

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

Expression und Regulation der Cysteinprotease Cathepsin X in Prostatakarzinom-Zelllinien

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

vorgelegt von
Maximilian Wolfgang Fruth
aus München

2012

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. M. Jochum

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

Mitbetreuung durch die
habilitierte Mitarbeiterin: PD Dr. rer. biol. hum. D. Nägler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2012

Meinem viel zu früh verstorbenen Vater

Dr. med. Wolfgang P. Fruth

gewidmet

- Danke für Alles -

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
A ZUSAMMENFASSUNG.....	1
B EINLEITUNG.....	2
B.1 Das Prostatakarzinom.....	2
B.1.1 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms.....	2
B.1.2 Hormone als Einflussfaktoren auf die Karzinogenese des Prostatakarzinoms.....	3
B.1.3 Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms.....	4
B.1.4 Metastasierung des Prostatakarzinoms.....	5
B.2 Die extrazelluläre Matrix.....	6
B.2.1 Aufbau der extrazellulären Matrix.....	6
B.2.1.1 Bindegewebsfasern.....	7
B.2.1.2 Proteine der amorphen Grundsubstanz.....	7
B.2.3 Die Rolle der extrazellulären Matrix bei der Tumordinvasion.....	8
B.3 Proteasen.....	9
B.3.1 Klassifikation der Proteasen.....	9
B.3.2 Cathepsine als Untergruppe der Cysteinproteasen.....	10
B.3.2.1 Funktionen von Cathepsinen.....	10
B.3.2.2 Pathologische Funktionen der Cathepsine.....	11
B.3.2.3 Die humane Cysteinprotease Cathepsin X.....	12
B.4 Zielsetzungen.....	14
C MATERIAL UND METHODEN.....	15
C.1 Material.....	15
C.1.1 Geräte.....	15
C.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel.....	18
C.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	18
C.1.3.1 Allgemeine Chemikalien.....	18

C.1.3.2	Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken.....	18
C.1.3.2.1	Kits.....	18
C.1.3.2.2	Oligonukleotide.....	18
C.1.3.3	Materialien und Chemikalien für proteinchemische Techniken.....	19
C.1.3.4	Materialien und Chemikalien für zellbiologische Techniken.....	20
C.1.3.5	Inhibitoren und Substrate.....	21
C.1.3.6	Proteine und Antikörper.....	21
C.2	Methoden.....	22
C.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	22
C.2.1.1	RNA-Isolierung aus eukaryontischen Zellen.....	22
C.2.1.2	cDNA-Synthese.....	22
C.2.1.3	Quantitative RT-PCR.....	23
C.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	23
C.2.2.1	Proteinextraktion aus Prostatazellen und Isolierung von Zellkulturüberstand.....	23
C.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	24
C.2.2.3	Dialyse und Konzentration von Proteinlösungen.....	24
C.2.2.4	Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose.....	25
C.2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
C.2.2.6	Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Westernblot).....	26
C.2.2.7	Immundetektion der Zielproteine.....	26
C.2.2.8	Proteinimmobilisation und -färbung zur N-terminalen Sequenzierung.....	27
C.2.2.8.1	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran.....	27
C.2.2.8.2	Färbung der PVDF-Membran.....	27
C.2.2.9	Affinitätschromatographie.....	28
C.2.2.10	Gelfiltration.....	28
C.2.2.11	Quantitativer Nachweis von Cathepsin X durch Sandwich-ELISA.....	29
C.2.2.12	Bindungs-ELISA.....	30
C.2.3	Zellbiologische Methoden.....	31
C.2.3.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	31
C.2.3.2	Kultivierung der Prostata-Zelllinien.....	31
C.2.3.3	Subkultivierung konfluenter Zellen.....	31
C.2.3.4	Zellzahlbestimmung.....	32
C.2.3.5	Stimulation von Prostatakarzinom-Zellen (LNCaP) mit Dihydrotestosteron.....	32

C.2.3.6	Stimulation von Prostatakarzinom-Zellen (LNCaP) mit Proteinen der extrazellulären Matrix.....	33
C.2.3.7	Proliferationsstudien.....	33
C.2.3.8	RNA-Interferenz.....	34
C.2.3.9	Transmigrationsassay.....	34
C.2.3.10	Datenanalyse.....	35
D	ERGEBNISSE.....	36
D.1	Regulation der Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X.....	36
D.1.1	Einfluss von Dihydrotestosteron (DHT) auf die Proliferation der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP.....	36
D.1.2	Einfluss von Dihydrotestosteron (DHT) auf die Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X in LNCaP.....	37
D.1.3	Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X in LNCaP-Zellen.....	38
D.1.4	Extrazelluläre Formen von Cathepsin X.....	41
D.1.4.1	Detektion extrazellulärer Formen von Cathepsin X in konditioniertem Medium und humanem Plasma.....	41
D.1.4.2	Identifizierung der Cathepsin X-Formen im PC-3-konditionierten Medium.....	42
D.2	Einfluss von Cathepsin X auf die Invasionsfähigkeit von PC-3-Zellen.....	43
D.2.1	Niederregulation von Cathepsin X mittels RNA-Interferenz in PC-3-Zellen.....	44
D.2.1.1	Optimierung der siRNA-Transfektion.....	44
D.2.2	Einfluss von Cathepsin X auf das Invasionsverhalten von Prostatakarzinomzellen (PC-3).....	47
D.3	Interaktion von (Pro)Cathepsin X mit Plasmaproteinen.....	48
D.3.1	Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Procathepsin X an EZM-Proteine im Bindungs-ELISA.....	48
D.3.2	Nachweis der Bindung von Procathepsin X an Fibronektin durch Affinitätschromatographie.....	49
D.3.3	Versuch der Identifizierung potentieller Bindungsstellen von Fibronektin für die Interaktion mit Procathepsin X.....	50
D.3.4	Nachweis hochmolekularer (Pro)Cathepsin X-Formen im Plasma mittels Gelfiltration.....	52

D.3.4.1	Analytische Gelfiltration von humanem Plasma.....	52
D.3.4.2	Präparative Gelfiltration von humanem Plasma.....	53
D.3.5	Versuch der Identifizierung einer höhermolekularen (Pro)Cathepsin X-Form im Plasma.....	54
D.3.5.1	N-terminale Sequenzierung der 100 kDa-Bande aus den Affinitäts- chromatographie- und Gelfiltrationsversuchen.....	54
D.3.5.2.	Serpine als mögliche Bindungspartner von Cathepsin X.....	55
E	DISKUSSION.....	57
E.1	Regulation von Expression und Sekretion von Cathepsin X in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP.....	57
E.2	Der Einfluss von Cathepsin X auf das Invasionsverhalten von PC-3- Zellen..	59
E.3	Identifizierung extrazellulärer Bindungspartner von Procathepsin X.....	60
E.3.1.	Bindung von Cathepsin X an Fibronectin.....	61
E.3.2	Bindung von Cathepsin X an Serpine.....	62
E.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	63
F	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
G	DANKSAGUNG.....	71

Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit gelten die allgemein gültigen Ein- und Dreibuchstabenkodes für Aminosäuren nach der IUPAC-IUB-Kommission für Biochemische Nomenklatur.

Desweiteren wurden folgende Abkürzungen verwendet (in alphabetischer Reihenfolge):

A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AT III	Antithrombin III
BCA	<i>Bicinchonin acid</i>
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cath X	Cathepsin X
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>charcoal depleted serum</i>
CDS	<i>charcoal depleted serum</i>
Da	Dalton
DANN	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
EPCA	<i>early prostate cancer antigen</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> = fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
h	Stunde
HPF	HiPerFect® (Qiagen)

HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Molar
m	Meter
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
M _r	Molekularmasse
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
OD	Optische Dichte
Pa	Pascal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ProcathX	Procathepsin X
PSA	Prostataspezifisches Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rcf	<i>relative centrifugation force</i>
RCL	<i>reactive centre loop</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
siRNA	<i>small interfering-RNA</i>
Sog.	sogenannten
SV 40	Simianes Virus 40
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
V	Volt
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid
α ₁ -PI	α ₁ -Antitrypsin

A Zusammenfassung

Cysteinproteasen, zu denen zahlreiche Cathepsine zählen, spielen eine wichtige Rolle in (patho)physiologischen Prozessen, die mit Gewebedestruktion verbunden sind. In diesem Kontext wurden vor allem Cathepsin B extrazelluläre Funktionen bei der Tumordinvasion und -metastasierung zugeschrieben. Es häufen sich jedoch Hinweise darauf, dass auch Cathepsin X an invasiven Vorgängen beteiligt ist.

Cathepsin X wird unter anderem in Zellen der Immunabwehr sowie in maligne entarteten Orgazellen stark exprimiert. Eine erhöhte Expression des Enzyms wurde vor allem beim Prostatakarzinom beschrieben. Zu Beginn dieser Arbeit war jedoch wenig über die Mechanismen bekannt, die für diese Überexpression verantwortlich ist. Durch Stimulationsversuche konnte in einem Prostatakarzinom-Zellmodell (LNCaP) gezeigt werden, dass weder das Androgen Testosteron, welches essentiell für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms ist, noch Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) in der Lage sind, die intra- und extrazelluläre (Pro)Cathepsin X-Konzentration zu steigern.

Ob Cathepsin X bei der Tumordinvasion eine maßgebliche Rolle spielt, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit ebenfalls weitgehend unbekannt. Deshalb wurde die Protease unter Anwendung der siRNA-Technik in Prostatakarzinomzellen (PC-3) herunter reguliert und die Zellen im Anschluss auf ihr Invasionsvermögen analysiert. Dabei konnte nach Niederregulation von (Pro)Cathepsin X eine signifikant verminderte Invasivität der Zellen beobachtet werden. Da dieses Enzym nur Carboxypeptidase-Aktivität besitzt, muss eine Beeinflussung der Zellinvasivität durch direkte Degradation der EZM allerdings ausgeschlossen werden. Eine mögliche Wirkweise wäre, dass Procathepsin X über dessen RGD-Sequenz an Zelloberflächenrezeptoren bindet und durch Aktivierung von Signaltransduktionswegen die Invasionsfähigkeit der Zellen beeinflusst. In Versuchen mit humanem Plasma und konditioniertem Zellmedium konnte gezeigt werden, dass Procathepsin X extrazellulär vorkommt und somit theoretisch RGD-abhängig an Adhäsionsmoleküle vom Integrin-Typ binden kann.

Im Verlauf dieser Arbeit mehrten sich auch Hinweise darauf, dass Procathepsin X in der Lage ist an EZM- und Plasmaproteine zu binden. Experimente mit rekombinanten Komponenten zeigten eine eindeutige Interaktion mit dem EZM-Protein Fibronektin. Zudem scheint Procathepsin X mit dem Serpin α_1 -Antitrypsin einen SDS-stabilen Komplex zu bilden. Die entsprechenden Bindungsstellen müssen in weiteren Versuchen identifiziert sowie die biologische Bedeutung dieser Interaktionen ermittelt werden.

B Einleitung

B.1 Das Prostatakarzinom

In Deutschland erkranken jährlich ca. 58500 Männer neu an einem Prostatakarzinom und somit liegt die Erkrankung auf Platz 1 der malignen Neoplasien beim Mann (wobei die Tendenz steigend ist). Pro Jahr versterben ca. 11100 Patienten an dieser Krankheit, was etwa jedem dritten Krebstoten in Deutschland entspricht (ROBERT-KOCH-INSTITUT & KREBSREGISTER, 2010). In den USA ergibt sich ein ähnliches Bild mit ca. 240000 erwarteten Neuerkrankungen für 2011 und ca. 33000 erwarteten Todesfällen. Damit liegt auch hier das Prostatakarzinom an der Spitze der Malignome beim Mann und ist dort für jeden zweiten Krebstoten verantwortlich (AMERICAN-CANCER-SOCIETY, 2011).

B.1.1 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms

Für die Entstehung des Prostatakarzinoms wurden eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert. Dazu gehören das Alter, die genetische Prädisposition und die ethnische Herkunft (AMERICAN-CANCER-SOCIETY, 2011). Die Erkrankung kommt bei Männern unter 50 Jahren praktisch nicht vor (ROBERT-KOCH-INSTITUT & KREBSREGISTER, 2010). Für die wenigen Fälle, in denen die Patienten jünger sind, wird eine genetische Prädisposition diskutiert. Als gesichert gilt das H(ereditary) P(rostate) C(ancer) 1-Gen, welches auf dem Chromosom 1q24-25 lokalisiert ist (SMITH et al., 1996). In den letzten Jahren gelangte auch der Genlocus 8q24 ins Visier der Forschung (SUN et al., 2008; YEAGER et al., 2007). Für das Vorliegen genetischer Zusammenhänge spricht auch die unterschiedliche Häufigkeit des Prostatakarzinoms in den verschiedenen ethnischen Gruppen. So liegt die Inzidenz bei Afro-Amerikanern ca. 40 – 60fach höher als bei Asiaten (HSING & DEVESA, 2001; HSING et al., 2000). In Nordamerika und Nordeuropa ist die Krankheit häufig, während sie in Asien und Südamerika eher selten vorkommt (AMERICAN-CANCER-SOCIETY, 2011).

Weniger genau untersucht sind die Risikofaktoren Übergewicht im Zusammenhang mit fett- und kalorienhaltiger Ernährung, Bewegungsmangel und Rauchen (ROBERT-KOCH-INSTITUT & KREBSREGISTER, 2008). Unter Berücksichtigung der Parameter PSA (Prostata-spezifisches Antigen) und Prostatavolumen scheint ein Body-Mass-Index >30 ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms zu sein (FREEDLAND et al., 2008). Auch Pestizide und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe werden mittlerweile als potenzielle Auslöser angesehen (CLAPP et al., 2008).

B.1.2 Hormone als Einflussfaktoren auf die Karzinogenese des Prostatakarzinoms

Bereits 1941 wurden die ersten Zusammenhänge zwischen dem Prostatakarzinom und Androgenen beobachtet (HUGGINS & HODGES, 1941). Testosteron ist der Hauptvertreter der Sexualhormone beim Mann in der Blutzirkulation. Die höchste biologische Aktivität erreicht das Hormon in Form von Dihydrotestosteron (DHT). Gleichzeitig ist DHT der Hauptvertreter der Androgene im Zellkern (HSING et al., 2002). Es entsteht unter dem Einfluss der 5 α -Reduktase (Abb. B.1). Hauptproduktionsorte für DHT sind der Hoden und die Prostata. Hier finden sich im Vergleich zum Plasma auch deutlich höhere DHT-Konzentrationen (HSING et al., 2002).

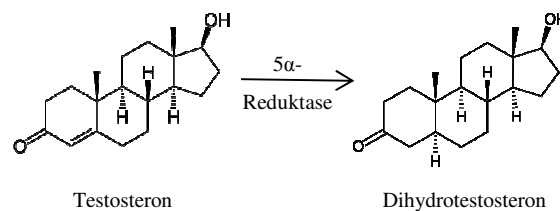


Abbildung B. 1 *Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron*

Die Wirkungen von Testosteron sind vielfältig: es fördert das Wachstum und die Differenzierung von Prostata, Samenleiter, Vesikulardrüsen und Penis sowohl während der Embryogenese, als auch nach der Geburt. Während der Pubertät fördert es die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale wie Bartwuchs, virile Behaarung, Vergrößerung des Kehlkopfs und Verdickung der Stimmbänder. Weitere Funktionen sind Stimulation der Erythropoetin-Synthese, des Wachstums der Pektormuskulatur, Förderung der Libido und Potenz, sowie Induktion der Spermatogenese (LÖFFLER & PETRIDES, 2003).

In der Prostata wirkt Testosteron durch Diffusion in die Zelle und anschließender Umwandlung zu DHT. Dieses bindet seinerseits an den intrazellulären, zytosolischen DHT-Rezeptor, der zur Superfamilie der Steroidrezeptoren zählt. Der entstandene DHT-Rezeptorkomplex gelangt in den Zellkern und bindet dort an die DNA der Prostatazellen. Diese Bindung induziert sowohl DNA-Synthese als auch die Zellproliferation (HSING et al., 2002).

Huggins und Hodges beschrieben bereits 1941 die essentielle Rolle von Testosteron in der Entwicklung des Prostatakarzinoms als sie nachwiesen, dass Kastration die Krankheitsprogression verlangsamt und die Hormonapplikation zu einer Beschleunigung der Karzinogenese führt (HUGGINS & HODGES, 1941; LUCIA et al., 1998). Nicht sicher nachgewiesen werden konnte bisher ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Serumtestosteronwerte und dem Risiko für ein Prostatakarzinom. Während in einem Großteil der aktuelleren Studien kein Zusammenhang gefunden werden konnte (SEVERI et al., 2006; STATIN et al., 2004; TSAI et al., 2006; WEISS et al., 2008), sehen andere eine leichte Korrelationen (TRAVIS et al., 2007) oder sogar signifikante Zusammenhänge (GANN et al., 1996; PARSONS et al., 2005).

Auch in Bezug auf DHT sind die Ergebnisse uneinheitlich. Neben den Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem Hormonspiegel und dem Karzinomrisiko sehen wollen (EATON et al., 1999) und solchen, die es nicht tun (GANN et al., 1996; WIRÉN et al., 2007), fällt eine Arbeit auf: ein erniedrigter DHT-Wert scheint bei diagnostiziertem Prostatakarzinom auch ein vermindertes Überleben zur Folge zu haben (KJELLMAN et al., 2008).

Neben dem Testosteron sind noch weitere Hormone identifiziert worden, die Einfluss auf Wachstum, Metastasierung und Prognose des Prostatakarzinoms nehmen. So wird das weibliche Sexualhormon Östrogen und seine Derivate in der Antiandrogen-Therapie des Prostatakarzinoms eingesetzt. Hohe Insulinspiegel scheinen die Prognose der Erkrankung zu verschlechtern (HAMMARSTEN & HOGSTEDT, 2005), Leptin wirkt hemmend auf die Invasionsfähigkeit der Tumorzellen (DEO et al., 2008; MISTRY et al., 2008) und Cholecalciferol führt zu einer verminderten zellulären Proliferation (BLUTT & WEIGEL, 1999).

B.1.3 Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms

Bei der Diagnostik maligner Erkrankungen spielt die frühe Diagnosestellung eine entscheidende Rolle. Dabei sind effiziente Screening-Methoden von großer Bedeutung. Für das Prostatakarzinom hat sich bis heute das sogenannte „Prostata-spezifische Antigen“ (PSA) als Parameter etabliert. Hierbei handelt es sich um eine Serinprotease, deren physiologische Aufgabe wohl in der Verflüssigung der Samenflüssigkeit liegt (LILJA, 1985). Vorteil dieses Enzyms als Screeningparameter ist seine Spezifität für die Prostata. Der Nachteil von PSA ist, dass es nicht ausschließlich vom Prostatakarzinom gebildet wird, sondern auch bei Normalbefunden oder der benignen Prostatahyperplasie (BPH) erhöhte Werte aufweisen kann (LILJA et al., 2008). In der Kritik steht die Protease auch, weil die Inzidenz des Prostatakarzinoms seit ihrer Einführung als Screeningparameter zwar stark gestiegen, die Mortalität jedoch nahezu unverändert geblieben ist (DAMBER & AUS, 2008). Dieser „Überdiagnostik“ von Erkrankungen, die auch ohne Therapie nie einen Einfluss auf die Lebenserwartung des Patienten genommen hätten (LILJA et al., 2008), steht gegenüber, dass eine frühzeitige Diagnosestellung die Gefahr eines metastasierenden oder tödlichen Krankheitsverlaufes um 27% senkt (SCHRÖDER, 2009).

Die Tatsache, dass PSA auch unabhängig vom Prostatakarzinom erhöhte Werte aufweisen kann, führte zu einer intensiven Suche nach alternativen Biomarkern für die maligne Entartung der Vorsteherdrüse. Vor allem im Urin finden sich einige vielversprechende Moleküle, die das PSA ablösen oder ergänzen könnten. Bisher hat aber keiner dieser Parameter den Sprung in die klinische Anwendung geschafft (STEUBER et al., 2007).

Neben der PSA-Bestimmung sieht die Leitlinie zur Prostatakarzinom-Früherkennung auch eine digitale rektale Untersuchung vor. Eine knotige Veränderung des Organs wird als Hinweis auf ein Karzinom angesehen, wobei diese Methode nur einen geringen Prozentsatz an

Karzinomen aufdeckt und daher zur Früherkennung untauglich ist (DEUTSCHE-KREBSGESELLSCHAFT, 2002).

Nach auffälligen Ergebnissen in der PSA-Bestimmung und der Tastuntersuchung schließen sich weitere diagnostische Schritte an. Da die endgültige Diagnose durch Aufarbeitung histologischer bzw. zytologischer Proben gestellt wird, werden transrektal ultraschallkontrolliert Biopsien entnommen. Standard sind heute sechs unterschiedliche Entnahmen vornehmlich in lateralen Organregionen. Mittlerweile wird eine Erhöhung der Probenzahl auf acht oder zwölf propagiert (DAMBER & AUS, 2008). Nach histo- bzw. zytologischer Diagnosestellung erfolgt das Grading des Karzinoms nach dem sogenannten Gleason-Score (GLEASON & MELLINGER, 1974). Dieser kann Werte von 2 bis 10 annehmen, wobei ein hoher Wert einer schlechten Differenzierung des Tumors entspricht und mit einer negativen Prognose der Erkrankung korreliert.

Die Wahl des Therapieregims hängt vom Stadium der Erkrankung ab. Für die Auswahl des geeigneten Verfahrens unterscheidet man heute vier Entitäten des Prostatakarzinoms: das lokal begrenzte Karzinom, das kapsel-überschreitende Karzinom ohne Absiedelung, das metastasierte Karzinom und das hormon-refraktäre Karzinom (DAMBER & AUS, 2008). Im Falle eines streng auf die Prostata begrenzten Tumorgeschehens haben sich folgende therapeutische Optionen etabliert: Aktives Beobachten, eine radikale Prostatektomie oder Strahlentherapie. Die auf den ersten Blick befremdliche Methode des aktiven Zuwartens begründet sich auf der hohen Zahl an diagnostizierten Prostatakarzinomen, die nie klinisch apparent werden und deren Träger häufig an den Folgen ganz anderer Erkrankungen versterben. Es handelt sich dabei also vor allem um eine Option für den älteren Patienten mit per se eingeschränkter Lebenserwartung (DAMBER & AUS, 2008).

Bei bereits fortgeschrittener Erkrankung (Organkapsel überschritten, Fernmetastasen) gibt es die Möglichkeiten der Bestrahlung, der ablativen Hormontherapie (Ausschaltung der testikulären Androgene auf medikamentösem oder chirurgischem Weg) und der Chemotherapie mit Docetaxel. In Zukunft könnten auch Inhibitoren der Angiogenese sowie möglicherweise Impfstoffe neue Fortschritte bringen (DAMBER & AUS, 2008).

B.1.4 Metastasierung des Prostatakarzinoms

Die Metastasierung stellt einen kritischen Punkt im Verlauf des Prostatakarzinoms dar. Bei einem auf die Prostata begrenzten Malignom können Therapien mit kurativem Ansatz zum Einsatz gebracht werden. Sobald Absiedelungen in Lymphknoten oder weiter entfernten Geweben vorliegen, ist nur noch mit palliativer Intention zu therapieren, da ein metastasiertes Prostatakarzinom nicht mehr heilbar ist (DAMBER & AUS, 2008).

Die Ausbreitung des Tumors erfolgt zunächst in die benachbarten Beckenlymphknoten und von dort weiter entlang des Lymphabflusses. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Lymphknotenmetastasen korreliert mit der Größe des Primärtumors. Bei klinisch inap-

parenten Tumoren (T1 nach TNM-Klassifikation) liegt die Wahrscheinlichkeit bei 25%, dass bereits lymphatische Absiedelungen erfolgt sind. Wenn beide Prostatalappen betroffen sind (T2), steigt die Wahrscheinlichkeit auf 35%, ist die Organkapsel bereits durchbrochen (T3), liegt das Risiko bei 75%. Eine Tumorstreuung auf hämatogenem Weg in Leber und Lunge findet nur selten statt (RIEDE et al., 2004).

Abgesehen von den Lymphknoten ist das Skelett der häufigste Ort für eine Metastasierung des Prostatakarzinoms (BUSSARD et al., 2008). Typischerweise führen diese Tumorabsiedelungen zu einer vermehrten Knochenbildung im Bereich des Metastasengewebes und werden deshalb als osteoblastische Metastasen bezeichnet. Der genaue Mechanismus, welcher dieser vermehrten Knochenbildung durch das Metastasengewebe zugrunde liegt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt (BUSSARD et al., 2008).

B.2 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein komplexer Verbund bestehend aus interstitiellen Substanzen, in welchem die Zellen des Organstromas eingebettet sind. Sie ist bestimmend für die Struktur und Funktion des Bindegewebes und beeinflusst somit auch die Organfunktion (HYNES, 2009). Die Funktion einer Zelle ist unter anderem von seiner Interaktion mit der umgebenden extrazellulären Matrix geprägt. In diesem Zusammenhang gilt eine intakte Organstruktur als effizienter Tumorsuppressor. Im Umkehrschluss kann eine veränderte EZM das maligne Krankheitsgeschehen beeinflussen (NELSON & BISSELL, 2006). Zudem stellt sie im Prozess der Metastasierung eine Barriere für die entarteten Zellen auf dem Weg zur erfolgreichen Absiedelung dar.

B.2.1 Aufbau der extrazellulären Matrix

Funktionell lässt sich die EZM in eine amorphe Grundsubstanz und die Bindegewebsfasern untergliedern. Dabei geben die Bindegewebsfasern die Struktur der Matrix vor und die Grundsubstanz gewährleistet den Transport von Gasen, Nährstoffen, Metaboliten und Abbauprodukten (HYNES, 2009).

Die spezifische Zusammensetzung der Prostata-EZM ist bisher wenig untersucht. Lediglich über die Zusammensetzung der Basallamina als Trennschicht zwischen Organepithel und Organstroma existiert eine exakte Vorstellung. So finden sich dort Kollagen IV und VII sowie Laminine als Vertreter der Bindegewebsfasern. Die amorphe Grundsubstanz in der Basallamina der Prostata besteht aus Vitronektin, Fibronektin, Hyaluronsäure und einigen für diese Arbeit unwichtigen Proteinen.

Im Rahmen der malignen Entartung der Prostata, verändert sich die Zusammensetzung der EZM, insbesondere der Basallamina. Es kommt dabei zum Verlust an Laminin 5, Kollagen IV

und VII. Dem gegenüber steht eine vermehrte Expression von Hyaluronsäure und Tenascin D (Übersicht in STEWART et al., 2004 und NAGLE, 2004). Im Folgenden sollen die Komponenten der EZM mit Relevanz für die vorliegende Arbeit etwas genauer beschrieben werden.

B.2.1.1 Bindegewebefasern

Kollagen I ist der häufigste Vertreter der Kollagene und das Hauptprotein des Knochengewebes (BUCKWALTER & COOPER, 1987). Eine vermehrte Bildung dieses Proteins steht klinisch vor allem mit Keloidbildung, Sklerosen, Skorbut und Fibrosen im Zusammenhang (FELSENBERG, 2001). Bei der Glasknochenkrankheit (Osteogenesis imperfecta) liegt dagegen eine Synthesestörung von Kollagen I vor (Übersicht in RAUCH & GLORIEUX, 2004). Für das Prostatakarzinom konnte gezeigt werden, dass entartete Prostatazellen, die auf Kollagen I kultiviert wurden, ein verändertes Genexpressionsmuster aufweisen. Dies betrifft vor allem Gene der zellulären Signaltransduktion, des Metabolismus und der Gen-Translation und -Transkription (KIEFER et al., 2004).

Kollagen IV wurde 1966 von Kefalides (KEFALIDES, 1966) erstmalig beschrieben. Im Gegensatz zu den meisten anderen, mehr oder weniger ubiquitär vorkommenden Kollagenen, ist Kollagen IV ausschließlich in der Basallamina vorhanden (KHOSHNOODI et al., 2008). Prostatakarzinomzellen sind in der Lage, an dieses Kollagen zu binden und dadurch Prozesse wie Zellproliferation, -differenzierung, -überleben und -migration zu beeinflussen (KHOSHNOODI et al., 2008). Störungen der Kollagen IV-Synthese machen sich klinisch vor allem in Form des Alport-Syndrom und des Good-Pasture-Syndrom bemerkbar (KHOSHNOODI et al., 2008). Beiden gemeinsam ist der Befall der Niere mit konsekutiver Zerstörung der Nierenfunktion. Durch diese Funktionsstörung kann die Rolle der glomerulären Basalmembran als Plasmafilter nicht aufrecht erhalten werden.

Laminine sind eine Familie von Glykoproteinen, die zusammen mit Kollagen IV den Hauptbestandteil der Basalmembran bilden. Die Vertreter dieser Proteinfamilie entstehen als Heterotrimere aus α -, β - und γ -Ketten (COLOGNATO & YURCHENCO, 2000). Die Funktionen der Laminine erstrecken sich von der Formgebung der EZM über Beeinflussung der Zellproliferation, -adhäsion, -migration und -differenzierung bis hin zur Wundheilung (TZU & MARINKOVICH, 2008). Eine gestörte Laminin-Synthese äußert sich klinisch in Form der kongenitalen Muskeldystrophien und der sogenannten Epidermolysis bullosa junctionalis (Umgangssprachlich auch Schmetterlingshaut genannt), einer Hauterkrankung mit Blasenbildung in der Lamina lucida der Basalmembran (MOLL, 2005; TZU & MARINKOVICH, 2008).

B.2.1.2 Proteine der amorphen Grundsubstanz

Fibronectin wird von vielen Zelltypen sezerniert. Während das lösliche Fibronectin im Plasma und anderen Körperflüssigkeiten vorkommt, ist die unlösliche Form Bestandteil der EZM. Das Fibronectin-Molekül ist ein Dimer aus nahezu identischen Polypeptidketten, die

über Disulfidbrücken verbunden sind. So wird ein Molekulargewicht von ca. 250 kDa erreicht. Zwar existiert für Fibronectin nur ein Genort, jedoch können auf Grund von alternativem Spleißen 20 verschiedene Formen des Moleküls unterschieden werden (PANKOV & YAMADA, 2002).

Die Funktionen von Fibronectin sind vielfältig: sie reichen von der Kontrolle der Zellmorphologie, der Zellmigration und -proliferation (DARRIBERE & SCHWARZBAUER, 2000) bis hin zu einer maßgeblichen Rolle bei der Wundheilung (VALENICK et al., 2005). Die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (das sogenannte RGD-Motiv) in der Primärstruktur des Fibronectin ermöglicht dessen Bindung an Integrinrezeptoren der Zellen und somit die Vermittlung zellulärer Funktionen (PANKOV & YAMADA, 2002). Defekte des Fibronectin-Gens führen in der Regel zu dessen Inaktivierung und damit zum Tod in der Embryonalphase (PANKOV & YAMADA, 2002). Im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom ist bekannt, dass Kultivierung von Karzinomzellen auf Fibronectin eine Verminderung der Proliferation und Apoptose bewirkt (MORGAN et al., 2000).

Ein weiteres häufiges Protein der amorphen Grundsubstanz ist Osteopontin, welches vor allem von Osteoblasten und Osteoklasten synthetisiert (WAI & KUO, 2008) wird. Es ist jedoch auch im Pankreas, der Lunge, dem Speichel- und Schweißdrüsen sowie in Blut, Milch und Urin zu finden (RODRIGUES et al., 2007). Osteopontin vermittelt in erster Linie die Haftung der Osteoblasten und -klasten an der Knochenmatrix und kontrolliert den Mineralisierungsgrad des Knochens. Wie bereits für Fibronectin beschrieben, kann auch Osteopontin über ein RGD-Motiv an Adhäsionsmoleküle binden und auf diesem Weg die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen (RODRIGUES et al., 2007). Osteopontin wird von vielen Karzinomen überexprimiert und wird nach heutigem Wissenstand als Biomarker für einen fortgeschrittenen Krankheitsverlauf und Mediator der Metastasierung angesehen. Aus diesem Grund wird es mittlerweile auch als Zielfaktor zur therapeutischen Beeinflussung neoplastischer Prozesse evaluiert (WAI & KUO, 2008).

B.2.3 Die Rolle der extrazellulären Matrix bei der Tumordinvasion

Charakteristisch für eine maligne Erkrankung ist das Bestreben, mit zunehmender Tumorgroße Absiedlungen in Lymphknoten, Knochen und entfernten Organen zu bilden. Hierfür müssen einzelne Tumorzellen durch das Organstroma migrieren und in Lymph- und/oder Blutgefäße einbrechen. Der Vorgang der Metastasierung ist dabei ein mehrstufiger Prozess, der mit der Induktion der Angiogenese beginnt. Dadurch werden die Ernährung und der Abtransport der Stoffwechselprodukte der wachsenden Tumormasse sichergestellt. Gleichzeitig steigt die Wahrscheinlichkeit, dass eine Tumorzelle Anschluss an ein Blutgefäß gewinnt. Die Schritte einer Metastasierung sind in der Abb. B.2 schematisch dargestellt (STEWART et al., 2004; WOODHOUSE et al., 1997).

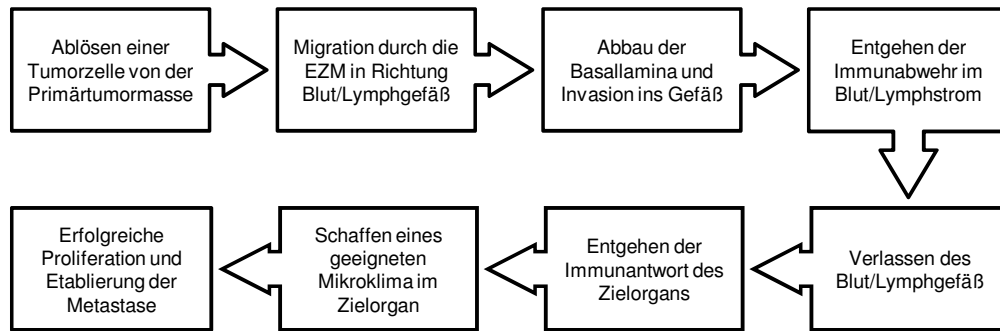


Abbildung B.2 Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Metastasierung einer malignen Erkrankung

In den oben beschriebenen Prozessen spielt die EZM eine zentrale Rolle. Sie stellt mit der Basalmembran die erste große Barriere des Tumors auf dem Weg zur Metastasierung dar. Sowohl beim Verlassen des Primärorgans als auch beim Etablieren der Metastase im Lymphknoten oder in anderen Organen findet eine Interaktion der Tumorzellen mit der EZM statt. Dies bewirkt einen Abbau der Matrix und einen Übertritt der Tumorzellen in die Blutzirkulation. Trotz großer Tumormassen bilden nur 0,05% der Zellen, die es in die Blutzirkulation schaffen, erfolgreich eine Metastase (WOODHOUSE et al., 1997).

B.3 Proteasen

Die Ausbildung von Metastasen ist für die Heilungschancen des Prostatakarzinoms und die damit verbundene Lebenserwartung der betroffenen Patienten der maßgebliche Wendepunkt im Erkrankungsverlauf. Der Abbau der extrazellulären Matrix und die Zellmigration stellen die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Metastasierung dar. Proteolytische Enzyme (Proteasen), die für den Abbau der EZM verantwortlich sind, spielen deshalb im Krankheitsgeschehen eine wichtige Rolle.

B.3.1 Klassifikation der Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die in der Lage sind, den Abbau von Proteinen durch Hydrolyse von Peptidbindungen zu katalysieren. Deshalb werden sie synonym auch als Peptidasen bezeichnet. Die Nomenklatur aller Enzyme richtet sich nach der Liste des *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*“ (NC-IUBMB). Diese Liste wurde 1992 erstmalig veröffentlicht und seither ständig aktualisiert (aktuelle Liste unter <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Die Einteilung der Enzyme basiert dabei auf der Art der katalysierten Reaktion.

Ergänzend zur NC-IUBMB-Klassifikation entwarfen Rawlings & Barrett 1993 ein System zur spezifischeren Gliederung der Proteasen. Die Grundlagen dieser Klassifikation sind strukturelle und evolutionäre Gemeinsamkeiten der Enzyme (RAWLINGS & BARRETT, 1993).

Darauf basierend entwickelte sich 1996 die MEROPS-Datenbank für Proteasen (<http://merops.sanger.ac.uk>). In dieser Datenbank werden die Proteasen in sechs Hauptgruppen eingeteilt, wobei die Zuordnung auf der Beschaffenheit des aktiven Zentrums basiert. So ergibt sich die Untergliederung in Aspartyl (A)-, Cystein (C)-, Glutamat (G)-, Metallo (M)-, Threonyl (T)- und nicht klassifizierte (U)-Proteasen.

Bezüglich der zu spaltenden Peptidbindung wird bei Proteasen zwischen Exo- und Endopeptidasen unterschieden. Während Exopeptidasen einzelne Aminosäuren oder kurze Oligopeptide vom C- oder N-Terminus des Proteins abspalten, hydrolysieren die Endopeptidasen interne Peptidbindungen.

B.3.2 Cathepsine als Untergruppe der Cysteinproteasen

Neben den Serin- und Matrixmetalloproteasen stellen Cysteinproteasen eine bedeutende Enzymgruppe für den Abbau der extrazellulären Matrix dar. Zu den Cysteinproteasen gehören die sogenannten Cathepsine sowie die Caspasen und Calpaine. Der Begriff „Cathepsin“ wurde von Willstätter und Bamann 1929 für eine Protease mit pH-Optimum im schwach sauren Bereich eingeführt (WILLSTÄTTER & BAMANN, 1929). Im späteren Verlauf konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den von Willstätter als „Cathepsine“ bezeichneten Enzymen um verschiedene Klassen von Proteasen handelt, die in den Lysosomen lokalisiert sind (COFFEY & DE DUVE, 1968).

B.3.2.1 Funktionen von Cathepsinen

Cathepsine werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellarten exprimiert, darunter Fibroblasten, Osteoklasten, Granulozyten, Lymphozyten, Mastzellen und Endothelien (MOHAMED & SLOANE, 2006). Lässt man die Endothelzellen außer Acht, ergeben sich somit zwei große Zellgruppen: Bindegewebszellen und Zellen der Immunabwehr. Dabei fällt auf, dass einige Vertreter dieser Cysteinproteasen nahezu ubiquitär vorkommen (Cathepsin B, H und L), andere dafür gewebespezifisch exprimiert werden (z.B. Cathepsin W in T-Lymphozyten).

Die physiologischen Funktionen der Cathepsine sind vielfältig. Dies liegt nicht zuletzt an der Tatsache, dass die Proteasen nicht nur in den Lysosomen aktiv sind, sondern auch in den extrazellulären Raum freigegeben werden können, um dort Proteine zu hydrolysieren (REDDY et al., 1995). Neben dem allgemeinen Abbau von Proteinen sind Cathepsine an der Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle (Cathepsin L, S und F), dem belastungsabhängigen Knochenumbau (Cathepsin K) sowie der Prozessierung von Thyreoglobulin (und der damit verbundenen Freisetzung von Schilddrüsenhormonen) beteiligt [Cathepsin K, B und L; (BOSSARD et al., 1996; NAKAGAWA et al., 1998; SHI et al., 1999; TEPEL et al., 2000)].

Weitere Funktionen der Cathepsine erschließen sich durch *knockout*-Studien an Mäusen und Enzymdefizienzen beim Menschen. Das spezifische Ausschalten von Cathepsin L führte bei Mäusen zu zyklischem Haarausfall, bedingt durch Störungen der Haarfollikel-Morphogenese (ROTH et al., 2000). Zusätzlich lassen sich Veränderungen am Herzmuskel nachweisen, die gewisse Ähnlichkeiten mit dem Krankheitsbild der humanen Kardiomyopathie haben (STYPMANN et al., 2002). Die Protease hat somit für die Haarfollikel-Bildung und im Stoffwechsel der Herzmuskelzellen eine große Bedeutung. Eine 1:1-Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen ist jedoch schwierig, da das murine Cathepsin L eine höhere Sequenzidentität zum humanen Cathepsin V im Vergleich zum humanen Cathepsin L aufweist (BROMME et al., 1999).

Beim Menschen wurden lediglich Defizienzen der Cathepsine C und K beschrieben. Dabei führen Mutationen des Cathepsin C-Gens zum sogenannten Papillon-Lefèvre-Syndrom. Kernsymptome dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung sind Hyperkeratosen im Bereich der Handflächen und Fußsohlen sowie eine Peridontitis (TOOMES et al., 1999). Bei einer Cathepsin K-Defizienz kommt es zur so genannten Pyknodystosis, trivial auch Marmor-Knochenkrankheit genannt, einer ebenfalls autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung (GELB et al., 1996). Charakteristisch für die Erkrankung sind: Kleinwuchs, Hypoplasie der Maxilla, ein verzögerter Verschluss der Fontanelle, Neigung zu pathologischen Frakturen und eine erhöhte Knochendichte im Röntgenbild, die vor allem die Trabekel betrifft (SCHILLING et al., 2007). Eine Cathepsin K-Überfunktion wird unter anderem mit dem Auftreten einer Osteoporose verknüpft. Deshalb wird der Cathepsin K-Inhibitor Odanacatib in klinischen Studien der Phase III als potientes Agens zur Behandlung der Osteoporose getestet (COSTA et al., 2011).

B.3.2.2 Pathologische Funktionen der Cathepsine

Die Expression von Cathepsinen in vielen Zellen der Immunabwehr legt eine Bedeutung der Proteasen in entzündlichen Prozessen nahe. Immunzellen müssen durch Migration zum Entzündungsherd gelangen. Der dazu notwendige Abbau der EZM erfolgt unter anderem durch extrazellulär sezernierte Cathepsine. Detaillierte Untersuchungen existieren dabei für entzündliche Erkrankungen an Knochen, Gelenken und der Haut: Inhibitoren der Cathepsine S und K gelten als Hoffnungsträger für die Therapie der rheumatoiden Arthritis (YASUDA et al., 2005). Zudem gibt es Anhaltspunkte, dass Cathepsin L eine Rolle bei der Entstehung von entzündlichen Hauterkrankungen wie der Psoriasis (Schuppenflechte) und dem atopischen Ekzem spielt (BYLAITE et al., 2006).

Das Phänomen der Überexpression von Cathepsinen im Rahmen maligner Erkrankungen kann für eine Vielzahl von Tumoren beobachtet werden (Übersicht in JEDESZKO & SLOANE, 2004). Für das Prostatakarzinom sind Überexpressionen von Cathepsin B (FERNÁNDEZ ET AL., 2001; SINHA ET AL., 1998; SINHA ET AL., 1995), Cathepsin S (FERNÁNDEZ ET AL., 2001), Cathepsin K (BRUBAKER ET AL., 2003), Cathepsin H (WAGHRAY ET AL., 2002) und Cathepsin X (NÄGLER ET AL., 2004) nachgewiesen worden.

Cathepsine können die maligne Entartung einer Zelle kausal bedingen (WANG et al., 2006) oder durch Degradation der EZM Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung unterstützen. Dabei kann der Abbau der EZM entweder direkt durch die Cysteinprotease erfolgen oder indirekt durch Aktivierung anderer Proteasen. Als Ursachen für die Mehrbildung der Proteasen in Malignomen wurden Mechanismen wie alternatives Spleißen (ARORA & CHAUHAN, 2002), posttranskriptionelle Modifikationen (BERQUIN et al., 1999) und letztendlich auch Genamplifikationen (HUGHES et al., 1998; LIN et al., 2000) beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde bisher hauptsächlich Cathepsin B untersucht. Für einen Großteil der übrigen Cathepsine sind die Mechanismen der Überexpression noch weitgehend unbekannt (MOHAMED & SLOANE, 2006).

B.3.2.3 Die humane Cysteinprotease Cathepsin X

1998 wurde das humane Cathepsin X nahezu zeitgleich von zwei Forschungsgruppen beschrieben (NÄGLER & MENARD, 1998; SANTAMARIA et al., 1998). Während die Gruppe um Santamaria zunächst den Begriff Cathepsin Z prägte, wurde das Enzym von Nägler et al. als Cathepsin X bezeichnet. Dieser Begriff setzte sich letztendlich auch durch, da bereits 1985 eine bovine Cysteinprotease beschrieben und als Cathepsin X bezeichnet wurde (GAY & WALKER, 1985), welche eine hohe Homologie zur humanen cDNA-Sequenz der Protease aufweist.

Cathepsin X unterscheidet sich in einigen Merkmalen von den übrigen Cathepsinen. So besitzt es mit einer Länge von 38 Aminosäuren die kürzeste Proregion aller Cysteinproteasen der Papainfamilie. Eine wichtige Besonderheit der Cathepsin X-Proregion ist ihre Arginin-Glycin-Aspartat-Aminosäuresequenz (RGD-Motiv). Hierüber ist das Enzym in der Lage an den Vitronektinrezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$, zu binden (LECHNER et al., 2006). Auch die Aktivität von Cathepsin X ist einzigartig unter den humanen Cathepsinen. Als Monopeptidyl-Carboxypeptidase ist Cathepsin X lediglich in der Lage, einzelne Aminosäuren vom C-Terminus eines Proteins abzuspalten (NÄGLER et al., 1999).

Das Vorkommen in Monozyten und zum Teil in Granulozyten (NÄGLER et al., 2006) lässt bei Cathepsin X auf eine Beteiligung an entzündlichen Prozessen schließen. Im Rahmen einer Polytraumatisierung kommt es bei den betroffenen Patienten zur Induktion von Entzündungsreaktionen (BAUE, 2000; MANNICK et al., 2001). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es bei einem Polytrauma mit letztendlich letalem Verlauf zu einem signifikanten Anstieg der Cathepsin X-Plasmakonzentration kommt (NÄGLER et al., 2006). Daneben konnte nachgewiesen werden, dass es bei einer *Helicobacter pylori*-induzierten Gastritis zu einer Überexpression von Cathepsin X kommt (KRUEGER et al., 2005). Diese Form der Magenschleimhautentzündung stellt eine Präkanzerose für das Magenkarzinom dar (SUERBAUM & MICHETTI, 2002). Bei Untersuchungen von Magenkarzinomproben zeigte sich ebenfalls eine Überexpression von Cathepsin X, die sich bereits auf mRNA-Ebene abspielt. Auf Proteinebene ergaben sich in Abhängigkeit vom Karzinomtyp Unterschiede. So war die Cathepsin X-

Expression bei Tumoren vom interstinalen Typ signifikant höher als bei Tumoren vom diffusen Typ (KRUEGER et al., 2005).

Auch bei malignen Entartungen der Prostata findet sich eine Überexpression von Cathepsin X. Während in der gesunden Prostata bei immunhistochemischen Untersuchungen die Cysteinprotease nur in den Basalzellen der Drüsen lokalisiert ist, kann sie nach der malignen Entartung in sämtlichen Zelltypen nachgewiesen werden [Abb. B.2;(NÄGLER, 2007)]. Diese Beobachtung lässt sich durch Westernblotanalysen von Zelllysaten aus Prostatakarzinomen im Vergleich zum gesunden Organ bestätigen.

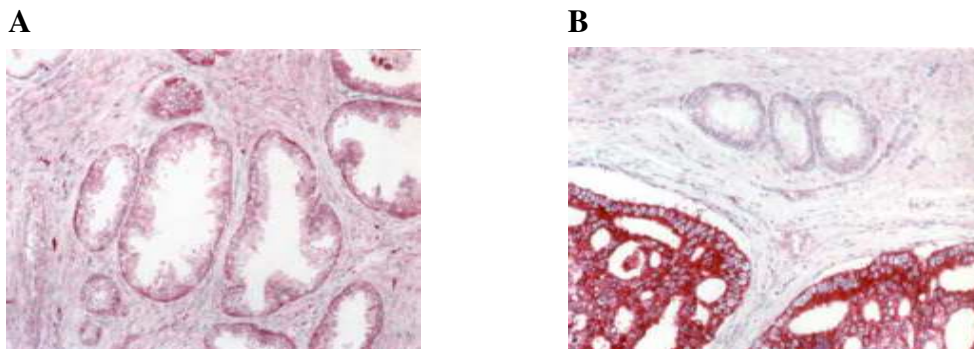


Abbildung B.2 Immunhistochemischer Nachweis von Cathepsin X in Prostatagewebe

A: Im gesunden Prostatagewebe lässt sich Cathepsin X hauptsächlich im Bereich der Basalzellen nachweisen.

B: Beim Prostatakarzinom findet sich Cathepsin X in allen Zellen der Drüsen. Insgesamt fällt auch die deutlich stärker Anfärbung und die damit höher Menge des Enzyms in der entarteten Drüse auf (Fotos aus Nögler, 2007)

Über die Mechanismen die zu dieser Überexpression führen, ist bisher wenig bekannt. Das humane Cathepsin X-Gen befindet sich auf dem Chromosom 20 in einer Region, die beim Prostatakarzinom häufig amplifiziert ist (20q13) (SANTAMARIA et al., 1998). Durch Untersuchungen an genomischer DNA konnte die Genamplifikation als Ursache der Überexpression jedoch ausgeschlossen werden (NÄGLER et al., 2004). Genauso unklar ist die Rolle von Cathepsin X für das Tumorgeschehen, da die typische Degradierung der extrazellulären Matrix aufgrund der Monocarboxy-Peptidase-Spezifität als unwahrscheinlich anzusehen ist.

B.4 Zielsetzungen

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Entdeckung, dass im Prostatakarzinom eine vermehrte Expression und Sekretion von Cathepsin X nachweisbar war. Die Ursachen für diese Überexpression waren dabei ebenso unbekannt, wie die Funktion des extrazellulären Cathepsin X. Hieraus ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Zielsetzungen.

Identifizierung möglicher Faktoren für die Überexpression von Cathepsin X in Zellen des Prostatakarzinoms:

Vorversuche mit nicht-entarteten Prostatazellen (PNT1A) zeigten, dass eine Ko-Kultivierung der Zellen mit dem EZM-Protein Vitronektin zu einem signifikanten Anstieg der Expression von (Pro)Cathepsin X führte. Diese Ergebnisse sollten auf maligne entartete Prostatazellen übertragen werden. Weiterhin sollten Proteine der EZM, sowie das Androgen Testosteron auf ähnliche Effekte zu untersucht werden.

Untersuchung der Bedeutung von Cathepsin X für die Invasion und Migration von Prostatakarzinomzellen:

Über die Funktion der Überexpression von Cathepsin X im Prostatakarzinom war zu Beginn dieser Arbeit wenig bekannt. Durch Ausschaltung des Enzyms unter Verwendung der siRNA-Technologie sollten Einblicke über eine mögliche Bedeutung von Cathepsin X auf die Invasionsfähigkeit der Prostatakarzinomzellen im Invasionsassay gewonnen werden.

Charakterisierung der extrazellulären molekularen Formen von Cathepsin X:

Durch die Tatsache, dass Cathepsine auch extrazellulär wirken, stellte sich die Frage, ob Cathepsin X als gereiftes Enzym oder in seiner Proform freigesetzt wird. Hierfür wurden sowohl konditionierte Zellkulturmedien als auch humanes Plasma untersucht und die entsprechenden Cathepsin X-Formen identifiziert.

Identifizierung möglicher Bindungspartner von Cathepsin X in der Zirkulation:

Im Rahmen der Vorversuche zur Ko-Kultivierung von Prostatakarzinomzellen mit EZM-Proteinen ergaben sich Hinweise darauf, dass Cathepsin X in der Lage sein könnte, an das EZM-Protein Fibronektin zu binden. Diese Bindung sollte durch den Einsatz von Bindungs-ELISAs sowie Gelfiltration und Affinitätschromatographie dargestellt werden. Zudem sollten weitere potentielle Liganden identifiziert werden.

C Material und Methoden

C.1 Material

C.1.1 Geräte

Autoklaven:

3850
VST 500-C 12D

Systec GmbH, Wettenberg
Zirbus, Bad Grund

CO₂-Inkubatoren:

Forma Scientific Modell 3682
Galaxy S
Jouan IG 150

Forma Scientific, Marietta, USA
Nunc, Wiesbaden
Jouan GmbH, Unterhaching

Eismaschine:

AF-10

Scotsman, Frimont, Italien

Fraktionssammler:

Frac-900

Pharmacia Biotech, Freiburg

Gelfiltrationsapparatur:

ÄKTA Explorer

GE Healthcare, München

Magnetrührer:

Ika-Combimag RCO
Ikamag RET

Janke & Kunkel, Staufen
Janke & Kunkel, Staufen

Mikrotiterplatten-Lesegerät

Microtec Laborsysteme, Overath

Mikroskope:

IX50 mit
CCD Kamera Typ 3CCD
UV-Lampe U-RFL-T
IX70 mit
SensiCam QE
Uniblitz[®] VCM-D1 Shutter
UV-Lampe BH2-RFL-T3
Zeiss LSM 510

Olympus, Feldkirchen-Westerham
Sony, Köln
Olympus, Feldkirchen-Westerham
Olympus, Feldkirchen-Westerham
PCO CCD Imaging, Kehlheim
Vincent Associates, Rochester, USA
Olympus, Feldkirchen-Westerham
Carl Zeiss, Jena

Mikrowellenofen:

R-6270

Sharp, Osaka, Japan

Orbitalschüttler:

Certomat® R
Eppendorf Thermomixer compact

Braun Biotech International, Melsungen
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

PCR Thermal cycler:

Gene Amp 2400
LightCycler™ II
Primus 25
T *personal*

Perking Elmer, Langen
Roche, Mannheim
MWG Biotech, Ebersberg
Whatman Biometra, Göttingen

pH-Meter:

Typ 114D
pH Elektrode

WTW, Weilheim
Ingold, Steinbach-Taunus

Proteintransfereinheiten:

MilliBlot™–SDE System
Fastblot B33

Millipore, Eschborn
Whatman Biometra, Göttingen

Rotationsgerät:

Rotator Drive STR4

Stuart Scientific, Staffordshire, England

Scanner:

Image Scanner

Pharmacia, Freiburg

Schreiber:

LKB 2210 2-Channel Recorder

Pharmacia, Freiburg

Sicherheitswerkbänke:

BDK 7419, Modell UVF 6.18S
Herasafe Typ HS12

BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Heraeus Instruments, Göttingen

Spannungsquellen:

EPS 500/400
Mighty Slim™

Pharmacia, Freiburg
Hoefer, Heidelberg

Stickstofftank:

Cryosystem 4000
Locator Jr.
Locator 4

MVE Cryosystems, Jüchen
Sigma, Taufkirchen
Sigma, Taufkirchen

Spektrofluorimeter:

Safire 2

Tecan, Crailsheim

Spektrophotometer:

LKB 2238 Uvicord SII
Uvikon 930

Pharmacia, Freiburg
Kontron Instruments, Eching

Tiefkühlgefrierschrank:

Colora UF 85-300S (-80 °C)

Colora, Lorch

Ultraschalllanze:

Branson Sonifier 250

Branson, Danbury, USA

Vertikale Proteinelektrophoreseeinheit:

Mighty Small II

Hoefer, Heidelberg

Vortexer:

Vortex Genie 2

Scientific Industries, New York, USA

Waagen:

Analysenwaage, A 120 S
Technische Waage, MA AF200

Satorius, Göttingen
Satorius, Göttingen

Wärmeschränke:

B30
BE30

Memmert, Schwabach
Memmert, Schwabach

Wasserbäder:

WB-14
Thermomix ME

Memmert, Schwabach
Braun Biotech, Melsungen

Wasserentionisierungseinheit:

Membrapure

MembraPURE, Bodenheim

Zentrifugen:

Centrikon H-401 (mit Rotoren A6.9 und A8.24)
Varifuge 3.0 R
Varifuge 3.2 RS
Eppendorf 5415 D
Kühlzentrifuge, Eppendorf 5415 R

Kontron Instruments, Eching
Heraeus Sepatech, München
Heraeus Sepatech, München
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

C.1.2 Bioinformatische Hilfsmittel

Image-Pro [®] PLUS	Media Cybernetics, Silver Spring, USA
LightCycler Software 3.5	Roche, Mannheim
Magic Scan V4.4	Pharmacia, Freiburg
XFluor4 Safire2	Tecan, Crailsheim
Microsoft Office EXCEL 2003	Microsoft, Unterschleissheim
Unicorn 4.11	Amersham Biosciences, Braunschweig

C.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle eingesetzten Chemikalien hatten „p.a.-Qualität“. Die Kultivierungs- und Reaktionsgefäße wurden entweder bereits steril bezogen oder vor ihrer Verwendung bei 121 °C und 1 x 10⁵ Pa Überdruck für 20 Minuten autoklaviert.

C.1.3.1 Allgemeine Chemikalien

Allgemeine Chemikalien wurden - soweit nicht gesondert angegeben - von den Firmen Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen und Serva, Heidenheim bezogen.

C.1.3.2 Chemikalien und Materialien für molekularbiologische Techniken

C.1.3.2.1 Kits

iScript [™] cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD, Hercules, USA
LightCycler [®] - Primer Set Human Cathepsin Z	Search LC, Heidelberg
LightCycler [®] - Primer Set Human GAPDH	Search LC, Heidelberg
LightCycler [®] FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit	Roche, Mannheim
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

C.1.3.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide für quantitative RT-PCR

Die Oligonukleotide für die quantitative RT-PCR waren Bestandteil der oben genannten LightCycler[®] - Primer Sets und wurden von Search LC, Heidelberg bezogen.

siRNA-Oligonukleotide (Qiagen, Hilden)

Die Sequenzen der siRNA-Oligonukleotide ergaben sich durch Datenbank-Recherche (<https://www1.qiagen.com/GeneGlobe/Default.aspx>, <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>) und Anwendungen der Regeln nach Reynolds et al. (REYNOLDS et al., 2004). Abschließend wurde die Zielsequenz-Spezifität durch Genom-weitem Vergleich mit dem Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) sichergestellt. Die Sequenzen sind nachfolgend in 5'-3'-Richtung angegeben.

Nonsilencing (Negativkontrolle)

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

CatX304mis (Mismatch)

Zielsequenz	AAC GGA GCG GAT CAA TAT CAA
Sense	CGG AGC GGA UCA AUA UCA AdTdT
Antisense	UUG AUA UUG AUC CGC UCC GdTdT

CatX304

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

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

C.1.3.3 Materialien und Chemikalien für proteinchemische Techniken

Albumin-Standardlösung	Pierce, Rockford, USA
BC Assay Reagenz A und B	Interchim, Montluçon, Frankreich
BioMax Filme	Kodak, Rochester, USA
BioMax Filmkassette	Kodak, Rochester, USA
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham, Braunschweig
Coomassie Brilliant Blau R250 und G250	Serva, Heidelberg
Gel Filtration Calibration Kit High Molecular Weight	Amersham, Braunschweig
Gel Filtration Calibration Kit Low Molecular Weight	Amersham, Braunschweig
Heparin	Ratiopharm, Ulm
HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grad	Amersham, Braunschweig

Hyperfilm-MB Filmkassette	Amersham, Braunschweig
Macrosep [®] Centrifugal Devices	PALL, Ann Arbor, USA
Membranen für Ultrafiltration	Millipore, Bedford, USA
Microsep [®] Centrifugal Devices	PALL, Ann Arbor, USA
Nitrozellulosemembran BA 85 (0,45 µm)	Schleicher und Schuell, Kassel
PVDF-Membran	Schleicher und Schuell, Kassel
SeeBlue [®] Plus2 Protein-Molekularstandard	Invitrogen, Karlsruhe
Spectra/Por [®] Dialysesschläuche	Spectrum Labs, Los Angeles, USA
Superdex 200 10/300 GL	Amersham, Braunschweig
Ultrafiltrationszellen	Amicon, Beverly, USA
Whatman Filterpapier Nr.1	Whatman/Vetter, Ammerbuch

C.1.3.4 Materialien und Chemikalien für zellbiologische Techniken

1,8 ml Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Accutase	PAA, Linz, Österreich
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Mannheim
Cell Scraper	Nunc, Wiesbaden
Charcoal/Dextran-treated FCS (CDS)	Perbio Science, Logan, USA
Costar-Transwell-Filter 6,5 mm Ø, 8 µm PorenØ	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
HiPerFect	Qiagen, Hilden
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
MaxiSorp-Mikrotiterplatten (96-well)	Nunc, Wiesbaden
Nalgene [™] Cryo 1°C Freezing Container	Nunc, Wiesbaden
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nicht-Essentielle Aminosäuren	PAA, Linz, Österreich
Nutridoma	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	PAA, Linz, Österreich
Pyruvat	PAA, Linz, Österreich
RPMI 1640 mit L-Glutamin ohne Phenolrot	PAA, Linz, Österreich
RPMI 1640 mit 2mM L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Trypanblau, 0,5 % (w/v) in PBS	Sigma, Deisenhofen
VenorGeM [®] - Kit (Mykoplasmen-Nachweis)	Minerva Biolabs, Berlin
Zellkulturgefäße (T25, T75, T175)	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96well)	Nunc, Wiesbaden

Humane Prostata-Zelllinien

- LNCap
Humane Prostata-Adenokarzinomzelllinie, aus Lymphknotenmetastase etabliert
gilt als androgenabhängig
DSMZ Nr: ACC 256
- PC-3
Humane Prostata-Adenokarzinomzelllinie, aus Knochenmetastase etabliert
gilt als androgenunabhängig
DSMZ Nr: ACC 465
- PNT1A
Humane adulte Prostataepithelzelllinie, mit SV40 immortalisiert
ECACC Nr: 95012614

C.1.3.5 Inhibitoren und Substrate

Inhibitorcocktail III	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Single Component TMB Peroxidase EIA Substrate Kit	BIO-RAD, Hercules, USA
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA

C.1.3.6 Proteine und Antikörper

Proteine

(Pro)Cathepsin X (rekombinant)	Nägler et al., 2006
exprimiert in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	
Antithrombin III (AT III)	Chromogenix, Mailand, Italien
Fibronectin Fragment H-2064	Bachem, Weil am Rhein
Fibronectin Fragment H-2068	Bachem, Weil am Rhein
Fibronectin Fragment H-2094	Bachem, Weil am Rhein
Fibronectin Fragment H-3608	Bachem, Weil am Rhein
Humane Extrazelluläre Matrix (EZM)	BD Biosciences, Bedford, USA
Humanes Fibronectin	Tebu-Bio, Norwood, USA
Humanes Kollagen I	Chemicon, Temecula, USA
Humanes Kollagen IV	Chemicon, Temecula, USA
Humanes Laminin	Chemicon, Temecula, USA
Humanes Osteopontin	Chemicon, Temecula, USA
α_1 -Antitrypsin	Sigma, Deisenhofen

Antikörper:

Alle eingesetzten Antikörper sind gegen humane Antigene gerichtet. Sie wurden in Abhängigkeit des Versuchsaufbaus in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt, welche den jeweiligen Methodenbeschreibungen zu entnehmen sind.

<i>goat</i> anti-Antithrombin	Affinity Biologicals, Ancaster, Canada
<i>goat</i> anti-Cathepsin X	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>goat</i> anti- α_1 -Antitrypsin	Affinity Biologicals, Ancaster, Canada
<i>goat</i> anti- α_2 -Antiplasmin	Affinity Biologicals, Ancaster, Canada
<i>mouse</i> anti-Fibronektin (MAB1932)	Chemicon, Temecula, USA
<i>rabbit</i> anti-Cathepsin X	Nägler et al., 2006

Konjugate:

Alle Konjugate wurden in der Verdünnung 1:20 000 eingesetzt.

<i>goat</i> anti-mouse HRP-linked	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>goat</i> anti-rabbit HRP-linked	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>mouse</i> anti-goat/sheep HRP-linked	Sigma, Deisenhofen

C.2 Methoden**C.2.1 Molekularbiologische Methoden****C.2.1.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen**

Zur Analyse der Transkriptenanzahl mittels RT-PCR wurde RNA aus Prostata-Zellen isoliert. Dies erfolgte durch den *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach exakten Angaben des Herstellers. Um eine höhere Effizienz beim Aufschluss der Zellen zu erreichen, wurde zusätzlich der *QIAshredder Kit* (Qiagen, Hilden) nach beigefügter Anleitung eingesetzt.

C.2.1.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde der *iScriptTM cDNA Synthesis Kit* (BIO-RAD, Hercules, USA) nach Anleitung verwendet. Im Vorfeld wurde die Konzentration der isolierten RNA-Proben bestimmt. Um in der Synthesereaktion gleiche Volumina und Konzentrationen einsetzen zu

können, erfolgte eine Angleichung der Konzentrationen durch Zugabe von Nuklease-freiem Wasser. Nach der Synthese wurden die Proben mittels RT-PCR analysiert.

C.2.1.3 Quantitative RT-PCR

Zur quantitativen Erfassung von mRNA-Kopien wurde die LightCyclerTM-Technologie (Roche, Mannheim) eingesetzt. Diese basiert in ihrem Grundprinzip auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), erlaubt jedoch zusätzlich eine Quantifizierung der eingesetzten cDNA. Hierfür wird den Proben SYBR-Green zugesetzt, welches in doppelsträngige DNA interkaliert und eine Fluoreszenz bewirkt. Anhand von Fluoreszenzmessungen während eines RT-PCR-Laufs lässt sich auf die eingesetzte cDNA-Menge rückrechnen.

Die spezifischen Oligonukleotide und die Standards wurden von Search LC GmbH, Heidelberg synthetisiert. Die Reagenzien für den SYBR-Green-MasterMix entstammten dem LightCycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I-Kit der Firma Roche. Der MasterMix wurde nach Herstellerangaben hergestellt und eingesetzt.

Für den Reaktionsansatz wurde die cDNA zunächst 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Hiervon wurden 5 µl verwendet und je 1 µl Oligonukleotidlösung und SYBR-Green-MasterMix zugegeben. Um das Endvolumen von 10 µl zu erhalten, wurde mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Neben den cDNA-Proben wurden auch 3 Standards (1:10, 1:100, 1:1000) sowie eine Wasserkontrolle eingesetzt. Die Ansätze wurden in Glaskapillaren pipettiert und 4 Minuten bei 500 g und 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Kapillaren in das LightCycler-Kapillaren-Rondell eingesetzt und die PCR gestartet. Um Kontaminationen der Proben auszuschließen, erfolgte am Ende jedes Laufes eine Schmelzkurvenanalyse, die unspezifische PCR-Produkte aufgedeckt hätte. Für die PCR galten folgende Bedingungen: 95°C/10 Min; [95°C/10 Sek → 68°C/10 Sek/58°C → 72°C/16 Sek] × 35 Zyklen, Fluoreszenzverstärkung 5.

Bei allen Messungen wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als *housekeeping-gene* bestimmt, um eine Normierung der einzelnen Proben zu ermöglichen. Die zu untersuchende mRNA-Menge wurde dabei ins Verhältnis zur entsprechenden gemessenen Menge an GAPDH-mRNA gesetzt.

C.2.2 Proteinbiochemische Methoden

C.2.2.1 Proteinextraktion aus Prostatazellen und Isolierung von Zellkulturüberstand

Zur Lyse der Zellen wurde ein nicht-denaturierender Lysispuffer (50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0,2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton-X-100, pH 6,0) hergestellt. Kurz vor Verwendung wurde diesem Puffer ein Inhibitorcocktail (Inhibitorcocktail Nr. 3, Calbiochem) im Verhältnis 1:100 zugegeben. Die Zellen wurden zunächst mit PBS

gewaschen, danach wurde der Lysispuffer direkt auf die Zellen gegeben und die Zellkultur-Platten für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden nicht lysierte Zellen mittels *Cellscraper* (Nunc, Wiesbaden) abgelöst, die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurde die Zellsuspension 2 – 3 x durch vortexen gemischt. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 16000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und entweder sofort weiter analysiert oder bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse des Zellkulturüberstands wurde dieser abpipettiert und anschließend für 10 Minuten bei 400 g abzentrifugiert, um tote und nicht adhärierende Zellen aus dem Medium zu entfernen. Nach Überführung in ein neues Falcon-Gefäß wurde der Überstand entweder weiter verarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

C.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten erfolgte kolorimetrisch durch BCA-Methode. Die Methode basiert auf einer Komplexbildung von Cu^{2+} -Ionen mit Proteinen im alkalischen Milieu. Dadurch wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert, das seinerseits mit Bicinchonin-Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet. Zunächst wurden die Zelllysate entsprechend verdünnt und 100 µl davon sowie 100 µl der BCA/ Cu^{2+} (24:1) – Lösung in eine Vertiefung einer 96-well-Platte pipettiert und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der Absorption bei 560 nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve aus BSA in bekannten Konzentrationen erstellt.

C.2.2.3 Dialyse und Konzentration von Proteinlösungen

Im Rahmen der Proteinisolierung wurde zum Teil ein Austausch von Puffern durch Dialysieren nötig. Dies erfolgte in Dialyseschläuchen (*Spectra/Por*[®], Spectrum Laboratories, Los Angeles, USA) mit einem *molecular weight cut off* (MWCO) von 10 kDa gemäß der beigefügten Anleitung.

Für die Konzentration von Proteinlösungen großer Volumina (> 15 ml) wurde eine Amicon Ultrafiltrationszelle (Millipore GmbH, Schwalbach) unter Anlage eines Gasdrucks von 2,5 bar verwendet. Volumina zwischen 3,5 ml und 15 ml wurden mittels *Macrosep*[®] *Centrifugal Devices* (PALL, Ann Arbor, USA) konzentriert. Für Proteinlösungen < 3,5 ml kam das *Microsep*[®] *Centrifugal Device* (PALL, Ann Arbor, USA) zum Einsatz. Soweit nicht anders angegeben, war das Ausschluß-Molekulargewicht der verwendeten Filter 10 kDa.

C.2.2.4 Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose

Um Proteine aus Gemischen zu isolieren, wurden unter anderem Affinitätschromatographien eingesetzt. Hierfür war es zunächst notwendig, entsprechende Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose zu koppeln.

Alle Puffer wurden vor der Verwendung über eine Membran mit 0,8 µm Porendurchmesser filtriert. Zur Vorbereitung auf die Kopplung wurde das Protein gegen den Kopplungspuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Gekoppelt wurde entweder Procathepsin X (Kopplungspuffer: 0,1M NaHCO₃, 0,5M NaCl, pH 8,3) oder Anti-Procathepsin X (Kopplungspuffer: 0,1 M Trinatriumcitrat-2-hydrat, pH 6,5 mit gesättigter Zitronensäure-Lösung eingestellt). 1 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham, Braunschweig) wurde mit 50 ml Waschlösung (1 M HCl) aufgeschwemmt und über einer Fritte mit 200 ml der Waschlösung und in einem zweiten Schritt mit Kopplungspuffer gewaschen. Anschließend wurde das Gel sofort in ein Falcon-Gefäß überführt, mit der zu koppelnden Proteinlösung vereinigt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur durch *End-over-End*-Rotation inkubiert. Im Anschluss wurde das Gel nochmals mit Kopplungspuffer gewaschen. Nach Überführung in ein neues Falcon-Gefäß erfolgte eine 2-stündige Inkubation mit 20 ml Terminationspuffer (1 M Ethanolamin, pH 8,0 mit rauchender HCl eingestellt), ebenfalls unter *End-over-End*-Rotation bei Raumtemperatur. Abgeschlossen wurde die Kopplung durch fünfmaliges Waschen des Gels abwechselnd mit je 100 ml Waschpuffer I (0,1 M Natriumacetat, 1 M NaCl, pH 4,0 mit HCl eingestellt) und Waschpuffer II (0,1 M Tris-Base, 0,5 M NaCl, pH 8,0 mit 2 N HCl eingestellt). Im letzten Schritt wurde das Gel mit PBS + 0,02% NaN₃ aufgeschwemmt und in einer Säule entweder sofort eingesetzt oder bei 4 °C gelagert. Für Kontrollversuche wurde CNBr-aktivierte Sepharose ohne Kopplung eines Proteins analog behandelt.

C.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von komplexen Proteinlösungen wurde die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Durch die Gegenwart von SDS („*sodium dodecyl sulfate*“) werden die Proteine denaturiert und nach außen mit einer negativen Gesamtladung versehen. Dadurch kann die Auftrennung im elektrischen Feld ausschließlich in Abhängigkeit der Masse erfolgen.

Die Acrylamid-Konzentration in den Gelen richtete sich nach der gewünschten Auflösung (12% für Proteine <150 kDa, 8% für Proteine >150 kDa), die Dicke des Gels nach der aufzutrennenden Probenmenge (max. 20 µl pro Tasche in 0,75 mm dicken Gelen, max. 40 µl bei 1,5 mm Gelen). Beim Trenngel-Puffer handelte es sich um 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, beim Sammelgel-Puffer um 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8. Die Gelzusammensetzungen sind unten stehender Tabelle (Tab. C.1) zu entnehmen, wobei sich die Mengenangaben auf die Herstellung von 2 dünnen (0,75 mm) bzw. einem dicken (1,5 mm) Gel beziehen. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) gestartet.

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

	Trenngel		Sammelgel
	12 %	8 %	
dH₂O	4,5 ml	5,5 ml	5,675 ml
Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
40 % (w/v) (Bis)-Acrylamid	3 ml	2 ml	1,65 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	100 µl	100 µl

Die Proben wurden vor der Auftrennung mit 5-fach Probenpuffer (0,625 M Tris/HCl, 10 % SDS (w/v), 50 % (v/v) Glyzerin, 25 % (w/v) DTT, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und zusammen mit einer Markerproteinlösung (SeeBlue® Plus2, Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer (250 mM Tris/HCl, 192 mM (w/v) Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3) durch Anlegen einer Spannung von 100 – 140 V. Der Grad der Auftrennung konnte an Hand der vorgefärbten Markerproteine abgeschätzt werden.

C.2.2.6 Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Westernblot)

Für die immunologische Detektion wurden die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Dazu wurde ein „semi-dry“-Transferverfahren eingesetzt. Zunächst wurden 18 Whatman-Filterpapiere (Nr.1) und eine Nitrozellulosemembran auf Größe des SDS-Gels zugeschnitten. Anschließend wurden Membran, Filterpapiere und Gel für 5 Minuten im Transblotpuffer (45 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 0,00375 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol) inkubiert und auf der Blotting-Apparatur das „Transfersandwich“ nach folgendem Schema aufgebaut: ANODE – 9 Filterpapiere – Nitrozellulosemembran – Gel – 9 Filterpapiere – KATHODE. Für den Proteintransfer wurden Stromstärken von 100 – 200 mA angelegt und für 1,5 – 2,5 Stunden aufrecht erhalten, abhängig von der Größe des zu transferierenden Proteins.

C.2.2.7 Immundetektion der Zielproteine

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulose-Membran mit TBST (65 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween), 3 % (w/v) BSA) für 3 x 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch sollten unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulose abgesättigt werden. Zur Detektion der Zielproteine wurde die Nitrozellulose-Membran mit dem primären Antikörper (eingesetzter Antikörper und Konzentration abhängig vom Zielprotein, Tab. C.2) über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde die Membran gewaschen. Dies geschah durch dH₂O und anschließende Inkubation mit TBST für 3 x 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der

sekundäre Antikörper (ein HRP- (=horse radish peroxidase) Konjugat) wurde mit TBS (65 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl) verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nach erneuter Entfernung ungebundener Antikörper durch Waschen mit dH₂O und TBST erfolgte ein letzter Inkubationsschritt mit Luminol/H₂O₂-Lösung für 5 Minuten. Durch Auflegen eines Röntgenfilms konnten die zu detektierenden Proteine sichtbar gemacht werden.

Tabelle C.2 Antikörperversdünnungen zur Immundetektion nach Westernblot

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Anti-Procathepsin X	1 : 3000	Anti-Kaninchen IgG	1 : 20 000
Anti-Fibronektin	1 : 200	Anti-Maus IgG	1 : 20 000
Anti-Antithrombin III	1 : 500	Anti-Ziege IgG	1 : 20 000
Anti- α_1 -Antitrypsin	1 : 1000	Anti-Ziege IgG	1 : 20 000
Anti- α_2 -Antiplasmin	1 : 500	Anti-Ziege IgG	1 : 20 000

C.2.2.8 Proteinimmobilisation und –färbung zur N-terminalen Sequenzierung

C.2.2.8.1 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Für die N-terminale Proteinsequenzierung kam eine PVDF-Membran (Schleicher & Schuell, Kassel) zum Einsatz. Die Membran wurde zunächst mit 100% Methanol für 10 Minuten äquilibriert und danach die Proteine nach Auftrennung mittels SDS-PAGE auf die PVDF-Membran transferiert. Ähnlich wie beim Westernblot fand das „semi-dry“-Verfahren hier Anwendung. Der einzige Unterschied bestand in den eingesetzten Puffern. So wurden Filterpapiere, die mit der Anode in Kontakt kamen, in Anodenpuffer getränkt (50 mM Na-Borat, 5 % Methanol, pH 9,0) und jene, die mit der Katode in Berührung kamen, entsprechend mit Katodenpuffer (50 mM Na-Borat, 20 % (v/v) Methanol) benetzt. Blotaufbau und Blotbedingungen entsprachen denen der Westernblot-Methode.

C.2.2.8.2 Färbung der PVDF-Membran

Nach dem Proteintransfer erfolgte die Färbung der PVDF-Membran für 2 Minuten mit Coomassie-Blau-Lösung (0,1 % (w/v) Coomassie Blau G-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol). Anschließend wurde die Membran solange in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol) inkubiert, bis die Proteinbanden eindeutig sichtbar waren. Nach kurzem Waschen mit dH₂O wurde die Membran luftgetrocknet. Die N-terminale Proteinsequenzierung übernahm Herr R. Mentele (Arbeitsgruppe Prof. Lottspeich am Max Planck-Institut, Martinsried) nach der Methode des Edman-Abbaus.

C.2.2.9 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie diente zum einen dem Aufreinigen von(Pro)Cathepsin X aus Proteingemischen (Anti-Cathepsin X gekoppelt an Sepharose) als auch der Identifizierung potentieller Bindungspartner von Cathepsin X (Cathepsin X gekoppelt an Sepharose). Die Vorbereitung der Proben für die Affinitätschromatographie erfolgte folgendermaßen: Der Zellkulturüberstand wurde durch Zentrifugation (5 min bei 2000 g) von toten und abgelösten Zellen getrennt und mittels einer Amicon-Rührzelle konzentriert. Humanes EDTA-Plasma wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (je 10 Minuten bei 400 g) und Filtrieren (Porendurchmesser 0,45µm) von korpuskulären Zellbestandteilen getrennt. Die Proben wurden anschließend in geeignetem Verhältnis (Zellkulturüberstand 1:6,5; EDTA-Plasma 1:5) mit PBS verdünnt und rezyklisierend über Nacht auf die Sepharose-Säule aufgetragen. Die Flußgeschwindigkeit betrug ca. 15 – 20 ml/h. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit PBS gewaschen. Dies erfolgte solange, bis der dazugehörige Schreiber, welcher an einen UV-Detektor angeschlossen war, eine Nulllinie für die Absorption bei 280 nm zeigte. Daraufhin sollten Moleküle, die unspezifisch an das gekoppelte Protein gebunden hatten, eluiert werden. Als Puffer diente hierfür 0,2 M NaSCN. Nach erneutem Waschen der Säule mit PBS, erfolgte die Elution spezifisch gebundener Proteine mit 0,2 M Glycin/HCl, pH 2,2. Es wurden sowohl vom NaSCN-Eluat als auch vom Glycin/HCl-Eluat alle 2 Minuten Fraktionen abgenommen. Die Glycin/HCl-Fraktionen wurden mit Tris-Puffer (1,5 M Tris/HCl, pH 8,0) neutralisiert. Alle Schritte der Affinitätschromatographie wurden bei 4 °C durchgeführt.

C.2.2.10 Gelfiltration

Die Gelfiltration kam zum Einsatz, um Plasmaproteine nach ihrer Masse aufzutrennen. Dabei wurden zwei unterschiedliche Säulen eingesetzt (Superdex 200 10/300 GL und HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade; beide GE Healthcare). Die Versuche fanden am ÄKTAexplorer (GE Healthcare, Freiburg) statt. Alle eingesetzten Puffer wurden filtriert (Porendurchmesser 0,22 µm) und entgast. Für die Kalibrierung der Säulen wurde jeweils ein Gemisch aus Ferritin, RNase (aus Calibration-Kits HMW bzw. LMW, GE Healthcare) und BSA (10 mg/ml) eingesetzt. Zur Ermittlung des Totvolumens der HiLoad-Säule wurde der Kalibrierungslösung zusätzlich Dextran Blau zugegeben. Die Zusammensetzung und das aufgetragene Volumen der Kalibrierungslösung sind Tab. C.3 zu entnehmen.

Tabelle C.3 *Pipettierschema für die Kalibrierungslösung in Abhängigkeit der verwendeten Gelfiltrations-Säule*

	Säule	
	Superdex 200 10/300 GL	HiLoad 25/60 Superdex 200 prepgrade
RNase	20 µl	945 µl
BSA	160 µl	3775 µl
Ferritin	6 µl	140 µl
Dextran Blau	0 µl	140 µl
PBS	14 µl	0 µl
Gesamtvolumen	200 µl	5000 µl

Anhand des Elutionsvolumens konnte für jedes der oben genannten Eichproteine der sog. Verteilungskoeffizient K_{av} nach untenstehender Formel errechnet werden.

$$K_{av} = \frac{\text{Elutionsvolumen} - \text{Totvolumen}}{\text{Totalvolumen} - \text{Totvolumen}}$$

In einem Graph wird K_{av} gegen $\log M_r$ (Molekularmasse) aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade durch die einzelnen Datenpunkte gelegt. Die Gleichung dieser Ausgleichsgeraden wurde durch Microsoft® Excel 2003 bestimmt. Anhand der Regressionsgleichung konnten die Gewichte der aufgetrennten Proteine rechnerisch ermittelt werden.

Als Probe für die Gelfiltration fand humanes Citrat-Plasma Verwendung. Dieses wurde zunächst für 20 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Mit Überführung des Überstandes in ein neues Falcon-Gefäß, erneuter Zentrifugation für 20 Minuten bei 2000 g, 1:1 (v/v) Verdünnung mit PBS und anschließender Filtration in 2 Schritten (Porendurchmesser 5 µm und 0,22 µm) war die Vorbereitung der Probe beendet. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 200 µl (Superdex 200 10/300 GL-Säule) und 5 ml (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade-Säule).

Nach der Äquilibration der Säulen mit einem Säulenvolumen PBS, wurde die Probe aufgetragen und die Trennung mit einem weiteren Säulenvolumen PBS durchgeführt. Es wurden 1 ml-Fractionen (Superdex 200 10/300 GL) und 10 ml-Fractionen (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade) gesammelt. Die weitere Analyse der gesammelten Fractionen erfolgte durch ELISA und Westernblot. Anschließend wurde die Säule mit je einem Säulenvolumen dH₂O mit 0,02% NaN₃ sowie mit 0,5 M NaOH gereinigt. Die Reäquilibration erfolgte mit einem Säulenvolumen dH₂O mit 0,02% NaN₃ und zwei Säulenvolumen PBS.

C.2.2.11 Quantitativer Nachweis von Cathepsin X durch Sandwich-ELISA

Der eingesetzte Sandwich-ELISA zum Nachweis von (Pro)Cathepsin X wurde bereits publiziert (NÄGLER et al., 2006). Dieser Enzym-gekoppelte Immunoassay erlaubt die Detektion und Quantifizierung aller Cathepsin X-Formen in Zellkulturproben und Körperflüssigkeiten. Hierfür wurde eine Mikrotiterplatte zunächst mit einem polyklonalen Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X (anti-ProcathX-IgG aus Kaninchen, Verdünnung 1:1000)

beschichtet. Es folgte die Pipettierung von Standards, Kontrollen und Proben und die Inkubation in der Mikrotiterplatte. Anschließend wurden nicht-gebundene Komponenten in mehreren Waschschritten entfernt und nachfolgend der erste polyklonale Detektionsantikörper (anti-ProCathX-Ig aus Ziege, Verdünnung 1:200) zugegeben. Die Detektion erfolgte durch den zweiten Detektionsantikörper (anti-Ziege-IgG aus Maus, Meerrettichperoxidase-markiert) und TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin) als chromogenem Substrat. Durch Zugabe von TMB kommt es zu einer Farbreaktion, die in ihrer Intensität proportional zur (Pro)Cathepsin X-Konzentration in der Probe ist. Der Versuchsaufbau ist der Abbildung C.1 zu entnehmen.

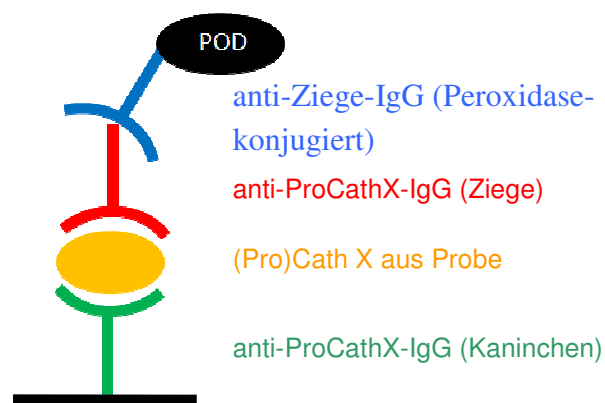


Abbildung C.1 Aufbau Sandwich-ELISA für humanes (Pro)Cathepsin X (POD=Peroxidase)

C.2.2.12 Bindungs-ELISA

Um die Bindungsfähigkeit von Procathepsin X an unterschiedliche Proteine zu testen, wurde ein Bindungs-ELISA eingesetzt. Dazu wurden Fibronectin (5 µg/ml), Kollagen I (5 µg/ml) und Heparin (5000 IE/ml) in einem Beschichtungspuffer (0,1 M Na-Acetat, 0,1 M NaCl, pH 5,5) verdünnt und davon je 200 µl über Nacht bei 4 °C auf eine 96-well-Platte pipettiert. Als Negativkontrolle diente eine BSA-Lösung (Beschichtungspuffer + 5% (w/v) BSA). Nach der Inkubation wurde die Platte 3 mal mit je 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) gewaschen. Anschließend erfolgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe von Procathepsin X mit Probenpuffer [Waschpuffer + 2% (w/v) BSA (10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 und 0,08 µg/ml)]. Davon wurden in jede Kavität 100 µl pipettiert und die Platte danach für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend folgte eine dreimalige Waschung mit 200 µl Waschpuffer. Im nächsten Schritt wurde die Mikrotiterplatte 1 Stunde mit einer 1:200-Verdünnung des Anti-(Pro)Cathepsin X Antikörper aus Ziege (R&D-Systems, USA) bei Raumtemperatur inkubiert. Die weiteren Schritte sind analog zum Sandwich-ELISA (Kap. C.2.2.9): 3-maliges Waschen mit Waschpuffer, Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Anti-Ziege-Antikörper (100 µl, Verdünnung 1:20000), erneutes 3-maliges Waschen (Waschpuffer), Zugabe von TMB (100µl), Stoppen der Farbreaktion durch H₂SO₄ (1 M, 100µl) und Messung der optischen Dichte bei 450nm.

C.2.3 Zellbiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die meisten zellbiologischen Methoden nach den Angaben von Celis durchgeführt (CELIS, 1994).

C.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vitale Zellen wurden durch Zugabe von Accutase (PAA, Linz) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und bei 300 g für 10 Minuten sedimentiert. Das entstandene Sediment wurde mit eiskaltem PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in ein steriles Einfriermedium (Kulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO) aufgenommen, so dass die Konzentration der Zellen $4 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter betrug. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Eine stufenweise Abkühlung der Zellen konnte mittels einer Einfrierbox der Firma Nunc („NalgeneTM Cryo 1°C Freezing Container“) auf Trockeneis erzielt werden. Die endgültige Überführung der Zellen in Flüssigstickstofftanks zur Langzeitlagerung erfolgte am Folgetag.

Nach Entnahme der Zellen aus dem Stickstofftank erfolgte das Auftauen durch schwenken des Kryoröhrchens in einem Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden danach in einem 37 °C warmen Kulturmedium resuspendiert, um das zytotoxische DMSO des Einfriermediums zu verdünnen. Nach Sedimentation bei 300 g für 10 Minuten erfolgte die Resuspension der Zellen in ein frisches Vollmedium, die Überführung in T₂₅-Zellkulturflaschen sowie die Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂.

C.2.3.2 Kultivierung der Prostata-Zelllinien

Alle eingesetzten Zelllinien wurden im Wachstumsmedium RPMI 1640 kultiviert, dem 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) L-Glutamin und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Das Medium für PC-3-Zellen enthielt zusätzlich 1% (v/v) Pyruvat. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5% CO₂-Konzentration und 90% Luftfeuchtigkeit. Eine regelmäßige Kontrolle auf Mykoplasmen-Kontamination erfolgte durch den Mykoplasmen-Test von VenorGeM[®], welcher nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

C.2.3.3 Subkultivierung konfluenter Zellen

Zur Subkultivierung wurde das Medium entfernt und die Zellschicht mit PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen vom Zellflaschenboden wurde unverdünnte Accutase zugeben, bis die Flaschenoberfläche vollständig benetzt war. Accutase hat gegenüber Trypsin-EDTA den Vorteil, dass sie sich selbst inaktiviert und somit schonender für die Zellen ist. Ausserdem wurde bei PC-3-Zellen eine deutlich effizientere Ablösung der Zellen erzielt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 5 Minuten. Zellen die sich bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Suspension befanden, wurden durch leichtes Klopfen von der Kulturflaschenoberfläche

gelöst. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert und das Sediment in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. Die Weiterkultivierung erfolgte nach dem Splitten im Verhältnis von 1:3 bis 1:10.

C.2.3.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer. Hier handelt es sich um einen speziellen Objektträger, in den zur Erleichterung der Zellzählung Quadrate eingraviert sind. Nach Reinigung von Objektträger und Deckblättchen mit 70%igem Ethanol wurden die Auflagestege leicht angefeuchtet und das Deckblättchen aufgesetzt. Der richtige Sitz ließ sich durch Auftreten der Newton-Ringe erkennen. Nun wurde die zu untersuchende Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung (0,5% (w/v) Trypan in PBS) verdünnt und 10 µl davon auf die Zellkammer pipettiert. Da vitale Zellen in der Lage sind den Farbstoff aus der Zelle hinauszutransportieren, konnten durch diese Färbung bereits abgestorbene Zellen identifiziert werden. Unter dem Mikroskop wurden die ungefärbten und damit lebenden Zellen innerhalb der Quadrate gezählt. Die Zellkonzentration errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{n_{\text{Zellen_total}}}{n_{\text{Quadrat}}} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor ergibt sich aus der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau.

C.2.3.5 Stimulation von Prostatakarzinom-Zellen (LNCaP) mit Dihydrotestosteron

Testosteron gilt als essentielles Hormon für die Pathogenese eines Prostatakarzinoms. Es galt zunächst die Hormonkonzentration zu ermitteln, die den größten Effekt auf die Prostatakarzinomzellen hat. Hierfür wurden androgenabhängige LNCaP-Zellen mit DHT stimuliert und die Zellproliferation als Parameter der Hormonwirkung herangezogen. In einem zweiten Schritt sollten unter der ermittelten DHT-Konzentration mögliche Veränderungen der Cathepsin X-Expression untersucht werden.

Um die optimale Konzentration an Dihydrotestosteron für die androgenabhängige Zelllinie LNCaP zu ermitteln, wurden zunächst 5×10^3 Zellen in 200 µl Kulturmedium je Kavität auf eine 48-well-Platte der Firma Nunc ausgesät. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ für 24 Stunden wurde das Medium abpipettiert und durch 200 µl Stimulationsmedium (RPMI 1640, 1% (v/v) L-Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1% (v/v) Pyruvat, 1% (v/v) *non-essential amino-acids* und 1% CDS (*charcoal depleted serum*)) ersetzt, wobei hier das RPMI 1640 phenolrot-frei war, um keinen Störeffekt auf die photometrische Auswertung zu haben. Das FCS (*fetal calf serum*) des Vollmediums wurde durch CDS ersetzt, um mögliche unerwünschte Effekte von Wachstumsfaktoren oder Hormonen aus dem FCS zu eliminieren. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Stimulation mit DHT. Für jeden Messpunkt wurden je 4 wells mit DHT stimuliert (1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM und 100 nM) sowie 4 wells als

Kontrolle unstimuliert belassen. Für das Experiment wurde das Medium erneut abpipettiert und durch 400 µl frisches Stimulationsmedium ersetzt, dem DHT in den obengenannten Konzentrationen zugegeben wurde. Da das DHT in Ethanol gelöst war, musste den unstimulierten Kontrollen die äquivalente Alkoholmenge (0,01% (v/v) C₂H₅OH) zugegeben werden. Der deutlichste Effekt von DHT auf das Wachstum von LNCaP-Zellen konnte nach Zugabe von 100 nM DHT erzielt werden.

Die weiteren Versuche zum Ermitteln von DHT-Effekten auf die Cathepsin X-Expression erfolgten daher mit dieser Hormonkonzentration. Dazu wurden 6-*well*-Platten mit 6×10^4 LNCaP pro *well* in 1,5 ml Vollmedium ausgesät und über Nacht im Inkubator inkubiert. Danach wurde das Medium abpipettiert und durch 3 ml Stimulationsmedium mit DHT (100 nM) ersetzt. Analog zum oben genannten Experiment wurde den Kontrollen Ethanol (0,01% (v/v)) zugegeben. Nach 48 Stunden bzw. 96 Stunden wurden die Zellen geerntet und Lysate angefertigt. Die Lysate und Zellkulturüberstände wurden durch LightCycler, ELISA und Westernblot weiter analysiert.

C.2.3.6 Stimulation von Prostatakarzinom-Zellen (LNCaP) mit Proteinen der extrazellulären Matrix

Neben Hormonen gelten auch Proteine der extrazellulären Matrix als Einflussfaktoren für die Entstehung und das Wachstum von Malignomen. Mögliche Effekte dieser Proteine auf die Expression von Cathepsin X in Prostatakarzinomzellen sollten durch Stimulation der Zellen untersucht werden. Hierfür wurden LNCaP-Zellen ($1,5 \times 10^5$ Zellen / *well* in 12-*well*-Platten) in ein Vollmedium ausgesät und durch Zugabe von EZM-Proteinen stimuliert (Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin und Laminin je 5 µg/ml, Osteopontin 1 µg/ml). Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die Zelllysate und Zellkulturüberstände im ELISA auf ihren (Pro)Cathepsin X-Gehalt untersucht.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellkulturplatten am Vorabend mit den oben genannten Proteinen (je 1 µg/ml in PBS gelöst) bei 4 °C beschichtet. Es wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in jedes *well* ausgesät und für 48 Stunden auf den beschichteten Proteinen inkubiert. Es erfolgte keine weitere Zugabe von EZM-Proteinen. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen geerntet und Zelllysate hergestellt. Die Lysate und Kulturüberstände wurden im ELISA und Lightcycler weiter untersucht.

C.2.3.7 Proliferationsstudien

Um die pro-proliferative Wirkung von Dihydrotestosteron auf LNCaP-Zellen (Kap. C.2.3.5) zu quantifizieren, wurde die Zellzahl nach der Hormonstimulation alle 24 Stunden durch den XTT-Assay der Firma Roche ermittelt. Dieser Assay basiert auf folgendem Prinzip: Das gelbe Tetrazolium-Salz XTT wird durch lebende Zellen gespalten und in das orange-farbene Formazan überführt (Abb. C.2). Diese Färbung lässt sich dann photometrisch detektieren. Der Assay wurde nach Vorgaben des Protokolls der Firma Roche angesetzt. Die Inkubationszeit

betrug 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂. Die photometrische Messung erfolgte bei 470 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm.

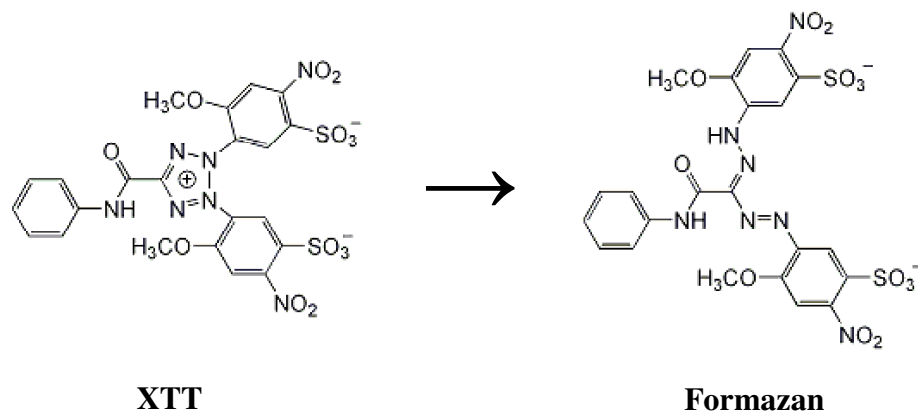


Abbildung C.2 Prinzip des XTT-Assays

Das gelbe Tetrazoliumsalz XTT wird von vitalen Zellen in das orange- farbene Formazan überführt.

C.2.3.8 RNA-Interferenz

Um Rückschlüsse auf die Funktion von Cathepsin X zu ziehen, wurde das Protein gezielt ausgeschaltet. Dies geschah durch RNA-Interferenz. Dabei wurde sog. siRNA in die Zellen transfiziert, die Cathepsin X-mRNA sequenzspezifisch abbaut. Für die Niederregulation von Cathepsin X in PC-3-Zellen wurden die spezifischen siRNAs CatX304 und CatX913 eingesetzt, die an unterschiedliche Sequenzen der Cathepsin X-mRNA binden. Als Kontrollen dienten sowohl eine unspezifische siRNA (*non-silencing*) als auch ein Derivat von CatX304 (die sog. *mismatch*-Kontrolle), welches zwei ausgetauschte Basenpaare enthält. Die Transfektion der PC-3-Zellen erfolgte mit HiPerFect als Transfektionsreagenz nach dem Fastforward-Protokoll der Firma Qiagen. Zunächst wurden PC-3-Zellen entweder in T₇₅-Flaschen oder 6-well-Platten ausgesät (6,4 – 7,3 x 10⁴ Zellen/ml Medium). Für die Transfektion wurden 5 nM – 10 nM jeder siRNA (CathX304, CathX913, Cath304*mismatch*, *Non-silencing*) und 7,5 µl HiPerFect pro ml Medium eingesetzt. Die Transfektion erfolgte 2 Stunden nach Aussaat der Zellen.

C.2.3.9 Transmigrationsassay

Die Untersuchungen zur Invasionsfähigkeit der PC-3-Zellen wurden mittels einer Boyden-Kammer durchgeführt. Bei der Boyden-Kammer handelt es sich um einen Zellkulturplatten-Einsatz, der die Kavität mittels einer Membran mit definierter Porengröße in zwei Kompartimente trennt. Die Zellen wandern durch die beschichtete Membran entlang eines Stimulusgradienten vom oberen in das untere Kompartiment. Eine Boyden-Platte (Corning, 24-well, Porendurchmesser 8µm) wurde über Nacht mit humaner extrazellulärer Matrix (BD Biosciences) beschichtet. Hierzu wurde die Matrix in serumfreiem Medium gelöst und 200 µl der Lösung (Konzentration 50 ng/µl) auf die Membran aufgebracht. Nach dem Trocknen unter der Sterilbank bei geöffnetem Plattendeckel über Nacht erfolgte die Rekonstitution der

EZM durch erneutes Auftragen von 200 µl serumfreiem Medium und Inkubation unter der Sterilbank für 2 Stunden.

Währenddessen wurden die Zellen mittels Accutase abgelöst und anschließend zentrifugiert (10 Minuten, 300 g). Durch Zugabe von RPMI 1640-Medium, welches 1% (v/v) Nutridoma enthielt, wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Das serumfreie Medium zur Rekonstitution der extrazellulären Matrix wurde abgesaugt und 200 µl der Zellsuspension auf den Einsatz der Boyden-Kammer pipettiert. Die unteren Kompartimente wurden mit RPMI 1640 mit 1% (v/v) Nutridoma und 10% (v/v) FCS befüllt. FCS stellte dabei den Migrationsstimulus für die Zellen dar. Nach 45 Minuten Inkubation bei 37 °C wurden die Einsätze luftblasenfrei in die unteren Kompartimente der Kammer eingesetzt und damit das Experiment gestartet.

Die Quantifizierung der transmigrierten Zellen erfolgte nach 24 Stunden im CO₂-Inkubator: Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und nicht-invadierte Zellen aus dem oberen Kompartiment mittels eines Wattestäbchens entfernt. Anschließend wurden die Einsätze für 2 Minuten mit 800 µl PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 800 µl eiskaltem Methanol bei 4 °C. Anschließend wurde der Alkohol entfernt und durch 800 µl PBS mit 0,2% Triton X-100 ersetzt. Die Zellen wurden nun für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und für die anschließende Färbung mit DAPI (4,6-Diamidin-2-Phenylindol) permeabel gemacht. DAPI wurde 1:7500 in PBS verdünnt und 600 µl davon für 3 Minuten zu den fixierten Zellen gegeben. Die Inkubation wurde im Dunklen auf dem Schüttler durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 800 µl für je 2 Minuten) und Zugabe von 1,6 ml PBS wurden die Platten ausgewertet.

Die Analyse migrierter Zellen erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop IX 70. Es wurde das 4fach Objektiv verwendet und pro Kammer ein repräsentatives Gesichtsfeld photographiert (SensiCam QE). Die fluoreszierenden Zellkerne wurden unter Benutzung der Software ImagePro ausgezählt.

C.2.3.10 Datenanalyse

Für die statistische Auswertung wurde der Student'sche t-Test mit zweiseitiger Verteilung und Microsoft® Excel 2003 (Microsoft, Unterschleißheim) eingesetzt. Bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) wurde eine statistische Signifikanz angenommen. Sofern nicht anders angegeben, wurden aus den Einzelwerten von Triplettansätzen zunächst Mittelwerte gebildet. Der Mittelwert der Kontrollmessung im Versuchsaufbau wurde im Anschluss als 100% festgelegt und die weiteren Versuchsergebnisse in Relation zum Kontrollwert unter Angabe der Standardabweichung dargestellt. Um Proliferationsunterschiede der einzelnen Versuchsansätze zu egalisieren wurden (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen immer pro Milligramm Gesamtprotein des entsprechenden Ansatzes ausgewertet.

D Ergebnisse

Anmerkung: Im Folgenden wird der Name „Procathepsin X“ auf verschiedene Weisen geschrieben. Wenn die Proform oder das gereifte Enzym nicht eindeutig detektiert wurden, so wird „Pro“ in Klammern gesetzt. Bei einer eindeutigen Identifizierung wird entweder „Procathepsin X“ oder „Cathepsin X“ angegeben. Dies gilt auch für andere Cathepsine.

D.1 Regulation der Expression und Sezernierung von (Pro)-Cathepsin X

Eine Überexpression von (Pro)Cathepsin X beim Prostatakarzinom wurde von der Arbeitsgruppe Nägler bereits vor einigen Jahren beschrieben (NÄGLER et al., 2004). Jedoch sind bis heute weder die (patho)physiologischen Funktionen dieser Protease noch die Mechanismen, die zu einer Veränderung der extra- und intrazellulären Konzentrationen von (Pro)Cathepsin X führen, bekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher Faktoren identifiziert werden, die möglicherweise eine Überexpression von (Pro)Cathepsin X beim Prostatakarzinom hervorrufen.

D.1.1 Einfluss von Dihydrotestosteron (DHT) auf die Proliferation der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP

Es ist bekannt, dass eine Karzinogenese in der Prostata eng mit der Anwesenheit von Testosteron zusammenhängt (HUGGINS & HODGES, 1941). Ob Testosteron bzw. Testosteron-abhängige Signalwege für die Überexpression von (Pro)Cathepsin X in Prostatakarzinom-zelllinien verantwortlich sind, sollte in dieser Arbeit geklärt werden. Dafür wurde die androgen-abhängige Prostatakarzinomzelllinie LNCaP herangezogen. Als Testosteron-äquivalent wurde in den Versuchen die biologisch aktivere Form Dihydrotestosteron eingesetzt. Zunächst wurde die DHT-Konzentration ermittelt, bei welcher der Effekt auf die Proliferation am größten war. Hierzu wurden 5×10^3 Zellen / well in einer 48-well-Platte ausgesät und mit 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM und 100 nM DHT für 1, 2, 3, 4 und 5 Tage inkubiert. Die Proliferation wurde indirekt mittels XTT-Assay über die optische Dichte bestimmt.

Im Vergleich zu den unstimulierten Kontroll-Zellen zeigte sich eine deutlich erhöhte Proliferation bei einer DHT-Konzentration von 100 nM nach 48 Stunden (Abb. D.1). Erstaunlicherweise hatten DHT-Konzentrationen von 1 pM und 10 pM über die gesamte Dauer des Versuchs einen negativen Einfluss auf die Proliferation. Die weiteren Versuche wurden mit DHT-Konzentrationen von 100 nM durchgeführt.

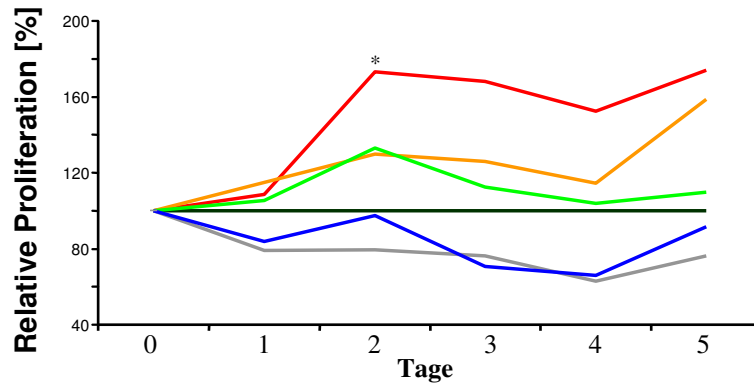


Abbildung D.1 Proliferation von LNCaP unter DHT

LNCaP-Zellen wurden mit 1 pM (blau), 10 pM (grau), 100 pM (grün), 1 nM (orange), 100 nM (rot) DHT stimuliert. Die Proliferation wurde nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen mittels XTT-Assay bestimmt und ins prozentuale Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle (schwarz) gesetzt. Alle Messpunkte wurden als Vierfachbestimmungen angelegt. Der deutlichste Effekt trat bei 100 nM DHT nach 2 (173%, $p < 0,01$ (*)) und 5 Tagen (174%, $p > 0,05$) auf.

D.1.2 Einfluss von Dihydrotestosteron (DHT) auf die Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X in LNCaP-Zellen

Mit den in D.1.1 ermittelten Versuchsbedingungen sollte ein möglicher Effekt von DHT auf die Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht werden. Hierfür wurden LNCaP in eine 6-well-Platte ausgesät und für 48 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit dem Androgen DHT. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die mRNA isoliert. Zudem wurde die (Pro)Cathepsin X-Konzentration in den entsprechenden Überständen und Zelllysaten mittels ELISA bestimmt. Der quantitative Nachweis der Cathepsin X-Expression in LNCaP-Zellen erfolgte mittels quantitativer RT-PCR (Lightcycler™).

Die Stimulation von LNCaP-Zellen mit DHT ergab auf mRNA-Ebene (Abb. D.2 A) keine Veränderung der Cathepsin X-Expression (Procath/GAPDH-Quotient 0,36 (unstimuliert) und 0,35 (stimuliert)). Auch die Veränderungen, welche sich in den Zelllysaten (121% der unstimulierten Kontrolle) und den Überständen (Abfall auf 81% der unstimulierten Kontrolle) nach DHT-Stimulation ergaben (Abb. D.2 B), waren nicht signifikant (jeweils $p > 0,05$).

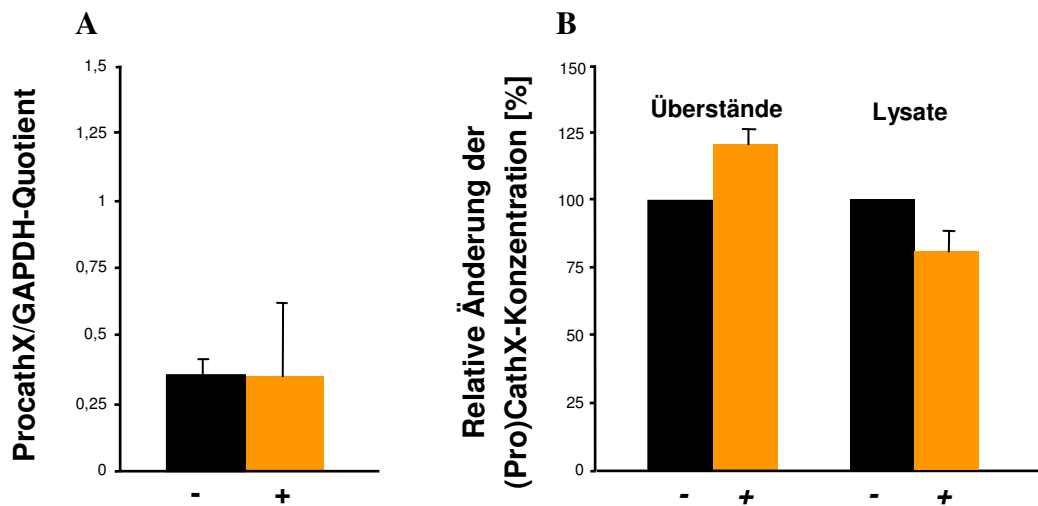


Abbildung D.2 Einfluss von Dihydrotestosteron auf die Transkription und Expression von Procathepsin X in LNCaP-Zellen

LNCaP-Zellen wurden für 48 Stunden mit 100 nM DHT stimuliert (orange, +). Als Kontrollen dienten entsprechende Ansätze ohne DHT (schwarz, -). Anschließend wurde die Cathepsin X-mRNA quantifiziert sowie die (Pro)Cathepsin X-Konzentration in den Überständen und Zelllysaten bestimmt.

A: Darstellung des Procathepsin X/GAPDH Quotienten

B: Darstellung der relativen Veränderung der (Pro)Cathepsin X-Menge pro mg Gesamtprotein gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

D.1.3 Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X in LNCaP-Zellen

Im Rahmen der Pathogenese von Karzinomen kommt es zu invasivem Wachstum und Metastasierung. In diesem Prozess stellt die Basalmembran der Organe und Gefäße eine wichtige Barriere dar. Hauptbestandteile dieser Membran sind EZM-Proteine. Die Stimulation der Prostatazelllinie PNT1A mit dem EZM-Protein Vitronektin führt zu einem deutlichen Anstieg der Sekretion von (Pro)Cathepsin X in den extrazellulären Raum (LECHNER, 2008). In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch bei der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP durch andere EZM-Proteine hervorgerufen werden kann. Um dies zu evaluieren, wurden die Zellen in einem Medium kultiviert, dem das entsprechende Protein zugegeben wurde. Alternativ wurden Zellkulturplatten mit den EZM-Proteinen beschichtet und die Zellen anschließend auf der beschichteten Oberfläche kultiviert.

Von den zahlreichen Proteinen der extrazellulären Matrix wurden mit Kollagen IV und Laminin die wichtigsten Bestandteile der Basallamina ausgewählt. Da das Prostatakarzinom bevorzugt in den Knochen metastasiert, wurden mit Kollagen I und Osteopontin Vertreter der Knochenmatrix auf ihren möglichen Effekt für die Expression und Sezernierung von (Pro)Cathepsin X untersucht. Fibronektin wurde wegen seiner bekannten Funktion für die Zellmigration und seinem nahezu ubiquitären Vorkommen im Plasma und der EZM ausgesucht.

LNCaP-Zellen wurden auf 6-*well*-Platten ausgesät, inkubiert und mit den oben genannten Proteinen stimuliert. Nach 48 Stunden erfolgte die Bestimmung der (Pro)Cathepsin X-Konzentration in den Überständen und Zelllysaten mittels ELISA.

Betrachtet man die Überstände (Abb. D.3 A) im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen zeigt sich lediglich bei der Stimulation mit Fibronectin ein signifikanter Abfall der (Pro)Cathepsin X -Konzentration auf knapp 50% ($p < 0,05$). Bei allen anderen Proteinen lagen die Veränderungen gegenüber der Kontrolle im Bereich von -6% und $\pm 0\%$. Im Lysat (Abb. D.3 B) zeigt sich ein ähnliches Bild: Die Stimulation mit EZM-Proteinen führt intrazellulär zu Veränderungen der (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen, die sich zwischen -3 und +16% bewegen. Insgesamt hat die Zugabe der EZM-Proteine ins Nährmedium von LNCaP-Zellen mit Ausnahme von Fibronectin keinen signifikanten Einfluss auf die intra- und extrazelluläre (Pro)Cathepsin X-Konzentration.

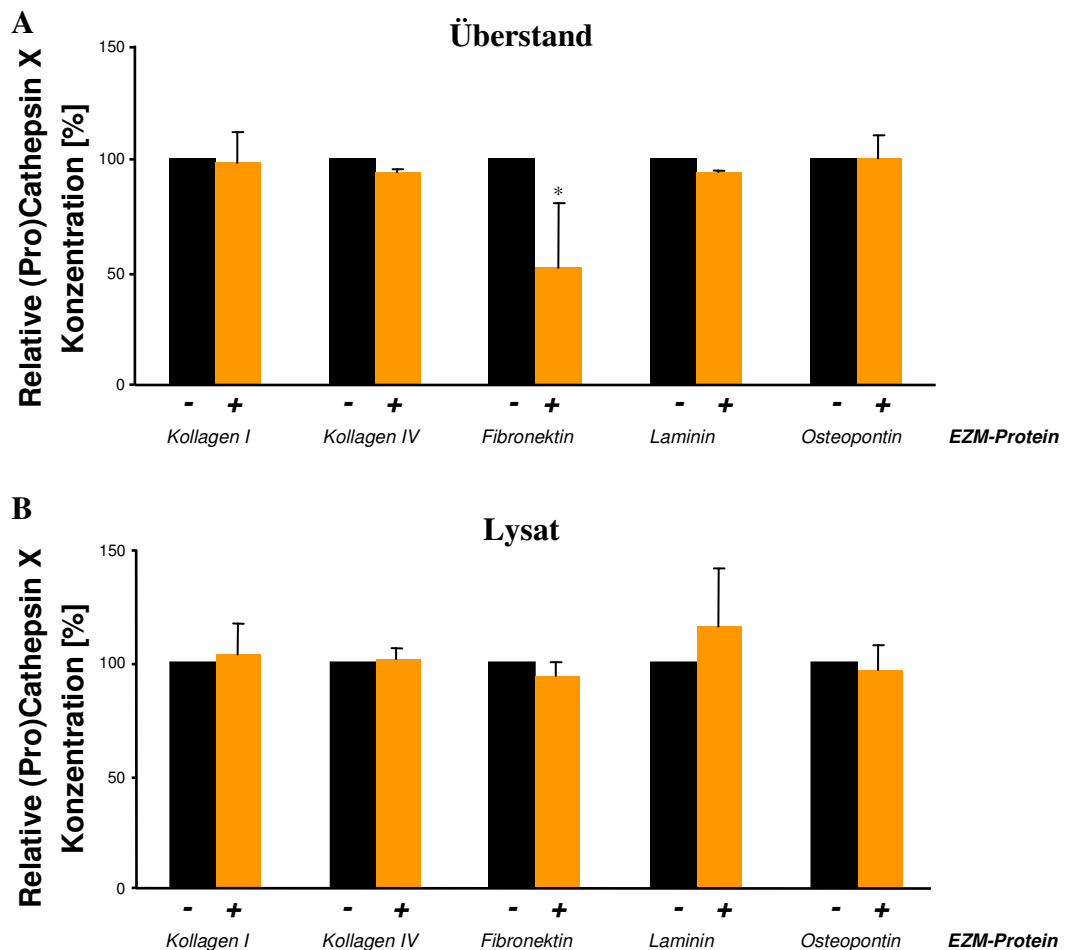


Abbildung D.3 (Pro)Cathepsin X in LNCaP-Zellen nach Stimulation mit EZM-Proteinen

LNCaP-Zellen wurden jeweils durch Zugabe der EZM-Proteine Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin und Osteopontin stimuliert. Die Menge an (Pro)Cathepsin X wurde pro mg Gesamtprotein in Überstand und Lysat bestimmt. Die schwarzen Balken stellen den Mittelwert der jeweiligen unstimulierten Kontrollen dar und wurden als Referenz auf 100% gesetzt.

A: (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen in den Überständen

B: (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen in den Lysaten

In einem zweiten Versuchsaufbau wurden 6-well-Zellkulturplatten, bevor die Zellen auf ihnen kultiviert wurden, jeweils mit 1 µg/ml Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin oder Laminin beschichtet und anschließend mit LNCaP-Zellen für 48 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte analog zum obigen Versuchsaufbau. Im Überstand (Abb. D.4 A) zeigten sich Veränderungen der (Pro)Cathepsin X-Konzentration die sich im Rahmen von -19% (Fibronectin) bis +6% (Laminin) im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle bewegten und alle nicht signifikant waren ($p > 0,05$).

In den Lysaten (Abb. D.4 B) fanden sich im Allgemeinen niedrigere (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen als in den entsprechenden Kontrollen. Die Unterschiede lagen bei 15-25% für Kollagen I, Kollagen IV und Laminin, wobei die Veränderungen für Kollagen I und Laminin sogar signifikant waren ($p < 0,05$). Die Beschichtung mit Fibronectin hatte dagegen keinen Einfluss auf die intrazelluläre (Pro)Cathepsin X-Konzentration.

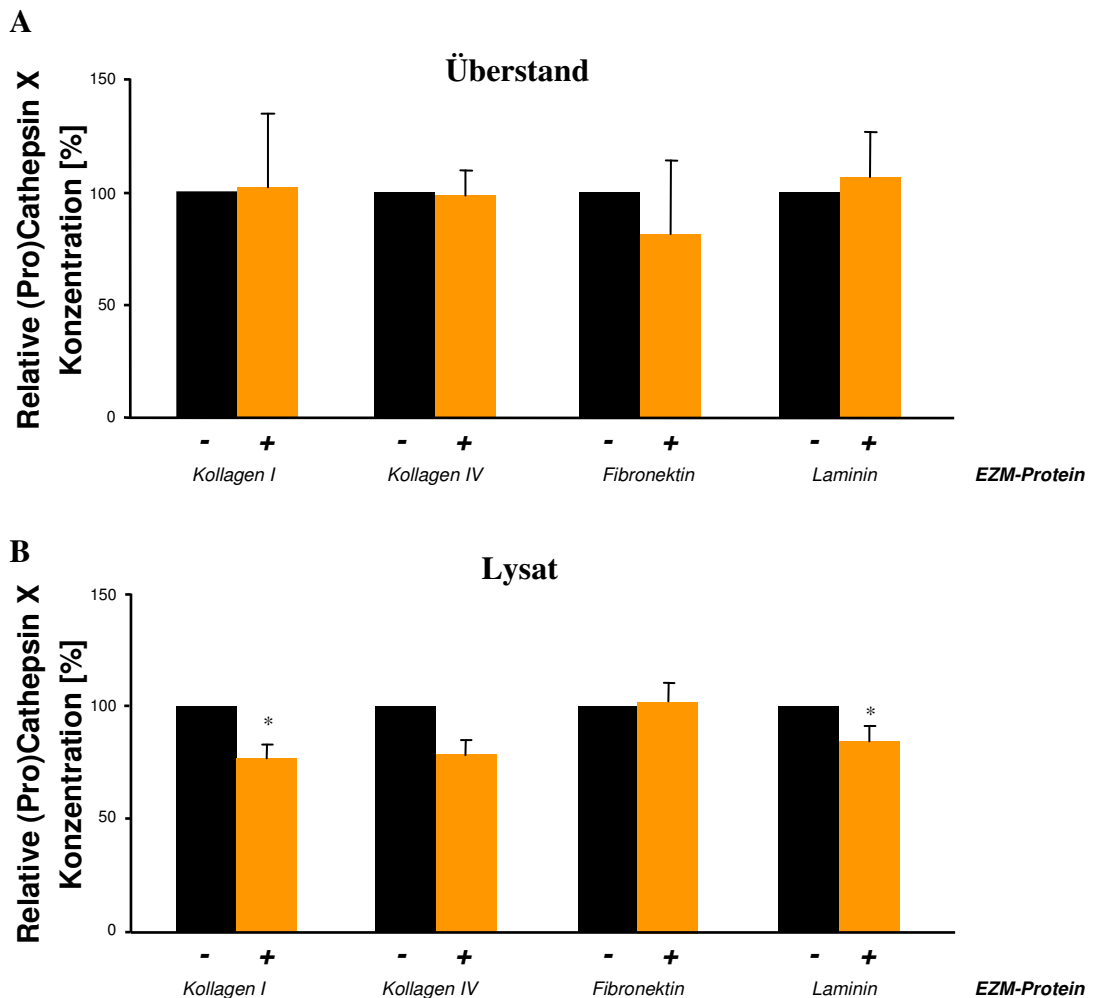


Abbildung D.4 (Pro)Cathepsin X in LNCaP-Zellen

Zellkulturplatten wurden mit den EZM-Proteinen Kollagen I und IV, Fibronectin und Laminin beschichtet. Anschließend wurden die LNCaP-Zellen darauf ausgesät und für 48 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. (Pro)Cathepsin X wurde in den Überstand und Lysaten quantifiziert. Die schwarzen Balken stellen jeweils den Mittelwert der unstimulierten Kontrollen (-) dar und wurden als Referenz auf 100% gesetzt.

A: (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen in den Überständen.

B: (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen in den Zelllysaten.

Sowohl in den Versuchen mit DHT (Abb. D.2) als auch in denen mit EZM-Proteinen (Abb. D.3 und D.4) ließen sich, bezogen auf das gesamte (Pro)Cathepsin X nur sehr geringe Veränderungen im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen beobachten. Möglicherweise führt eine Stimulation mit den oben genannten Substanzen jedoch zu einer Änderung am Verhältnis der Proform und der prozessierten Form zu einander. Um dies zu herauszufinden, wurden die entsprechenden Proben im Immunoblot untersucht. Aufgetragen wurde jeweils die unstimulierte Kontrolle und ihr stimuliertes Pendant. Dabei zeigte sich für keine der drei Substanzen eine Änderung des Bandenmusters. Detektiert wurde lediglich die prozessierte Form von Cathepsin X mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa (Abb. D.5).

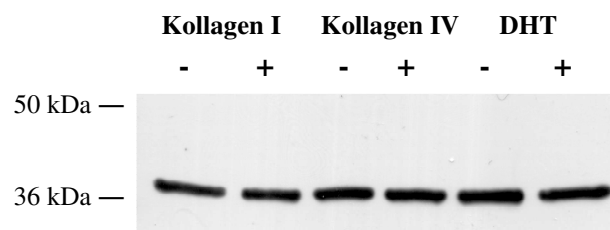


Abbildung D.5 *Cathepsin X-Nachweis im Immunoblot nach Stimulation von LNCap-Zellen mit EZM-Proteinen und DHT*

Aus den Stimationsversuchen mit beschichtetem Kollagen I und IV (s. D.1.3) und Dihydrotestosteron (s. D.1.2) wurde jeweils eine unstimulierte Kontrolle (-) und eine stimulierte Probe (+) nebeneinander aufgetragen.

D.1.4 Extrazelluläre Formen von Cathepsin X

Die weiteren Versuche wurden mit der nicht-androgen-abhängigen Prostatakarzinomzelllinie PC-3 durchgeführt, da diese im Vergleich zu LNCaP eine deutlich höhere Expression an Cathepsin X zeigt sowie ein deutlich größeres Invasionspotential besitzt und damit auch für Invasionsassays wesentlich besser geeignet ist.

Cathepsin X wird neben seiner typischen Lokalisation in den Lysosomen zusätzlich auch in den extrazellulären Raum sezerniert. Im Hinblick auf weitere Fragestellungen sollte geklärt werden, welche Formen des Cathepsin X extrazellulär vorkommen. Hierfür wurde zunächst eine Anreicherung des extrazellulären Cathepsin X durch Affinitätschromatographie durchgeführt. Anschließend wurden die Cathepsin X-Formen im Immunoblot detektiert und durch N-terminale Sequenzierung identifiziert.

D.1.4.1 Detektion extrazellulärer Formen von Cathepsin X in konditioniertem Medium und humanem Plasma

Zur Detektion extrazellulärer Formen von Cathepsin X wurden PC-3-Zellen für 3 – 5 Tage in RPMI-Medium kultiviert. Das auf diese Weise konditionierte Medium wurde 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert und in einer Amicon-Zelle unter Anlage eines Gasdrucks von 2,5 bar konzentriert. Danach wurden die Proben mit PBS 1:8 verdünnt und auf eine CNBr-aktivierte

Sephrose-Säule aufgetragen. Für die Herstellung des Säulenmaterials wurden Cathepsin X-Antikörper (aus Schaf) zunächst chemisch an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. An 1g Sepharose wurden ca. 20 mg Antikörper gebunden. Nach der Kopplung wurde die Sepharose-Matrix in eine Säule überführt und für die Affinitätschromatographie verwendet. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss wurde ein Westernblot zur Detektion von Cathepsin X durchgeführt. Während in den NaSCN-Fractionen kein Cathepsin X nachgewiesen werden konnte, ließen sich in den Glycin/HCl-Fractionen bis zu drei Banden mit unterschiedlichem Laufverhalten finden (Abb. D.6 A): Eine Doppelbande (ca. 45 und 48 kDa) sowie eine höhermolekulare Bande von ca. 55kDa.

Um die extrazellulären Formen von Cathepsin X in humanem Plasma zu untersuchen, wurde der Versuch mit EDTA-Plasma eines gesunden Probanden wiederholt. Die Probe wurde zweimalig zentrifugiert (für 30 Minuten bei 600 g und nach Überführung in ein neues Falcon-Gefäß für 20 Minuten bei 2000g), anschließend filtriert (5µm Porendurchmesser) und mit PBS 1:5 verdünnt. Der weitere Versuchsaufbau entsprach jenem für das Medium nach Konditionierung durch PC-3-Zellen. Im Westernblot der Glycin/HCl-Fractionen war ein ähnliches Bandenmuster zu erkennen, jedoch waren zusätzlich zwei Banden auf der Höhe von ca. 100 kDa sowie unterhalb von 36 kDa sichtbar (Abb. D.6 B).

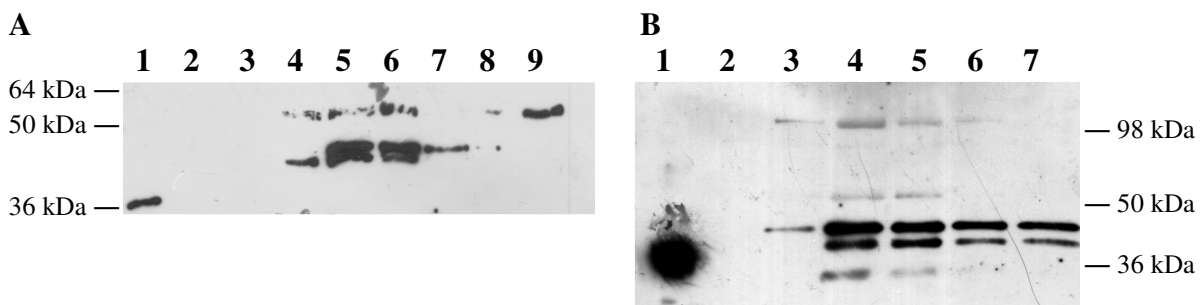


Abbildung D.6 Extrazelluläre Formen von Cathepsin X in konditioniertem Medium und humanem Plasma
Dargestellt sind die Immunoblots zur Detektion von (Pro)Cathepsin X. Als Positivkontrolle (Bahn 1 in A und B) diente rekombinantes, deglykosyliertes Cathepsin X. Auf Grund der Deglykosylierung läuft diese Bande etwas unterhalb der nativen, glykosylierten Formen.

A: Immunoblot der Glycin/HCl-Fractionen nach Affinitätschromatographie des konditionierten Mediums nach Kultivierung mit PC-3-Zellen

B: Immunoblot der Glycin/HCl-Fractionen nach Affinitätschromatographie des humanen EDTA-Plasmas

D.1.4.2 Identifizierung der Cathepsin X-Formen im PC-3-konditionierten Medium

Zur Identifizierung der einzelnen (Pro)Cathepsin X-Formen wurden die Glycin/HCl-Fractionen (Bahn 5 Abb. D.6 A) um den Faktor 10 konzentriert, in einem 12%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und danach auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt (Abb. D.7 A) und nach der Entfärbung einer

N-terminalen Sequenzierung unterworfen (R. Mentele, AG Prof. Lottspeich, Max-Planck-Institut, Martinsried).

Die PVDF-Membran enthielt zahlreiche Verunreinigungen, die wahrscheinlich größtenteils den von der Immunoaffinitätssäule eluierten Antikörpern (schwere Kette ca. 50 kDa bzw. leichte Kette ca. 25 kDa) entsprechen. Es wurden nur die mit „1“ und „2“ markierten Banden ausgeschnitten und sequenziert. Für die in Abb. D.7 mit 1 markierte Bande ergab die N-terminale Sequenzierung eine Misch-Sequenz aus GAAQGGL, AQGGLY und GLYF. Für die mit 2 markierte Bande wurde die Sequenz GLYFRRGQ ermittelt. Alle gefundenen Sequenzen entstammen der Pro-Region von Procathepsin X (Abb. D.7). Die gereifte Form (Cathepsin X) konnte im PC-3-Überstand nicht nachgewiesen werden.

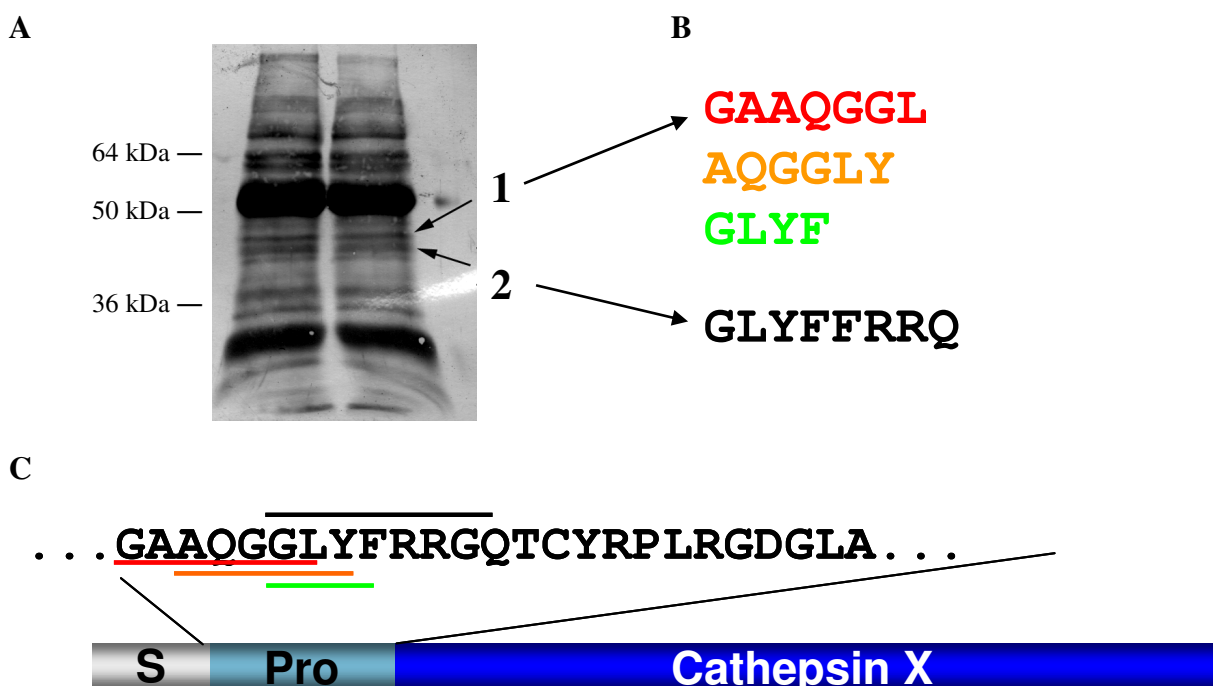


Abbildung D.7 Identifizierung der extrazellulären Formen von (Pro)Cathepsin X in konditioniertem Medium nach Kultivierung mit PC-3-Zellen

A: Coomassie-gefärbte PVDF-Membran. Die mit 1 und 2 markierten Banden wurden N-terminal sequenziert.

B: Durch N-terminale Sequenzierung nachgewiesene Sequenzen

C: Schematische Darstellung der Cathepsin X-Sequenz mit Signalsequenz (S), Proregion (Pro), gereiftem Enzym (Cathepsin X). Alle identifizierten Sequenzen entstammen der Proregion von Cathepsin X.

D.2 Einfluss von Cathepsin X auf die Invasionsfähigkeit von PC-3-Zellen

Die Bedeutung der Cathepsine bei der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren ist bereits seit längerem bekannt (MOHAMED & SLOANE, 2006). Besonders extrazelluläre (von Zellen freigesetzte) Cathepsine üben einen großen Einfluss auf die Fähigkeit der Tumorzellen zur Migration/Invasion aus. Da in den vorhergehenden Versuchen extrazelluläres Procathepsin X

in hohen Konzentrationen im konditionierten Medium nach Kultivierung von PC-3-Zellen nachgewiesen wurde, sollte in einer weiteren Versuchsreihe eine mögliche Rolle der Protease bei der Migration/Invasion von PC-3-Zellen durch die extrazelluläre Matrix untersucht werden. Hierfür wurde das Enzym mittels RNA-Interferenz ausgeschaltet und die transfizierten Zellen anschließend im Invasionsassay auf ihre Invasionsfähigkeit getestet.

D.2.1 Niederregulation von Cathepsin X mittels RNA-Interferenz in PC-3-Zellen

Die Versuche zur Niederregulation von Cathepsin X wurden an PC-3-Zellen durchgeführt, da die Cathepsin X-Expression in dieser Zelllinie besonders hoch ist und zudem die Invasionsfähigkeit dieser Zellen im Vergleich zu den Zelllinien LNCaP und DU-145 deutlich größer ist. Als Transfektionsreagenz wurde HiPerFect verwendet. Es wurden zwei verschiedene siRNAs eingesetzt: CathX304 und CathX913, die unterschiedliche Sequenzen der CathX-mRNA erkennen. Als Negativkontrolle wurde eine „mismatch-Variante“ von CathX304 gewählt, die sich durch den Austausch von zwei Nukleotiden von der ursprünglichen CathX304-siRNA unterscheidet. Als zweite Negativkontrolle wurde eine „non-silencing siRNA“ ohne Zielgen verwendet. Die optimalen Konzentrationen von siRNA und Transfektionsreagenz wurden in Vorversuchen bestimmt.

D.2.1.1 Optimierung der siRNA-Transfektion

Für die Bestimmung der Niederregulation der Cathepsin X-mRNA wurden PC-3-Zellen mit verschiedenen siRNAs transfiziert und die Effizienz mittels LightCycler® nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen. Die ermittelte CathX-mRNA-Menge wurde zum *housekeeping*-Gen GAPDH korreliert. Der deutlichste *knock-down* der CathX-mRNA zeigte sich nach 48 Stunden mit einem Abfall um 91%. Nach 72 Stunden waren nur noch etwa 80% der mRNA niederreguliert (Abb. D.8).

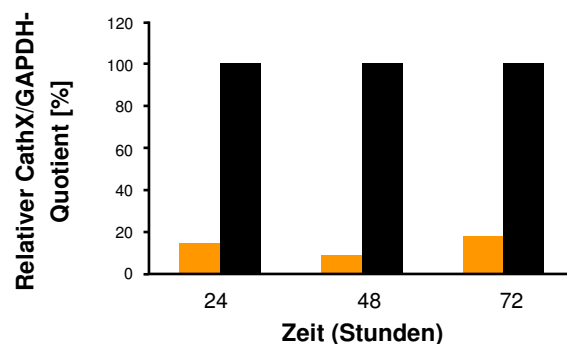


Abbildung D.8 Niederregulation der Cathepsin X-mRNA im Verlauf von 3 Tagen

PC-3-Zellen wurden mit den siRNAs CathX304 und Non-silencing transfiziert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Gesamt-RNA isoliert und nach reverser Transkription durch quantitative PCR die Transkriptenzahl bestimmt. Graphisch dargestellt ist die Anzahl der Cathepsin X-mRNA-Kopien (Orange) in % zur „non-silencing“-Kontrolle (schwarz).

Die Niederregulation des Cathepsin X auf mRNA-Ebene in PC-3-Zellen konnte somit gezeigt werden (Abb. D.8). Da für die weiteren Versuche die Niederregulation des fertigen Proteins entscheidend war, wurde eine weitere Versuchsreihe angelegt, in der die optimale Kombination an eingesetzter siRNA und Transfektionsreagenz ermittelt werden sollte, um eine möglichst deutliche Reduktion der intra- und extrazellulären Cathepsin X-Konzentration zu erzielen. Hierfür wurden unterschiedliche siRNA-Konzentrationen (5, 10 und 20 nM) und unterschiedliche Konzentrationen des Transfektionsreagenz HiPerFect (2,5; 5 und 7,5 µl/ml) getestet (Tab. D.1). Die PC-3-Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion lysiert und die Konzentration an (Pro)Cathepsin X in den Lysaten und Überständen mittels ELISA quantitativ bestimmt (Abb. D.9).

Tabelle D.1 Pipettierschema für die Optimierung der siRNA-Transfektion

20 nM siRNA A 2,5 µl/ml HPF	20 nM siRNA B 5 µl/ml HPF	20 nM siRNA C 7,5 µl/ml HPF
10 nM siRNA D 2,5 µl/ml HPF	10 nM siRNA E 5 µl/ml HPF	10 nM siRNA F 7,5 µl/ml HPF
5 nM siRNA G 2,5 µl/ml HPF	5 nM siRNA H 5 µl/ml HPF	5 nM siRNA I 7,5 µl/ml HPF

Die Effizienz der Niederregulation von (Pro)Cathepsin X war dabei proportional zur eingesetzten Menge an HiPerFect. Insgesamt fanden sich Niederregulationen bei allen Ansätzen in den Lysaten um 67% bis 81% und im Medium um 66% bis 83% (Abb. D.9). Der beste Kompromiss zwischen effizienter Ausschaltung von (Pro)Cathepsin X und ökonomischem Einsatz der siRNAs ergab sich bei 5 nM CathX304 und 7,5 µl HPF / ml Medium (Kombination I in Abb. D.9).

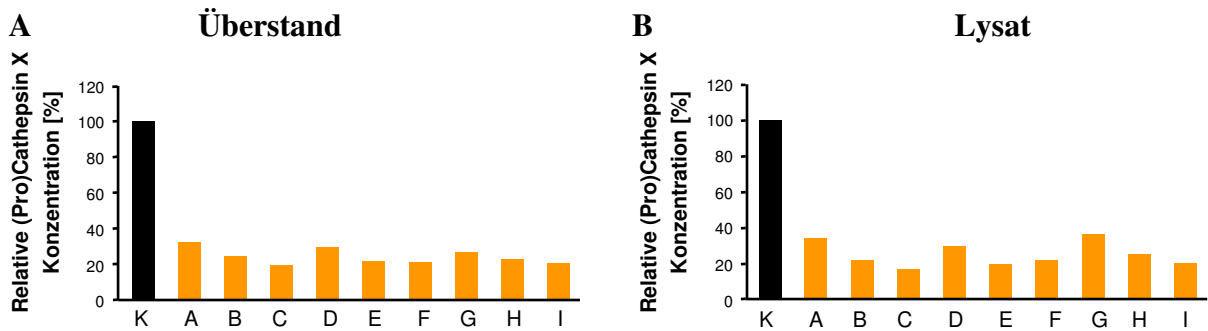


Abbildung D.9 Optimierung der Transfektionsbedingungen für PC-3-Zellen

PC-3-Zellen wurden mit unterschiedlichen siRNA- und HiPerFect-Konzentrationen für 48 Stunden inkubiert und anschließend der Kulturüberstand und das Lysat im ELISA auf ihre (Pro)Cathepsin X-Konzentration untersucht. Die Buchstaben A-I entsprechen den siRNA/HiPerFect-Kombinationen aus Tab. D.1. K stellt die Kontrolle ohne siRNA und ohne HiPerFect dar und wurde als Referenz auf 100% gesetzt.

A: (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen aus den Zellkulturüberständen im Vergleich zur nicht-transfizierten Kontrolle K

B: (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen aus den Lysaten im Vergleich zu K.

In einem weiteren Versuch wurde das Zeitfenster des effizienten Cathepsin X-knock-downs auf Proteinebene bestimmt. Dafür wurden PC-3-Zellen mit 10 nM siRNA (CathX304 und *non-silencing*) und 7,5 µl/ml Medium HiPerFect transfiziert. Die höhere siRNA-Konzentration wurde gewählt, um für die Dauer des Versuchs von insgesamt 7 Tagen, ausreichend zu sein. Nach 2 Tagen wurde die erste Messung durchgeführt und im Anschluss bei der Hälfte der Ansätze das Medium durch Nutridoma-Medium ersetzt. Bei der anderen Hälfte wurde das ursprüngliche Medium (Vollmedium + siRNA und HiPerFect) belassen. Auf diese Weise sollte der Einfluss des fötalen Kälberserums auf die Transfektionseffizienz untersucht werden. Nach 3, 4, 5 und 7 Tagen wurden die (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt und zum Gesamtprotein des Lysats normiert. Für die relative Darstellung wurde jeweils der Mittelwert des *non-silencing*-Ansatzes als 100% gesetzt.

Unter den getesteten Bedingungen konnte bereits 48 Stunden nach Transfektion und danach über weitere fünf Tage eine effiziente Niederregulation von (Pro)Cathepsin X gemessen werden (Abb. D.10). Der deutlichste Rückgang war erst nach 4 Tagen zu beobachten, was für eine relativ lange Halbwertszeit der Protease spricht. Der Mediumwechsel 48 Stunden nach der Transfektion hatte keinen relevanten Einfluss auf die Effizienz der Niederregulation.

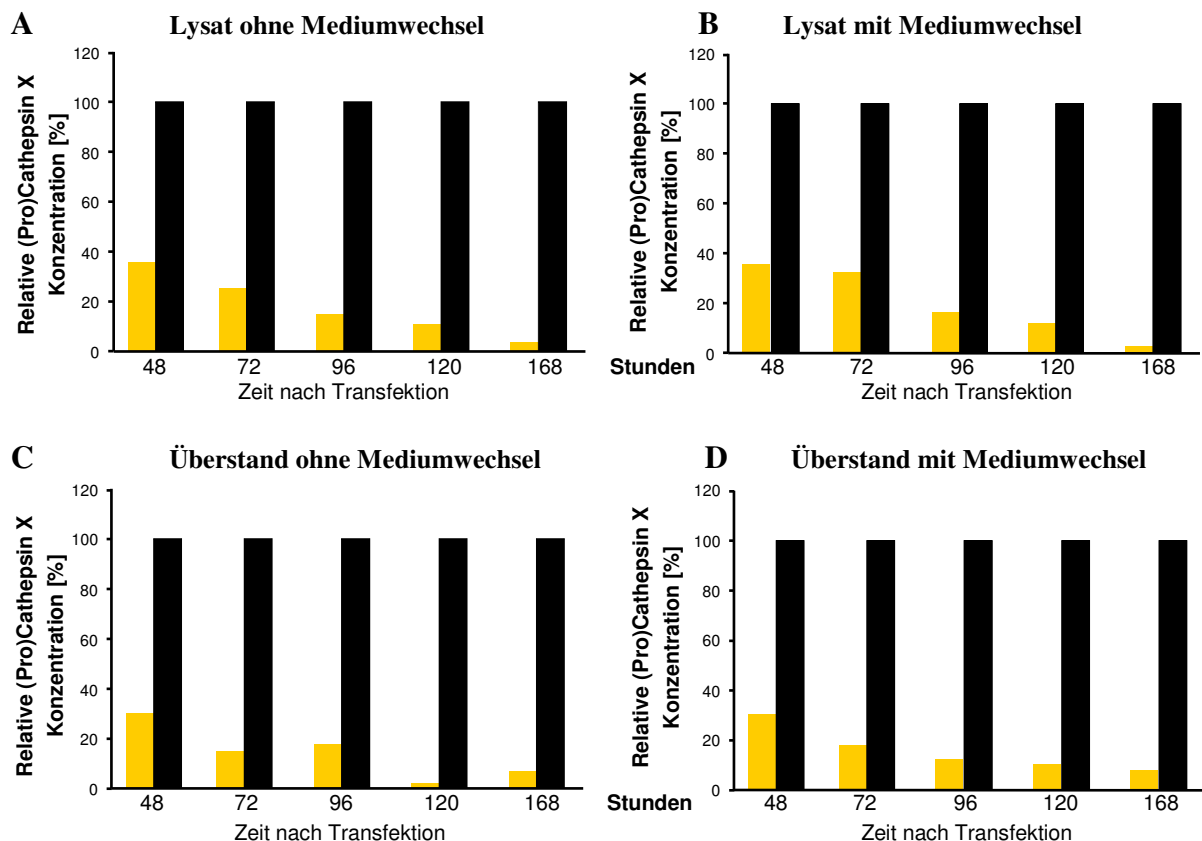


Abbildung D.10 Ermittlung des Zeitfensters für den Cathepsin X-knock-down in PC-3-Zellen nach siRNA-Transfektion

PC-3-Zellen wurden mit siRNA CathX304 (oranger Balken) und non-silencing (schwarzer Balken) transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Bestimmung von (Pro)Cathepsin X in den Lysaten und im Medium mittels ELISA-Messung und wurde als Stunde 0 gesetzt. Weitere Messungen erfolgten nach 48, 72, 96, 120 und 168 Stunden.

A,C: Relative (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen der Zelllysate und Überstände ohne das ein Mediumwechsel stattfand (orange: CathX304-siRNA; schwarz: non-silencing-siRNA)

B,D: Mit Mediumwechsel

Aus diesen Vorversuchen ergaben sich folgende Bedingungen für die Transfektion von PC-3-Zellen: siRNA-Konzentration: 5 nM, HiPerFect: 7,5 µl pro Milliliter Medium bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden.

D.2.2 Einfluss von Cathepsin X auf das Invasionsverhalten von Prostatakarzinomzellen (PC-3)

Zur Funktionsanalyse von (Pro)Cathepsin X im Rahmen der Invasionsfähigkeit von PC-3-Zellen wurden Transwell-Assays (Boyden-Kammer) durchgeführt. Hierfür wurde die zu durchwandernde humane EZM auf eine poröse Membran aufgebracht, die die beiden Kompartimente des Transwell-Systems trennt. Im Versuch wurden 5×10^4 transfizierte PC-3-Zellen eingesetzt (48 Stunden nach Transfektion) und die transmigrierten Zellen nach 24 Stunden gezählt.

Im Invasionsassay wurden mit beiden Cathepsin X-spezifischen siRNAs (CathX304 und CathX913) weniger invadierte Zellen gezählt (Abb. D.11), wobei für CathX304 die Invasivität um ca. 75% ($p < 0,01$) und für CathX913 um ca. 90% ($p < 0,01$) reduziert war. Die *mismatch*-siRNA zeigte ebenfalls eine leicht verminderte Invasionsrate.

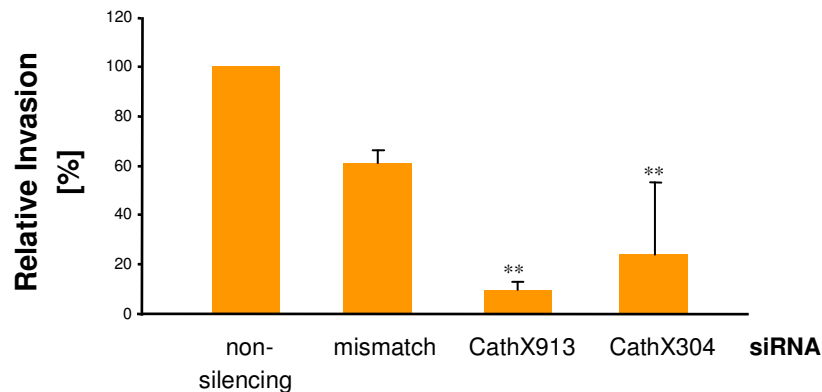


Abbildung D.11 Einfluss von Cathepsin X auf die Invasionsfähigkeit von PC-3-Zellen

Relative Darstellung der Invasionsfähigkeit von PC-3-Zellen nach Transfektion mit zwei Cathepsin X-spezifischen siRNAs (CathX304 und CathX913) sowie mit zwei Kontroll-siRNAs (CathX304mismatch und non-silencing).

D.3 Interaktion von (Pro)Cathepsin X mit Plasmaproteinen

Bei den Stimulationsversuchen von LNCaP mit EZM-Proteinen (Kap. D.1.3) zeigte sich eine Abnahme der (Pro)Cathepsin X-Konzentration in den Überständen der mit Fibronectin stimulierten Zellen (Abb. D.4 B). Dies führte zu der Annahme, dass extrazelluläres (Pro)Cathepsin X möglicherweise an EZM-Proteine - insbesondere Fibronectin - bindet. Um dies zu überprüfen wurde ein Bindungs-ELISA etabliert.

D.3.1 Untersuchung der Bindungsfähigkeit von Procathepsin X an EZM-Proteine im Bindungs-ELISA

Im Bindungs-ELISA wurden Kollagen I, Fibronectin und Heparin als potentielle Bindungspartner des Procathepsin X untersucht. Heparin wurde ergänzend zu den EZM-Proteinen eingesetzt, weil eine Bindung zwischen Heparansulfaten und Cathepsin X beschrieben wurde (NASCIMENTO et al., 2005). Der Versuchsaufbau ist dem Kapitel C.2.2.12 zu entnehmen.

Während bei Fibronectin eine Zunahme der gemessenen optischen Dichte bei 450 nm abhängig von der Procathepsin X-Konzentration zu beobachten war, zeigte sich keine Bindung bei Beschichtung mit Kollagen I und Heparin (Abb. D.12).

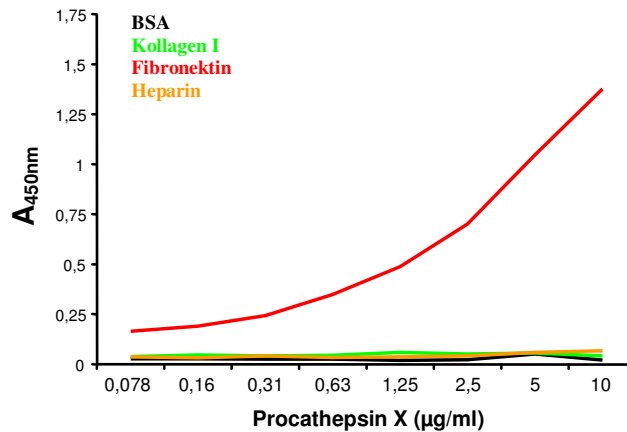


Abbildung D.12 Bindung von Procathepsin X an EZM-Proteine, BSA und Heparin

Darstellung der optischen Dichte bei A_{450nm} nach Bindungs-ELISA mit Fibronectin, Kollagen I, Heparin und BSA in Abhängigkeit von der Procathepsin X-Konzentration.

D.3.2 Nachweis der Bindung von Procathepsin X an Fibronectin durch Affinitätschromatographie

Zur Bestätigung der unerwarteten Bindung von Procathepsin X an Fibronectin wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Für die Herstellung der Affinitätssäule wurde Procathepsin X zunächst chemisch an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Nach der Kopplung wurde die Sepharose in ein kleines Säulengefäß überführt und für die Affinitätschromatographie verwendet. Als Fibronectin-Quelle wurde humanes Plasma 1:4 mit PBS verdünnt und über Nacht rezyklisierend auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit NaSCN und Glycin/HCl, pH 2,2. Die proteinhaltigen NaSCN- und Glycin/HCl-Fractionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, um den Faktor 10 konzentriert (Microsep® Centrifugal Device, PALL, Ann Arbor, USA), auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und Fibronectin anschließend im Immunoblot detektiert (Abb. D.13).

Unspezifisch gebundenes Fibronectin wurde mit NaSCN eluiert und war in den ersten drei NaSCN-Fractionen nachweisbar. Die spezifische Elution des an die Säule gebundenen Fibronectin erfolgte mittels Glycin/HCl. In den entsprechenden Fractionen ließ sich das EZM-Protein nachweisen (Abb. D.13 A Fraktion 9). Die in dieser Fraktion nachweisbaren niedermolekularen Banden waren bereits vor der Affinitätschromatographie vorhanden und stellen möglicherweise Abbauprodukte des Fibronectins dar (Abb. D.13 A Fraktion 1).

Um ein falsch positives Ergebnis durch eine unspezifische Bindung von Fibronectin an das Säulenmaterial auszuschließen, wurde eine Plasma-Probe auf eine Kontroll-Säule aufgetragen. Diese Säule bestand aus CNBr-aktivierter Sepharose mit abgesättigten Bindungsstellen, jedoch ohne gekoppeltes Procathepsin X. Im entsprechenden Immunoblot der Glycin/HCl-Fractionen ließ sich kein Fibronectin nachweisen (Abb. D.13 B). Als Positivkontrolle wurde hier rekombinantes humanes Fibronectin eingesetzt.

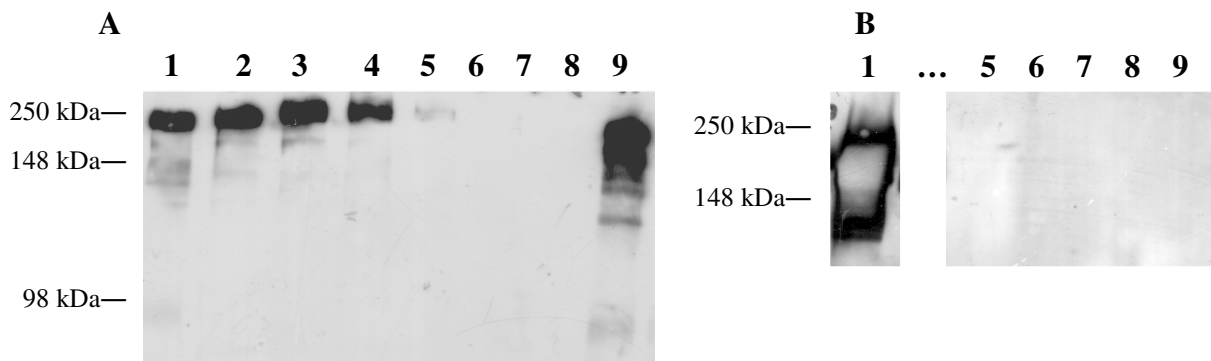


Abbildung D.13 Spezifische Bindung von Fibronectin an Procathepsin X in der Affinitätschromatographie
 Humanes Plasma wurde mittels Affinitätschromatographie aufgetrennt. Die Elution erfolgte mit NaSCN und Glycin/HCl, pH 2,2. Nach SDS-PAGE erfolgte der Immunoblot zur Detektion von Fibronectin. Als Positivkontrolle wurde eine 1:5 Plasma/PBS-Verdünnung (Spur 1 in A) bzw. rekombinantes Fibronectin eingesetzt (Spur 1 in B).

A: Immunoblot der einzelnen Fraktionen nach Affinitätschromatographie mit gekoppeltem Procathepsin X. Aufgetragen wurden die proteinhaltigen Fraktionen der NaSCN-Elution (2-6) sowie der Glycin/HCl-Elution (7-9). Unspezifisch gebundenes Fibronectin ließ sich in den ersten 3 Fraktionen nachweisen. Spezifisch gebundenes Fibronectin wurde in der Glycin/HCl-Fraktion ebenfalls detektiert (9).

B: Immunoblot nach Affinitätschromatographie mit abgesättigter Sepharose. Aufgetragen wurden die Glycin/HCl-Fraktionen (5-9). Spezifisch gebundenes Fibronectin ließ sich im Kontrollversuch nicht detektieren.

D.3.3 Versuch der Identifizierung potentieller Bindungsstellen von Fibronectin für die Interaktion mit Procathepsin X

Nachdem die oben beschriebenen Experimente auf eine Interaktion zwischen Procathepsin X und Fibronectin hinweisen, sollte nun die Bindungsstelle auf dem Fibronectin-Molekül identifiziert werden. Dieser Fragestellung sollte durch den Einsatz von kommerziell erworbenen Fibronectinfragmenten in modifizierten Bindungs-ELISAs nachgegangen werden. Aus der Vielzahl der erwerbbarer Fragmente wurde je eines mit einer möglichst langen Aminosäuresequenz vom Anfang (H-2064), der Mitte (H-3608) und dem Ende (H-2094) der Primärstruktur ausgesucht (Abb. D.14). Zusätzlich wurde H-2068 gewählt, dass als biologisch aktiver Teil des Proteins beschrieben wird und eine mögliche Bindungsstelle für sulfatierte Polyanionen darstellt (DRAKE et al., 1993). Ziel dieser Versuche war es, entweder eine Bindung von Procathepsin X an einer der Proteine direkt nachzuweisen oder durch Präinkubation mit den Fragmenten die Bindungsstelle abzusättigen und so die Interaktion indirekt durch ein nun fehlendes Bindungsverhalten an Fibronectin zu beweisen.

MLRGPGLLLLLAVQCLGTAVPSTGASKSKRQAQQMVPQSPVAVSQSKPGCYDNGKHYQINQQWERTYLGNALVCTCYG	80
GSRGFNCESKPEAEETCFDKYTGNTYRVGDTYERPKDSMIWDCTCIGAGRGRISCTIANRCHEGGQSYKIGDTRRRPHET	160
GGYMLECVCLNGKGWEWCKPIAEKCFDHAAGTSYVVGETWEKPYQGWMMVDCTCLGEGSGRITCTSRNRNCNDQDRTSY	240
RIGDTSWKKDNRGNLLQCICTGNRGEWKCEHRTSVQTTSSSGSPFTDVRAAVYQPPHPQPPYGHCVTDSGVVYSVGM	320
QWLKTQGNKQMLCTCLNGVSCQETAVTQTYGGSNGEPCVLPFTYNGRTFYSCTEGRQDGLHWCSTTSNYEQDQKYSF	400
CTDHTVLVQTRGGSNGALCHFPFLYNNHNYTDTCTSEGRDNNMKWCGTTQNYDADQKFGFCPMAAHEEICTTNEGVMYRI	480
GDQWDKQHDMMRCTCVGNRGEWTCIAYSQLRDQCIQVDDITYNVNDTFHKRHEEGHMLNCTCFGQGRGRWKCDPVDQ	560
CQDSETGTFFYQIGDSWEKYVHGVRYQCYCYGRGIGEWHCQPLQTYPSSSGPVEVFIETETPSQPNSHPIQWNAQPSPHISK	640
YILRWRPKNSVGRWKEATIPGHLNSYTIKGLKPGVVYEGQLISIQYGHQEVTRFDFTTTSTSTPVTSTNTVTGETTFFSP	720
LVATSESVTEITASFFVSVWSASDTSVSGFRVEYELSEEGDEPQYLDLPSTATSVNIPDLLPGRKYIVNVYQISEDEQS	800
LILSTSQTAPDAPPDPTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITGYRIVYSPSVEGSSSTELNLPETANSVTLSDLQPGVQYNITI	880
YAVEENQESTPVVQQETGTTPRSDTVPSPRDLQFVEVTDVKVTIMWTPPESAVTGYRVDVIPVNLPGHEHGRLPISRNT	960
FAEVTGLSPGVTYFYKVFVAVSHGRESKPLTAQQTTKLDAPTNLQFVNETDSTVLVRWTPPPRAQITGYRLTVGLTRRGQPR	1040
QYNVGPVSQYPLRNLQPAEYTVSLVAIKGNQESPKATGVFTTLQPGSSIPPYNTEVTETITIVITWTPAPRIGFKLGVR	1120
PSQGGAPREVTSDSGSIVVSGLTPGVEYVYTIQVLRDQGERDAPVNVKVVTPLSPTNLHLEANPDTGVLTVSWERSTT	1200
PDITGYRITTTTTPTNGQQGNSLEEVVHADQSSCTFDNLSPGLEYNVSVYTVKDDKESVPISDTIIEVPQLTDLSPVDITD	1280
SSIGLRWTPLNSTIIGYRITVVAAGEGIPIFEDFVDSVGYTGTGLEPGIDYDISVITLINGGESAPTTLTQQTAVPP	1360
PTDLRFTNIGPDMRVTWAPPSIDLTNFLVRYSPVKNEEDVAELSISPSDNAVVLTNLLPGTEYVSVSSVYEQHESTP	1440
LRGRQKTGLDSTPGIDFSDITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPHEFSGRPREDRVPHSRNSITLNLTPGTEYVVSIV	1520
ALNGREESPLLIQQSTVSDVPRDLVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK	1600
PGVDYTTITVYAVTGRGDPASSKPIISINYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLPSSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKT	1680
AGPDQTEMTIEGLQPTVEYVSVYAQNPSGESQPLVQTAVTNIDRPKGLAFTDQVDSIKIAWESPQGQVSRYRVITYSSP	1760
EDGIHELFPAPDGEEDTAELQGLRPGSEYTVSVVALHDDMESQPLIGTQSTAIAPATDLKFTQVTPTSLSAQWTPPNVQL	1840
TGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDSSSVVSGLMVATKYEVSVYALKDILTSTRPAQGVVTTLENVSPRRARVTDATETT	1920
ITISWRTKTETITIGFQVDAVPANGQTPIQRTIKPDVRSYITITGLQPGTDYKIYLYTLNDNARSSPVVIDASTAIDAPSNL	2000
RFLATPNSLLVSWQPPRARITGYIIKYEKPGSPREVVPVRPRPGVTEATITGLEPGTEYTIYVIALKNNQKSEPLIGRK	2080
KTDELPLQLVTLPHNLHGPEILDVPSTVQKTPFVTHPGYDTGNGIQLPGTSGQQPSVGQQMIFEEHGFRTTPPTATPI	2160
RHRPRPYPPNVGEEIQIGHIPREDVDYHLYPHGPGLPNPNASTGQEALSQTTISWAPFQDTSEYIISCHPVGTDDEEPLQFR	2240
VPGTSTSATLTGLTRGATYNIIVEALKDQQRHKVREEVTVGNSVNEGLNQPTDDSCFDPYTVSHYAVGDEWERMSES GF	2320
KLLCQCLGFGSGHFRCDSSRