatoren (Campisi, 2005). Die Expression der zwei dominanten Zellzyklusinhibitoren p21 (CDKN1a) und p16 (CDKN2a) ist besonders oft erhöht (Campisi, 2001; Braig et Schmitt, 2006). p21 und p16 sind Komponenten von Tumorsuppressorsignalwegen, die durch die Transkriptionsfaktoren p53 und das Retinoblastomprotein (pRB) reguliert werden.

Die Apoptose stellt neben der Seneszenz ebenfalls einen wichtigen Tumorsuppressor-mechanismus dar (Green et Evan, 2002). Während jedoch der Mechanismus der zellulären Seneszenz ein Wachstum verhindert, eliminiert der programmierte Zelltod geschädigte oder gestresste Zellen. Die meisten seneszenten Zellen sind durch einen weitgehend unbekanntem Mechanismus resistent gegen bestimmte Apoptosesignale (Ryu et al., 2008; Ryu et al., 2007). Die Apoptoseresistenz könnte teilweise die lange Stabilität von seneszenten Zellen in Zellkultur erklären bzw. die steigende Anzahl von seneszenten Zellen im Alter (Campisi, 2007). In manchen Fällen kann Seneszenz jedoch auch zur Aktivierung von Signalwegen des programmierten Zelltods führen (Nogueira et al., 2008; Weinmann et al., 2008).

Für den Nachweis von seneszenten Zellen in der Zellkultur und *in vivo* gibt es verschiedene Marker, von denen jedoch keiner spezifisch für zelluläre Seneszenz ist. Ein gängiger Marker ist die Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase (SA- β -Gal)-Aktivität, welche durch histochemische Färbung in der Mehrzahl der seneszenten Zellen detektierbar ist (Dimri et al., 1995). Die SA- β -Gal (lysosomale β -Galaktosidase) spiegelt die Zunahme der lysosomalen Masse und Aktivität wieder, die gewöhnlich in seneszenten Zellen zu beobachten ist (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006; Gerland et al., 2003). Jedoch kann eine Erhöhung der SA- β -Gal-Aktivität auch durch Zellstress, beispielsweise anhaltende Konfluenz in Zellkultur induziert werden.

Der seneszente Phänotyp kann in präseneszenten Zellen durch verschiedenste Stimuli induziert werden (Abb. 6). Die Ursache für das *Hayflick limit* ist in den meisten Zellen die fortschreitende Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung (sogenanntes Endreplikationsproblem), die in dysfunktionalen Telomeren endet. Diese dysfunktionalen Telomere triggern Seneszenz durch die Aktivierung des p53-Signalweges (Herbig et al., 2004). Daneben existieren andere Stimuli wie Telomer-unabhängige DNA-Schäden, starke mitogene Signale wie beispielsweise Onkogene (Onkogen-induzierte Seneszenz) und nicht-genotoxischer Stress wie Chromatin-Perturbation oder andere bis jetzt unbekannte Stressoren (Campisi, 2007).

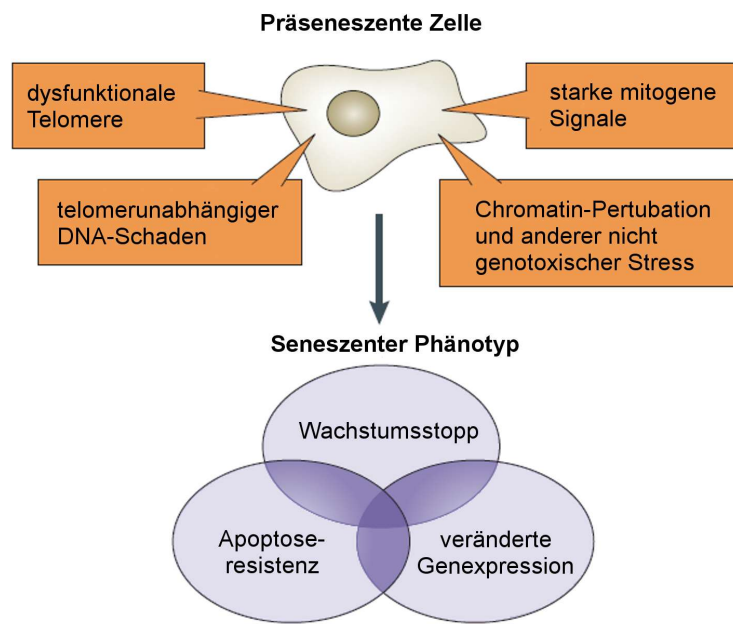


Abb. 6: Schematische Darstellung des seneszenten Phänotyps.

Die Transformation der präseneszenten Zelle zum seneszenten Phänotyp kann durch multiple Stimuli erfolgen (modifiziert nach Campisi et d'Adda di Fagagna, 2007).

2.7.2 Regulation der Seneszenz durch Tumorsuppressorsignalwege

Die Aktivierung der beiden Tumorsuppressorsignalwege p53-p21 und p16-pRB durch Seneszenz-induzierende Signale etabliert den seneszenten Wachstumsstopp. Je nach Zelltyp und Stimulus können diese Signalwege interagieren oder auch unabhängig voneinander den Zellzyklus anhalten. Obwohl in den meisten seneszenten Zellen entweder der p53-p21- oder der p16-pRB-Signalweg bzw. beide aktiv sind, gibt es auch Beispiele in denen keiner der beiden Signalwege verwendet wird. In diesem Fall spricht man von p53- und p16-unabhängiger Seneszenz (Olsen et al., 2002; Michaloglou et al., 2005).

Der p53-Signalweg wird überwiegend durch DNA-schädigende Stimuli (zum Beispiel ionisierende Strahlung und Telomerdysfunktion) aktiviert und wird an multiplen Punkten durch verschiedene Proteine reguliert. So aktivieren DNA-Schäden via Proteinkinasen wie ATM oder CHK2 bevorzugt p53 (Banin et al., 1998). Ebenso können onkogene Signale wie Ras den Schlüsselmediator ARF (*alternate reading frame protein*) induzieren (Zindy et al., 1998), der wiederum die p53-ubiquitinierende E3-Ligase HDM2 (erleichtert Degradation von p53) und damit dessen Funktion inhibiert (Sherr et McCormick, 2002) (Abb. 7). In Folge dessen kommt es zu einer Akkumulation von p53, wodurch die Bildung des Proteins p21 induziert wird (Jackson et Pereira-Smith, 2006). Der Zellzyklusinhibitor p21 fungiert als entscheidender Mediator der

p53-abhängigen Seneszenz (Brown et al., 1997). Jedoch vermittelt p21 auch den transienten, durch DNA-Schäden induzierten Proliferationsstopp.

Die Mechanismen der Stimulation des p16-pRB-Signalweges sind noch weitgehend unklar. Jedoch konnte gezeigt werden, dass durch die Aktivierung von onkogenem Ras die Expression des Tumorsuppressorproteins p16 induziert wird. Ebenso können Zellkultivierung (Rodier et Campisi, 2011) und DNA-Schäden (Stein et al., 1999) als Stimulus fungieren. p16 verhindert die Phosphorylierung und Inaktivierung von pRB und somit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F (Sherr et McCormick, 2002), der normalerweise die Expression von Zellzyklusproteinen stimuliert (Abb. 7). E2F kann ebenso durch Induktion der ARF-Expression und folgende Aktivierung des p53-Signalweg die Zellproliferation einschränken. Zudem kann p21 ebenso die Phosphorylierung und infolgedessen die Inaktivierung von pRB hemmen (Campisi, 2007). Folglich existiert eine reziproke Regulation zwischen dem p53- und dem p16-pRB-Signalweg (Campisi, 2007).

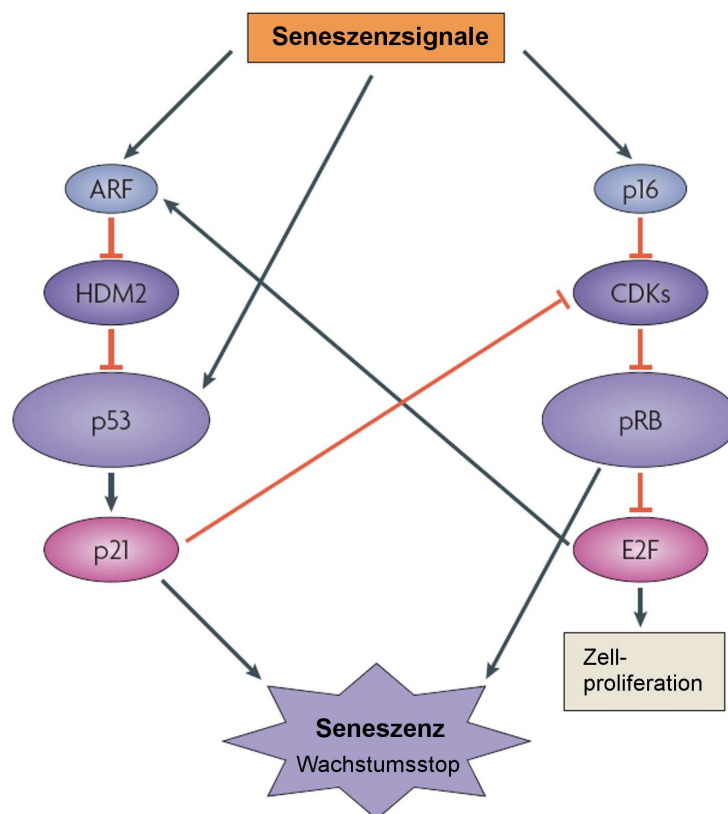


Abb. 7: Schematische Darstellung der Tumorsuppressorsignalwege p53 und p16.

Seneszenz wird hauptsächlich durch die beiden Tumorsuppressorsignalwege p53 und p16 kontrolliert. Diese können auch in Wechselwirkung miteinander treten (modifiziert nach Campisi, 2007).

2.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit war die pathologische Funktion der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin X noch weitgehend unbekannt. Da neben den Cathepsinen B und L besonders Cathepsin X im Prostatakarzinom und auch schon in dessen Vorstufen (sogenannte PINs) überexprimiert wird (Nägler et al., 2004), ließ dies darauf schließen, dass Cathepsin X im Rahmen der Tumorprogression des Prostatakarzinoms eine besondere Stellung einnimmt.

Darauf basierend sollte eine weitere Funktionsaufklärung mittels *in vitro*-Untersuchungen erfolgen, wobei sich für die Promotionsarbeit nachfolgende Fragestellungen ergaben:

- Welchen Einfluss haben die Cathepsine X, B und L auf das Invasions- und Migrationsverhalten von PC-3-Zellen?
- Welche zusätzlichen extrazellulären Funktionen könnten die Cathepsine X, B und L im Rahmen der Tumorprogression haben?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen zellulärer Seneszenz und der Expression der Cathepsine X, B und L?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte durch die folgenden wesentlichen Zielsetzungen erreicht werden:

1. Knock-Down von Cathepsinen in Prostatakarzinomzellen und Charakterisierung der Cathepsin-defizienten Zellen

Zur detaillierten Aufklärung der Funktion von Cathepsinen bei Invasions-/Migrationsprozessen sollte die zelluläre Bildung und Aktivität der Proteasen möglichst gezielt unterbunden werden. Da die derzeit verfügbaren Cysteinprotease-Inhibitoren größtenteils unspezifisch und/oder nicht zellgängig sind, sollte die Ausschaltung der Proteasen mittels der siRNA-Technologie erfolgen. Die Prostatakarzinomzellen sollten dazu mit siRNAs gegen Cathepsin X, B und L nach einem von uns etablierten Protokoll transfiziert werden. Danach sollte das Wanderungsverhalten der Cathepsin-defizienten PC-3-Zellen in Transwellassays untersucht werden.

2. Einfluss extrazellulärer Cathepsine auf den ERK-Signalweg (*outside-in-signaling*)

Da Procathepsin X von Prostatakarzinomzellen sezerniert wird und RGD-abhängig an Integrin $\alpha_v\beta_3$ binden kann (Lechner et al., 2006), könnte Procathepsin X als Ligand für Integreine fungieren und hierdurch Signaltransduktionskaskaden beeinflussen. Um dies zu untersuchen, sollte die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 mit dem exogen zugegebenen Procathepsin X

stimuliert werden und die Aktivierung bzw. Deaktivierung intrazellulärer Signalwege mittels Immunoblot analysiert werden. Inwiefern auch andere Cathepsine eine Signaltransduktion auslösen könnten, sollte in weiteren Stimulationsversuchen geklärt werden.

3. Charakterisierung des Phänotyps Cathepsin-defizienter Prostatakarzinomzellen

Cathepsin X-, B- und L-defiziente Prostatakarzinomzellen wiesen morphologische Merkmale seneszenter Zellen auf. Deshalb sollte der Phänotyp Cathepsin-defizienter PC-3-Zellen mittels Analyse verschiedener Seneszenzmarker, wie der Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase-Aktivität oder der Expression von Zellzyklusinhibitoren, näher charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

3.1.1 Geräte in der Zellkultur

Epifluoreszenzmikroskop Olympus IX70	Olympus, Feldkirchen-Westerham
Kamera SensiCam QE PCO	CCD Imaging, Kehlheim
Mikroskop Olympus IX50	Olympus, Feldkirchen-Westerham
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Instruments, Göttingen
Stickstofftank Locator 4	Sigma, Taufkirchen
Spektrofluorimeter Safire 2	Tecan, Crailsheim
Zellkulturbrutschrank Jouan IG 150	Jouan GmbH, Unterhaching
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus Sepatech, München

3.1.2 Geräte für die Molekularbiologie

Heissluft Inkubatorofen	ITE Infrons AG, Bottmingen, Schweiz
PCR Thermal Cycler LightCycler™ II	Roche, Mannheim
PCR Thermal Cycler T <i>personal</i> Whatman	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer Uvikon 930	Kontron Instruments, Eching
Tiefkühlgefrierschrank Colora UF 85-300S (-80°C)	Colora, Lorch
Zentrifuge Eppendorf 5415 D	Eppendorf, Hamburg

3.1.3 Geräte für die Proteinchemie

Analysenwaage, A 120 S	Satorius, Göttingen
Image Scanner	Pharmacia, Freiburg
Kühlzentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer Thermal Stirrer	Bachofer, Reutlingen
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Microtek Laborsysteme, Overath
Orbitalschüttler Certomat´ R	Braun Biotech International, Melsungen

Proteinelektrophoreseeinheit Mighty Small II	Hoefler, Heidelberg
Proteintransfereinheit Fastblot B33	Biometra, Göttingen
Spektrofluorimeter Safire II	Tecan, Crailsheim
Technische Waage, MA AF200	Satorius, Göttingen
Ultraschalllanze Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Wasserbad Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

3.2 Bioinformatische Hilfsmittel

Image-Pro™ PLUS	Media Cybernetics, Silver Spring, USA
ImageJ	National Institutes of Health, USA
LightCycler Software 3.5	Roche, Mannheim
Mikrowin2000 V4.0	Microtek Laborsysteme, Overath
Magic Scan V4.4	Pharmacia, Freiburg
TotalLab Quant	TotalLab Limited, Newcastle, UK
XFluor4 Safire2	Tecan, Crailsheim

3.3 Allgemeine Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt wurden, hatten „p. a.“ Qualität und wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) oder Merk (Darmstadt) bezogen.

3.4 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Methoden

AmpoLabeling-LPR-Kit	SuperArray, Bethesda, USA
Biotin-16-dUTP	Roche, Mannheim
DNase	Sigma, Deisenhofen
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD, Hercules, USA

Human Cancer PathwayFinder™ Gene Array	SuperArray, Bethesda, USA
Human ECM & Adhesion Molecules Gene Array	SuperArray, Bethesda, USA
Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR green I-Kit	Roche, Mannheim
LightCycler™-Kapillaren	Roche, Mannheim
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden

3.4.1 Oligonukleotide

Alle siRNA-Oligonukleotide wurden von Qiagen (Hilden) bezogen sowie laut Herstellerangaben gelagert und verwendet. Die Abkürzungsbezeichnungen sind in Klammern gesetzt. Die Sequenzen sind nachfolgend in 5'-3'-Richtung aufgeführt.

Nonsilencing (Negativkontrolle) (NS)

Zielsequenz AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT
 Sense UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT
 Antisense ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT

CatX304 (CatX1)

Zielsequenz AAC GGA TCG GAT CAA CAT CAA
 Sense CGG AUC GGA UCA ACA UCA AdTdT
 Antisense UUG AUG UUG AUC CGA UCC GdTdT

CatX913 (CatX2)

Zielsequenz AAT CGT GAC CAG CAC CTA TAA
 Sense UCG UGA CCA GCA CCU ACG AdTdT
 Antisense UUA UAG GUG CUG GUC ACG AdTdT

CatL440 (CatL1)

Zielsequenz AAC CGT TAC CAG CAC GTG TAA

Sense CGG UGA CCA GCA CGU UCA AdTdT

Antisense UUA CAC GUG CUG GUC UCC AdTdT

Die folgenden siRNA-Oligonukleotide waren vorgefertigte Konstrukte der Firma Qiagen.

Hs_CTSX_4 (CatX3)	Qiagen, Hilden
Hs_CTSB_6 (CatB1)	Qiagen, Hilden
Hs_CTSB_7 (CatB2)	Qiagen, Hilden
Hs_CTSL_5 (CatL2)	Qiagen, Hilden

3.4.2 Primer für die qRT-PCR

Cathepsin X	Search LC, Heidelberg
Cathepsin B	Search LC, Heidelberg
Cathepsin L	Search LC, Heidelberg
GAPDH	Search LC, Heidelberg
MMP9	Search LC, Heidelberg
p21	Qiagen, Hilden
p16	Qiagen, Hilden
p53	Qiagen, Hilden

3.5 Zelllinien

Die Zelllinien PC-3, LNCaP und DU145 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

PC-3

Die PC-3-Zelllinie entstammt einem 62-jährigen männlichen Spender kaukasischen Ursprungs

und wurde 1979 aus einer Knochenmetastase eines androgenunabhängigen Prostataadenokarzinoms Grad VI isoliert (Kaighn et al., 1979).

LNCaP

Die LNCaP-Zelllinie wurde 1977 aus dem linken supraklavikulären Lymphknoten eines 50-jährigen männlichen Kaukasiers mit bestätigtem metastatischem Prostatakarzinom isoliert. LNCaP-Zellen sind androgenabhängig (Horoszewicz et al., 1980).

DU145

Die DU145-Zelllinie wurde 1975 aus einer Läsion des Gehirns eines 69-jährigen Patienten kaukasischen Ursprungs mit androgenunabhängigen Prostatakarzinom isoliert (Mickey et al., 1980).

3.6 Chemikalien und Materialien für zellbiologische Methoden

Accutase	PAA, Linz, Österreich
Costar-Transwell-Filter 6,5 mm Ø, 8 µm Porengröße	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DMEM mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Linz, Österreich
nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAA, Linz, Österreich
Fötale Kälberserum Gold (FKS)	PAA, Linz, Österreich
Galacto-Light™ System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Glutardialdehyd	Roth, Karlsruhe
HiPerfect	Qiagen, Hilden
humane extrazelluläre Matrix (hEZM)	BD Biosciences, Bedford, USA
Humanes Serum	PAA, Linz, Österreich
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Nunc, Wiesbaden
L-Glutamin (100x)	Invitrogen, Karlsruhe

Nalgene™Cryo 1°C Einfrierbehälter	Nunc, Wiesbaden
Natrium-Pyruvat	PAA, Linz, Österreich
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nutridoma	Roche, Mannheim
PBS (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -frei)	PAA, Linz, Österreich
RPMI mit 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/l Glukose	PAA, Linz, Österreich
Senescence β-Galactosidase Staining Kit	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Tryptanblau, 0,5 % (w/v) in PBS	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA, 10 x Lösung	PAA, Linz, Österreich
VenorGeM®-Kit (Mykoplasmen-Nachweis)	Minerva Biolabs, Berlin
Zellkulturgefäße (T75, T175)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96-Well)	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstaedt, Nümbrecht

3.6.1 Proteine

Vitronektin	Promega, Mannheim
humane extrazelluläre Matrix (hEZM)	BD Bioscience, Bedford, USA
humanes Procathepsin X	Sivaraman et al., 2000
humanes Cathepsin X	Nägler et al., 1999
humanes Cathepsin B	Nägler et al., 1997
humanes Cathepsin L	Biniossek et al., 2011
fötale Kälberserum Gold (FKS)	PAA, Linz, Österreich

3.6.2 Inhibitoren

U0126	Promega, Mannheim
Wortmannin	Sigma, Deisenhofen

3.7 Chemikalien und Materialien für proteinchemische Techniken

Acrylamid : Bisacrylamid (37,1 : 1)	Serva, Heidelberg
Albumin-Standardlösung (BSA)	Pierce, Rockford, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
BC Assay Reagenz A und B	Interchim, Montluçon, Frankreich
BioMax Filme	Kodak, Rochester, USA
BioMax Filmkassette	Kodak, Rochester, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva, Heidelberg
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DQ™ BSA, Fluoreszein konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
DQ™ Kollagen I, Fluoreszein konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
DQ™ Kollagen IV, Fluoreszien konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Glyzerol	Merck, Darmstadt
Glyzin	Merck, Darmstadt
Hyperfilm-MB Filmkassette	Amersham, Braunschweig
Inhibitorcocktail III	Merck/Calbiochem, Darmstadt
LumiGLO®	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Kassel
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
NuPAGE™ Novex 4-12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe

Methanol	Merck, Darmstadt
Quantikine® pro-Cathepsin B Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
SeeBlue® Plus2 Protein-Molekularstandard	Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal®West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	BIO-RAD, Hercules, USA
Tris-HCl	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Serva, Heidelberg
Whatman Filterpapier Nr.1	Whatman/Vetter, Ammerbuch

3.7.1 Antikörper

MultiplexWestern I	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (E10)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-p42 MAP Kinase (3A7)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-Phospho-MEK	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-MEK	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-Phospho-Rac-1	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-Rac-1 (monoklonal)	BD Bioscience, Bedford, USA
Anti-phospho-PAK	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-PAK	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-ProCathepsin X (Kaninchen)	Nägler et al., 2006
Anti-ProCathepsin X (Ziege)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-Aktin	Sigma, Deisenhofen
Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugierter Antikörper	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-Maus-IgG, HRP-konjugierter Antikörper	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-Ziege/Schaf-IgG-PoD	Sigma, Deisenhofen

3.8 Zellbiologische Methoden

3.8.1 Kultivierung und Aufbewahrung der Zelllinien

Die Zelllinien PC-3 und LNCaP wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert, dem 10 % fötales Kälberserum (PAA Laboratories), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen Corporation), 1 % Natrium-Pyruvat (PAA Laboratories) und 1 % nicht-essentielle Aminosäuren (PAA Laboratories) zugesetzt wurden. Die Zelllinie DU145 wurde in DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (PAA Laboratories), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen Corporation), 1 % Natrium-Pyruvat und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert. Die Inaktivierung der im fötalen Kälberserum (FKS) enthaltenen Komponenten des Komplementsystems erfolgte durch 30-minütiges Erhitzen auf 56°C.

Die Routinekultivierung der Zellen erfolgte in 75 ml-Zellkulturgefäßen im Zellkulturbrutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Konzentration und 90 % Wasserdampfsättigung, wobei die Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % (alle 2-3 Tage) passagiert wurden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellschicht wurde für 10 Minuten mit einer Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, um die Zellen von der Plastikoberfläche zu lösen. Die Trypsinaktivität wurde durch die Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Durch anschließende 10-minütige Zentrifugation der Zellsuspension bei 300 g wurde die Trypsin-EDTA-Lösung entfernt. Nach Resuspension mit frischem Kulturmedium wurden die Zellen gezählt und in neue Gewebekulturflaschen ausgesät.

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen für 10 Minuten bei 300 g sedimentiert, in sterilem Einfriermedium (Kulturmedium mit 20 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Daraufhin wurden die Zellen in einem Einfriercontainer („Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container“, Nunc) bei -80°C über Nacht schonend eingefroren, um am nächsten Tag für die Langzeitlagerung in einen Stickstofftank überführt zu werden.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen zügig bei 37°C aufgetaut bis nur noch ein Eiskern vorhanden war und in das vorgewärmte Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 g für 10 Minuten sedimentiert, um das zelltoxische DMSO vollständig zu entfernen. Nach Resuspension in Kulturmedium wurden die Zellen in neue Gewebekulturflaschen ausgesät.

3.8.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurde ein Aliquot der Zellen 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0,5 %

(w/v) Trypanblau in PBS) verdünnt. Trypanblau färbt tote Zellen blau, während es von vitalen Zellen aktiv ausgeschlossen wird. Unter dem Mikroskop wurde anschließend die Zellanzahl in vier Quadranten bestimmt und die Zelldichte wie folgt berechnet:

$$\text{Mittelwert der vier Großquadrate} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$$

3.8.3 Serumfreie Zellkultur und Stimulation der PC-3-Zellen

Zur Untersuchung der Aktivierung von Signaltransduktionswegen in PC-3-Zellen durch Cathepsine und Vitronektin sollten störende Einflüsse durch Komponenten des Kälberserums wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die Zellen während der Stimulationsexperimente unter serumfreien Bedingungen mit RPMI 1640-Medium, das 1 % Nutridoma enthielt, kultiviert.

Vor jedem Stimulationsexperiment wurden PC-3-Zellen in 6-Well-Platten (5×10^4 Zellen/Well mit jeweils 2 ml Medium/Well) ausgesät. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Kulturmedium gegen vorgewärmtes Hungermedium (RPMI 1640-Medium mit 1 % Nutridoma) gewechselt, nachdem die Zellen einmal vorsichtig mit vorgewärmtem PBS gewaschen worden waren. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden je nach Versuchsaufbau vordefinierte Zellen für 1 Stunde mit 10 μM Inhibitor (U0126, Wortmannin) vorinkubiert, bevor die zur Stimulierung verwendeten Proteine vorsichtig ins serumfreie Medium gegeben wurden. Zu den unstimulierten Zellen wurde PBS bzw. Lagerungspuffer (50 mM NaAcetat, 150 mM NaCl, 100 μM Methylmethanthiolsulfonat, pH 5,0) als Kontrolle zugegeben. Die Zellen wurden für die Dauer der Stimulation im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Das weitere Vorgehen wird in Absatz 1.9.2. *Herstellung von Zelllysaten zur Analyse phosphorylierter Proteine* erläutert.

3.8.4 Stimulation der PC-3-Zellen mit Proteinen der extrazellulären Matrix

Um mögliche Effekte von EZM-Proteinen auf die Expression von Cathepsinen in PC-3-Zellen zu untersuchen, wurden die PC-3-Zellen mit Vitronektin (Promega) und humaner extrazellulärer Matrix (BD Biosciences) für 1, 4 oder 7 Tage inkubiert. Vitronektin wird aus humanem Plasma gewonnen und fungiert als Zelladhäsionsmolekül, das die Migration beeinflusst. Die humane extrazelluläre Matrix ist ein löslicher Basalmembran-Extrakt, der aus humaner Plazenta gewonnen wird und vor allem Laminin, Collagen IV und Heparansulfat beinhaltet.

Vor jedem Stimulationsexperiment wurden 12-Well-Platten in Tripletts mit jeweils 1 µg Vitronektin bzw. hEZM in 1 ml PBS (PAA Laboratories) für 6 Stunden bei 4°C beschichtet. Nach vorsichtiger Aspiration des PBS wurden je nach geplanter Inkubationsdauer 10.000, 20.000 oder 50.000 Zellen pro Well in 1 ml Kulturmedium ausgesät. Anschließend wurden 5 µg/ml Vitronektin bzw. hEZM zugegeben. Die Zellysate, die Zellkulturüberstände und die RNA wurden nach den in den folgenden Kapiteln genannten Verfahren nach 1, 4 und 7 Tagen Inkubation bei 37°C isoliert.

3.8.5 Knock-Down der Cathepsine X, B und L durch siRNA-Transfektion

Um einen selektiven Knock-Down der Cathepsine X, B und L in PC-3-Zellen zu erreichen, wurde die siRNA-Technologie verwendet. Hierzu wurden PC-3-Zellen in 6- bzw. 12-Well-Platten in einer Konzentration von 5.000 Zellen/cm² ausgesät und für 6 Stunden bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die Transfektion wurde nach dem Protokoll der Firma Qiagen (HiPerFect) durchgeführt. Für die Transfektion wurde eine siRNA-Endkonzentration von 10 nM gewählt. Die siRNA wurde mit 18 µl HiPerfect (Qiagen) und 100 µl serumfreiem Medium vermischt. Dieses Transfektionsgemisch wurde nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur tröpfchenweise auf die adhärenen Zellen gegeben.

Um mögliche Oligonukleotid-abhängige Nebeneffekte auszuschließen, wurde für den Knock-Down der einzelnen Cathepsine jeweils mehrere Oligonukleotide eingesetzt, die an unterschiedliche Sequenzen der Cathepsin-mRNA binden. Als Negativkontrolle wurde eine *Non-silencing*-siRNA (NS-siRNA) verwendet, die keine Sequenzübereinstimmungen mit bekannten mRNA-Sequenzen zeigt.

3.8.6 Invasionsassay

Für Untersuchungen des Invasionsverhaltens der Prostatakarzinomzellen wurde das Prinzip der Boyden-Kammer verwendet (Abb. 8). Die Membranen der 24-Well-Einsätze (Porengröße 8 µm, BD Biosciences) wurde mit humaner EZM (BD Biosciences) beschichtet, um *in vitro* eine Basalmembran (BM) nachzubilden.

Die Stammlösung der hEZM wurde bei -80°C in Aliquots (120 µg) gelagert. Nach dem Auftauen eines Aliquots hEZM auf Eis wurde die Stammlösung in 2,4 ml serumfreiem, Nutridomahaltigem (1 %) Medium gelöst. Hiervon wurden 200 µl/Well bzw. 10 µg hEZM auf die Membranen gegeben und über Nacht bei offenem Deckel unter sterilen Bedingungen getrocknet. Die Membranen wurden am nächsten Tag durch Zugabe von 200 µl serumfreiem Medium und einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur rehydriert. Nach vorsichtiger

Aspiration des überschüssigen Mediums, wurde die gewünschte Zellanzahl in 200 µl serumfreiem Medium (mit 1 % Nutridoma) auf die rekonstituierte Membran gegeben. Die untere Kammer wurde anschließend mit 600 µl Nutridoma-haltigem (1 %) Medium und humanem Serum (10 %) als chemotaktischer Zusatz befüllt. Nach 2 bzw. 3 Tagen Inkubationszeit bei 37 °C wurde das Medium aspiriert und die nicht migrierten Zellen mit einem in PBS getauchten Wattestäbchen von der Oberseite der Membran vorsichtig entfernt. Danach wurde der Einsatz einmal mit 800 µl PBS für 2 min gewaschen, um danach die migrierten Zellen für 10 Minuten mit 800 µl 100%-igem Methanol bei -20°C zu fixieren. Nach der Rehydratation (800 µl PBS, 0,2 % Triton-X-100 für 10 Minuten bei Raumtemperatur) wurden die Zellkerne mit DAPI (1:7500 in PBS, 600 µl zugeben für 3 Minuten bei Raumtemperatur) gefärbt. Um eventuelle Reste von DAPI vollständig zu entfernen, wurden die Einsätze dreimal mit PBS (800 µl) gewaschen. Anschließend wurden je 1,6 ml PBS in die Vertiefungen gegeben und die Einsätze mit 4-facher Vergrößerung fotografiert. Pro Einsatz wurden drei Gesichtsfelder unter Benutzung der *Image-Pro™ PLUS-Software* (Media Cybernetics) ausgezählt. Die Invasionsrate wurde als Quotient der gewanderten Zellen gegenüber der eingesetzten Zellen berechnet. Der Invasionsindex repräsentiert die Invasionsrate der behandelten Zellen geteilt durch die Invasionsrate der Kontrollzellen.

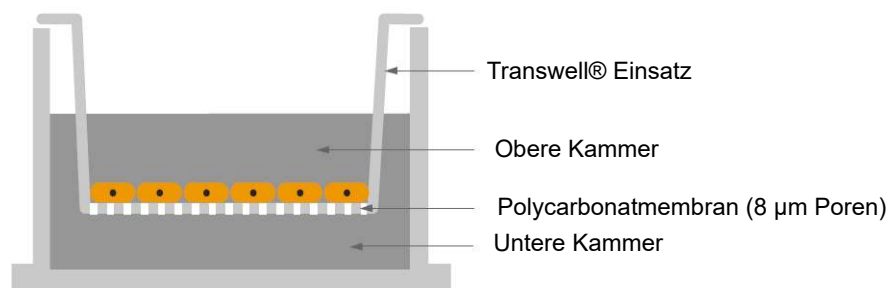


Abb. 8 : Schema eines Transwell®Kammer-Systems.

(modifiziert nach Corning Incorporated, NY)

3.8.7 Bestimmung der Seneszenz-assoziierten-β-Galaktosidase-Aktivität

3.8.7.1 Zytochemische SA-β-Galaktosidasefärbung

Die Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase (SA-β-Gal)-Aktivität wurde mit Hilfe des *Senescence β-Galactosidase Staining Kit* (CellSignaling Technology) bei pH 6 bestimmt. Der Nachweis erfolgt hierbei über die Spaltung des Substrates X-Gal durch die SA-β-Gal mit anschließender Oxidation des Produkts durch Luftsauerstoff, wodurch ein tiefblauer Farbstoff entsteht (Dimri et al., 1995). Für den Versuch wurden 30.000 PC-3-Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und mit siRNAs gegen Cathepsin X, B und L und Kontroll-siRNAs transfiziert.

Nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen nach dem Protokoll des Herstellers gefärbt. Für eine längerfristige Lagerung der gefärbten Zellen wurde die Färbelösung entfernt, um die Zellen daraufhin mit Glycerinlösung (70 %) zu bedecken und bei 4°C zu lagern. Die blau gefärbten Zellen wurden mit 10-facher Vergrößerung fotografiert und sieben Gesichtsfelder pro Well mit Hilfe eines Färbeindex ausgewertet. Hierbei wurden je nach Intensität der Färbung Punkte von 0 (= keine Färbung) bis 3 (= starke Färbung) pro Zelle vergeben. Der Quotient aus der Summe der Punkte und der Gesamtzellzahl der Gesichtsfelder ergab den Färbeindex.

3.8.7.2 Quantitative Detektion der SA- β -Galaktosidase-Aktivität

Zur Überprüfung und Bestätigung der Ergebnisse der zytochemischen SA- β -Galaktosidasefärbung, wurde noch eine zweite Methode - die Galacton Chemilumineszenz Methode (Bassaneze et al., 2008) - verwendet, um die SA- β -Gal-Aktivität zu bestimmen.

Vor Versuchsbeginn wurde eine 12-Well-Platte mit je 10.000 PC-3-Zellen/Well beschichtet, mit siRNAs gegen Cathepsin X, B und L sowie Kontroll-siRNAs jeweils in Triplets transfiziert und für fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und jeweils mit 250 μ l Lysispuffer (Galacto-Light™, Applied Biosystems) bedeckt. Nach einer kurzen Lysephase wurde das Zelllysate für 2 Minuten bei 600 g sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 10 μ l des jeweiligen Überstandes auf eine 96-Well-Platte transferiert und mit je 70 μ l Reaktionspuffer (Galacto-Light™, Applied Biosystems) versetzt. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, wurde jeweils 100 μ l Accelerator(-II) zugegeben und sofort die Lumineszenz im Spektrofluorimeter (Safire II, Tecan) gemessen.

3.8.8 Quantifizierung der Proliferation

Um die Proliferationsrate von Zellen zu quantifizieren, wurde die Zellzahl zu festgelegten Zeitpunkten bestimmt und auf die zum Zeitpunkt 0 gemessenen Zellen normiert. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der mit einem Emissionmaximum bei 461 nm spezifisch DNA darstellt.

Zu Beginn wurden PC-3-Zellen mit Cathepsin X- sowie mit NS-siRNA transfiziert. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Zellen jeweils in Triplets in einer Konzentration von 4000 Zellen pro Well auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach weiteren 24 Stunden wurde die erste DAPI-Färbung nach folgendem Protokoll durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen zweimal mit je 200 μ l PBS pro Well gewaschen, um danach mit einer 5%-igen Glutardialdehydlösung (200 μ l pro Well) fixiert zu werden. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten mit 0,2 % (v/v)

Triton-X-100 bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach der Färbung mit je 200 µl DAPI-Lösung (1:7500 in PBS) pro Well wurden die Zellen nochmals zweimal mit je 200 µl PBS pro Well gewaschen. Bei allen genannten Schritten wurden die Lösungen nicht abgesaugt, sondern die 96-Well-Platte vorsichtig auf Zellstoff ausgeklopft, um eine vorzeitige Ablösung der Zellen zu verhindern. Die Auswertung erfolgte mittels Epifluoreszenzmikroskopie, bei der pro Well drei Gesichtsfelder fotografiert und die Zellkerne unter Benutzung der *Image-Pro™ PLUS-Software* (Media Cybernetics) ausgezählt wurden.

3.9 Molekularbiologische Methoden

3.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Tumorzellen

Um die mRNA-Expression in PC-3-Zellen zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) isoliert. Zuerst wurden die adhärenen Zellen mit PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen und Zellreste zu entfernen. Die Zelllyse der PC-3-Zellen erfolgte mit 350 µl Lysepuffer, der mit 10% β-Mercaptoethanol versetzt war. Danach wurde die Homogenisierung des Zellmaterials unter Verwendung des *QIAshredder Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um eine störende Amplifikation von DNA-Resten in der nachfolgenden PCR zu verhindern, wurde die verbliebene DNA mit DNase I (*RNase-free DNase Set*, Qiagen) in einem Zwischenschritt verdaut. Nach der Isolierung der RNA wurde die RNA-Konzentration photometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm (RNA, DNA) in einer Quarzküvette gemessen. Verunreinigungen durch Proteine wurden mit Hilfe des OD-Quotienten A_{260} / A_{280} ermittelt. Dieser sollte bei einer Protein-freien Nukleinsäurelösung mindestens 2,0 betragen. Die RNA-Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamt-RNA } [\mu\text{g/ml}] = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnung}$$

3.9.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese aus der isolierten RNA wurde der *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (BIO-RAD) nach Angaben des Herstellers verwendet. Um gleiche Endkonzentrationen und Volumina der gereinigten Gesamt-RNA in der Synthesereaktion zu erreichen, wurde die Konzentration der isolierten RNA-Probe bestimmt und mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt, so dass die jeweils eingesetzte Menge RNA 1 µg entsprach und ein Endvolumen von 15 µl erreicht wurde. Danach wurden 4 µl *iScript* Reaktionsmix und 1 µl *iScript™* Reverse Transkriptase dazu gegeben und

die Reaktionslösung wie folgt inkubiert: 25 °C/5 Min – 42 °C/30 Min – 85 °C/5 Min – 4 °C/5 Min. Nach der Synthesereaktion wurden die umgeschriebene cDNA in Aliquots à 10 µl bei - 20 °C aufbewahrt bzw. sofort mittels qRT-PCR analysiert.

3.9.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Bestimmung der mRNA-Expression in PC-3-Zellen wurde mit Hilfe der LightCycler™-Technologie (Roche) durchgeführt. Dazu wurden der LightCycler™-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit (Roche) und spezifische Primer-Sets (Search LC bzw. Qiagen) verwendet.

Pro Reaktionsansatz wurden zuerst 1 µl *SYBR-Green-Mastermix* (Roche), 1 µl Oligonukleotidlösung (Search LC bzw. Qiagen) und 3 µl RNase-freies Wasser in jede LightCycler™-Kapillare (Roche) gegeben. Anschließend wurden die Kapillaren jeweils mit 5 µl cDNA-Probe (Verdünnung 1:10 in RNase-freiem Wasser) aufgefüllt. Für die Negativkontrolle wurde 5 µl RNase-freies Wasser verwendet. Als Positivkontrolle wurden Standards mit definierter Kopienanzahl mitgeführt. Die Ansätze wurden für 4 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert und anschließend in ein LightCycler-Kapillar-Rondell eingesetzt und die PCR-Reaktion gestartet.

Für die Primer von Search LC erfolgte die PCR-Reaktion unter folgenden PCR-Bedingungen: Denaturierung der DNA: 95°C/10 Minuten, Amplifikation der Zielsequenz: [95°C/10 Sekunden → 68°C/10 Sekunden/ 58°C → 72°C/16 Sekunden] x 35 Zyklen.

Für die Primer von Qiagen wurden folgende PCR-Bedingungen verwendet: Denaturierung der DNA: 95°C/15 Minuten, Amplifikation der Zielsequenz: [94°C/15 Sekunden → 55°C/22 Sekunden → 72°C/20 Sekunden] x 40 Zyklen.

Abschließend wurde durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur (95°C → 58°C/10 Sekunden dT/dt 0,1°C/Sekunde) eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die es erlaubt, Primerdimere und unspezifische Produkte zu identifizieren. Die Quantifizierung der vorhandenen DNA-Kopien beruhte auf der Fluoreszenz-Messung, die durch die Interkalation des fluoreszierenden Farbstoffs *SYBR Green I* (Roche) in doppelsträngige DNA entstand. Mit zunehmender Zyklenzahl nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Über die Verdünnungsreihe eines Standards mit genau definierter Kopienanzahl wird eine Standardkurve erstellt, anhand der bestimmt werden kann, wie viele Kopien des Zielgens ursprünglich in der Probe vorlagen. Die Quantifizierung der Expression des *housekeeping*-Gens GAPDH wurde zur Normalisierung der Zielgen-Expression verwendet und diente zum Abgleich der cDNA-Menge in den verschiedenen Proben.

3.9.4 cDNA-Array

Um eine Änderung des mRNA-Expressionsmusters in Cathepsin-defizienten Zellen zu untersuchen, wurden zwei verschiedene cDNA-Arrays (*Human Cancer PathwayFinder™ Gene Array* und *Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules Gene Array*) der Firma SuperArray (Bioscience Corp.) verwendet. Hierdurch konnten jeweils 96 relevante Zielgene in einem einzigen Experiment untersucht werden.

PC-3-Zellen wurden hierfür mit siRNA transfiziert und deren RNA unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) isoliert. Die benötigten cDNA-Sonden wurden vor der Hybridisierung für die anschließende Detektion markiert. Hierfür wurde für den Einbau von Biotin-16-dUTP (Roche) während der cDNA-Synthese der *AmpoLabeling LPR-Kit* gewählt, da diese Technik geringe Hintergrundsignale verursacht. Im ersten Schritt wurde 5 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (37 °C/25 Minuten → 85 °C/5 Minuten → Eis). In einem zweiten Schritt wurde mit Hilfe einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase und einem spezifischen Primermix Biotin-16-dUTP-markierte cDNA hergestellt (85 °C/5 Minuten; [85 °C/1 Minute → 50 °C/1 Minute → 72 °C/1 Minute] x 30 Zyklen; 72 °C/5 Minuten). Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 94°C für 2 Minuten gestoppt. Zunächst erfolgte eine Prähybridisierung der *cDNA-Array-Membran* mittels Lachsspermien-DNA (100 µg/ml) in Hybridisierungslösung bei 60 °C für 2 Stunden und 10 Umdrehungen pro Minute in einem Hybridisierungsöfen. Für die anschließende Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung aus den Tubes entfernt und durch 721 µl Hybridisierungslösung, versetzt mit 49 µl cDNA-Probe, ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60 °C und 10 Umdrehungen pro Minute in einem Hybridisierungsöfen. Bei diesem Vorgang lagern sich zwei komplementäre Nukleinsäure-Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren hydrophoben Purin- und Pyrimidin-Basen zusammen (*Watson-Crick-Base-Pairing*).

Um nicht gebundene cDNA zu entfernen, wurde die *cDNA-Array-Membran* am folgenden Tag zweimal mit jeweils 5 ml Waschlösung 1 (360 mM NaCl, 20 mM TriNatriumCitrat-Dihydrat, pH 7 und 1 % (w/v) SDS) und danach zweimal mit jeweils 5 ml Waschlösung 2 (18 mM NaCl, 1 mM TriNatriumCitrat-Dihydrat, pH 7 + 0,5 % (w/v) SDS) bei 20 Umdrehungen pro Minute und 60 °C für je 15 Minuten gewaschen.

Die Detektion der hybridisierten cDNA-Sonden erfolgte mittels alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die *cDNA-Array-Membran* zuvor mit 2 ml Blockierungslösung (*GEAblocking Solution Q*) für 40 Minuten und 20 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Bindung des mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidins an die markierte cDNA. Hierfür erfolgte eine 10-minütige Inkubation der *cDNA-Array-Membran* mit 2 ml Pufferlösung (*Buffer F*), die im

Verhältnis 1:8000 mit alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin versetzt war. Nach viermaligem Waschen mit 4 ml Pufferlösung (*Buffer F*) für je 5 Minuten, erfolgte die Detektion nach zwei-minütiger Inkubation mit 1 ml Chemilumineszenzlösung (*CDP-Star-Substrate*) bei Raumtemperatur mittels Belichtung eines Röntgenfilms. Die entwickelten Filme wurden eingescannt und mit der Software *TotalLab Quant* (TotalLab Limited) densitometrisch ausgewertet. Nach Subtraktion des Hintergrundes wurden die einzelnen Signale auf die *housekeeping*-Gene Aktin und GAPDH bezogen. Jeder cDNA-Array wurde in Triplikaten durchgeführt.

3.10 Proteinchemische Methoden

3.10.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Extraktion von intrazellulären Proteinen wurde ein nicht-denaturierender Lysispuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, pH 6,0) verwendet, der kurz vor Gebrauch mit dem Inhibitorcocktail III (Calbiochem) im Verhältnis 1:100 versetzt wurde. Die adhärennten Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, danach wurde der Lysispuffer direkt auf die Zellen gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (die Zelllyse wurde unter dem Mikroskop kontrolliert) wurde das Lysat vollständig in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend nochmals für 10 Minuten bei 4°C unter gelegentlichem Benutzen des „Vortexers“ inkubiert. Danach wurde das Lysat auf Eis 2 mal für 5 Sekunden mit Hilfe der Ultraschalllanze sonifiziert. Die unlöslichen Bestandteile wurden danach bei 16 000 g und 4°C für 10 Minuten durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsglas überführt und direkt untersucht oder bei -20°C aufbewahrt.

3.10.2 Herstellung von Zelllysaten zur Analyse phosphorylierter Proteine

Zur Analyse phosphorylierter Proteine wurden die behandelten Zellen mit gekühltem PBS und durch Zugabe von 1x Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 10% Glycerol, 50 nM DTT, 0,03% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) lysiert (100 µl/Well einer 6-Well-Platte). Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines „Zellschabers“ von der Platte entfernt, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen. Hiermit wurde auch sichergestellt, dass durch die sofortige Denaturierung der Proteine eine weitere Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung nach Versuchsende verhindert wurde. Durch die folgende 10-minütige Zentrifugation bei 4°C wurden alle unlöslichen Bestandteile sedimentiert. Der Überstand wurde entweder sofort für die SDS-PAGE verwendet oder bei -80°C gelagert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt.

3.10.3 Isolierung des Zellkulturüberstandes

Um die Konzentration an sezernierten Proteinen in Zellkulturüberstand zu bestimmen, wurde 1 ml des Überstandes abpipettiert und für 10 Minuten bei 4°C und 10 000 g zentrifugiert, um abgelöste oder abgestorbene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, sofort verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

3.10.4 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung wurde mit Hilfe der BCA-Methode durchgeführt. Hierbei wurden die Proben (Zellysate) 1:40 in destilliertem Wasser verdünnt und in 96-Well-Platten mit den Färbereagenzien (BC Assay Reagenz A und B) im Verhältnis 1:1 nach den Angaben des Herstellers vermischt (Endvolumen 200 µl). Zur Quantifizierung wurde auf derselben Platte eine Standardkurve mit Albumin in Konzentrationen von 1000 µg/ml bis 15,6 µg/ml erstellt. Nach 40-60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Absorption bei 560 nm im Mikrotitermessgerät (Microtek Laborsysteme GmbH) gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Standardkurve unter Verwendung von *MicroWin 2000* (Microtek Laborsysteme GmbH) errechnet.

3.10.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen komplexer Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet. Das SDS-Polyacrylamidgel bestand aus einem 12%-igen Trenngel und einem 4%-igen Sammelgel. Trenn- und Sammelgel wurden nach dem in Tabelle 1 gezeigten Pipettierschema hergestellt.

Tabelle 1: Pipettierschema für die Herstellung von Gelen für die diskontinuierliche SDS-PAGE.

1 x 1,5 mm Gel	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
dH ₂ O	4,5 ml	5,675 ml
Acrylamid (40%)	3 ml	1,65 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl; pH 8,8)	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl; pH 6,8)	-	2,5 ml
SDS (10%)	100 µl	100 µl
APS (10%)	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Zuerst wurden alle Bestandteile außer TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) vereinigt und vermischt. TEMED und APS wurden erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben, um die Polymerisierung einzuleiten. Daraufhin wurden die Zellysate mit 3x Probenpuffer (187,7 mM Tris/HCl, 6% (w/v) SDS, 30% Glycerol, 0,03% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) und 30x Reduktionsagens (1,25 M DTT) versetzt. Um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen, wurden die Proben für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben bei 4°C und 5000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand auf das Gel aufgetragen (25 µl/Tasche). Die Elektrophorese erfolgte in einem Laufpuffer (250 mM Tris/HCl, 192 mM (w/v) Glyzin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3) bei 125 Volt für 1-2 Stunden.

Gradientengele (NuPAGE™ Novex, Invitrogen) wurden zur Auftrennung der Zellproben zur Detektion von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 200 bis 2,5 Kilodalton eingesetzt. Die Elektrophorese wurde hierfür bei 200 Volt für 35 Minuten unter Verwendung einer *Novex Minicell*-Gelkammer und Laufpuffer (1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, 1 M Tris-Base, 69,3 mM SDS, 20,5 mM EDTA) durchgeführt. Um die Proteintrennung abschätzen zu können, wurde als Molekulargewichtsstandard ein vorgefärbter Standard (SeeBlue2 Prestained Standard, 8µl/Tasche) verwendet.

3.10.6 Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie-Brillantblau

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel, wurde das gesamte Gel in einer Coomassie-Brillantblau-Lösung (0,5 % (w/v) Coomassie Blau G-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol) für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend durch Inkubation in Entfärberlösung (10 % (v/v) Essigsäure, 45 % (v/v) Methanol) für 2 – 3 Stunden entfärbt. Damit die Elastizität des Gels erhalten blieb, wurde das Gel danach für 20 Minuten in Trocknungslösung (20 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Glycerol) inkubiert, zwischen zwei Zellophanblättern (Invitrogen) eingespannt und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.10.7 Westernblot und Immundetektion

Die aufgetrennten Proteine wurden durch ein "semi-dry" Elektrotransferverfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Hierzu wurde nach der Elektrophorese das Gel, die Nitrocellulosemembran sowie 18 Filterpapiere (Whatmann) in Transblotpuffer (45 mM Tris-HCl, 39 mM Glycin, 0,00375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3) für 5 Minuten bei Raumtemperatur äquilibriert. Für den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran

wurde ein "Transfersandwich" wie folgt gebildet: ANODE - 9 Filterpapiere - Nitrocellulosemembran - Gel - 9 Filterpapiere – KATHODE. Der Transfer erfolgte bei 100 mA für 1-2 Stunden, abhängig von dem Molekulargewicht des Zielproteins. Um die freien Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Nitrocellulosemembran danach für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (TBS-T (150 mM NaCl, 65 mM Tris/HCl, 0,05 % (v/v) Tween-20, pH 7,6) und 5% BSA) auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 5 Minuten) der Membran mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden 1. Antikörper (Verdünnung Tabelle 2) in Blockierungslösung bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch kräftiges Abspritzen der Membran mit destilliertem Wasser und dreimaligem Waschen (je 5 Minuten) mit TBS-T entfernt. Der 2. Antikörper wurde in TBS-T verdünnt (Tabelle 2) und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Ungebundene Antikörper-Moleküle wurden durch Waschen mit TBS-T und destilliertem Wasser entfernt. Die Detektion mittels Chemilumineszenzfarbstoff erfolgte nach 5-minütiger Inkubation der Membran mit 10 ml LumiGLO® (CellSignalingTechnology) durch Exponieren auf Röntgenfilm (Kodak BioMax Light Film, Sigma-Aldrich).

Tabelle 2 : Verdünnungen der im Westernblot verwendeten Antikörper.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
Anti-Procathepsin X	1:3.000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
MultiplexWestern I	1:200	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-Phospho-p44/42 MAPK	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-p42 MAP Kinase	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-Phospho-MEK	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-MEK	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-Phospho-Rac-1	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:20.000
Anti-Rac-1	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:20.000
Anti-phospho-PAK	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-PAK	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-phospho-p38	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-p38	1:1000	Anti-Kaninchen IgG	1:4.000
Anti-Aktin	1:400	Anti-Maus IgG	1:2.000

3.10.8 Sandwich-ELISA zum quantitativen Nachweis von Cathepsinen

Cathepsin X wurde durch einen sensitiven Sandwich-ELISA (Nägler et al., 2006) quantifiziert. Hierbei wurde eine 96-Well-Platte (NUNC) über Nacht bei 4°C mit Anti-(Pro)Cathepsin X-IgG (Kaninchen, Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer (15,9 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6)) beschichtet. Die unspezifisch gebundenen Antikörper wurden durch fünfmaliges Waschen mit 200 µl Waschpuffer (50 mM NaCl; 10 mM NaH₂PO₄ x H₂O; 10 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 0,05 % (w/v) Tween 20, pH 7,4) pro Kavität entfernt. Nach Absättigen der unspezifischen Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit je 100 µl Blockierungspuffer/Kavität für 1 Stunde bei Raumtemperatur, wurden die Kavitäten zweimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Der Standard aus rekombinatem Procathepsin X wurde in den Konzentrationen 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 und 62,5 pg/ml in Probenpuffer (Waschpuffer + 2 % (w/v) BSA) aufgetragen. Die Proben wurden entsprechend der zu erwartenden Cathepsin X-Konzentration mit Probenpuffer verdünnt und in Dupletts pipettiert. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler wurden die Kavitäten fünf mal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. Als erster Detektions-Antikörper wurde anti-Cathepsin X IgG (Ziege, R&D Systems) mit einer Verdünnung von 1:200 in Probenpuffer eingesetzt. Nach mehreren Waschschritten wurde ein zweiter mit Peroxidase-gekoppelter Detektions-Antikörper (Anti-Ziege/Schaf IgG, Verdünnung 1:20.000) für 1 Stunde zugegeben. Nach Entfernung der nicht-gebundenen Antikörper wurde durch Zugabe von 100 µl Substrat (Tetramethylbenzidin, TMB) pro Kavität für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln eine Farbreaktion ausgelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 100 µl Stopplösung (1 M H₂SO₄) pro Kavität beendet. Die Absorption wurde bei 450 nm (550 nm Referenzfilter) in einem Mikrotitermessgerät (Microtek Laborsysteme GmbH) gemessen und die Cathepsin X-Konzentration anhand des Standards berechnet.

Für die quantitative Bestimmung von Cathepsin B wurde der *Quantikine® Human pro-cathepsin B immunoassay* von R&D Systems nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.10.9 Abbau von EZM-Komponenten durch rekombinante Cathepsine

Zur Analyse des möglichen proteolytischen Abbaus von EZM Komponenten durch Cathepsin X, B und L wurden fluorogene DQTM-Substrate (Invitrogen) eingesetzt. DQTM Kollagen I, DQTM Kollagen IV und DQTM BSA sind Analoge der natürlichen Substrate, die mit einer überhöhten Anzahl von Fluorophoren beladen sind, wodurch annähernd kein Fluoreszenzsignal freigesetzt wird. Diese Fluoreszenzlöschung (engl. *quenching*) ist durch die in dem intakten Substrat räumlich nah aneinander liegenden Fluoreszenzfarbstoffe begründet. Nach der enzymatischen Spaltung der Substrate werden fluoreszierende Peptide freigegeben (Abb. 9). Die Zunahme der

Fluoreszenz (proportional zur proteolytischen Aktivität) wurde in einem Spektrofluorimeter (Safire II, Tecan) gemessen.

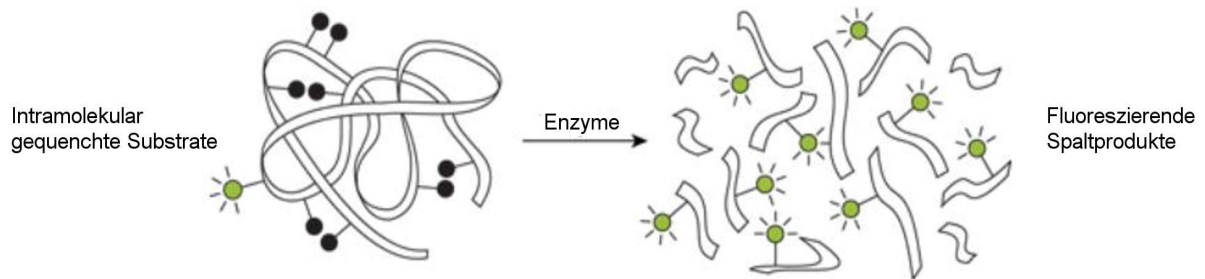


Abb. 9: Prinzip der Detektion von Enzymaktivität durch Spaltung von intramolekular gequenchten Substraten (modifiziert nach www.probes.invitrogen.com).

Zuerst wurden die lyophilisierten Substrate in je 1 ml sterilem dH₂O rekonstituiert. Die rekombinanten Cathepsine X, B und L (Nägler et al., 1999; Nägler et al., 1997; Biniossek et al., 2011) wurden durch die Zugabe von Phosphatpuffer (50 mM Natriumphosphat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 6) für 5 Minuten bei Raumtemperatur aktiviert und danach auf Eis gelegt. Pro Reaktionsansatz wurden 10 µl DQ™-Substrat und 90 µl Reaktionspuffer (angesetzt nach den Angaben des Herstellers) in eine 96-Well-Platte (NUNC) gegeben. Die zu untersuchenden Enzyme wurden mit Reaktionspuffer verdünnt (Endkonzentration von 2 nM). Um die Reaktion zu starten, wurden die Substrate mit 100 µl des verdünnten Enzyms oder 100 µl Reaktionspuffer als Negativkontrolle versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenzintensität im Spektrofluorimeter (Safire II, Tecan) quantifiziert. Der Leerwert wurde von den entsprechenden Messwerten abgezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Transmigrationsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinien PC-3, LNCaP und DU145

Im Hinblick auf weitere Versuche zur Transmigration sollte zu Beginn der Arbeit die Zelllinie mit dem höchsten Invasions-/Migrationspotential ermittelt werden. Hierfür wurden die Prostatakarzinomzelllinien PC-3 (isoliert aus einer Knochenmetastase, androgen-unabhängig), LNCaP (isoliert aus einer Lymphknotenmetastase, androgenabhängig) und DU145 (isoliert aus einer Gehirnmetastase, androgenunabhängig) in einem Invasionsassay (BD Bioscience) verglichen. Um die optimale Inkubationszeit sowie einzusetzende Zellzahl zu ermitteln, wurden die Invasionsassays mit jeweils zwei verschiedenen Inkubationszeiten (6 Stunden und 20 Stunden) sowie zwei unterschiedlichen Zellzahlen (50.000 Zellen und 25.000 Zellen) durchgeführt (Abb.10).

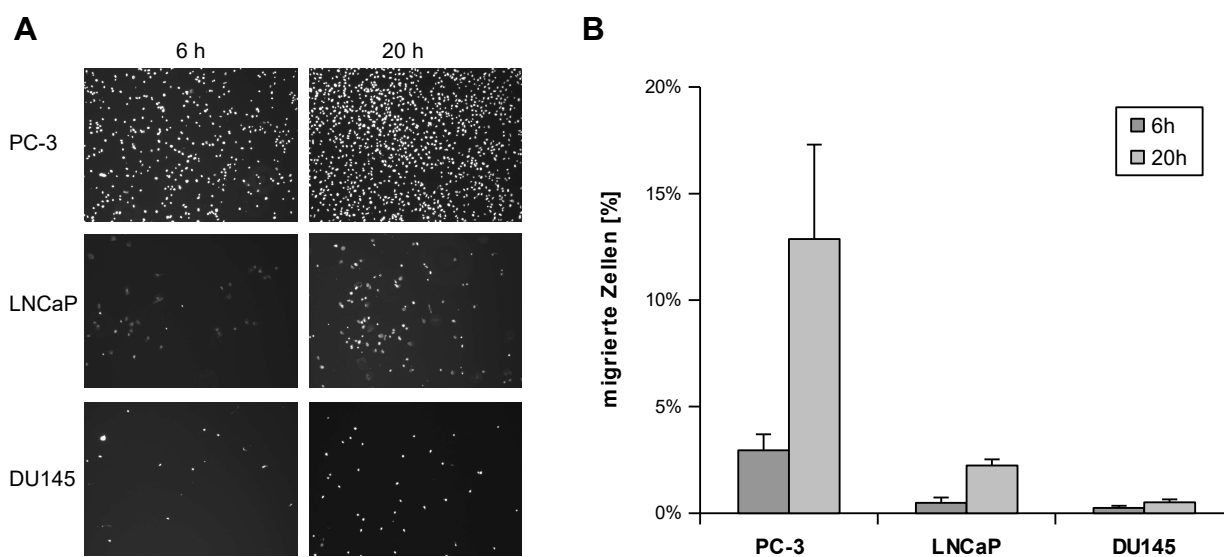


Abb. 10: Vergleich der Invasionsfähigkeit der Prostatakarzinomzelllinien PC-3, LNCaP und DU145.

Die Invasion für PC-3, LNCaP und DU145 wurde in einer mit humaner EZM beschichteten Transwell-Kammer (8µm Porengröße) nach 6 bzw. 20 Stunden Inkubationszeit gemessen, wobei die anfängliche Zellzahl 50.000 Zellen pro Kammer betrug. Die invadierten Zellen wurden mit DAPI gefärbt, fotografiert (**A**) und quantifiziert (**B**). Die Invasionsrate ergibt sich aus dem Quotienten der Anzahl der invadierten Zellen durch die Anzahl der ausgesäten Zellen.

Die PC-3-Zellen zeigten unabhängig von der eingesetzten Zellzahl und Inkubationszeit das

höchste Invasions-/Migrationspotential im Vergleich zu den weniger invasiven LNCaP-Zellen. Überraschenderweise konnte in unserem Versuchsaufbau für die Zelllinie DU145 ein nicht-invasives Verhalten beobachtet werden, obwohl sie in der Literatur als invasiv beschrieben wurde (Pulukuri et al., 2005). Die Invasionsrate war bei allen drei Zelllinien im Vergleich zu 6 Stunden Inkubationszeit nach 20 Stunden Inkubationszeit deutlich erhöht. Dieses Phänomen könnte mit der Proliferation der Zellen an der Unterseite der Membran sowie der relativierten Adhäsionszeit nach dem Aussähen begründet werden. Um diesen Effekt abzuschwächen wurden für die folgenden Transwellassays eine geringere Inkubationszeit von 15 Stunden gewählt. Da bei 50.000 eingesetzten Zellen die Zelldichte der migrierten Zellen sehr hoch war (Abb. 10) und somit die Fehlerquote bei der automatischen Auszählung stieg, wurden für die folgenden Transwellassays 30.000 Zellen pro Kammer eingesetzt.

4.2 Knock-Down der Cathepsine X, B und L mittels siRNA

Um den Einfluss der Cathepsine X, B und L in PC-3-Zellen auf Invasions- und Migrationsprozessen zu untersuchen, wurde ein spezifischer Knock-Down mit Hilfe der siRNA-Technologie durchgeführt. Zur Bestimmung des Zeitpunkts mit der höchsten Knock-Down-Effizienz, wurde zunächst in Vorversuchen eine Zeitkinetik über 4 Tage erstellt. Hierzu wurden in 6-Well-Platten jeweils 75.000 Zellen pro Well in 2 ml Medium ausgesät. Diese wurden mit den Oligonukleotiden CatX1, CatB1 und CatL1 sowie NS als Kontroll-Oligonukleotid transfiziert. Ein Well wurde mit einem fluoreszierenden Oligonukleotid transfiziert, um die Transfektionseffizienz bildlich sichtbar zu machen. Nach jeweils 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden wurden die Zellen lysiert und Zelllysate hergestellt. Außerdem wurde 1 ml konditioniertes Medium von jedem Zeitpunkt und jedem Oligonukleotid bei -20°C gelagert sowie Gesamt-RNA isoliert.

Auf mRNA-Ebene wurde die siRNA-Effizienz für die Cathepsine X, B und L mit Hilfe von qRT-PCR (LightCycler) überprüft und das *housekeeping*-Gen GAPDH zur Normalisierung verwendet. Es zeigte sich, dass der Knock-Down von Cathepsin X und B bereits am ersten Tag sehr stark ausgeprägt war (über 80 Prozent Reduktion) und nahezu über die gesamte Zeitspanne von vier Tagen anhielt (Abb. 11 A und B). Die höchste Downregulation der mRNA-Expression für Cathepsin L betrug im Vergleich zur Kontrolle 80 Prozent nach 48 Stunden. Danach kam es wieder zu einem kontinuierlichen Anstieg der mRNA-Konzentration von Cathepsin L (Abb. 11 C).

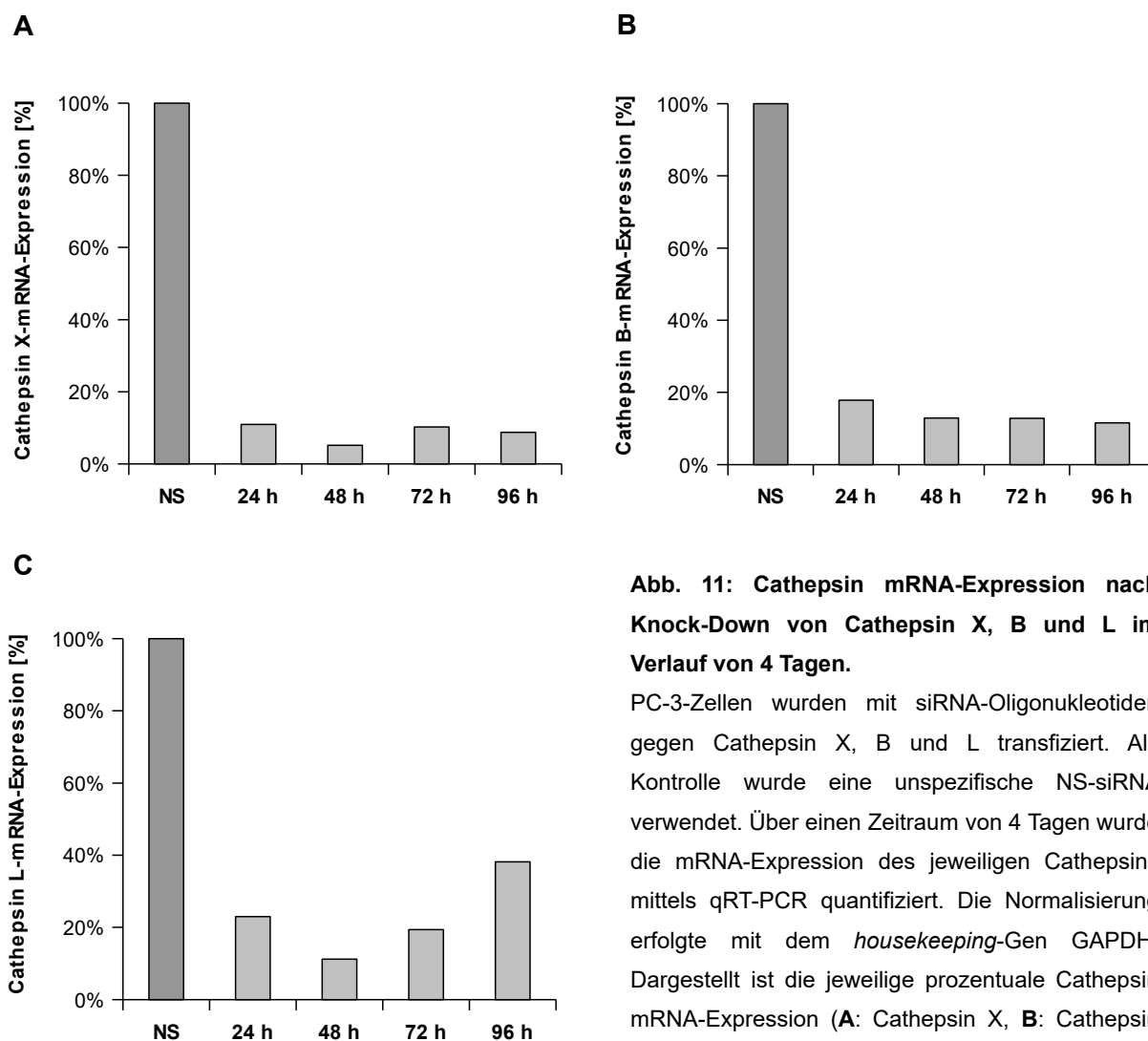


Abb. 11: Cathepsin mRNA-Expression nach Knock-Down von Cathepsin X, B und L im Verlauf von 4 Tagen.

PC-3-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden gegen Cathepsin X, B und L transfiziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische NS-siRNA verwendet. Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurde die mRNA-Expression des jeweiligen Cathepsins mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte mit dem *housekeeping*-Gen GAPDH. Dargestellt ist die jeweilige prozentuale Cathepsin mRNA-Expression (**A**: Cathepsin X, **B**: Cathepsin B, **C**: Cathepsin L) im Vergleich zu den Kontrollzellen, dessen Werte auf 100% festgelegt wurden.

Nach der Bestimmung der Gesamt-Proteinmenge der Zellysate durch die BCA-Methode wurde die Expression und Sekretion von Cathepsin X und B mittels ELISA quantifiziert. Der intrazelluläre Cathepsin X-Gehalt war auf Proteinebene nach 48 Stunden Transfektion im Vergleich zu den Kontrollzellen um 70 Prozent verringert (Abb. 12 A), wohingegen die Expression von Cathepsin B schon nach 72 Stunden Inkubationszeit um zirka 70 Prozent reduziert war (Abb. 12 C). Dieser Trend war auch bei der Sekretion von Cathepsin X und B zu beobachten, da bei Cathepsin X nach 24 Stunden und bei Cathepsin B nach 72 Stunden eine deutliche Reduktion der sezernierten Proteinmenge messbar war (Abb. 12 B und D). Als Hinweis auf eine kontinuierliche Sekretion akkumulierte die Konzentration von Cathepsin X und B im Zellkulturüberstand der Kontrollzellen im Verlauf der Zeit (Abb. 12 B und D). Auffällig ist, dass Cathepsin X im Vergleich zu Cathepsin B im Medium in höherer Konzentration vorliegt.

Dieser Unterschied wird bei dem intrazellulär gemessenen Proteingehalt von Cathepsin X und B noch deutlicher (Daten nicht gezeigt). Somit wird Cathepsin X in PC-3-Zellen stärker exprimiert als Cathepsin B. Dies spiegelt sich auch in der immunhistologischen Analyse von Patienten-Biopsien wieder. Im Vergleich zu Cathepsin B zeigt Cathepsin X eine deutlich stärkere positive Reaktion in Prostatagewebsdünnschnitten (Nägler et al., 2004). Die Analyse der Expression von Cathepsin L auf Proteinebene war nicht möglich, da Cathepsin L von PC-3-Zellen nur in geringen Mengen exprimiert wurde und der verwendete ELISA (IBL Hamburg) nicht sensitiv genug war.

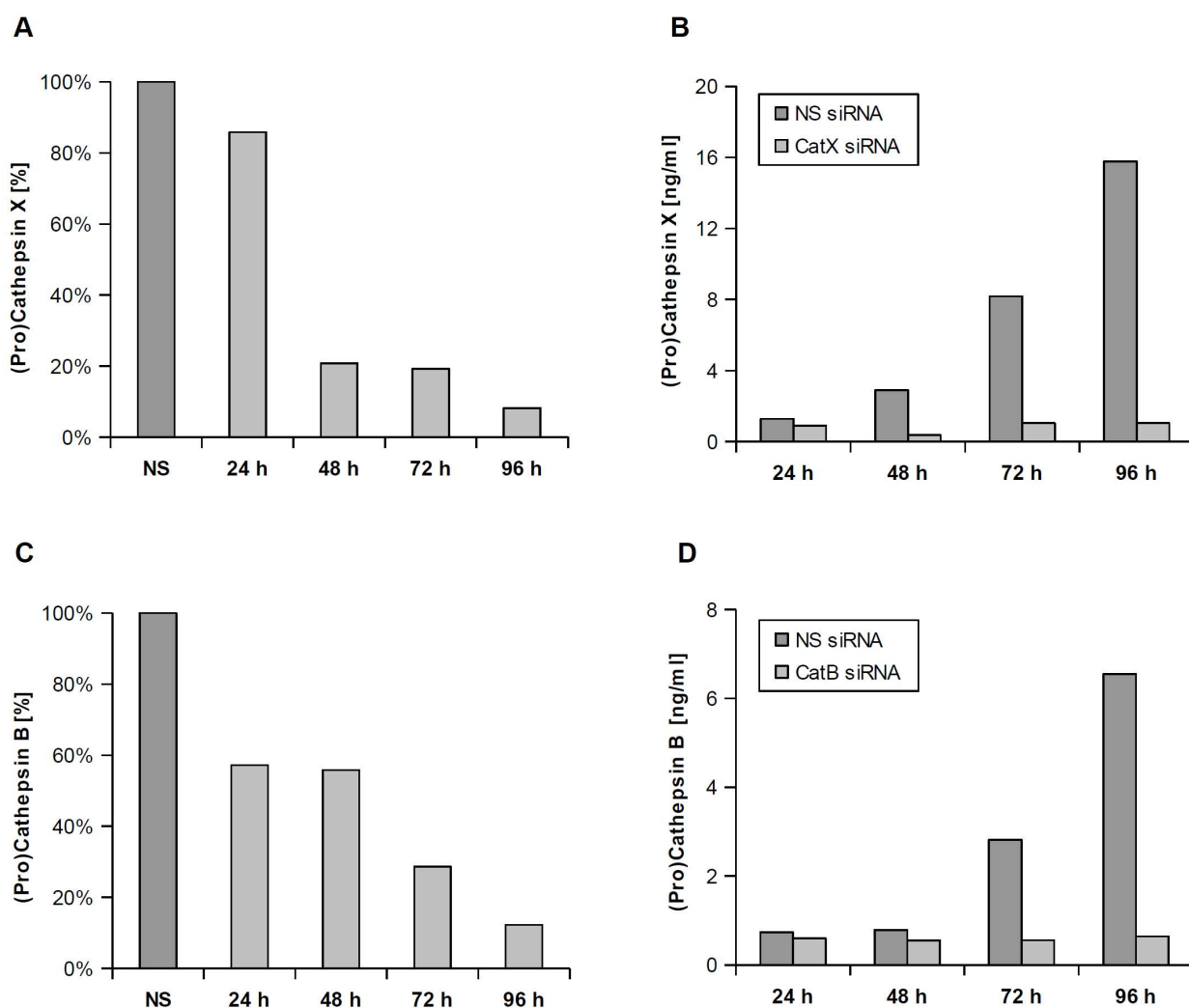


Abb. 12: Verifizierung des Knock-Downs von Cathepsin X und B im Verlauf von 4 Tagen mittels ELISA.

PC-3-Zellen wurden mit 10 nM siRNA-Konzentration gegen Cathepsin X (CatX1) und B (CatB1) über einen Zeitraum von 4 Tagen transfiziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische NS-siRNA verwendet. Nach 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden wurde das Gesamt-Protein, sowie konditioniertes Medium isoliert. Der Proteingehalt von Cathepsin X und B im Zelllysat und in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA ermittelt. Die intrazelluläre Konzentration von Cathepsin X und B wurde auf die Kontrolle normiert (A und C). Die sezernierten Proteinmengen von Cathepsin X und B wurden in ng pro ml Medium quantifiziert und für jeden Zeitpunkt vergleichend mit der Kontrolle dargestellt (B und D).

Die Expression von Cathepsin X auf Proteinebene wurde zusätzlich mittels Westernblot analysiert (Abb. 13). Es konnte ein deutlicher Rückgang der intrazellulären Cathepsin X-Menge sowie der Cathepsin X-Sekretion nach Knock-Down gemessen werden. Es zeigte sich, dass Cathepsin X im Zelllysate insgesamt überwiegend in gereifter Form mit einem Molekulargewicht von ca. 36 Kilodalton vorkommt. Dagegen wurde deutlich, dass Cathepsin X fast ausschließlich in der Proform sezerniert wird und in den Zellkulturüberständen nicht in der gereiften Form nachweisbar ist.

Aufgrund der oben aufgeführten Vorversuche wurden alle folgenden Knock-Down-Experimente für die Cathepsine B und L nach 72 Stunden Inkubationszeit und für Cathepsin X nach 48 Stunden Inkubation durchgeführt.

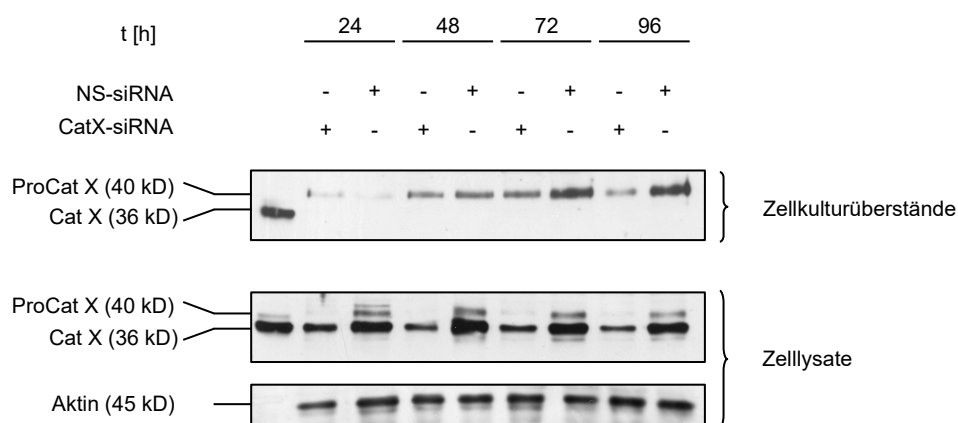


Abb. 13 : Westernblotanalyse der Knock-Down-Effizienz von siRNA gegen Cathepsin X.

PC-3-Zellen wurden mit 10 nM siRNA-Konzentration gegen Cathepsin X (CatX3) über einen Zeitraum von 4 Tagen transfiziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische NS-siRNA verwendet. Nach 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden wurde das Gesamt-Protein sowie die Zellkulturüberstände isoliert und der Gehalt an Cathepsin X mittels Immunoblotting bestimmt. Als Positivkontrolle (erste Spur) wurde ein rekombinantes Cathepsin X verwendet.

4.3 Einfluss der Cathepsine X, B und L auf das Invasionsverhalten von PC-3-Zellen

Um den Einfluss der Cathepsine X, B und L auf das Invasionsverhalten von PC-3-Zellen zu untersuchen, wurde ein Knock-Down von Cathepsin X, B und L mit Hilfe der siRNA-Technologie durchgeführt. Hierzu wurden PC-3-Zellen mit jeweils zwei verschiedenen Oligonukleotiden für 48 Stunden (Cathepsin X) bzw. 72 Stunden (Cathepsin B und L) inkubiert, um danach in einer Konzentration von 30.000 Zellen pro Insert auf mit hEZM beschichteten Transwell-Kammern

(Corning) ausgesät zu werden. Nach 15 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen auf der Unterseite der Transwell-Kammer fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt und quantifiziert. Für jedes Oligonukleotid wurde der Invasionsversuch mindestens zweimal durchgeführt, wobei bei jedem Experiment Triplets verwendet wurden.

Der Knock-Down von Cathepsin X und Cathepsin L in PC-3-Zellen führte unabhängig vom verwendeten Oligonukleotid zu einer signifikanten Reduktion der Migrations-/Invasionsfähigkeit im Transwellassay. Die Invasionsrate war für Cathepsin X um bis zu 80 Prozent und für Cathepsin L um bis zu 60 Prozent erniedrigt (Abb. 14 A und D). Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Invasionsfähigkeit von PC-3-Zellen nach Knock-Down von Cathepsin B nur um etwa 30 Prozent (Abb. 14 C). Die Knock-Down-Effizienz wurde durch qRT-PCR und ELISA für jedes Oligonukleotid einzeln bestätigt (Daten nicht gezeigt).

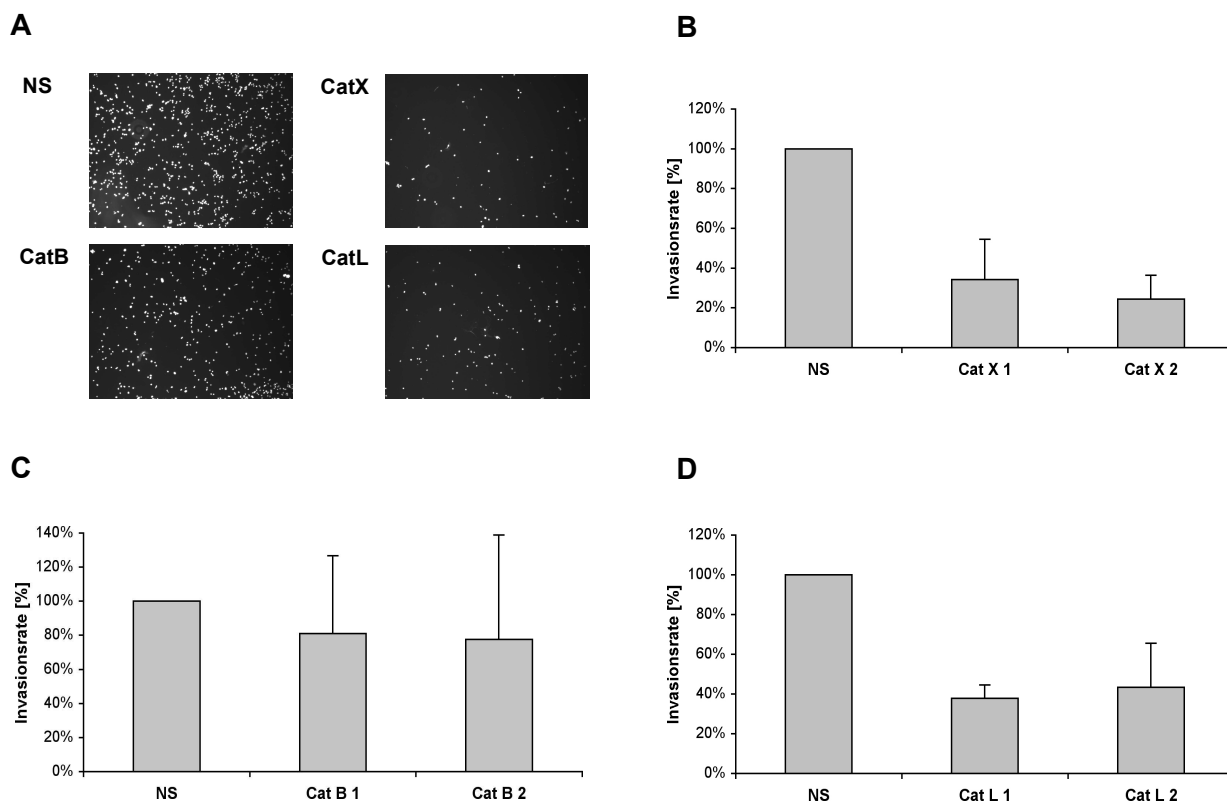


Abb. 14: Invasions-/Migrationsverhalten von PC-3-Zellen nach Knock-Down der Cathepsine X, B und L.

PC-3-Zellen wurden mit jeweils zwei Oligonukleotiden gegen die Cathepsine X, B und L transfiziert und für 72 Stunden bzw. 48 Stunden inkubiert. Danach wurden jeweils 30.000 Zellen pro Insert in mit hEZM beschichteten Transwell-Kammern ausgesät. Nach 15 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurden die transmigrierten Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt und mit 4-facher Vergrößerung fotografiert (A). Die Invasionsrate ergab sich aus dem Quotienten der Anzahl der transmigrierten Zellen und der Anzahl der eingesetzten Zellen. Diese wurde danach auf die Kontrollzellen normiert (B, C und D).

4.4 Einfluss der Downregulation von Cathepsinen auf die MMP9-mRNA-Expression

Für die Invasion von Tumorzellen ist der proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix durch verschiedene Proteasen eine wichtige Voraussetzung. Die Matrixmetalloproteasen (MMPs) spielen dabei eine Schlüsselrolle, da sie Endopeptidasen sind und am Umbau der Matrix durch kontrollierte Proteolyse beteiligt sind (Stamenkovic, 2003). Bei diesem Prozess nehmen die Gelatinasen MMP2 und MMP9 eine besondere Stellung ein, da sie Kollagen IV (Hauptbestandteil der Basalmembran) binden und spalten können (Matrisian, 1992). Nun stellte sich die Frage, ob es nach Knock-Down der Cathepsine X, B und L zu einer veränderten MMP9- und MMP2-Expression kommt und dies die beobachtete verringerte Invasion im Transwellassay teilweise erklären würde.

Um diese Fragestellung zu klären, wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurden PC-3-Zellen mit jeweils zwei verschiedenen Oligonukleotiden für 48 Stunden (Cathepsin X) bzw. 72 Stunden (Cathepsin B und L) inkubiert, um danach die MMP9- und MMP2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR zu quantifizieren. Da die Expression von MMP2 auf mRNA-Ebene in PC-3-Zellen sehr niedrig war, wurde diese Gelatinase nicht näher untersucht. Der Knock-Down von Cathepsin X und B führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der MMP9-mRNA-Expression. Nach Cathepsin L-Knock-Down ließ sich ein Anstieg der Expression von MMP9-mRNA beobachten (Abb. 15).

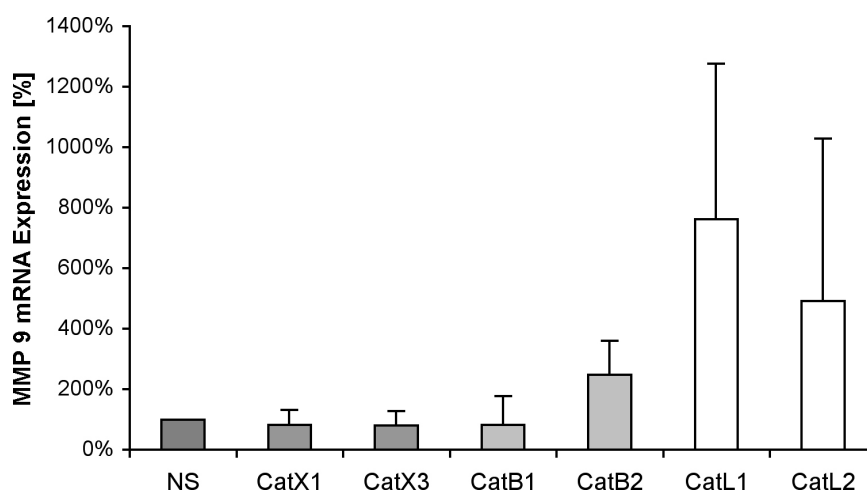


Abb. 15: MMP9 mRNA-Expression nach Knock-Down von Cathepsin X, B und L.

Nach Knock-Down der Cathepsine X, B und L durch siRNAs in PC-3-Zellen wurde die MMP9-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Zur Normalisierung wurde das *housekeeping*-Gen GAPDH verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Versuchen pro Oligonukleotid.

4.5 Degradation von EZM-Komponenten durch die Cathepsine X, B und L

Da die Cathepsine X und B von PC-3-Zellen sezerniert werden, stellte sich die Frage nach deren extrazellulären Funktionen. Eine mögliche Funktion wäre der direkte proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembran, um die Invasion von Tumorzellen zu erleichtern. Dies ist für die Monopeptidyl-Carboxypeptidase Cathepsin X jedoch unwahrscheinlich, da sie als Exopeptidase wirkt und somit nur einzelne Aminosäuren von einem Protein abspaltet (Nägler et al., 1999). Im Gegensatz dazu sind die Endopeptidasen Cathepsin B und L laut Literatur direkt am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt und weisen eine unterschiedlich starke endoproteolytische Aktivität auf (Reddy et al., 1995). Das folgende Experiment sollte die proteolytische Aktivität der Cathepsine X, B und L im direkten Vergleich darstellen und die potentielle Fähigkeit der einzelnen Cathepsine Komponenten der extrazellulären Matrix in relevanten Mengen abzubauen, aufzeigen. Hierfür wurde getestet, ob aktiviertes rekombinantes Cathepsin X, B oder L in der Lage ist die gequenchten fluorogenen Substrate DQ™-Kollagen I und IV zu spalten. Als Positivkontrolle wurde das leicht zu spaltende DQ™-BSA verwendet. Die proteolytische Aktivität wurde im Lumineszenzeinheiten gemessen.

Cathepsin X zeigte wie erwartet für Kollagen I, Kollagen IV und BSA nur einen minimalen proteolytischen Abbau (Abb. 16). Ebenso war bei den Ansätzen mit Cathepsin B auch nur ein geringer Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten, der jedoch im Vergleich zu Cathepsin X deutlich stärker war. Im Gegensatz dazu spaltete Cathepsin L alle drei Substrate sehr gut, wobei Kollagen I etwa doppelt so effizient wie Kollagen IV degradiert wurde und die Positivkontrolle sogar um ein vielfaches besser gespalten wurde als Kollagen IV (Abb. 16).

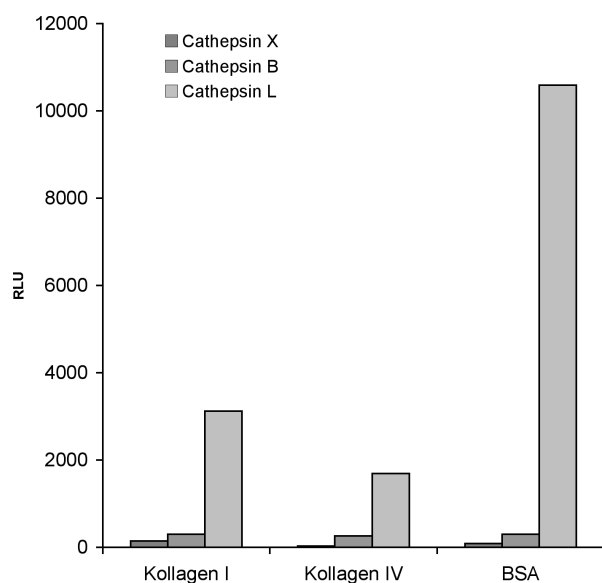


Abb. 16: Vergleichende Darstellung der proteolytischen Aktivität der Cathepsine X, B und L beim Abbau von DQ™-Kollagen I und IV.

Die gequenchten fluorogenen DQ™-Substrate wurden mit den Cathepsinen X, B und L vermischt. Nach 24 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenzintensität im Spektrofluorimeter (Tecan) quantifiziert. Der Leerwert wurde von den entsprechenden Messwerten abgezogen.

4.6 Einfluss von Procathepsin X und Vitronektin auf die Signaltransduktion

Die verminderte Invasion der Cathepsin-X-defizienten PC-3-Zellen ist wahrscheinlich nicht auf den direkten Abbau der extrazellulären Matrix zurückzuführen, da Cathepsin X eine Mono-peptidyl-Carboxypeptidase ist, die hauptsächlich als inaktive Proform sezerniert wird. Jedoch kann Procathepsin X über das RGD-Motiv in dessen Proregion an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Vitronektin-Rezeptor) binden (Lechner et al., 2006). Dies führte zu der Hypothese, dass Procathepsin X RGD-abhängig eine Signaltransduktion (*outside-in*) ähnlich wie Vitronektin induzieren kann und somit eine extrazelluläre nicht-proteolytische Funktion bei Invasions- und Migrationsprozessen ausüben könnte.

Um dies zu überprüfen, wurden PC-3-Zellen mit Vitronektin (Positivkontrolle) oder Procathepsin X stimuliert. Die Aktivierung von Signalwegen wurde über die Phosphorylierung von Kinasen oder nicht-enzymatischen Proteinen ermittelt.

4.6.1 Identifizierung von aktivierten Signalwegen nach Stimulation mit Procathepsin X und Vitronektin

Zu Beginn sollte mit Hilfe eines Gemischs verschiedener polyklonaler Antikörper (*Multiplex Western Blot Cocktail I*, Cell Signaling) die Stimulierbarkeit der potentiellen Zielsignalwege ERK und Akt durch Vitronektin und Procathepsin X überprüft werden.

Da die Aktivierung des MAPK- und des Akt-Signalweges durch Vitronektin in zahlreichen Zelltypen bereits beschrieben wurde (Chen et al., 1994; Zhu et Assoian, 1995), sollten die PC-3-Zellen zunächst in einem Vorversuch mit Vitronektin in verschiedenen Konzentrationen und Zeitspannen stimuliert werden. Es zeigte sich, dass die Stimulation mit Vitronektin auch in PC-3-Zellen zu einer Aktivierung von Akt und ERK1/2 führte (Abb. 17). Die Signalstärke war nach 10-minütiger Stimulation mit 10 µg/ml Vitronektin am höchsten. Nach 30 Minuten war die Signalintensität insgesamt schwächer als nach 10 Minuten, jedoch konnte auch hier noch eine schwach erhöhte Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

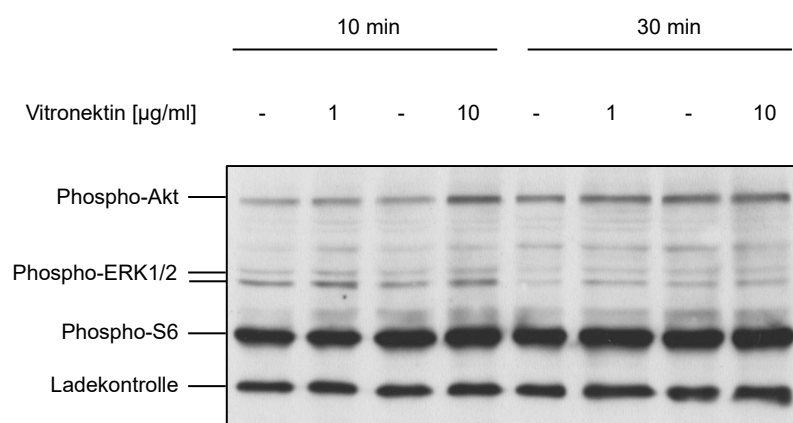


Abb. 17: Analyse eines Immunoblots von PC-3-Zelllysaten nach Stimulation mit Vitronektin.

PC-3-Zellen wurden für 10 Minuten und für 30 Minuten mit Vitronektin jeweils in den Konzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml stimuliert. Zu den unstimulierten Zellen wurde PBS als Kontrolle gegeben. Nach der Zellyse mit 3x SDS-Probenpuffer und SDS-Page, wurden in einem *Multiplex Western Blot* Phospho-Akt, Phospho-ERK1/2, Phospho-S6 und eIF4E als Ladekontrolle detektiert.

Im nächsten Versuch sollte geklärt werden, ob die Zugabe von Procathepsin X zum Medium auch zu einer Aktivierung von ERK und Akt führt. Hierzu wurden PC-3-Zellen zunächst für 1 Stunde nur mit dem MEK1/2 Inhibitor U0126 (inhibiert den ERK-Signalweg) sowie in Kombination mit dem PI3K-Inhibitor Wortmannin (inhibiert den Akt-Signalweg) vorinkubiert und danach für 10 Minuten bzw. 30 Minuten mit Procathepsin X (10 µg/ml) stimuliert (Abb. 18). Die Zugabe von Procathepsin X zum Medium führte zu einer erhöhten Phosphorylierungsrate von

ERK1/2. Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen war die Aktivierung von ERK1/2 nach 30 Minuten deutlicher, obwohl die Signalstärke allgemein abnahm. Die Inhibition von MEK1/2 durch U0126 führte wie erwartet zu einer Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2. Eine geringe Aktivierung von Akt durch Procathepsin X war interessanterweise nach 30-minütiger Stimulation in Anwesenheit des Inhibitors U0126 erkennbar. Dagegen wurde nach 10 Minuten eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung von Akt im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle detektiert. Das S6 Ribosomal Protein zeigte unabhängig von der Stimulation stets eine starke Phosphorylierung die nur durch Inhibition der PI3Kinase mit Wortmannin verringert wurde.

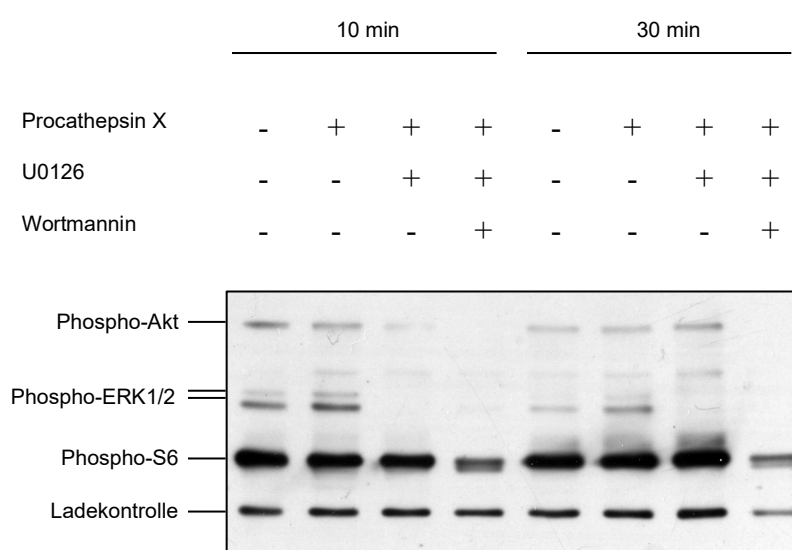


Abb. 18: Analyse eines Immunoblots von PC-3-Zelllysaten nach Stimulation mit Procathepsin X und Inhibition mit U0126 und Wortmannin.

PC-3-Zellen wurden für 1 Stunde mit U0126 und Wortmannin bzw. unbehandelt vorinkubiert und danach für 10 Minuten sowie für 30 Minuten mit Procathepsin X (10 µg/ml) stimuliert. Zu den unstimulierten Zellen wurde PBS als Kontrolle gegeben. Nach der Zellyse mit 3x SDS-Probenpuffer und SDS-Page, wurden in einem Multiplexwestern Phospho-Akt, Phospho-ERK1/2, Phospho-S6 und eIF4E als Ladekontrolle detektiert.

4.6.2 Analyse von MEK1/2 und ERK1/2 nach Stimulation mit Vitronektin und Procathepsin X

Da die exogene Stimulation mit Procathepsin X zu einer Aktivierung des ERK1/2-Signalweges führt, sollte nun überprüft werden, ob diese Aktivierung konzentrationsabhängig ist und ab welcher Konzentration sie auftritt. PC-3-Zellen wurden hierfür mit Procathepsin X und Vitronektin als Positivkontrolle in steigenden Konzentrationen von 1 µg/ml, 10 µg/ml und 25 µg/ml für 30 min inkubiert. Wie erwartet konnte für beide Substanzen eine konzentrations-

abhängige Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 beobachtet werden (Abb. 19). Es zeigte sich, dass die Stimulation mit 10 µg/ml Vitronektin oder Procathepsin X ausreichend war, um die Phosphorylierungsrate von MEK1/2 und ERK1/2 im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle signifikant zu erhöhen. Somit wurden die weiteren Stimulationsversuche mit dieser Konzentration durchgeführt.

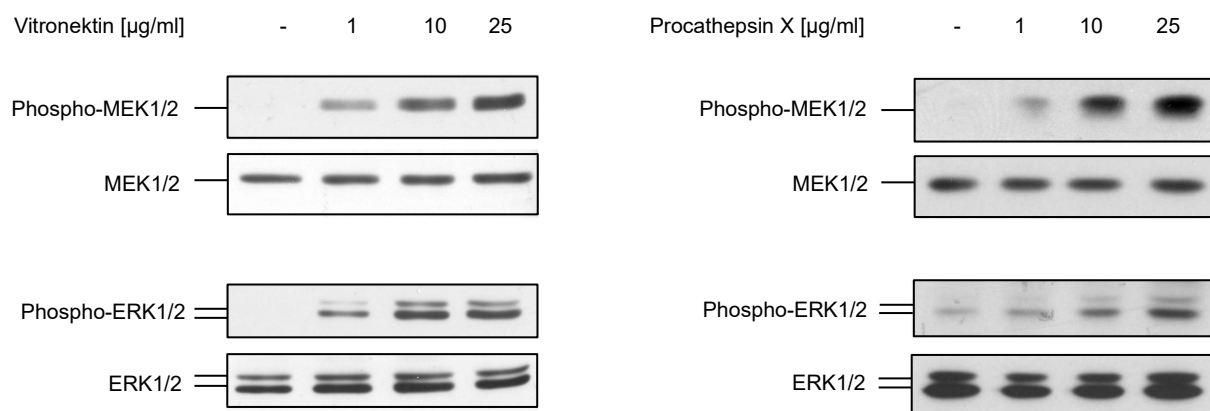


Abb. 19: Aktivierung des ERK-Signalweges in PC-3-Zellen durch Procathepsin X und Vitronektin.

PC-3-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (1 µg/ml, 10 µg/ml und 25 µg/ml) von Vitronektin (A) und von Procathepsin X (B) für 30 min inkubiert. Zu den unstimulierten Zellen wurde PBS als Kontrolle gegeben. Nach der Zellyse mit 3x SDS-Probenpuffer und SDS-Page, wurden phosphoryliertes ERK1/2 und MEK1/2 im Westernblot detektiert. Als Ladekontrolle wurde Gesamt-ERK1/2 bzw. -MEK1/2 detektiert.

4.6.3 Analyse von PAK1 und Rac1 nach Stimulation mit Procathepsin X und Vitronektin

Um den möglichen Signalverlauf über PAK1 und Rac1 *upstream* von ERK zu untersuchen, wurden PC-3-Zellen mit Wortmannin für 1 Stunde vorinkubiert und danach mit Vitronektin und Procathepsin X für 10 Minuten stimuliert. Im Vergleich zur den unstimulierten PC-3-Zellen führte die Stimulation zu keiner Veränderung der Phosphorylierung von PAK1 oder Rac (Abb. 20). Auffällig ist die Tatsache, dass nach Hemmung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) durch Wortmannin phospho-PAK1 sowie phospho-Rac1 nach Procathepsin X-Stimulation vermehrt nachweisbar war. Dieser Effekt ist ebenso nach Zugabe von Vitronektin ins Medium bei der Detektion von phospho-Rac1 zu beobachten.

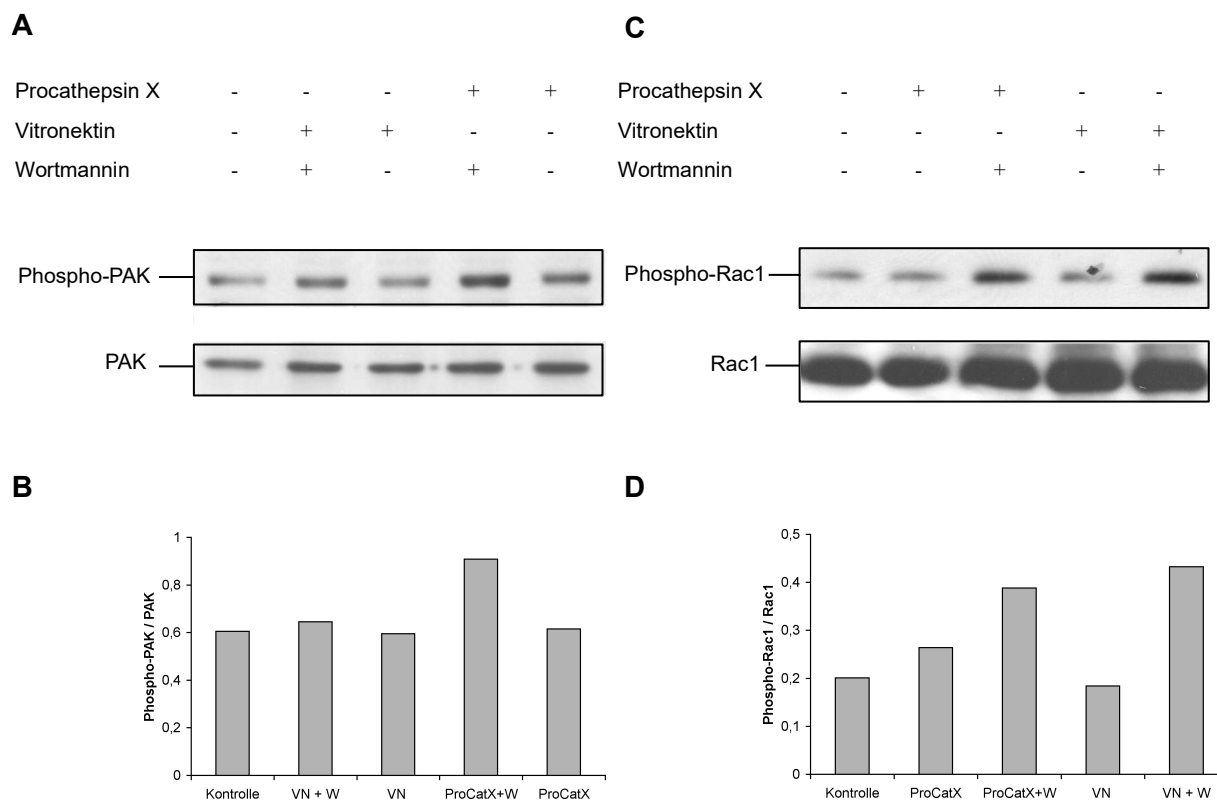


Abb. 20: Detektion von PAK und Rac1 nach Stimulation von PC-3-Zellen mit Vitronektin und Procathepsin X sowie Inhibition mit Wortmannin.

(A und C) PC-3-Zellen wurden für 60 Minuten mit Wortmannin bzw. unbehandelt vorinkubiert und danach für 30 Minuten mit Vitronektin (10 µg/ml) sowie Procathepsin X (10 µg/ml) stimuliert. Zu den unstimulierten Zellen wurde PBS als Kontrolle gegeben. Nach der Zellyse mit 3x SDS-Probenpuffer und SDS-Page, wurden phosphoryliertes PAK bzw. Rac1 sowie Gesamt-PAK bzw. Gesamt-Rac1 im Westernblot detektiert. (B und D) Quantitative densitometrische Analyse der PAK- bzw. Rac1-Aktivierung mit Hilfe von ImageJ (National Institutes of Health).

4.7 Einfluss von exogenem Cathepsin X, B und L auf Signaltransduktionswege

Nun stellte sich die Frage, ob die beobachtete ERK-Aktivierung in PC-3-Zellen durch Procathepsin X nur auf das RGD-Motiv des Propeptids von Cathepsin X zurückzuführen ist oder ob auch die gereifte Form eine Aktivierung auslösen kann. Um dies zu beantworten, wurden PC-3-Zellen mit den gereiften Formen von Cathepsin X, B und L, die über kein Propeptid verfügen, über einen Zeitraum von 30 Minuten stimuliert. Den unstimulierten Zellen wurde 12,5 µl/ml Lagerungspuffer als Kontrolle zugegeben. Die verwendeten rekombinanten Proteine wurden im inaktivierten Zustand gelagert und auf die Zellen gegeben. Somit konnte die Prozessierung anderer Enzyme wie zum Beispiel uPA, welche auch Signalwege induzieren könnten ausgeschlossen werden. Infolgedessen wäre die alleinige Bindung zu Oberflächen-

molekülen für die Signaltransduktion verantwortlich. Überraschenderweise induzierten die gereiften Formen von Cathepsin X und B eine erhöhte Phosphorylierung von ERK im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 21). Cathepsin L zeigte dagegen keine Effekte auf die Aktivität des ERK-Signalweges durch *outside-in-signaling*.

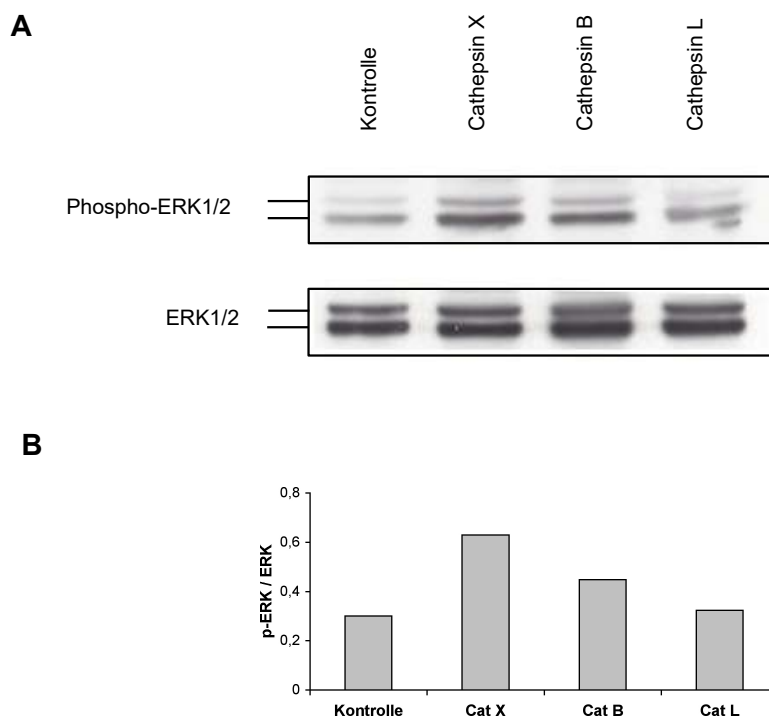


Abb. 21: Aktivitätsnachweis von ERK1/2 nach Stimulation von PC-3 Zellen mit Cathepsin X, B und L.

(A) PC-3-Zellen wurden für 30 Minuten mit den gereiften, aber inaktivierten Formen von Cathepsin X, B und L (10 µg/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurde zu den unstimulierten Zellen Lagerungspuffer (50 mM NaAcetat, 150 mM NaCl, pH 5,0) zugegeben. Nach der Zellyse mit 3x SDS-Probenpuffer und SDS-Page, wurden phosphoryliertes ERK1/2 sowie Gesamt-ERK1/2 im Westernblot detektiert. (B) Quantitative Analyse der ERK-Aktivierung mit Hilfe von ImageJ (National Institutes of Health).

4.8 Einfluss von exogenen Cathepsinen auf die Aktivierung von p38

Um den Einfluss von Cathepsinen auf andere MAPK-Signalwegen zu überprüfen, wurde nach Stimulation von PC-3-Zellen mit Procathepsin X, Cathepsin X, Cathepsin B sowie Vitronektin die phosphorylierte Form der MAP-Kinase p38 bestimmt. Als Kontrolle für Procathepsin X und Vitronektin wurde PBS zu den unstimulierten Zellen gegeben. Für Cathepsin X und B wurde Lagerungspuffer (50 mM NaAcetat, 150 mM NaCl, pH 5,0) als Kontrolle verwendet. Die Analyse der Zellysate im Westernblot zeigte eine erhöhte Phosphorylierung der MAPK p38 nach Zugabe von Vitronektin und Procathepsin X in das Kulturmedium (Abb. 22). Der zugesetzte

saure Lagerungspuffer aktivierte zum Teil ebenso die MAPK p38. Interessanterweise war nach Zugabe von Cathepsin B eine starke Reduktion der p38-MAPK-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen detektierbar.

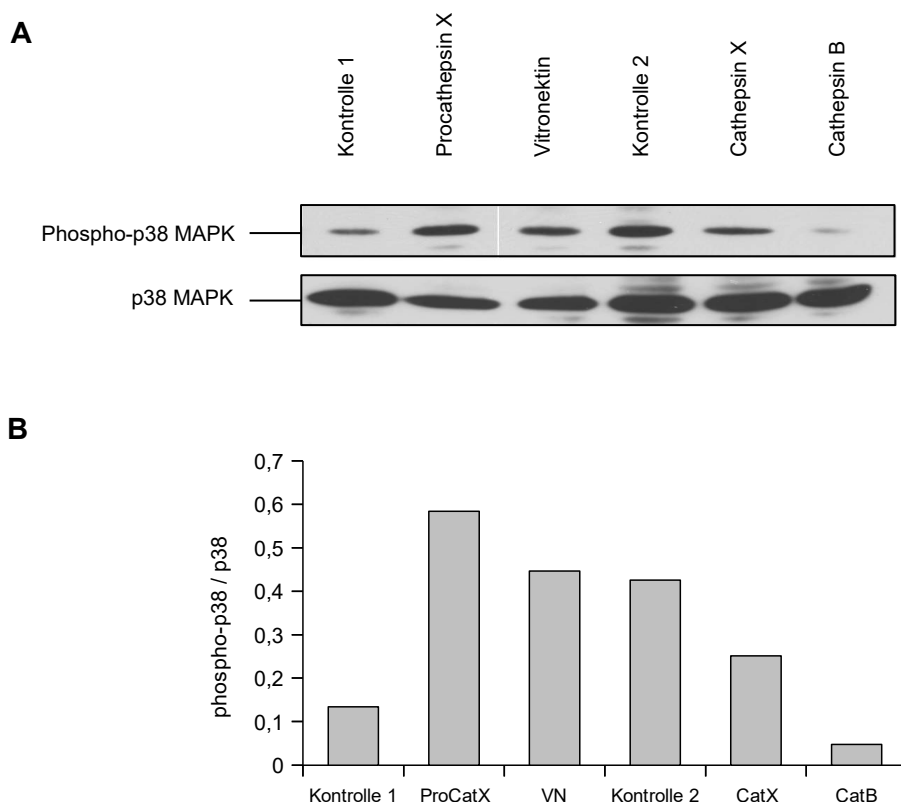


Abb. 22: Immunoblot-Analyse der MAPK p38 nach Stimulation mit Procathepsin X, Vitronektin, Cathepsin X und Cathepsin B.

(A) PC-3-Zellen wurden für 30 Minuten mit mit Procathepsin X, Vitronektin, Cathepsin X sowie Cathepsin B stimuliert. Zu den unstimulierten Zellen wurde für 30 Minuten entweder PBS (Kontrolle 1) oder Lagerungspuffer (50 mM NaAcetat, 150 mM NaCl, pH 5,0) (Kontrolle 2) als Kontrolle zugegeben. Nach der Zellyse mit 3x SDS-Probenpuffer und SDS-Page, wurden phosphoryliertes p38 sowie Gesamt-p38 im Westernblot detektiert. (B) Quantitative Analyse der Aktivierung von p38 mit Hilfe von ImageJ (National Institutes of Health).

4.9 Einfluss des Knock-Downs von Cathepsin X und B auf die Aktivität des ERK-Signalweges

Nach Stimulation mit Procathepsin X und der gereiften Form von Cathepsin X kam es zu einer Aktivierung des ERK-Signalweges. Da PC-3-Zellen Procathepsin X in großen Mengen sezernieren und eine Autostimulation wahrscheinlich ist, stellte sich die Frage, ob ein Knock-

Down von Cathepsin X zu einer veränderten Phosphorylierung von ERK führt.

Nachdem PC-3-Zellen für zwei Tage mit siRNA gegen Cathepsin X und NS-siRNA als Kontrolle transfiziert worden waren, erfolgte eine 10-minütige Stimulation mit Procathepsin X. Ein Well wurde mit dem MEK-Inhibitor U126 für eine Stunde vorinkubiert. Die Cathepsin X-transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu den NS-transfizierten Zellen eine geringere Phosphorylierungsrate von ERK1/2 (Abb. 23). Nach Zugabe von Procathepsin X ins Medium erreichte die Phosphorylierung von ERK das Niveau der Kontrollzellen. Überraschenderweise konnte nach Inhibition von MEK1/2 durch U0126 eine Aktivierung von ERK1/2 detektiert werden. Darüber hinaus konnte nach transientem Knock-Down von Cathepsin X eine Reduktion der Gesamt-ERK Proteinmenge beobachtet werden.

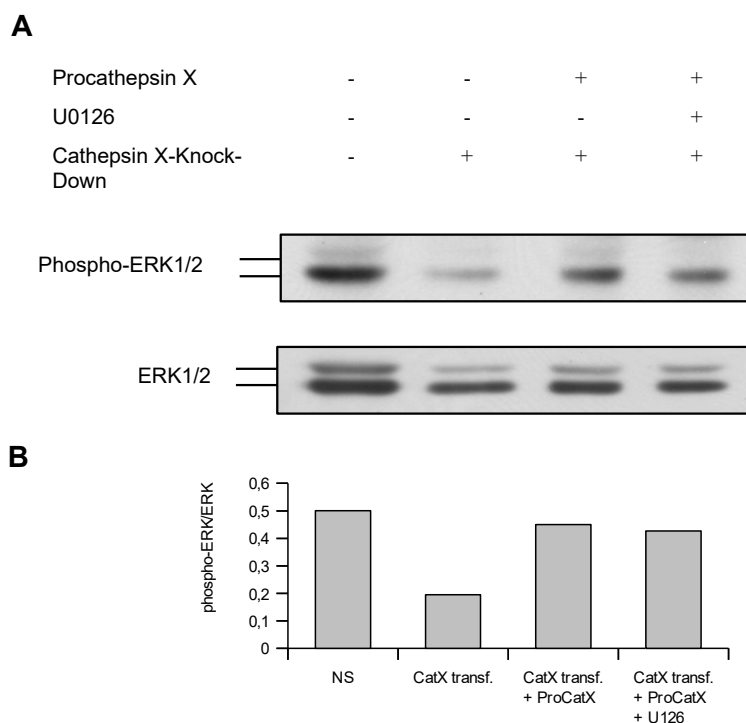


Abb. 23: Detektion von ERK1/2 nach Stimulation von transfizierten PC-3-Zellen mit Procathepsin X.

(A) PC-3-Zellen, die entweder mit siRNA gegen Cathepsin X oder mit NS-siRNA transfiziert waren, wurden für 10 Minuten mit Procathepsin X (10 µg/ml) stimuliert. Zu den unstimulierten Zellen wurde PBS als Kontrolle gegeben. Nach der Zellyse wurden phosphoryliertes ERK1/2 sowie Gesamt-ERK1/2 im Westernblot detektiert. (B) Quantitative Analyse der ERK1/2-Aktivierung mit Hilfe von ImageJ (National Institutes of Health).

Da exogen zugegebenes Cathepsin B ebenso zu einer Aktivierung des ERK-Signalweges führte, sollte nun überprüft werden, ob nach Knock-Down von Cathepsin B eine Veränderung der Phosphorylierung des ERK-Signalweges auftritt. Hierfür wurden PC-3-Zellen mit siRNA gegen Cathepsin B über drei Tage transfiziert und danach mit Cathepsin B und Vitronectin für 30 Minuten stimuliert. Nach der Stimulation mit Cathepsin B kam es im Vergleich zu den

unstimulierten PC-3-Zellen wie erwartet zu einer erhöhten Phosphorylierung von MEK1/2 sowie ERK1/2 (Abb. 24). Der Knock-Down von Cathepsin B führte zu einer geringen Reduktion des Anteils an phosphoryliertem MEK1/2 und ERK1/2 im Vergleich zu den NS-transfizierten Zellen. Wurden die Cathepsin B-defizienten Zellen nun zusätzlich mit Cathepsin B stimuliert, konnte eine Zunahme der Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 festgestellt werden, die leicht über dem Niveau der unstimulierten Kontrollzellen lag. Die Zugabe von Vitronektin ins Medium von mit NS-siRNA transfizierten Zellen führte zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK1/2 und von MEK1/2. Dieser Effekt war bei MEK1/2 besonders stark ausgeprägt. Die Gesamtmenge des MEK1/2- und ERK1/2-Proteins wurde durch den transienten Cathepsin B-Knock-Down nicht verändert.

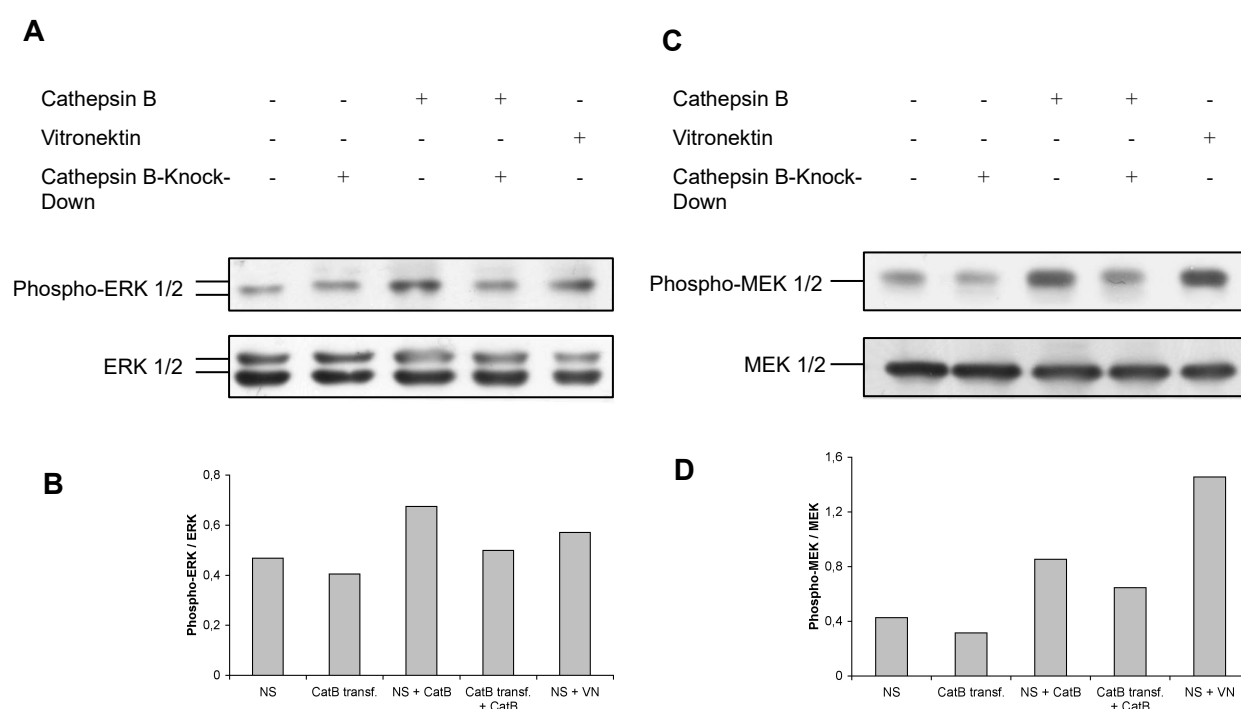


Abb. 24: Detektion von ERK1/2 und MEK1/2 nach Stimulation von transfizierten PC-3-Zellen mit Vitronektin und Cathepsin B.

(A und C) PC-3-Zellen, die entweder mit siRNA gegen Cathepsin B oder mit NS-siRNA transfiziert waren, wurden für 30 Minuten mit Cathepsin B (10 µg/ml) sowie Vitronektin (10 µg/ml) stimuliert. Zu den unstimulierten Zellen wurde PBS als Kontrolle gegeben. Nach der Zellyse mit 3x SDS-Probenpuffer und SDS-Page, wurden phosphoryliertes ERK1/2 bzw. MEK1/2 sowie Gesamt-ERK1/2 bzw. Gesamt-MEK1/2 im Westernblot detektiert. (B und D) Quantitative Analyse der ERK1/2- bzw. MEK1/2-Aktivierung mit Hilfe von ImageJ (National Institutes of Health).

4.10 Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Expression der Cathepsine X, B und L

Untersuchungen haben gezeigt, dass in der Tumorgenese die extrazelluläre Matrix nicht nur als Substrat von Proteasen fungiert, sondern auch direkte Auswirkungen auf deren Expression und Regulation haben kann (Podgorski et al., 2005). Die gezielte Stimulation der monozytären Tumorzelllinie THP-1 und der Prostatazelllinie PNT1A mit dem EZM-Protein Vitronektin führt zu einer verstärkten Sezernierung von Cathepsin X (Lechner, 2008). Nun sollte untersucht werden, ob Vitronektin und anderen Komponenten der extrazellulären Matrix auch Einfluss auf die Expression und Sekretion der Cathepsine X, B und L in PC-3-Zellen haben. Hierfür wurden PC-3-Zellen mit Vitronektin (Promega) und hEZM (BD Biosciences) mit einer Konzentration von jeweils 1µg/ml für 1, 4 oder 7 Tage stimuliert.

Nach 1 bzw. 4 Tagen Stimulation mit Vitronektin und hEZM kam es zu einer geringen Reduktion der Expression von Cathepsin X auf mRNA-Ebene. Nach 7 Tagen Inkubation mit Vitronektin und hEZM konnte jedoch eine Erhöhung der Cathepsin X-Expression um jeweils zirka 80 Prozent im Vergleich mit unstimulierten Zellen beobachtet werden (Abb. 25 A). Die mRNA-Expression von Cathepsin B verhielt sich bis auf den siebten Tag nach Stimulation mit hEZM ähnlich wie die von Cathepsin X. Im Gegensatz zu Cathepsin X kam es nach siebentägiger Stimulation mit hEZM zu keiner Zunahme von Cathepsin B gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Abb. 25 B). Cathepsin L zeigte ein ähnliches Expressionsmuster nach Stimulation mit Vitronektin und hEZM wie Cathepsin B. Jedoch ist die Reduktion der Cathepsin L-Expression auf mRNA-Ebene mit 40 Prozent nach Zugabe von Vitronektin sowie hEZM am ersten Inkubationstag etwas stärker als bei Cathepsin B. Die verringerte Expression von Cathepsin L nach Stimulation mit Vitronektin war nach 4 Tagen Inkubationszeit noch messbar, wohingegen die Cathepsin L-Expression unter Stimulation mit hEZM wieder auf Kontrollniveau anstieg. Am 7. Inkubationstag konnte unter Vitronektin-Stimulation eine Erhöhung der Cathepsin L-Transkription beobachtet werden. Ebenso stieg unter hEZM-Zugabe die Expression von Cathepsin L leicht über Kontrollniveau an (Abb. 25 C).

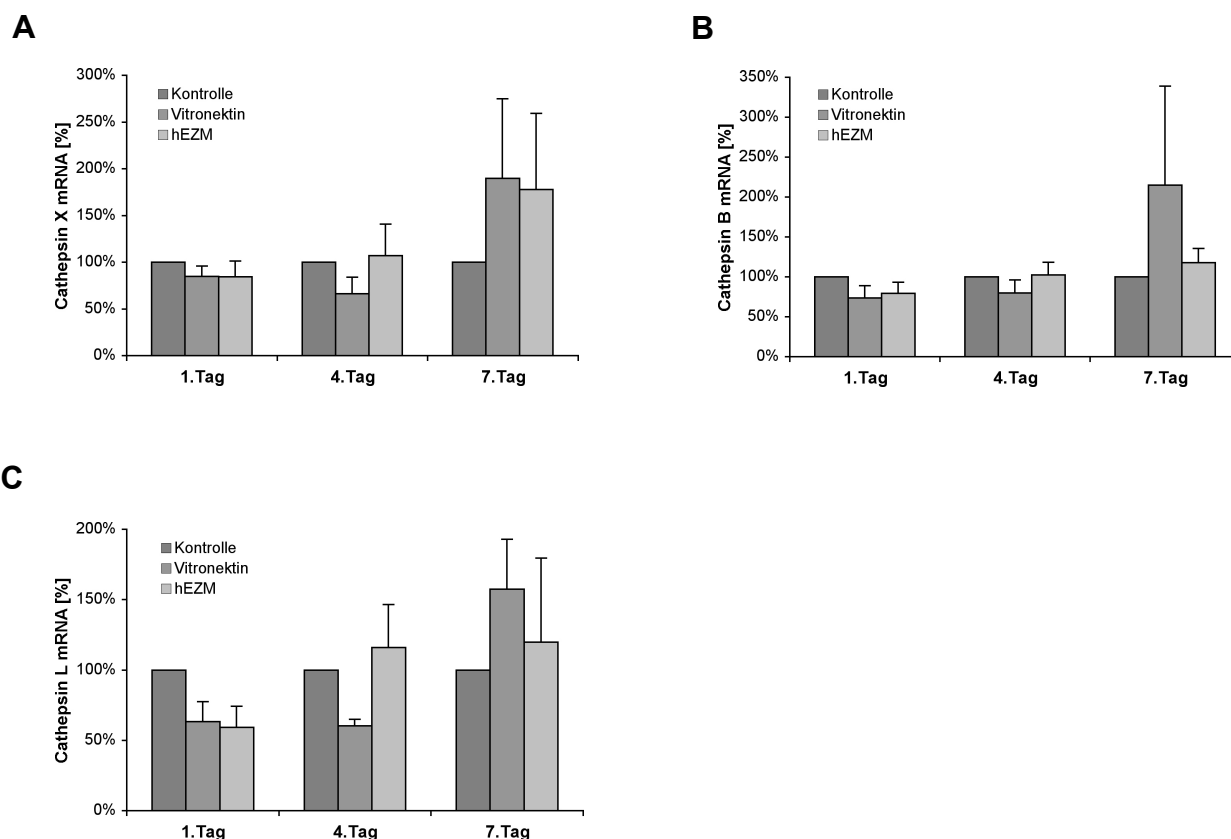


Abb. 25: mRNA-Expression von Cathepsin X, B und L nach Stimulation mit Vitronectin und hEZM.

Nach 1, 4 und 7 Tagen Stimulation von PC-3-Zellen mit Vitronectin bzw. hEZM wurden mittels qRT-PCR die mRNA-Expressionslevel für Cathepsin X (A), B (B) und L (C) ermittelt. Die Normalisierung erfolgte mit GAPDH.

Aufgrund der deutlich veränderten Cathepsin X-Expression nach dem siebten Stimulationstag wurde die Expression von Cathepsin X auf Proteinebene näher untersucht. Auch hier zeigte sich nach 1 bzw. 4 Tagen Stimulation mit Vitronectin und hEZM ein leichter Rückgang der (Pro)Cathepsin X-Menge intrazellulär (Abb. 26 A). Nach 7 Tagen Inkubation mit Vitronectin wurde jedoch ein Anstieg von (Pro)Cathepsin X um zirka 80 Prozent im Vergleich zu den unstimulierten Zellen beobachtet. Die Stimulation mit hEZM über 7 Tage führte sogar zu einer Steigerung der (Pro)Cathepsin X-Expression um das fünffache im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Abb. 26 A). Jedoch zeigte sich auch eine hohe Standardabweichung. Die Stimulation mit Vitronectin hatte zu allen drei Inkubationszeitpunkten keinen signifikanten Effekt auf die Sezernierung von (Pro)Cathepsin X (Abb. 26 B).

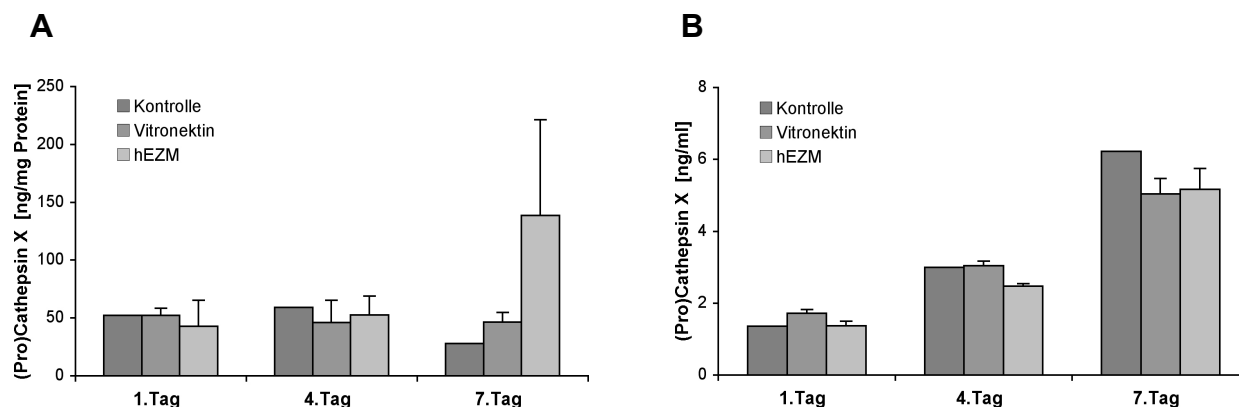


Abb. 26: Expression und Sekretion von Cathepsin X nach Stimulation mit Vitronektin und hEZM.

Nach 1, 4 und 7 Tagen Inkubation mit Vitronektin bzw. hEZM wurde mittels ELISA die intrazelluläre Expression (A) und Sekretion (B) von (Pro)Cathepsin X ermittelt.

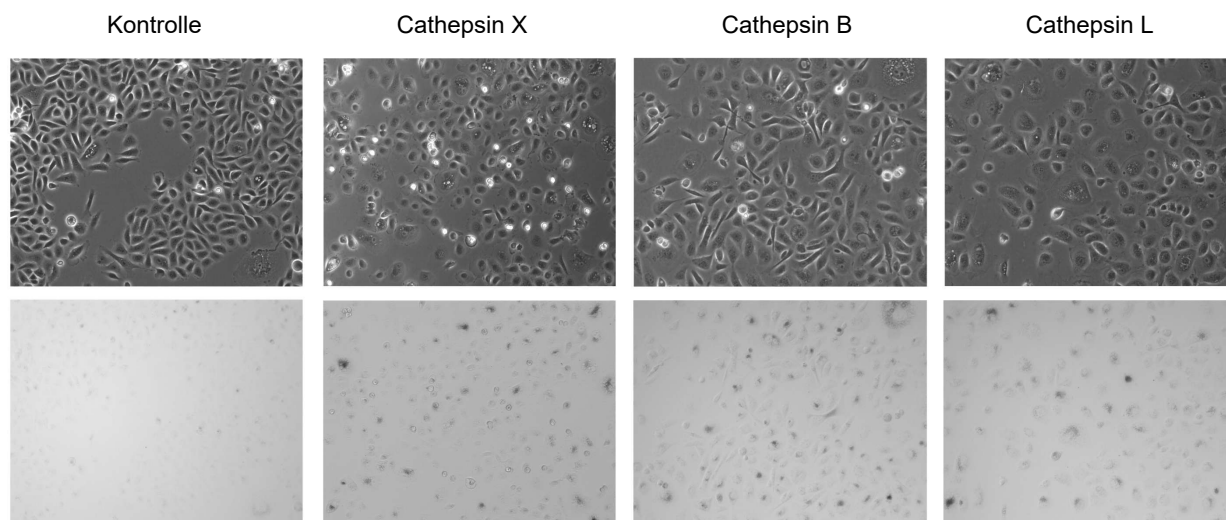
4.11 Einfluss der Cathepsin-Defizienz auf die zelluläre Seneszenz

4.11.1 Detektion der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidaseaktivität in PC-3-Zellen

PC-3-Zellen zeigten nach transientem Knock-Down von Cathepsin X und L vermehrt einen Seneszenz-typischen Phänotyp mit vergrößerten und abgeflachten Zellkörpern (Abb. 27 A). Im Vergleich dazu führte die verringerte Expression von Cathepsin B nur zu geringen morphologischen Veränderungen der PC-3-Zellen. Aufgrund der Veränderung der Morphologie sollte eine Beteiligung der Cathepsine X, B und L an Seneszenz-assoziierten Prozessen untersucht werden. Die Akkumulation von lysosomalen Enzymen wie der β -Galaktosidase ist ein Charakteristikum des seneszenten Phänotyps. Deshalb wurde nach transientem Knock-Down zuerst die Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidaseaktivität mit Hilfe der zytochemischen β -Galaktosidasefärbung bestimmt.

Nach fünf Tagen Inkubationszeit mit siRNAs gegen Cathepsin X, B und L konnte bei allen drei Cathepsinen eine erhöhte β -Galaktosidasefärbung gegenüber den mit NS-siRNA transfizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 27 A). Zur genauen Quantifizierung wurde ein Färbeindex verwendet, welcher bei allen Cathepsin-defizienten Zellen im Durchschnitt eine Verdopplung der Färbeintensität zeigt (Abb. 27 B).

A



B

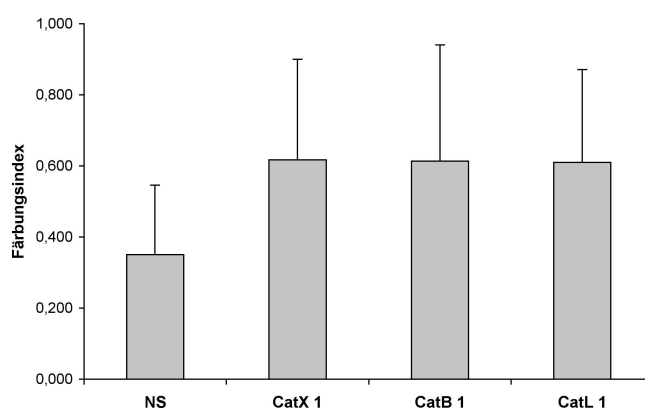


Abb. 27: Erhöhte β -Galaktosidasefärbung nach transientem Knock-Down von Cathepsin X, B und L.

(A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (10-fache Vergrößerung) von PC-3-Zellen nach 5-tägiger Transfektion mit siRNA gegen Cathepsin X, B und L und zytochemischer β -Galaktosidasefärbung. Die obere Reihe zeigt in Phasenkontrastaufnahmen die Morphologie der Zellen. Die untere Reihe zeigt ausschließlich die β -Galaktosidasefärbung derselben Ausschnitte. (B) Für die Quantifizierung wurden pro Well sieben Gesichtsfelder mit Hilfe eines Färbungsindex ausgewertet. Hierbei wurden je nach Intensität der Färbung Punkte von 0 (=keine Färbung) bis 3 (=starke Färbung) pro Zelle vergeben. Der Quotient aus der Summe der Punkte und der Gesamtzellzahl des Gesichtsfeldes ergibt den Färbungsindex. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Versuchen pro Oligonukleotid.

Um den möglicherweise bei der zytochemischen Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidasefärbung auftretenden Auswertungsbias durch eine ungleichmäßige Zellverteilung zu umgehen, wurde noch eine zweite Methode - die Galacton Chemilumineszenz Methode (Bassaneze, 2008) - verwendet. Die Galacton Chemilumineszenz Methode bestimmt schnell und sensitiv die Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase-Aktivität, indem ein chemilumineszentes Substrat von der β -Galaktosidase gespalten wird. Die dabei freigesetzte Chemilumineszenz korreliert positiv

mit der Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase-Aktivität. Auch hier zeigten Cathepsin X-, B- und L-defiziente Zellen eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität gegenüber der Kontrolle. Im Vergleich zu Cathepsin X- und L-defizienten Zellen war der Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität nach Knock-Down von Cathepsin B am höchsten (Abb. 28).

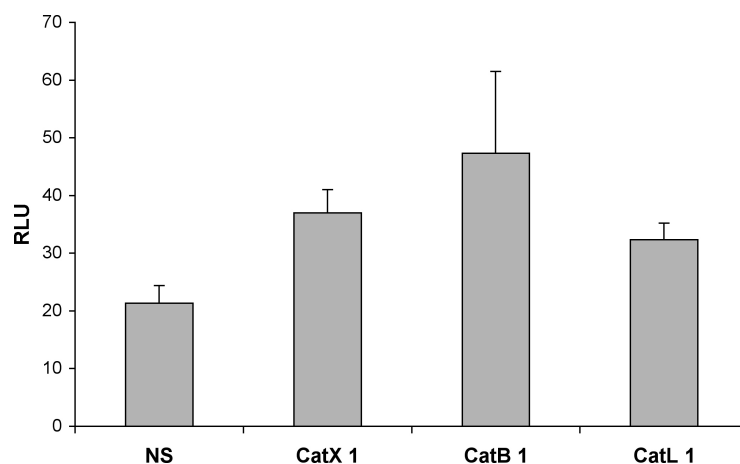


Abb. 28: Quantitative Chemilumineszenz Detektion der Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase Aktivität nach transienten Knock-Down der Cathepsine X, B und L.

Nach 5 Tagen Inkubationszeit mit siRNA gegen Cathepsin X, B und L wurden die PC-3-Zellen lysiert, mit Reaktionsbuffer versetzt und die resultierende Lumineszenz im Spektrofluorimeter (Safire II, Tecan) quantifiziert. Der Knock-Down der Cathepsine X, B und L führt zu einer signifikant ($p < 0,05$) erhöhte β -Galaktosidasefärbung gegenüber den mit NS-siRNA transfizierten PC-3-Zellen.

4.11.2 Proliferationsverhalten von Cathepsin X-defizienten PC-3-Zellen

Ein wichtiges Hauptmerkmal des seneszenten Phänotyps ist der permanente Proliferationsstopp (Hayflick, 1965). Mit Hilfe eines Proliferationsassays sollte untersucht werden, ob dieser Wachstumsstopp auch bei Cathepsin X-defizienten Zellen auftritt. Hierfür wurde nach zweitägiger Transfektion mit Cathepsin X- und NS-siRNA zu drei verschiedenen Zeitpunkten (0h, 24h und 48h) die Zellzahl in der Neubauer-Kammer bestimmt. Es zeigte sich zwar eine verringerte Proliferation von Cathepsin X-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, jedoch betrug die Reduktion im Mittel nur 17 Prozent (Abb. 29).

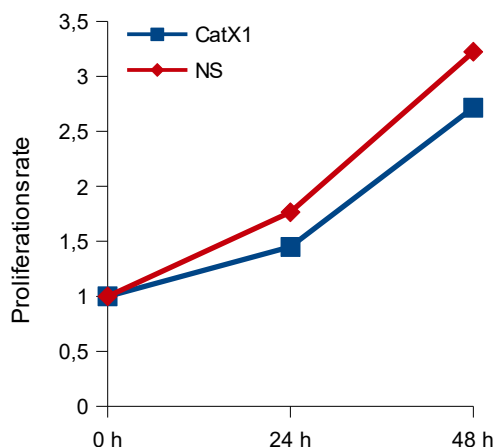


Abb. 29: Bestimmung der Proliferation von PC-3-Zellen nach transienten Knock-Down von Cathepsin X.

PC-3-Zellen wurden für zwei Tage mit Cathepsin X und NS-siRNA transfiziert. Danach wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 24 h und 48 h) die Zellzahl mit Hilfe der DAPI-Färbung bestimmt. Es wurden pro Oligonukleotid Triplets verwendet und jeweils drei Gesichtsfelder pro Well ausgezählt. Die Proliferationsrate ergab sich aus der Normierung auf die zum Zeitpunkt 0 h gemessenen Zellanzahl. Im Vergleich zur Kontrolle war die Proliferation von Cathepsin X-defizienten Zellen nur geringfügig reduziert.

4.11.3 Veränderung der Seneszenz-assoziierten Genexpression

Senescente Zellen zeigen eine veränderte Genexpression, die durch die vermehrte Expression von zwei Zellzyklusinhibitoren (p21 (CDKN1a) und p16 (CDKN2a)) gekennzeichnet ist (Campisi, 2001; Braig, 2006). Zusätzlich weist das Tumorsuppressorgen p53 bei Seneszenz ebenfalls häufig erhöhte Werte auf. Um eine Veränderung dieser zusätzlichen Seneszenzmarker in Cathepsin-defizienten Zellen zu überprüfen, wurde die mRNA-Expression von p16, p21 und p53 nach zwei bzw. drei Tagen Transfektion mit siRNA gegen Cathepsin X, B und L mittels qRT-PCR bestimmt. Nach Cathepsin X-Knock-Down konnten für p16 sowie für p21 ein signifikanter Anstieg beobachtet werden (Abb. 30 A). Die Messergebnisse zeigten für den Zellzyklusinhibitor p21 jedoch eine hohe Standardabweichung. Auffällig ist die Tatsache, dass die Expression von p53 keinen Unterschied zu den Kontrollzellen aufwies. Nach Knock-Down von Cathepsin B war nur bei p16 eine signifikante Erhöhung gegenüber den NS-transfizierten Zellen zu quantifizieren. Die Seneszenzmarker p21 und p53 zeigten dagegen keine Veränderung in ihrem Expressionsmuster im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 30 B). Der Knock-Down von Cathepsin L führte zu einer Hemmung der mRNA-Expression von p16 und p53 (Abb. 30 C). Im Gegensatz dazu war der Zellzyklusinhibitor p21 zwar hochreguliert, es zeigte sich jedoch eine hohe Standardabweichung.

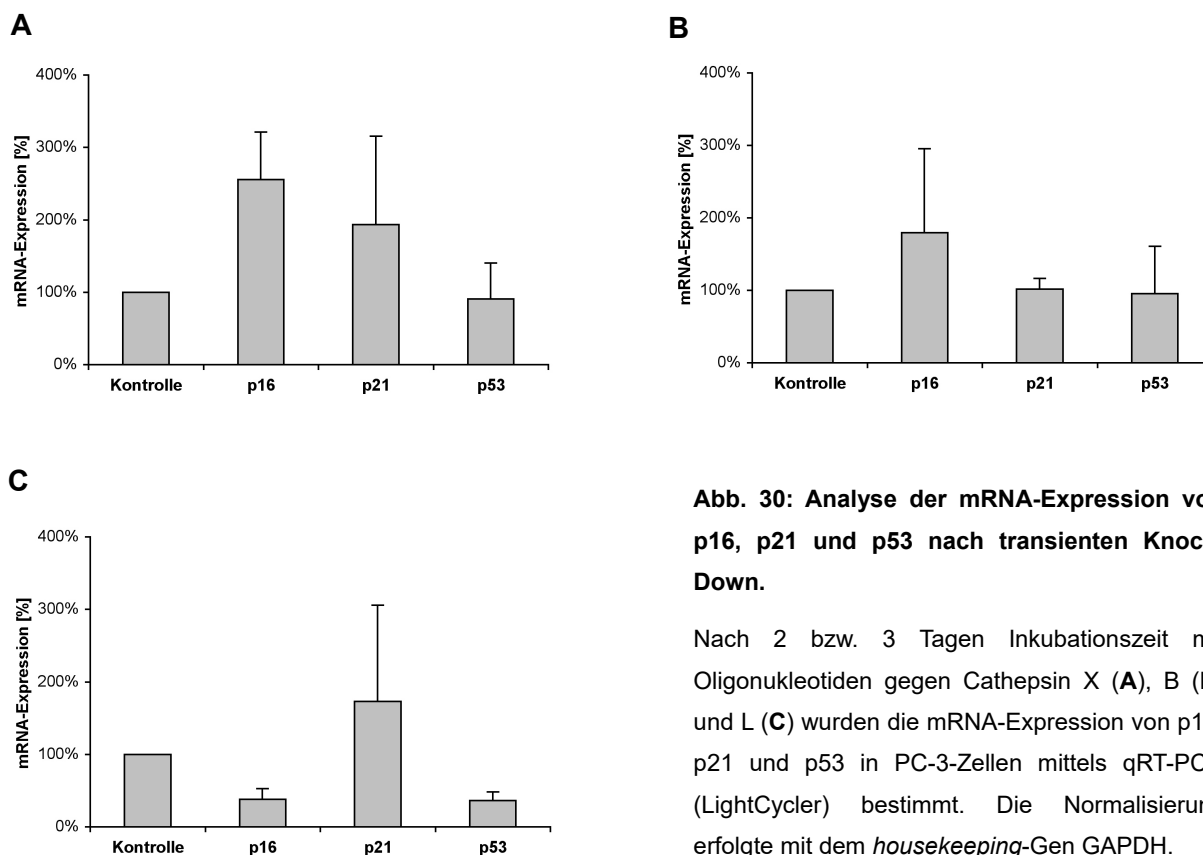


Abb. 30: Analyse der mRNA-Expression von p16, p21 und p53 nach transienten Knock-Down.

Nach 2 bzw. 3 Tagen Inkubationszeit mit Oligonukleotiden gegen Cathepsin X (**A**), B (**B**) und L (**C**) wurden die mRNA-Expression von p16, p21 und p53 in PC-3-Zellen mittels qRT-PCR (LightCycler) bestimmt. Die Normalisierung erfolgte mit dem *housekeeping*-Gen GAPDH.

4.11.4 Charakterisierung von Cathepsin-defizienten PC-3-Zellen mittels

Gene Arrays

Im Kontext der veränderten Expression von p16, p21 und p53 nach spezifischen Cathepsin-Knock-Down, sollten noch weitere mögliche Änderungen der Genexpression nach Downregulation der Cathepsine X, B und L identifiziert werden. Hierfür wurden sog. *Gene Arrays* eingesetzt, die in einem einzigen Experiment jeweils 96 relevante Zielgene gleichzeitig untersuchen. Es wurden zwei verschiedene cDNA-Arrays (Human Cancer PathwayFinder™ Gene Array und Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules Gene Array) der Firma SuperArray (Bioscience Corp.) verwendet.

Im ersten Schritt wurden aus Cathepsin X-, B- und L-defizienten und aus Kontroll-transfizierten PC-3-Zellen RNA isoliert, um danach mit Hilfe der oben genannten cDNA-Arrays (SuperArray) jeweils das Expressionsprofil von 96 Genen zu erstellen. Es konnte bei einigen Genen eine Veränderung der Expression nach Knock-Down der Cathepsine X, B und L festgestellt werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Knock-Down-Effekte von Cathepsin X, B und L auf die Expression anderer Gene.

Human Extracellular Matrix & Adhesion Molecules Gene Array				
Gen	Beschreibung	Cathepsin X-Knock-Down	Cathepsin B-Knock-Down	Cathepsin L-Knock-Down
Cell Adhesion Molecules				
ITGA6	Integrin, alpha 6	↑ up ↑	—	—
Extracellular Matrix Proteins				
Proteases				
CTSL	Cathepsin L	↑ up ↑	↓ down ↓	↓ down ↓
MGEA5	Meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	↑ up ↑	—	—
MMP9	Matrix metalloprotease 9	—	↑ up ↑	—
tPA	Plasminogen activator, tissue	—	↓ down ↓	—
Protease Inhibitors				
SERPIN B5	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin) member 5	↑ up ↑	—	↓ down ↓
SERPIN B2	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin) member 2	—	—	↑ up ↑
CST3	Cystatin C	↓ down ↓	—	↓ down ↓

Human Cancer PathwayFinder™ Gene Array				
Gene Name	Description	Cathepsin X-Knock-Down	Cathepsin B-Knock-Down	Cathepsin L-Knock-Down
Cell Cycle Control and DNA Damage Repair				
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A	↑ up ↑	—	—
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	↓ down ↓	↓ down ↓	—
Apoptosis and Cell Senescence				
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	↑ up ↑	↑ up ↑	—
BAX	BCL2-associated X protein	↓ down ↓	↓ down ↓	—
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	—	↑ up ↑	—
TERT	Telomerase reverse transcriptase	↓ down ↓	↓ down ↓	↓ down ↓
Signal Transduction Molecules and Transcription Factors				
ETS2	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2	↓ down ↓	↓ down ↓	—
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	↑ up ↑	↑ up ↑	—
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	—	↓ down ↓	—
RAF1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	—	↑ up ↑	—
RASA1	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	↑ up ↑	—	↑ up ↑
Adhesion				
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	—	—	↓ down ↓
ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	—	—	↑ up ↑

Human Cancer PathwayFinder™ Gene Array				
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A	—	↑ up ↑	↑ up ↑
Angiogenesis				
EGFR	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	↓ down ↓	—	—
Invasion and Metastasis				
PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	↑ up ↑	—	—

Im zweiten Schritt konnte mittels qRT-PCR die Hochregulation von Cathepsin L nach Cathepsin X-Knock-Down sowie die erwartete Niederregulation von Cathepsin L nach Cathepsin L-Knock-Down bestätigt werden (Abb. 31). Nach Knock-Down von Cathepsin B zeigte sich jedoch eine erhöhte Expression von Cathepsin L in der qRT-PCR, wohingegen im *Gene Array* eine Reduktion von Cathepsin B beobachtbar war. Auch weitere Expressionsmuster des *Gene Arrays*, wie zum Beispiel von MMP9 und p21 ließen sich durch qRT-PCR nicht verifizieren. Im *Gene Array* zeigte sich nach Cathepsin L-Knock-Down keine Veränderung der MMP9-Expression, jedoch konnte mittels qRT-PCR ein deutlicher Anstieg der MMP9-Expression gemessen werden (siehe Kapitel 4.4 *Einfluss der Cathepsin Downregulation auf MMP9-mRNA-Expression*). Die Messung der p21-Expression mit Hilfe der qRT-PCR nach Knock-Down der Cathepsine X, B und L korrelierte nicht mit den Ergebnissen des *Gene Arrays* (siehe Kapitel 4.11.3 *Veränderung der Expression der Seneszenzmarker p21, p16 und p53 nach Knock-Down von Cathepsin X, B und L*).

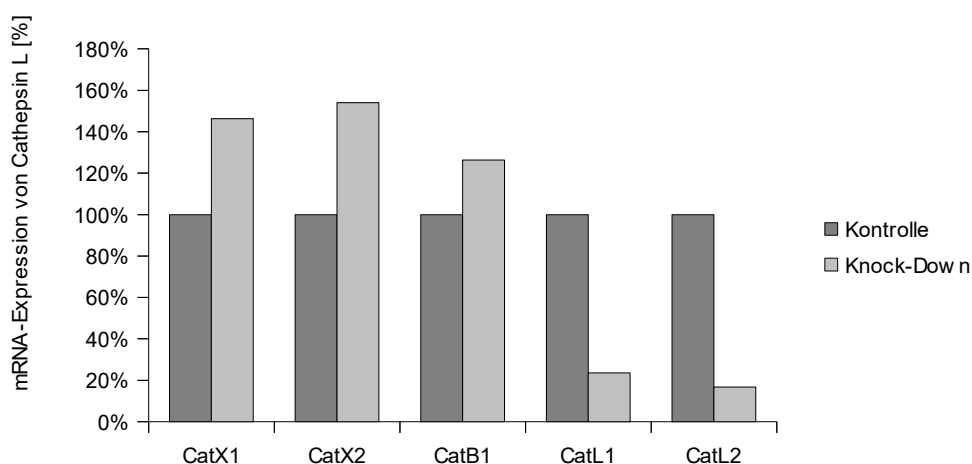


Abb. 31: Cathepsin L-mRNA-Expression nach Knock-Down von Cathepsin X, B und L.

PC-3-Zellen wurden mit siRNA gegen Cathepsin X, B und L transfiziert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische NS-siRNA verwendet. Nach einer Transfektionszeit von zwei Tagen für Cathepsin X und B bzw. für drei Tage für Cathepsin L wurde die mRNA-Expression von Cathepsin L mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte mit dem *housekeeping*-Gen GAPDH.

5 Diskussion

Aufgrund des demographischen Wandels in den Industriestaaten ist zu erwarten, dass die Inzidenz des Prostatakarzinoms dramatisch ansteigen wird. Bis zum Jahr 2050 wird in Deutschland der Anteil der über 60-Jährigen in der Bevölkerung voraussichtlich auf 28 Millionen anwachsen (37 Prozent) und somit doppelt so hoch sein wie im Jahr 2006 (Börgermann et Rübben, 2006). Es ist deshalb anzunehmen, dass die Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms als häufigstes Karzinom des Mannes stark an Bedeutung zunehmen wird. Die hohe Sterblichkeitsrate bei malignen Prostatakarzinomen ist hauptsächlich auf die Invasivität und Metastasierung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zurückzuführen. Neben Matrixmetalloproteasen und Serinproteasen spielen nach neuesten Erkenntnissen auch Cysteinproteasen eine wichtige Rolle bei der Metastasierung. Da die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin X im Prostatakarzinom bereits in den PINs stark überexprimiert ist (Nägler et al., 2004) und deren Funktion bei der Tumorentwicklung noch unklar ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit deren Einfluss auf das Migrations-/Invasionsverhalten von Prostatakarzinomzellen näher untersucht werden. Neben Cathepsin X sind die Cathepsine B und L ebenfalls im Prostatakarzinom überexprimiert (Fernandez et al., 2001; Chauhan et al., 1991) und wurden deshalb vergleichend zu Cathepsin X untersucht. Um die Bedeutung der einzelnen Proteasen im Gesamtkontext der zellulären Cysteinproteasen-Ausstattung abzuklären, wurden die oben genannten Cathepsine gemeinsam in einem Zellmodell analysiert.

5.1 Die verringerte Invasivität der Prostatakarzinomzellen nach Knock-Down von Cathepsin X, B und L

Lysosomale Cysteinproteasen werden in vielen malignen Tumoren überexprimiert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese und insbesondere bei invasiven Prozessen (Mohamed et Sloane, 2006). So führt die Niederregulation von Cathepsin B zu einem verringerten Invasionsverhalten von Melanom-, Osteosarkom- und Prostatakarzinomzellen (Krueger et al., 1999; Szpaderska et Frankfater 2001). Umgekehrt führt eine Überexpression von Cathepsin B in niedrigmalignen Melanomzelllinien zu einer dreifach erhöhten Invasivität durch Matrigel (Szpaderska et Frankfater, 2001). Auch der pharmakologische Knock-Down der proteolytischen Aktivität von Cathepsin B und L mit selektiven Proteaseinhibitoren verringert das invasive Potential von Ovarial-, Bronchial-, Mamma- sowie Prostatakarzinomzellen (Kobayashi et al., 1992; Navab et al., 1997; Premzl et al., 2003; Colella et al., 2004). In Gliomazelllinien kann nach Downregulation von Cathepsin L durch siRNA eine verringerte Invasion im Transwellassay

beobachtet werden (Levicar et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch nach Hemmung der Cathepsin X-Expression in Magenkarzinomzellen (Krueger et al., 2005).

Aufgrund der oben genannten Befunde wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Cathepsine X, B und L auch im Prostatakarzinom an invasiven Prozessen beteiligt sind. Hierfür wurden zunächst verschiedene Zellmodelle verglichen. Die Zelllinie PC-3 zeigte im Vergleich zu den weniger invasiven Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und DU-145, wie schon bei Pulukuri beschrieben (Pulukuri et al., 2005), das höchste Migrations-/Invasionspotential im Transwellassay und wurde deshalb für die nachfolgenden Versuche verwendet. Für die spezifische Funktionsanalyse der Cathepsine X, B und L wurden diese mit Hilfe der siRNA-Technologie niederreguliert. Diese Technologie bietet sich an, da kurze doppelsträngige RNA-Moleküle durch RNA-Interferenz zu einem spezifischen Knock-Down von Genen führen (Fire et al., 1998). In allen durchgeführten Experimenten wurde die Knock-Down-Effizienz durch qRT-PCR auf RNA-Ebene und durch ELISA oder Westernblot auf Proteinebene verifiziert. Wie erwartet zeigten die PC-3-Zellen im Transwellassay nach Knock-Down der Cathepsine X, B und L jeweils ein deutlich verringertes Invasions-/Migrationspotential. Um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt kein oligoabhängiger Nebeneffekt war, wurde für den Knock-Down der einzelnen Cathepsine jeweils zwei unterschiedliche Oligonukleotide eingesetzt. Da die beobachtete Reduktion für jedes einzelne Cathepsin kaum zwischen den zwei verwendeten Oligonukleotiden variierte, konnte eine Oligoabhängigkeit ausgeschlossen werden.

Die *in vitro* deutlich messbare Reduktion der Invasionsrate ist *in vivo* nicht in dem Ausmaß zu beobachten. Dies zeigt sich zum Beispiel im *pyloma middle T* (PymT)-induzierten Mausmodell für das Mammakarzinom, in welchem Cathepsin X-defiziente Mäuse nur eine verlängerte tumorfreie Periode und Cathepsin B-defiziente Mäuse sowohl eine verzögerte erste Tumordetektion als auch eine reduzierte Tumormasse aufweisen (Sevenich et al., 2010). Bei doppelt-defizienten Mäusen kommt es hingegen zu einem synergistischen Effekt mit einer signifikanten Verlangsamung der Tumorentwicklung und Reduktion von Anzahl und Größe der Lungenmetastasen. Dies spricht für eine reziproke Kompensation von Cathepsin X und B *in vivo*. Dieser Effekt konnte auch *in vitro* in den untersuchten PC-3-Zellen zwischen Cathepsin X und B bzw. zwischen Cathepsin X und L gemessen werden. Nach dem Knock-Down von Cathepsin X war die Expression von Cathepsin B und L jeweils erhöht (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst weisen diese Erkenntnisse auf eine Beteiligung der Cathepsine X, B und L bei Invasions-/Migrationsprozessen im Prostatakarzinom hin. Es stellt sich nun die Frage, auf welchen Mechanismen dieser Effekt beruht. Von einer Vielzahl von lysosomalen Cysteinproteasen ist bekannt, dass sie von Tumorzellen und Tumor-assoziierten Zellen sezerniert werden und extrazellulär an der Tumorgenese beteiligt sind (Mohamed et Sloane,

2006). Für das Prostatakarzinom ist die Sekretion der Cathepsine X, B und L beschrieben (Fernandez et al., 2001; Sudhan et Siemann, 2013; Pečar-Fonović et al., 2013). Die Cathepsine werden überwiegend als inaktive Proform von den Tumorzellen freigesetzt (Cavallo-Medved et Sloane, 2003; Collette et al., 2004; Roshy et al., 2003). Dies konnte für Cathepsin X in PC-3-Zellen mittels Westernblotanalyse bestätigt werden. Cathepsin X war im Zellkulturüberstand vorwiegend als Proform nachweisbar. Darüber hinaus lag Cathepsin X im Vergleich zu Cathepsin B in wesentlich höherer Konzentration im Medium vor. Auch in immunhistologischen Analysen von Prostatakarzinomgewebe zeigten die Cathepsine B und L nur eine schwache Reaktion, während für Cathepsin X eine starke positive Reaktion in PIN- und Prostatakarzinomgewebe nachgewiesen wurde (Nägler et al., 2004). Dies weist auf einen starken Einfluss von Cathepsin X auf die Pathogenese des Prostatakarzinoms hin.

Eine wichtige extrazelluläre Funktion von Proteasen während der Tumorprogression ist die Degradation der extrazellulären Matrix. Diese kann direkt oder indirekt erfolgen. Aufgrund der unterschiedlichen proteolytischen Aktivität der drei Proteasen muss zwischen den Cathepsinen X, B und L differenziert werden. Für die Endopeptidase Cathepsin L ist die direkte Matrixdegradation sehr wahrscheinlich, da sie Kollagen I, Kollagen IV sowie die BSA-Kontrolle *in vitro* sehr effizient spaltete. Darüber hinaus hat Cathepsin L die Fähigkeit Elastin, Laminin und andere Komponenten der EZM *in vitro* zu degradieren (Buck et al., 1992; Chauhan et al., 1991). Zudem wird Procathepsin L extrazellulär durch Heparansulfate aktiviert (Ishidoh et Kominami, 1995). Daher kann auch *in vivo* von einem Abbau der EZM durch Cathepsin L ausgegangen werden.

In der Literatur wird eine direkte Degradation der EZM-Komponenten Laminin, Kollagen IV, Fibronectin und Tenascin C durch Cathepsin B beschrieben (Buck et al., 1992; Mai et al., 2002). Im Proteolyseexperiment zeigte Cathepsin B für Kollagen I und IV eine deutlich schwächere proteolytische Aktivität als erwartet. Diese Diskrepanz kann durch die Tatsache erklärt werden, dass Cathepsin B in aktiver Form aufgrund des sogenannten *occluding loop* als Endo- oder als Exopeptidase fungieren kann (Turk et al., 2001; Nägler et al., 1997). Dieser *occluding loop* blockiert bei saurem pH-Wert teilweise das Aktivitätszentrum und daraufhin wirkt Cathepsin B als Carboxydipeptidase. Bei einem neutralem pH-Wert kommt es zu einer Konformationsänderung des *occluding loop* und das Aktivitätszentrum wird nicht mehr blockiert. In diesem Fall zeigt das Enzym Endopeptidaseaktivität, die im Vergleich zu Cathepsin L jedoch nur schwach ausgeprägt ist (Illy et al., 1997). Der Proteolyseversuch wurde bei pH 6 (entsprechend dem leicht sauren Milieu der Lysosomen) durchgeführt. Die geringe proteolytische Aktivität kann daher dadurch erklärt werden, dass Cathepsin B möglicherweise nicht seine maximale Endopeptidaseaktivität erreicht hatte. Allgemein ist eine direkte Degradation von extrazellulären Matrixproteinen und somit eine Beteiligung an

Invasionsprozessen durch Cathepsin B auch *in vivo* möglich. Dies wird besonders im Hinblick auf die erhöhte Expression und Plasmamembran-assoziierte Aktivität von Cathepsin B an der Invasionsfront des Prostatakarzinoms erkennbar (Sinha et al., 1993). Darüber hinaus beteiligt sich Cathepsin B indirekt an der Matrixdegradation durch Aktivierung anderer Proenzyme wie Pro-uPA oder ProMMPs, welche in ihrer aktiven Form für den direkten Abbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembran verantwortlich sind (Kobayashi et al., 1991; Eeckhout et Vaes, 1977). Auf diese Weise ist Cathepsin B auf der Tumorzelloberfläche an proteolytischen Kaskaden beteiligt, welche eine entscheidende Rolle bei der Matrixdegradation spielen.

Die Matrix-Metalloprotease MMP9 ist ein wichtiger Effektor dieser proteolytischen Kaskaden. Sie wird häufig im Prostatakarzinom exprimiert und mit einem aggressiven Phänotyp in Verbindung gebracht (Ishimaru et al., 2002). Es stellt sich die Frage, ob Cathepsin B oder andere Cathepsine nur Aktivatoren von MMP9 sind oder zusätzlich auch Einfluss auf die MMP9-Expression haben. Sollte die Reduktion von Cathepsinen zu einer verringerten MMP9-Expression führen, so könnte dies die verringerte Invasion im Transwellassay nach Cathepsin-Knock-Down teilweise erklären. Der Knock-Down von Cathepsin B führte nur bei einem Oligonukleotid zu einer Erhöhung der MMP9-mRNA-Expression, was vermutlich ein unspezifischer Nebeneffekt ist. In Cathepsin X-defizienten Zellen wurde keine Veränderung der MMP9-mRNA-Expression gemessen. Dies lässt darauf schließen, dass die Cathepsine B und X keinen Einfluss auf die Expression von MMP9 in PC-3-Zellen haben. In der Literatur kann zumindest nach Überexpression von Cathepsin X in Lebertumorzellen eine erhöhte Expression von MMP-9 auf mRNA- und Proteinebene gemessen werden (Wang et al., 2011). Erstaunlicherweise ist nach Cathepsin L-Knock-Down ein starker Anstieg der MMP9-mRNA-Expression bei beiden Oligonukleotiden nachweisbar. Dies weist auf eine reziproke Kompensation zwischen Cathepsin L und MMP9 hin. Um diesen Zusammenhang näher aufklären zu können, wären noch Versuche auf Proteinebene nötig. Zusätzlich müsste das Sekretionsverhalten von MMP9 in Cathepsin L-defizienten Zellen näher untersucht werden.

Zusammenfassend ist die direkte Degradation der EZM durch Cathepsin B und L sehr wahrscheinlich. Die reduzierte Invasionsfähigkeit der Cathepsin B- und L-defizienten PC-3-Zellen im Transwellassay könnte somit durch die nach Knock-Down verringerte Sekretion und die daraus folgende verringerte EZM-Degradation erklärt werden. Da Cathepsin X nur Monocarboxypeptidaseaktivität besitzt und für Cathepsin X praktisch keine relevante Spaltung der drei Substrate im Proteolyseexperiment zu beobachten war, ist die direkte Degradation von EZM-Komponenten sehr unwahrscheinlich (Nägler et al., 1999; Nägler et al., 2004; Krüger et al., 2005). Deshalb müssen andere Eigenschaften von Cathepsin X von entscheidender Bedeutung für die veränderte Invasionsfähigkeit der PC-3-Zellen sein. Möglicherweise könnten nicht-proteolytische Funktionen von Cathepsin X einen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit

haben. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die Hemmung der Cathepsin X-Aktivität durch neutralisierende Antikörper nicht zu einer Reduktion der Transmigrationsrate von Mammakarzinomzellen führt (Kos et al., 2005). Dies spricht für eine nicht-proteolytische Beteiligung am Invasionsprozess. Neben diesem Argument sprechen auch noch andere Forschungsergebnisse für eine nicht-proteolytische Funktion von Cathepsin X. *In vitro* konnte an der Zelloberfläche von Endothelzellen (HUVECs) eine partielle Kollokalisierung von Cathepsin X mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Lechner et al., 2006) gezeigt werden. Intrazellulär werden Cathepsin X und Integrin $\alpha_v\beta_3$ jedoch in unterschiedlichen Vesikeln nachgewiesen und somit scheint deren Interaktion erst extrazellulär stattzufinden (Lechner et al., 2006). Da die Proregion von Cathepsin X über ein Zell-Adhäsions-Motiv, das sog. RGD-Motiv, verfügt, ist die Protease über diese Aminosäuresequenz in der Lage an den Vitronektinrezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu binden (Lechner et al., 2006). Diese Bindungseigenschaft deutet darauf hin, dass Cathepsin X neben seiner Rolle als proteolytisches Enzym auch nicht-proteolytische Funktionen als Ligand für Integrin $\alpha_v\beta_3$ und/oder andere Integrine ausüben könnte und sich auf diese Weise an der *outside-in*-Signaltransduktion beteiligt.

5.2 Aktivierung von Signaltransduktionswegen durch Stimulation von PC-3-Zellen mit Cathepsinen und Vitronektin

Bei der molekularen Pathogenese von Tumoren spielt die erhöhte oder fehlerhafte Aktivität von verschiedenen Signalwegen eine wichtige Rolle. Die Aufklärung beteiligter Signalkaskaden in Prostatakarzinomzellen stellt daher einen wichtigen Schwerpunkt moderner Tumorforschung dar. Durch Stimulation mit verschiedenen Signalstoffen können Signaltransduktionswege identifiziert werden und dadurch Rückschlüsse auf die Funktion und die Regulation der Zelle gezogen werden. Auch lysosomale Cysteinproteasen können Signaltransduktionskaskaden beeinflussen. Zum Beispiel reguliert Cathepsin K die TLR9-Signaltransduktion in dendritischen Zellen (Asagiri et al., 2008). Ein weiteres Beispiel ist Cathepsin S, welches eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellautophagie spielt, indem es über den EGF-Rezeptor, eine Rezeptor-Tyrosinkinase, den ERK-Signalweg beeinflusst (Chen et al., 2012). Weitere Rezeptoren des ERK-Signalweges sind Integrine, die durch *outside-in-signaling* unterschiedliche intrazelluläre Signalwege aktivieren und somit fundamentale zelluläre Prozesse wie die Proliferation, das Zellüberleben und die Zellmotilität regulieren (Hynes, 2002). Aufgrund dieser Regulierungsmechanismen sind Integrine auch für das Tumorstadium und die Tumordinvasion von entscheidender Bedeutung. So ist eine erhöhte Expression von diversen Integrinen mit einer vermehrten Zellinvasion und Metastasierung assoziiert (Albelda, 1993). Die in dieser Arbeit

verwendeten hochinvasive Prostatakarzinomzelllinie PC-3 exprimiert im Gegensatz zu der nichtinvasiven Prostatakarzinomzelllinie LNCaP das Integrin $\alpha_v\beta_3$ (Zheng et al., 1999). Ein Ligand von Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist das EZM-Protein Vitronektin, das in verschiedenen Zellen eine Aktivierung des ERK- und Akt-Signalweges über eine RGD-abhängige Interaktion mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ induzieren kann (Chen et al., 1994; Zhu et Assoian, 1995; Lee et Juliano, 2004).

Auch in den vorliegenden PC-3-Zellen führte die Vitronektin-Stimulation zu einer Aktivierung des ERK- sowie des Akt-Signalweges. Da PC-3-Zellen das Integrin $\alpha_v\beta_3$ exprimieren, wurde diese Aktivierung höchstwahrscheinlich durch eine Interaktion von Vitronektin mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ induziert. Zheng und Kollegen zeigen, dass die Bindung von Vitronektin an Integrin $\alpha_v\beta_3$ über eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung von FAK zu einer Aktivierung des Akt-Signalweges und dadurch zu einer vermehrten Migration von Prostataepithelzellen führt (Zheng et al., 2000).

Die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 sezerniert Procathepsin X in hohen Mengen. Da eine extrazelluläre RGD-abhängige Interaktion mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ in HUVECs nachgewiesen wurde (Lechner et al., 2006) und PC-3-Zellen das Integrin $\alpha_v\beta_3$ exprimieren (Zheng et al., 1999), besteht die Möglichkeit eines *outside-in-signaling* ähnlich der Signaltransduktion von Vitronektin. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden im Rahmen dieser Arbeit PC-3-Zellen mit Procathepsin X stimuliert und entsprechende Signalwege untersucht, die durch Integrine aktiviert werden können. Tatsächlich führte die extrazelluläre Zugabe von Procathepsin X zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 in PC-3-Zellen, welche auch in humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) beobachtet wird (Nicolaus, 2011). Zur Bestätigung, dass der beobachtete Effekt spezifisch auf die Procathepsin X-Stimulation zurückzuführen ist, wurde die Sekretion von Procathepsin X durch einen transienten Knock-Down unterdrückt, um danach Procathepsin X exogen zu zugeben. Tatsächlich führte die Downregulation von Cathepsin X zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2, die durch exogenes Procathepsin X aufgehoben werden konnte. Angesichts der Tatsache, dass die Interaktion mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ und der β_2 Integrin-Untereinheit für Cathepsin X bekannt ist (Lechner et al., 2006; Obermajer et al., 2006), wäre eine Integrin-abhängige Aktivierung von ERK aufgrund deren Interaktion mit Cathepsin X möglich.

Nun stellte sich die Frage, ob Procathepsin X durch dessen RGD-abhängige Bindung an Integrine eine Signaltransduktion ähnlich der von Vitronektin auslöst. Im Gegensatz zu Vitronektin konnte nach Stimulation mit Procathepsin X keine Aktivierung von Akt beobachtet werden. Jedoch findet nach Hemmung des ERK-Signalweges *upstream* von ERK1/2 eine leichte Aktivierung des Akt-Signalweges statt, ähnlich in mesenchymalen Stammzellen (Nicolaus, 2011). Der Akt-Signalweg ist demnach nur nach Inhibition des ERK-Signalweges durch Procathepsin X aktivierbar. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es Unterschiede in der

Aktivierung der Signalkaskaden zwischen Cathepsin X und Vitronektin gibt. Ein weiterer Hinweis für Unterschiede in der Signaltransduktion ist die Tatsache, dass die Kolo-kalisation mit Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der Oberfläche von HUVECs nur partiell ist (Lechner et al., 2006). Dies deutet auf weitere Bindungspartner von Cathepsin X auch auf der Tumorzelloberfläche hin. Auf der Suche nach weiteren Interaktionspartnern hat unsere Arbeitsgruppe eine Interaktion von Procathepsin X mit dem Plättchenintegrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ nachgewiesen, die jedoch im Vergleich zu $\alpha_v\beta_3$ etwas schwächer ist (Lechner et al., 2006). Die β_3 -Untereinheit der Integrine spielt anscheinend eine wesentliche Rolle für die Assoziation mit Procathepsin X (Lechner et al., 2006), da auch in U-937-Zellen eine Interaktion von Procathepsin X mit der β_3 -Untereinheit stattfindet (Obermajer et al., 2006). Außerdem kann Cathepsin X an der Zelloberfläche auch an Heparansulfat-Proteoglykane binden (Nascimento et al., 2005). Heparin interagiert mit der *mini-loop*-Region von Cathepsin X und induziert eine Konformationsänderung der Protease, die zu einer Reduzierung der Monocarboxypeptidaseaktivität führt (Nascimento et al., 2005). Durch die Bindung an Proteoglykane könnte Cathepsin X der Wechsel zwischen proteolytischen und nicht-proteolytischen Funktionen (z.B. als Ligand) ermöglicht werden. Da Heparansulfat-Proteoglykane an der Regulation von Integrinen beteiligt sein können (Beauvais et al., 2004), wäre über diese Bindung eine indirekte Aktivierung von Integrinen und die folgende Induktion des ERK-Signalweges denkbar. Somit könnte Procathepsin X entweder über die direkte oder die indirekte Interaktion mit Integrinen den ERK-Signalweg aktivieren und hierdurch auf das Adhäsions- und die Migrationsverhalten von PC-3-Zellen Einfluss nehmen.

Durch nähere Betrachtung von Signalproteinen, die *upstream* von ERK und *downstream* von Integrinen liegen, sollte der potentielle Signalverlauf nach Stimulation mit Procathepsin X untersucht werden. Da die Serine/Threoninkinase PAK1 und das kleine G-Protein Rac1 an Migrationsprozessen beteiligt sind und PAKs in verschiedenen Tumoren überexprimiert und/oder überaktiviert sind (Dummler et al., 2009), wurden diese zuerst untersucht. Es konnte jedoch keine direkte Aktivierung von PAK1 oder Rac1 durch Procathepsin X oder Vitronektin nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung von ERK durch Procathepsin X und Vitronektin in PC-3-Zellen nicht über den PAK-Signalweg erfolgt. Auch scheint eine mögliche Beteiligung von Procathepsin X an Migrationsprozessen nicht über PAK reguliert zu werden. Im Gegensatz dazu führt die Stimulation mit Procathepsin X und Vitronektin in hMSC zu einer Aktivierung von PAK1 (Nicolaus, 2011). Diese Unterschiede in der Aktivierbarkeit zeigen, dass die Stimulationseffekte zwischen verschiedenen Zellarten variieren können. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre zum Beispiel eine differenzierte Modulation der Signalwege durch Verbindungsproteine (sogenannte *scaffold*-Proteine) (Kolch, 2005). Entgegen den Erwartungen löste die Zugabe von Procathepsin X nach Hemmung des Akt-Signalweges durch einen PI3K-Inhibitor eine Aktivierung von PAK1 und Rac1 aus. Dieser Effekt ist ebenso

nach Vitronectin-Stimulation bei der Detektion von phospho-Rac1 zu beobachten. Da Rac1 ein direktes Effektorprotein *downstream* von PI3K ist und eine Hemmung von PI3K zu einer verringerten Aktivierung von Rac1 führen sollte (Innocenti et al., 2003), ist dieser Effekt eher unerwartet. Aufgrund des komplexen Aufbaus von zellulären Signalnetzwerken ist es möglich, dass die Hemmung von PI3K die Aktivierung von anderen Rac1-aktivierenden Signalproteinen wie beispielsweise FAK verstärken und somit indirekt zu einer Aktivierung von Rac1 und PAK1 führen könnte.

Interessanterweise konnten auch die gereiften Formen von Cathepsin X und B eine erhöhte Aktivität der MAPK ERK1/2 induzieren. Eine mögliche Begründung für Cathepsin X wäre die Tatsache, dass im reifen Teil des Enzyms ebenso ein Integrin-Erkennungsmotiv mit der Sequenz Glu-Cys-Asp (ECD) vorhanden ist, welches eine Interaktion mit β_2 -Integrinen und $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ermöglicht (Obermajer et al., 2006). Ebenso könnte die proteolytische Aktivität der Cathepsine X und B durch Prozessierung anderer Liganden oder direkt der Rezeptoren für die Induktion des ERK-Signalweges verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang identifizierten Kos und Kollegen die β_2 -Untereinheit der Integrine als Substrat von Cathepsin X, wodurch die Adhäsion und Migration von Monozyten und Makrophagen verstärkt wird (Kos et al., 2009). Jedoch findet die Proteolyse in diesem Fall nicht extrazellulär statt, sondern am kurzen zytoplasmatischen Teil der β_2 -Untereinheit. Cathepsin B könnte indirekt auf den ERK-Signalweg Einfluss nehmen, indem es über Oberflächenstrukturen wie Annexin II (Mai et al., 2000) und Heparansulfate, die stabilisierend auf die Cathepsin B-Aktivität wirken (Almeida et al., 2001), an die Tumorzelloberfläche bindet. Dort wird es aktiviert bzw. bleibt aktiv und aktiviert daraufhin uPA (Kobayashi et al., 1991). Diese Protease kann wiederum Signaltransduktionsprozesse initiieren. Der uPA-Rezeptor, der im Prostatakarzinom überexprimiert ist (Li et Cozzi, 2007), aktiviert nach Bindung von uPA mit Hilfe von transmembranären Co-Rezeptoren (v.a. Integrine) viele intrazelluläre Signalwege, darunter auch den ERK-Signalweg (Smith et Marshall, 2010). Die Aktivierung von uPA-Rezeptoren findet in sogenannten „Caveolae“ statt, in denen sich auch Annexin II befindet (Cavallo-Medved et al., 2005). Caveolae vernetzen proteolytische Kaskaden mit zellulären Signalwegen, wodurch Migration und Invasion erleichtert wird (Mohamed et Sloane, 2006). Cathepsin L zeigte in PC-3-Zellen wie erwartet keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit des ERK-Signalweges durch *outside-in-signaling*.

Im Prostatakarzinom ist eine erhöhte ERK-Aktivität mit einem hohen Gleasonscore und Tumorstadium assoziiert (Gioeli et al., 1999). Dies lässt auf einen ständig aktivierten Ras-Signalweg schließen. Da Ras aber nur in 3 Prozent der Prostatakarzinome mutiert ist (Clarke et al., 2009), könnten Procathepsin X, Cathepsin X und Cathepsin B aufgrund ihrer Überexpression und der nachgewiesenen Aktivierung von ERK mögliche ständige Stimuli von Ras sein und dadurch zur postulierten, erhöhten ERK-Aktivität führen. Cathepsin X und B würden

durch diesen Mechanismus die Tumorprogression des Prostatakarzinoms unterstützen. Besonders da die Hemmung von ERK auch zu einer reduzierten Invasion von Prostatakarzinomzelllinien führt (Bessard et al., 2008), können Cathepsin X und B über die nachgewiesene Interaktion mit dem ERK-Signalweg auch an Adhäsions-/Migrationsprozessen beteiligt sein.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Cathepsine nicht nur den ERK-Signalweg, sondern auch noch andere MAPK-Signaltransduktionswege beeinflussen. In diesem Zusammenhang zeigten erste Untersuchungen nach Stimulation von PC-3-Zellen mit Procathepsin X sowie Vitronektin eine erhöhte Aktivität der Effektor kinase p38. Nach Stimulation mit Cathepsin B hingegen war eine starke Reduktion der p38-MAPK-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen detektierbar. Durch welche Mechanismen die Interaktion mit dem hauptsächlich durch Stressstimuli und inflammatorischen Zytokinen getriggerten p38-Signalweg stattfindet (Pearson et al., 2001), ist unklar und muss in weiteren Studien näher untersucht werden.

5.3 Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Expression von Cathepsinen

Die physiologische Funktion einer Zelle ist unter anderem von ihrer Interaktion mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix bestimmt. Auch beim Prostatakarzinom ist die wechselseitige Interaktion zwischen Tumorzellen und Tumorstroma von entscheidender Bedeutung für die Regulation des Tumorwachstums, der Invasion und der Metastasierung (Chung et al., 2005). So können Komponenten der extrazellulären Matrix die Genexpression und Sezernierung von diversen Proteasen beeinflussen. Bei Melanomzellen führt die Stimulation mit Vitronektin zu einer erhöhten Expression und Freisetzung von MMP-2 und TIMP-2 und daraus resultierend zu einer verstärkten Migration der Zellen (Bafetti et al., 1998). Die Interaktion der Prostatakarzinomzelllinie DU145 mit humanen Knochenexplantaten und Kollagen I induziert die Sekretion von Cathepsin B (Podgorski et al., 2005). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem Matrixprotein Vitronektin bei einer Reihe von unterschiedlichen Zelllinien (HeLa, HEK293, HUVEC und THP-1) und der nicht malignen Prostatazelllinie PNT1A zu einem signifikanten Anstieg der Cathepsin X-Expression führt (Lechner, 2008).

Um den Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Expression und Sekretion der Cathepsine X, B und L im Prostatakarzinom zu untersuchen, wurden Stimulationsversuche an PC-3-Zellen durchgeführt. Im Vergleich zu PNT1A-Zellen führte die Behandlung mit Vitronektin

und hEZM in PC-3-Zellen zu keiner vermehrten Sekretion von Cathepsin X nach 24 bzw. 36 Stunden. Nach 7 Tagen kam es sogar zu einer geringen Reduktion der Sekretionsrate von Cathepsin X. Somit hat die Stimulation mit Vitronektin und hEZM kaum einen Einfluss auf die Freisetzung von Cathepsin X in PC-3-Zellen. Die Prostatakarzinomzelllinien DU145 und LNCaP konnten auch nicht zu einer vermehrten Sezernierung angeregt werden, obwohl sie, wie PNT1A, aus Prostatagewebe stammen (Lechner, 2008). Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung von Vitronektin auf die Cathepsin X- Sezernierung im Prostatakarzinom nicht dieselbe wie in anderen Tumorarten ist und daher vom Zelltyp abhängig ist. Bei Betrachtung der intrazellulären Expression von Cathepsin X nach Stimulation, zeigte sich in den ersten Tagen sogar eine leicht reduzierte Cathepsin X-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Nach siebentägiger Behandlung mit Vitronektin und hEZM kam es hingegen zu einer erhöhten Cathepsin X-Expression. Somit wurde nach einer langen Stimulationsdauer doch noch auf transkriptioneller Ebene eine verstärkte Expression des Cathepsin X-Gens induziert. Da die Erhöhung nach Stimulation mit hEZM auf Proteinebene stärker war, deutet dies auf andere EZM-Komponenten hin, die auch auf die Proteinbildung von Cathepsin X Einfluss nehmen.

Wie bei Cathepsin X führte die Stimulation mit Vitronektin nach 24 bzw. 36 Stunden zu einer Reduktion der Expression von Cathepsin B und L auf mRNA-Ebene und erst nach 96 Stunden zu einer erhöhten Expression. Die Zugabe von Vitronektin scheint zunächst zu einer reduzierten Transkription der Gene von Cathepsin X, B und L zu führen, um dann nach einer mehrtägigen Zeitspanne eine erhöhte Transkription zu induzieren. Im Gegensatz zu Cathepsin X hatte die hEZM auf die Expression von Cathepsin B und L keinen Einfluss. Insgesamt ist der genaue Mechanismus durch den Vitronektin auf die Expression der Cathepsine X, B und L Einfluss nimmt noch unklar und benötigt weitergehende Untersuchungen.

5.4 Auswirkungen der Cathepsin-Defizienz auf die zelluläre Seneszenz

In Tumorzellen führt die experimentelle Induktion von zellulärer Seneszenz zur Hemmung von Tumorwachstum durch reduzierte Invasion (Latini et al., 2008; Cichowski et Hahn, 2008). Umgekehrt begünstigt die Inhibition der zellulären Seneszenz die Tumordinvasion (Masuda et al., 2003; Pavey et al., 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das invasive Potential von Cathepsin X-, B- und L-defizienten PC-3-Zellen reduziert ist. Demzufolge kann die Induktion von zellulärer Seneszenz ein weiterer potentieller Mechanismus sein, der die Invasionsfähigkeit von Cathepsin-defizienten Tumorzellen beeinflusst.

Ein typisches Merkmal von seneszenten Zellen in Zellkultur ist eine vergrößerte und abgeflachte

Zellmorphologie (Hayflick, 1965). PC-3-Zellen zeigten nach Knock-Down der Cathepsine X, B und L einen Seneszenz-typischen Phänotyp mit flachen und vergrößerten Zellkörpern. Dieser war bei Cathepsin B-defizienten Zellen am schwächsten ausgeprägt. In unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass auch in Fibroblasten von Cathepsin X^{-/-}-Mäusen und in humanen Fibroblasten nach transientem Knock-Down von Cathepsin X im Gegensatz zu den jeweiligen Kontrollzellen eine Seneszenz-charakteristische Änderung der Morphologie zu beobachten ist (Kraus et al., 2011).

Der Nachweis der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidase (SA- β -Gal), deren Aktivität bzw. Menge in seneszenten Zellen erhöht ist, stellt derzeit den gebräuchlichsten Biomarker für zelluläre Seneszenz dar. Nach Knock-Down der Cathepsine X, B und L konnte mit zwei Methoden eine erhöhte SA- β -Gal-Aktivität in PC-3-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen werden. Jedoch wurde auch in den Kontrollzellen SA- β -Gal-Aktivität detektiert.

Ein weiteres Merkmal von seneszenten Zellen ist deren verändertes Genexpressionsprofil. Gewöhnlich werden bei der Induktion der zellulären Seneszenz entweder der p53/p21- oder der p16-pRB-Signalweg aktiviert und dessen Komponenten hochreguliert (Campisi, 2005; Campisi et al., 2007). In Cathepsin X-defizienten normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) wurde eine erhöhte Expression besonders von p21 und p53 auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Kraus et al., 2011). Im Gegensatz dazu zeigten die Prostatakarzinomzellen PC-3 nach Knock-Down dieser Protease eine erhöhte mRNA-Expression von p21 und p16, wobei p53 unverändert blieb. Die unterschiedlichen Expressionsmuster der NHDF und der PC-3-Zellen sind nicht ungewöhnlich, da die Mechanismen zur Induktion von zellulärer Seneszenz zwischen verschiedenen Zelltypen variieren können (Itahana et al., 2004; Smith et al., 2004). Offensichtlich können - trotz unveränderter p53-Expression - beide Signalwege aktiviert werden und eine p53-p21-vermittelte Signaltransduktion nach Cathepsin X-Knock-Down in PC-3-Zellen ähnlich wie bei NHDF stattfinden. In diesem Zusammenhang konnte in vielen seneszenten Zellen kein Unterschied im mRNA-Gehalt von p53 festgestellt werden, jedoch stieg die Phosphorylierung und somit die Aktivität von p53 während der Seneszenz an (Webley et al., 2000). Der Knock-Down von Cathepsin B führte zu einem anderen Expressionsmuster mit einer Hochregulation des Zellzyklusinhibitors p16 auf mRNA-Ebene und einer unveränderten Expression von p53 und p21, welche beide zur p53-Achse zählen. Dies deutet darauf hin, dass die durch Cathepsin B-Defizienz möglicherweise induzierte Seneszenz von dem p16-pRB-Signalweg abhängig sein kann. Nach Cathepsin L-Knock-Down konnte eine erhöhte mRNA-Expression von p21 bei gleichzeitiger Niederregulation von p16 und p53 beobachtet werden. In Doxorubicin-resistenten Tumorzellen war nach gleichzeitiger Behandlung mit Doxorubicin und Cathepsin L Inhibitor bzw. siRNA-Transfektion gegen Cathepsin L ebenso eine erhöhte Expression von p21 und eine erhöhte SA- β -Gal-Aktivität zu verzeichnen (Zheng et

al., 2004). Darüberhinaus zeigten *in vitro* Experimente, dass p21 ein Substrat von Cathepsin L ist. Die Hemmung von Cathepsin L führt zur Stabilisierung und Akkumulation von p21/WAF1 und somit zu vermehrter Induktion von zellulärer Seneszenz (Zheng et al., 2004). Die Inhibition von Cathepsin L erleichtert besonders in Arzneimittel-resistenten Zellen die Induktion von Seneszenz und die Umkehr der Arzneimittelresistenz. Die erhöhte p21-Expression nach Cathepsin L-Knock-Down liefert nun erste Hinweise, dass dieser Mechanismus potentiell auch in PC-3-Zellen stattfinden kann. Diese Daten deuten darauf hin, dass es keine einheitliche Hochregulation Seneszenz-assoziiierter Gene sowie dazugehöriger Signalwege nach Cathepsin-Knock-Down gibt. Die einzelnen Cathepsine beeinflussen wahrscheinlich unterschiedliche Signalwege durch einen zum heutigen Zeitpunkt ungeklärten Mechanismus.

Der permanente Wachstumsstopp ist ein Hauptmerkmal von seneszenten Zellen. In der Lungenkarzinomzelllinie A549 führt die Hemmung der Cathepsin L-Expression zu einer reduzierten Proliferation (Wille et al., 2002). Auch nach Downregulation von Cathepsin B durch RNA-Interferenz ist die Zellproliferation in PC-3- und DU145-Zellen signifikant reduziert (Nalla et al., 2010). Im Vergleich zu NHDF zeigten Cathepsin X-defiziente PC-3-Zellen nur eine geringe Reduktion der Proliferation nach 48 Stunden. Andere Proliferationsassays (XTT) konnten nach 24 Stunden sogar eine erhöhte Proliferation nachweisen, die wahrscheinlich den erhöhten Metabolismus von Cathepsin X-defizienten Zellen widerspiegelt (Daten nicht gezeigt). Deshalb kann die verringerte Transmigration von Cathepsin X-defizienten PC-3-Zellen durch hECM-beschichtete Membranen *in vitro* höchstwahrscheinlich nicht auf eine verringerte Proliferation zurückgeführt werden. Erstens liegt die Verdopplungszeit von PC-3-Zellen zwischen 25 und 30 Stunden (Office of Physical Sciences-Oncology, 2012; Gosh et al., 2006). Aufgrund der gewählten Transmigrationszeit von 15 Stunden kann die Proliferation als Einflussfaktor vernachlässigt werden. Zweitens war die Reduktion der Proliferationsrate nach Cathepsin X-Knock-Down insgesamt sehr gering. Jedoch kann die veränderte Zellmorphologie seneszenten Zellen - u.a. eine deutliche Größenzunahme - zu einer veränderten Zellmotilität führen, die für die verringerte Migration mitverantwortlich sein kann.

Aufgrund der Tatsache, dass Cathepsin X schon in den Vorläuferläsionen des Prostatakarzinoms (PINs) überexprimiert wird und keine Korrelation mit dem Gleason Score nachgewiesen wurde, könnte diese Protease möglicherweise an der frühen Tumorgenese beteiligt sein (Nägler et al., 2004). Ein wichtiger Schritt der frühen Tumorgenese ist die Immortalisierung der Zellen, die durch die Reaktivierung der Telomerase oder andere Mechanismen, die die Telomerfunktion erhalten, erreicht wird (Stewart et Weinberg, 2000). In 73 Prozent der PINs und in den meisten Prostatakarzinomen (97 Prozent) kann eine Telomerase-Expression gemessen werden, jedoch besteht auch hier keine Korrelation zwischen Gleason Score und Telomeraseaktivität (Zhang et al., 1998). Interessanterweise gibt es in

vorläufigen Ergebnissen (*Gene Array* und qRT-PCR) Hinweise auf eine verminderte Telomerase-Expression nach Cathepsin X-Knock-Down. Im Umkehrschluss kann man nun die Hypothese aufstellen, dass die erhöhte Cathepsin X-Expression im Prostatakarzinom möglicherweise die Reaktivierung der Telomerase-Gene begünstigt. Diese Reaktivierung ist charakteristisch für Tumorzellen, da sie den natürlichen Prozess der Seneszenz als Tumorsuppressor unterbricht (Campisi et al., 2007). In diesem Kontext könnte es sich bei der durch Cathepsin X-Defizienz ausgelösten Seneszenz zum Teil um Telomer-abhängige Seneszenz handeln. Die potentielle Reduktion der Telomerase-Expression in Cathepsin X-defizienten Zellen könnte zu einem vermehrten Auftreten von dysfunktionalen Telomeren führen, die eine beschleunigte zelluläre Seneszenz induzieren.

Zusammengefasst deuten die Daten daraufhin, dass Cathepsin-Defizienz in PC-3-Zellen zu beschleunigter zellulärer Seneszenz führt. Dies kann im Umkehrschluss bedeuten, dass eine erhöhte Expression der Cathepsine X, B und L in Prostatakarzinomzellen die Induktion von Seneszenz - ein Tumorsuppressormechanismus - unterdrückt und demzufolge die Tumorentwicklung unterstützt. Jedoch sind die entsprechenden molekularen Mechanismen bis jetzt weitgehend ungeklärt. In der Literatur wird die Beteiligung von Cathepsin B an Seneszenzprozessen unterschiedlich diskutiert. In diesem Zusammenhang wird überwiegend eine Erhöhung der Cathepsin B-Expression in verschiedenen Geweben mit steigendem Alter sowie in seneszenten Zellen postuliert (Nakanishi et al., 1994; Wyczałkowska-Tomasik et al., 2012; Keppler et al., 2000; Kamino et al., 2003). Beim Prostatakarzinom kann die Hormonentzugstherapie seneszente Zellen induzieren, welche eine erhöhte Cathepsin B-Expression aufweisen (Pernicová et al., 2011). Allerdings wird eine reduzierte Cathepsin B-Expression ebenso mit seneszenten Zellen in Verbindung gebracht (Lai et al., 2008; Cho et al., 2003).

6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde die Beteiligung der Cathepsine X, B und L an Invasionsprozessen von Prostatakarzinomzellen evaluiert. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass eine Funktion der Cathepsine B und L die direkte Matrixdegradation ist, indem eine direkte Proteolyse von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) durch diese Cathepsine nachgewiesen wurde. Die direkte Degradation der EZM durch Cathepsin X ist hingegen unwahrscheinlich, da diese Protease nur Carboxypeptidaseaktivität besitzt. Aufgrund der Tatsache, dass Procathepsin X von PC-3-Zellen freigesetzt wird und dessen Interaktion mit verschiedenen Integrinen bekannt ist (Lechner et al., 2006; Obermajer et al., 2006), wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche autokrine Induktion von *outside-in*-Signaltransduktion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass neben Procathepsin X auch die gereiften Formen von Cathepsin X und B den ERK-Signalweg induzieren, welcher die Migration und somit die Invasion regulieren kann.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollten in zusätzlichen Untersuchungen der Verlauf der Signalkaskade nach Cathepsin-Stimulation weiter aufgeklärt werden und mögliche Transkriptionsziele identifiziert werden. Ein zusätzliches Ziel wäre die Identifikation weiterer Interaktionspartner von Cathepsin X und B an der Tumorzelloberfläche, die zur Aktivierung des ERK-Signalweges führen können. Darüber hinaus sollten die molekularen Interaktionen zwischen diesen Bindungspartnern und Cathepsinen charakterisiert werden, um die pathophysiologische Funktion dieser Cathepsine genauer zu definieren.

Erkenntnisse aus Experimenten mit humanen mesenchymalen Stammzellen weisen darauf hin, dass Cathepsine auch bei der Zellalterung von Bedeutung sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Prostatakarzinomzelllinie PC-3 die Defizienz jeder einzelnen Protease zu morphologischen und funktionellen Veränderungen führt, die mit zellulärer Seneszenz assoziiert sind. Der zugrunde liegende Mechanismus, welcher nach Cathepsin-Knock-Down Seneszenz induziert, ist noch unklar. Sollten Cathepsine tatsächlich die Induktion von zellulärer Seneszenz beeinflussen, so könnte dies wichtige Erkenntnisse für unser Verständnis der Tumorentwicklung liefern und darüber hinaus ein potentielles therapeutisches Konzept für die Antitumorbehandlung darstellen, da die Förderung von zellulärer Seneszenz zur Hemmung von Tumorwachstum durch reduzierte Invasion führt (Latini et al., 2008; Cichowski et Hahn, 2008).

Die ursprüngliche Annahme, dass Cathepsine sich nur durch Matrixdegradation an Invasionsprozessen beteiligen, wurde bereits in diversen Publikationen angezweifelt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cathepsine zusätzlich an der Regulation

von intrazellulären Signalwegen und zellulärer Seneszenz beteiligt sind. Cathepsine spielen somit eine immer deutlicher werdende Rolle bei Invasionsprozessen des Prostatakarzinoms. In Zukunft könnten sich durch spezifische Inhibition dieser Proteasenklasse neue Möglichkeiten in der Therapie des Prostatakarzinoms eröffnen.

7 Literaturverzeichnis

- Albelda, S.M. (1993). Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* Jan;68(1):4-17. Review.
- Almeida, P.C., Nantes, I.L., Chagas, J.R., Rizzi, C.C., Faljoni-Alario, A., Carmona, E., Juliano, L., Nader, H.B., Tersariol, I.L. (2001). Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem.* Jan 12;276(2):944-51.
- Apolo, A.B., Pandit-Taskar, N., Morris, M.J. (2008). Novel tracers and their development for the imaging of metastatic prostate cancer. *J Nucl Med.* Dec;49(12):2031-41.
- Arnaout, M.A., Goodman, S.L., and Xiong, J.P. (2002). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 641–651 5.
- Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober, H.J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D.T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P., Takayanagi, H. (2008). Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science.* Feb 1;319(5863):624-7.
- Bafetti, L.M., Young, T.N., Itoh, Y., Stack, M.S. (1998). Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells. *J Biol Chem.* Jan 2;273(1):143-9.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C. Reiss, Y., Shiloh, Y., Ziv, Y. (1998): Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage, *Science* (Band 281), Nr. 5383, Seite 1674-7.
- Barrett, A.J. et Kirschke, H. (1981). Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol.*;80 Pt C:535-61.
- Barrett, A.J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Jarvinen, M., Katunuma, N., Machtleid, W., Müller-Esterl, W., Sasaki, M., Turk, V. (1986). Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J* 236, 312.
- Bassaneze, V., Miyakawa, A.A., Krieger, J.E. (2008). A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures. *Anal Biochem.* Jan 15;372(2):198-203.
- Beauvais, D.M., Burbach, B.J., Rapraeger, A.C. (2004). The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol.* Oct 11;167(1):171-81.
- Bessard, A., Fremin, C., Ezan, F., Fautrel, A., Gailhouste, L. (2008). RNAi mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 27: 5315–5325.

- Biniossek, M.L., Nägler, D.K., Becker-Pauly, C., Schilling, O. (2011). Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *J Proteome Res.* Dec 2;10(12):5363-73.
- Börgermann, C. et Rübber H. (2006). Früherkennung des Prostatakarzinoms. *Dtsch Arztebl;* 103(37): A 2399–406.
- Braig, M. et Schmitt, C.A. (2006). Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res.* 66, 2881–2884.
- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions. *Biochemie.* Feb; 90(2):194-207.
- Brown, J.P., Wei, W., Sedivy, J.M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831–834.
- Buck, M.R., Karustis, D.G., Day, N.A., Honn, K.V., Sloane, B.F. (1992). Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 282 (Pt 1), 273-8.
- Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11, 27–31.
- Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513–522.
- Campisi, J. et d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Sep;8(9):729-40. Review.
- Campo, E., Munoz, J., Miquel, R., Palacin, A., Cardesa, A., Sloane, B.F., and Emmert-Buck, M.R. (1994). Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am. J. Pathol.* 145, 301–309.
- Carter, B.S., Bova, G.S., Beaty, T.H. (1993). Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol;* 150: 797–802.
- Cavallaro, U. et Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer;* 4:118-32.
- Cavallo-Medved, D. et Sloane, B.F. (2003). Cell-surface cathepsin B: understanding its functional significance. *Curr. Top. Dev. Biol.* 54, 313–341.
- Cavallo-Medved, D., Mai, J., Dosesu, J., Sameni, M., Sloane, B. F. (2005). Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J. Cell Sci.* 118, 1493–1503.

- Chauhan, S.S., Goldstein, L.J., Gottesman, M.M. (1991). Expression of cathepsin L in human tumors. *Cancer Res.* Mar 1;51(5):1478-81.
- Chen, K.L., Chang, W.S., Cheung, C.H., Lin, C.C., Huang, C.C., Yang, Y.N., Kuo, C.P., Kuo, C.C., Chang, Y.H., Liu, K.J., Wu, C.M., Chang, J.Y. (2012). Targeting cathepsin S induces tumor cell autophagy via the EGFR-ERK signaling pathway. *Cancer Lett.* Apr 1;317(1):89-98.
- Chen, Q., Kinch, M.S., Lin, T.H., Burridge, K., Juliano, R.L. (1994). Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 269(43): 26602-26605.
- Cheng, L., Nagabhushan, M., Pretlow, T.P., Amini, S.B., Pretlow, T.G. (1996). Expression of E-cadherin in primary and metastatic prostate cancer. *Am J Pathol*; 148: 1375–80.
- Cho, Y.M., Bae, S.H., Choi, B.K., Cho, S.Y., Song, C.W., Yoo, J.K. (2003). Differential expression of the liver proteome in senescence accelerated mice. *Proteomics*; 3: 1883-1894.
- Chong, H., Vikis, H.G., Guan, K.L. (2003). Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.* 15:463–469.
- Chung, L.W., Baseman, A., Assikis, V., Zhau, H.E. (2005). Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *J Urol.* Jan;173(1):10-20. Review.
- Cichowski, K. et Hahn, W.C. (2008). Unexpected pieces to the senescence puzzle. *Cell* 133, 958-961.
- Clarke, N.W., Hart, C.A., Brown, M.D. (2009). Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology* 11: 57–67.
- Colella, R., Jackson, T., Goodwyn, E. (2004). Matrigel invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L+B activity. *Biotech Histochem.* Jun-Aug;79(3-4):121-7.
- Collette, J., Bocock, J.P., Ahn, K., Chapman, R.L., Godbold, G., Yeyeodu, S., Erickson, A.H. (2004). Biosynthesis and alternate targeting of the lysosomal cysteine protease cathepsin L. *Int Rev Cytol.*;241:1-51. Review.
- Dahl, S.W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., Turk, B. (2001). Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry.* Feb 13;40(6):1671-8.
- Dhom, G. (1983). Epidemiologic aspects of latent and clinically manifest carcinoma of the prostate. *J Cancer Res Clin Oncol* 106(3): 210-218.
- DiLeonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540–2551.

- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. (1995). A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 9363–9367.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3:11–22.
- Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R., Field, J. (2009). Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* Jun;28(1-2):51-63.
- Eeckhout, Y. et Vaes, G. (1977). Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J*; 166:21-31.
- Fernandez, P.L., Farre, X., Nadal, A., Fernandez, E., Peiro, N., Sloane, B.F., Shi, G.P., Chapman, H.A., Campo, E., Cardesa, A. (2001). Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 95, 51–55.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.
- Friedl, P. et Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev*; 28(1-2):129-35.
- Friedrich, B., Jung, K., Lein, M., Turk, I., Rudolph, B., Hampel, G., Schnorr, D., and Loening, S.A. (1999). Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. *Eur. J. Cancer* 35, 138–144.
- Friedrichs, B., Tepel, C., Reinheckel, T., Deussing, J., von Figura, K., Herzog, V., Peters, C., Saftig, P., Brix, K. (2003). Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J. Clin. Invest.* 111, 1733–1745.
- Frosch, B.A., Berquin, I., Emmert-Buck, M.R., Moin, K., Sloane, B.F. (1999). Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. *Apmis*; 107:28-37.
- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., Desnick, R.J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273, 1236-8.
- Gerland, L.M., Peyrol, S., Lallemand, C., Branche, R., Magaud, J.P., Ffrench, M. (2003). Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol.* Aug;38(8):887-95.
- Ghosh, A.K., Steele, R., Ray, R.B. (2006). Knockdown of MBP-1 in human prostate cancer cells delays cell cycle progression. *J Biol Chem.* Aug 18;281(33):23652-7.

- Gioeli, D., Mandell, J.W., Petroni, G.R., Frierson, H.F. Jr., Weber, M.J. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression. *Cancer Res.* Jan 15;59(2):279-84.
- Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., Joyce, J.A. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev*; 20:543-56.
- Gocheva, V. et Joyce, J.A. (2007). Cysteine Cathepsins and the Cutting Edge of Cancer Invasion. *Cell Cycle* 6:60–64.
- Goretzki, L., Schmitt, M., Mann, K., Calvete, J., Chucholowski, N., Kramer, M., Gunzler, W.A., Janicke, F., Graeff, H. (1992). Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *FEBS Lett*; 297:112-8.
- Green, D.R. et Evan, G.I. (2002). A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19–30.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100 (1): 57–70.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.
- Helpap, B. et Rübben, H. (1998). *Prostatakarzinom: Pathologie, Praxis und Klinik*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 7-20.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 14, 501-513.
- Hornsby, P.J. (2002). Cellular senescence and tissue aging in vivo. *J. Gerontol.* 57, 251–256.
- Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Chu, T.M., Wajsman, Z.L., Friedman, M., Papsidero, L., Kim, U., Chai, L.S., Kakati, S., Arya, S.K., Sandberg, A.A. (1980). The LNCaP cell line - A new model for studies on human prostatic carcinoma. In *Models for Prostate Cancer*, pp. 115-132.
- Hummel, K.M., Petrow, P.K., Franz, J.K., Müller-Ladner, U., Aicher, W.K., Gay, R.E., Brömme, D., Gay, S. (1998). Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol.* Oct;25(10):1887-94.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 673–687.
- Illy, C., Qurashi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T., Mort, J.S. (1997). Role of the occluding loop in cathepsin B activity, *J. Biol. Chem.* 272 (2) 1197–1202.

- Innocenti, M., Frittoli, E., Ponzanelli, I., Falck, J.R., Brachmann, S.M., Di Fiore, P.P., Scita, G. (2003). Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol.* Jan 6;160(1):17-23.
- Ishidoh, K. et Kominami, E. (1995). Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 624–631.
- Ishimaru, H., Kageyama, Y., Hayashi, T., Nemoto, T., Eishi, Y., Kihara, K. (2002). Expression of matrix metalloproteinase-9 and bombesin/gastrin-releasing peptide in human prostate cancers and their lymph node metastases. *Acta Oncol* 41: 289–296.
- Itahana, K., Campisi, J., Dimri, G.P. (2004). Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*;5:1–10.
- Jackson, J.G. et Pereira-Smith, O.M. (2006). p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res.* 66, 8356–8360.
- Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., Jones, L.W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology* 17 (1): 16-23.
- Kamino, H., Hiratsuka, M., Toda, T., Nishigaki, R., Osaki, M., Ito, H., Inoue, T., Oshimura, M. (2003). Searching for genes involved in arteriosclerosis: proteomic analysis of cultured human umbilical vein endothelial cells undergoing replicative senescence. *Cell Struct Funct.* Dec;28(6):495-503.
- Keppler, D., Walter, R., Pérez, C., Sierra, F. (2000). Increased expression of mature cathepsin B in aging rat liver. *Cell Tissue Res.* Nov;302(2):181-8.
- Kirkwood, T.B. et Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature* 408, 233–238.
- Knaus, U.G. et Bokoch, G.M. (1998). The p21^{Rac/Cdc42}-activated kinases (PAKs). *Int J Biochem Cell Biol.*; 30:857–862.
- Kobayashi, H., Schmitt, M., Goretzki, L., Chucholowski, N., Calvete, J., Kramer, M., Gunzler, W.A., Janicke, F., Graeff, H. (1991). Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). *J Biol Chem* 266, 5147-52.
- Kobayashi, H., Ohi, H., Sugimura, M., Shinohara, H., Fujii, T., Terao, T. (1992). Inhibition of in vitro ovarian cancer cell invasion by modulation of urokinase-type plasminogen activator and cathepsin B. *Cancer Res.* 52, 3610–3614.
- Kohno, M. et Pouyssegur, J. (2003). Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway: application as anticancer drugs. *Prog. Cell Cycle Res.* 5:219–224.

- Kolch, W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nov;6(11):827-37.
- Kos, J., Sekirnik, A., Premzl, A., Zavasnik Bergant, V., Langerholc, T., Turk, B., Werle, B., Golouh, R., Repnik, U., Jeras, M., Turk, V. (2005). Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues, *Exp. Cell Res.* 306 (1) 103–113.
- Kos, J., Jevnikar, Z., Obermajer, N. (2009). The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adh Migr.* 2009 Apr-Jun;3(2):164-6. Epub Apr 13. Review.
- Kraus, S., Bunsen, T., Schuster, S., Cichon, M.A., Tacke, M., Reinheckel, T., Sommerhoff, C.P., Jochum, M., Nagler, D.K. (2011). Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 678-686.
- Krueger, S., Haeckel, C., Buehling, F., Roessner, A. (1999). Inhibitory effects of antisense cathepsin B cDNA transfection on invasion and motility in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Res.* Dec 1;59(23):6010-4.
- Krueger, S., Kalinski, T., Hundertmark, T., Wex, T., Kuster, D., Peitz, U., Ebert, M., Nägler, D.K., Kellner, U., Malfertheiner, P., Naumann, M., Rocken, C., Roessner, A. (2005) Upregulation of cathepsin X in helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *J. Pathol.* 207(1): 32-42.
- Lai, W., Zheng, Y., Ye, Z.Z., Su, X.Y., Wan, M.J., Gong, Z.J., Xie, X.Y., Liu, W. (2010). Changes of cathepsin B in human photoaging skin both in vivo and in vitro. *Chin Med J (Engl).* Mar 5;123(5):527-31.
- Latini, F.R., Hemerly, J.P., Oler, G., Riggins, G.J., Cerutti, J.M. (2008). Re-expression of ABI3-binding protein suppresses thyroid tumor growth by promoting senescence and inhibiting invasion. *Endocr. Relat. Cancer* 15, 787-799.
- Laufs, S., Schumacher, J., Allgayer, H. (2006). Urokinase-receptor (u-PAR): An essential player in multiple games of cancer: A review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle*; 5:1760-71.
- Lechner, A.M., Assfalg-Machleidt, I., Zahler, S., Stoeckelhuber, M., Machleidt, W., Jochum, M., Nägler, D.K. (2006). RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin alphavbeta3 mediates cell-adhesive properties. *J. Biol. Chem.* 281, 39588-39597.
- Lechner, A. (2008). Regulation der Sekretion und Zelloberflächenassoziation von Cathepsin X durch Interaktionen mit dem Integrin alphavbeta3 und seinem Liganden Vitronektin. Dissertation, LMU München: Fakultät für Chemie und Pharmazie, <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/8482/>.
- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.

- Lee, J.W. et Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells*. Apr 30;17(2):188-202.
- Levicar, N., Dewey, R.A., Daley, E., Bates, T.E., Davies, D., Kos, J., Pilkington, G.J., Lah, T.T. (2003). Selective suppression of cathepsin L by antisense cDNA impairs human brain tumor cell invasion in vitro and promotes apoptosis. *Cancer Gene Ther*; 10:141-51.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74, 49-139.
- Li, Y. et Cozzi, P.J. (2007). Targeting uPA/uPAR in prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* Oct;33(6):521-7.
- Lilja, H., Ulmert, D., Vickers, A.J. (2008). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer.* May; 8(5):403.
- Mai, J., Finley, R.L. Jr., Waisman, D.M., Sloane, B.F. (2000). Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem.* Apr 28;275(17):12806-12.
- Mai, J., Sameni, M., Mikkelsen, T., Sloane, B.F. (2002). Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: an interaction involved in the progression of gliomas. *Biol Chem.* Sep;383(9):1407-13.
- Masuda, N., Kato, H., Nakajima, T., Sano, T., Kashiwabara, K., Oyama, T., Kuwano, H. (2003). Synergistic decline in expressions of p73 and p21 with invasion in esophageal cancers. *Cancer Sci.* 94, 612-617.
- Matrisian, L.M. (1992). The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioassays*, 14, 455–463.
- McQueney, M.S., Amegadzie, B.Y., D'Alessio, K., Hanning, C.R., McLaughlin, M.M., McNulty, D., Carr, S.A., Ijames, C., Kurdyla, J., Jones, C.S. (1997). Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem.* May 23;272(21):13955-60.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescencelike cell cycle arrest of human nevi. *Nature* 436, 720–724.
- Mickey, D.D., Stone, K.R., Wunderli, H., Mickey, G.H., Paulson, D.F. (1980). Characterization of a human prostate adenocarcinoma cell line (DU 145) as a monolayer culture and as a solid tumor in athymic mice. In *Models for Prostate Cancer*, pp. 67-84.
- Mohamed, M.M. et Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764-75.
- Nägler, D.K., Storer, A.C., Portaro, F.C., Carmona, E., Juliano, L., Ménard, R. (1997). Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry.* Oct 14;36(41):12608-15.

- Nägler, D.K. et Menard, R. (1998). Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett.* 434, 135-139.
- Nägler, D.K., Sulea, T., Ménard, R. (1999). Full-length cDNA of human cathepsin F predicts the presence of a cystatin domain at the N-terminus of the cysteine protease zymogen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257 (2): 313–8.
- Nägler, D.K., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T., Purisima, E.O., Ménard, R. (1999). Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* 38, 12648-12654.
- Nägler, D.K. et Menard, R. (2003). Family C1 cysteine proteases: biological diversity or redundancy? *Biol Chem* 384, 837-43.
- Nägler, D.K., Krüger, S., Kellner, A., Ziomek, E., Ménard, R., Buhtz, P., Krams, M., Roessner, A., Kellner, U. (2004). Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 60, 109-119.
- Nägler, D.K., Lechner, A.M., Oetl, A., Kozaczynska, K., Scheuber, H.P., Gippner-Steppert, C., Bogner, V., Biberthaler, P. et Jochum, M. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J. Immunol. Methods* 308, 241-250.
- Nagle, R.B., Knox, J.D., Wolf, C., Bowden, G.T., Cress, A.E. (1994). Adhesion molecules, extracellular matrix and proteases in prostate carcinoma. *J Cell Biochem Suppl*; 19: 232–7.
- Nakanishi, H., Tominaga, K., Amano, T., Hirotsu, I., Inoue, T., Yamamoto, K. (1994). Age-related changes in activities and localizations of cathepsins D, E, B, and L in the rat brain tissues. *Exp Neurol.* Mar;126(1):119-28.
- Nalla, A.K., Gorantla, B., Gondi, C.S., Lakka, S.S., Rao, J.S. (2010). Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther.* Sep;17(9):599-613.
- Nascimento, F.D., Rizzi, C.C., Nantes, I.L., Stefe, I., Turk, B., Carmona, A.K., Nader, H.B., Juliano, L., Tersariol, I.L.S. (2005). Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Arch. Biochem. Biophys.* 436 (2) 323–332.
- Navab, R., Mort, J.S., Brodt, P. (1997). Inhibition of carcinoma cell invasion and liver metastases formation by the cysteine proteinase inhibitor E-64. *Clin. Exp. Metastasis* 15, 121–129.
- Nicolaus, C. (2011). Regulation lysosomaler Cysteinproteasen durch extrazelluläre Matrixproteine in humanen mesenchymalen Stammzellen. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät <http://edoc.ub.uni-muenchen.de/12996/>.
- Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.C., Xu, P.Z., Chen, M.L., Tonic, I., Unterman, T., Hay, N. (2008). Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell* 14, 458-470.

- Nomura, T. et Katunuma, N. (2005). Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells. *J Med Invest.* Feb;52(1-2):1-9.
- Obermajer, N., Premzl, A., Zavasnik Bergant, T., Turk, B., Kos, J. (2006). Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp Cell Res.* Aug 1;312(13):2515-27.
- Office of Physical Sciences – Oncology (OPSO) (2012). Thawing, Propagation and Cryopreservation Protocol February 27, 2012; Version 1.5, http://physics.cancer.gov/docs/bioresource/prostate/NCI-PBCF-CRL1435_PC-3_SOP_508.pdf
- Ogryzko, V.V., Hirai, T.H., Russanova, V.R., Barbie, D.A., Howard, B.H. (1996). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5210–5218.
- Oka, H., Chatani, Y., Kohno, M., Kawakita, M., Ogawa, O. (2005). Constitutive activation of the 41- and 43-kDa mitogen-activated protein (MAP) kinases in the progression of prostate cancer to an androgen-independent state. *Int J Urol* 12: 899–905.
- Olsen, C.L., Gardie, B., Yaswen, P., Stampfer, M.R. (2002). Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. *Oncogene* 21, 6328–6339.
- O'Neill, E. et Kolch, W. (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br. J. Cancer* 90, 283–288.
- Pavey, S.J., Cummings, M.C., Whiteman, D.C., Castellano, M., Walsh, M.D., Gabrielli, B.G., Green, A., Hayward, N.K. (2002). Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. *Melanoma Res* 12, 539-547.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* Apr;22(2):153-83.
- Pečar Fonović, U., Jevnikar, Z., Rojnik, M., Doljak, B., Fonović, M., Jamnik, P., Kos J. (2013). Profilin 1 as a target for cathepsin X activity in tumor cells. *PLoS One.* 2013;8(1):e53918. doi: 10.1371/journal.pone.0053918. Epub Jan 10.
- Pernicová, Z., Slabáková, E., Kharashvili, G., Bouchal, J., Král, M., Kunická, Z., Machala, M., Kozubík, A., Souček, K. (2011). Androgen depletion induces senescence in prostate cancer cells through down-regulation of Skp2. *Neoplasia.* Jun;13(6):526-36.
- Pisoni, R.L., Acker, T.L., Lisowski, K.M., Lemons, R.M., Thoene, J.G. (1990). A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J Cell Biol.* Feb;110(2):327-35.

- Podgorski, I., Linebaugh, B.E., Sameni, M., Jedeszko, C., Bhagat, S., Cher, M.L., Sloane, B.F. (2005). Bone Microenvironment Modulates Expression and Activity of Cathepsin B in Prostate Cancer. *Neoplasia* 7, 207-223.
- Premzl, A., Zavasnik-Bergant, V., Turk, V., Kos, J. (2003). Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp. Cell Res.* 283, 206–214.
- Pulukuri, S.M., Gondi, C.S., Lakka, S.S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., Rao, J.S. (2005). 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.* Oct 28;280(43):36529-40.
- Ramsay, A.G., Marshall, J.F., Hart, I.R. (2007). Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Cell Adhesion Molecules In Prostate Cancer 305 Metastasis Rev.;* 26: 567-78.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Barrett, A.J. (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34, D270-2.
- Reddy, V.Y., Zhang, Q.Y., Weiss, S.J. (1995). Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;*92:3849–3853.
- Repasky, G.A., Chenette, E.J., Der, C.J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol.* 14, 639–647.
- Riese, R.J., Mitchell, R.N., Villadangos, J.A., Shi, G.P., Palmer, J.T., Karp, E.R., De Sanctis, G.T., Ploegh, H.L., Chapman, H.A. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J. Clin. Invest.* 101, 2351–2363.
- Robinson, M.J. et Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.
- Rodier, F. et Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* Feb 21;192(4):547-56.
- Roshy, S., Sloane, B.F., Moin, K. (2003). Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev;* 22:271-86.
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V.A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., Anton-Lamprecht, I., Von Figura, K., Paus, R., Peters, C. (2000). Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* 14, 2075–2086.
- Roux, P. et Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS,* June, p. 320–344.

- Rudensky, A. et Beers, C. (2006). Lysosomal cysteine proteases and antigen presentation. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 81-95.
- Pulukuri, S.M., Gondi, C.S., Lakka, S.S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., Rao, J.S. (2005). 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.* Oct 28;280(43):36529-40.
- Ryu, S.J., Oh, Y.S., Park, S.C. (2007). Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death Differ.* 14, 1020-1028.
- Ryu, S.J., An, H.J., Oh, Y.S., Choi, H.R., Ha, M.K., Park, S.C. (2008). On the role of major vault protein in the resistance of senescent human diploid fibroblasts to apoptosis. *Cell Death Differ.* 15, 1673-1680.
- Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P., von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 13453–13458.
- Sager, R. (1991). Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ. Health Perspect.* 93, 59–62.
- Schmitz, A.A., Govek, E.E., Böttner, B., Van Aelst, L. (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res.* Nov 25;261(1):1-12.
- Sevenich, L., Schurigt, U., Sachse, K., Gajda, M., Werner, F., Müller, S., Vasiljeva, O., Schwinde, A., Klemm, N., Deussing, J., Peters, C., Reinheckel, T. (2010). Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* Feb 9;107(6):2497-502.
- Shay, J.W. et Roninson, I.B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23, 2919–2933.
- Sherr, C.J. et McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.
- Shi, G.P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., Chapman, H.A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10, 197–206 .
- Shimaoka, M., Takagi, J., Springer, T.A. (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31 416–485.
- Sinha, A.A., Gleason, D.F., Deleon, O.F., Wilson, M.J., Sloane, B.F. (1993). Localization of a biotinylated cathepsin B oligonucleotide probe in human prostate including invasive cells and invasive edges by in situ hybridization. *Anat Rec* 235(2): 233–240.

- Sinha, A.A., Wilson, M.J., Gleason, D.F., Reddy, P.K., Sameni, M., Sloane, B.F. (1995). Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate. *Prostate*. Apr;26(4):171-8.
- Sivaraman, J., Nägler, D.K., Zhang, R., Menard, R., Cygler, M. (2000) Crystal structure of human procathepsin X: A cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine; *J. Mol. Biol.* 295: 939-95.
- Smith, H.W., Marshall, C.J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jan;11(1):23-36.
- Smith, S.K. et Kipling, D. (2004). The role of replicative senescence in cancer and human ageing: utility (or otherwise) of murine models. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 455 – 463.
- Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol.* Jul;200(4):448-64. Review.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., Dulic, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2109–2117.
- Steinberg, G.D., Carter, B.S., Beaty, T.H., Childs, B., Walsh, P.C. (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*;17(4):337-47.
- Stewart, S.A. et Weinberg, R.A. (2000). Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* Dec;10(6):399-406. Review.
- Stypmann, J., Gläser, K., Roth, W., Tobin, D.J., Petermann, I., Matthias, R., Mönnig, G., Haverkamp, W., Breithardt, G., Schmahl, W., Peters, C., Reinheckel, T. (2002). Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 6234–6239.
- Sudhan, D. et Siemann, D. (2013). Cathepsin L inhibition by the small molecule KGP94 suppresses tumor microenvironment enhanced metastasis associated cell functions of prostate and breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*; 30: 891.
- Szpaderska, A.M. et Frankfater, A. (2001). An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res.* 61, 3493–3500.
- Tao, K., Stearns, N.A., Dong, J., Wu, Q. L. et Sahagian, G.G. (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* 311, 19-27.
- Turk, V., Turk, B., Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities. *Embo J*; 20:4629-33.

- Wang, D., Li, W., Pechar, M., Kopecková, P., Brömme, D., Kopecek, J. (2004). Cathepsin K inhibitor-polymer conjugates: potential drugs for the treatment of osteoporosis and rheumatoid arthritis. *Int J Pharm.* Jun 11;277(1-2):73-9.
- Wang, J., Chen, L., Li, Y., Guan, X.Y. (2011). Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.*;6(9):e24967.
- Weber, M.J. et Gioeli, D. (2004). Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 91: 13–25.
- Webley K., Bond J.A., Jones C.J., Blaydes J.P., Craig A., Hupp T. und Wynford-Thomas D. (2000). Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 20(8): 2803-280.
- Weinmann, L., Wischhusen, J., Demma, M.J., Naumann, U., Roth, P., Dasmahapatra, B., Weller, M. (2008). A novel p53 rescue compound induces p53-dependent growth arrest and sensitises glioma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 15, 718-729.
- Whittemore, A.S., Wu, A.H., Kolonel, L.N. (1995). Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol* 141(8):732–740.
- Wille, A., Heimburg, A., Gerber, A., Reisenauer, A., Welte, T., Bühling, F. (2002). Functional consequences of cathepsin L deficiency in human lung epithelial cells. *Biol Chem.* Jul-Aug;383(7-8):1291-6.
- Wyczałkowska-Tomasik, A. et Pączek, L. (2012). Cathepsin B and L activity in the serum during the human aging process: cathepsin B and L in aging. *Arch Gerontol Geriatr.* Nov-Dec;55(3):735-8.
- Xia, L., Kilb, J., Wex, H., Li, Z., Lipyansky, A., Breuil, V., Stein, L., Palmer, J.T., Dempster, D.W., Brömme, D. (1999). Localization of rat cathepsin K in osteoclasts and resorption pits: inhibition of bone resorption and cathepsin K-activity by peptidyl vinyl sulfones. *Biol. Chem.* 380, 679–687.
- Yamazaki, D., Kurisu, S., Takenawa, T. (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci*; 96: 379-86.
- Zhang, W., Kapusta, L.R., Slingerland, J.M., Klotz, L.H. (1998). Telomerase activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium. *Cancer Res.* Feb 15;58(4):619-21.
- Zheng, D.Q., Woodard, A.S., Fornaro, M., Tallini, G., Languino, L.R. (1999). Prostatic carcinoma cell migration via alpha(v)beta3 integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Res.*; 59: 1655-64.
- Zheng, D.Q., Woodard, A.S., Tallini, G., Languino, L.R. (2000). Substrate specificity of alpha(v)beta3 integrin – mediated cell migration and phosphatidylinositol 3 - kinase /AKT pathway activation. *J Biol Chem* 275, 24565 – 74.

- Zheng, X., Chou, P.M., Mirkin, B.L., Rebbaa, A. (2004) Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L. *Cancer Res.* Mar 1;64(5):1773-80.
- Zhu, X. et Assoian, R.K. (1995). Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell.* 6(3): 273-282.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* (Band 12), 15: 2424-33.

8 Danksagung

Bei der Entstehung dieser Arbeit haben in direkter oder indirekter Art und Weise eine Vielzahl von Personen beigetragen, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte:

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Leiter des Lehrstuhles "Bakteriologie" des Max von Pettenkofer-Institutes und Leiter des Promotionsstudienganges "Molekulare Medizin", für die Möglichkeit, im Rahmen des Promotionsstudienganges "Molekulare Medizin" wissenschaftlich tätig sein zu dürfen.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Marianne Jochum, ehemalige Leiterin der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität, für die finanzielle Unterstützung der Experimente sowie für die Ratschläge und Korrekturen bei der Ausarbeitung des Promotionsthemas an ihrem Institut.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Dorit Nägler für die geduldige und hervorragende Betreuung während der experimentellen Arbeit und der Erstellung der Promotionsschrift sowie für ihren unermüdlichen persönlichen Einsatz und ihre motivierenden Worte.

Dr. Annette Lechner für die Einarbeitung in die Methoden der Zellbiologie, Proteinbiochemie und Molekularbiologie sowie ihre Geduld und die vielen Ratschläge.

Dr. Steffen Kraus für die freundschaftliche Begleitung und den moralischen Beistand.

Annemarie Oettl für die technische Unterstützung und ihre herzliche Art.

Allen Mitarbeitern, Doktoranden und Arbeitsgruppen-Leitern der Abteilung möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und gute Laune danken.

Meiner Schwester Jana und meinem gutem alten Freund Michael Plaß für ihre fortwährende Unterstützung und Motivation diese Doktorarbeit fertig zu stellen.

Korbinian Pieper für seine wertvollen Ratschläge.

Meinen Schwiegereltern Ulla und Toni Bunsen für ihren permanenten Rückhalt und ihr stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Meinen Eltern, die mir auf vielen Reisen die Welt gezeigt haben.

Vor allem aber möchte ich meinem Mann Bastian Bunsen für seine bedingungslose Liebe danken. Seine Begleitung und seine stetigen Ermutigungen haben in unermesslicher Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

9 Eidesstattliche Versicherung

Bunsen, Thea

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss von lysosomalen Cysteinproteasen auf das Migrations-/Invasionsverhalten von Prostatakarzinomzelllinien

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin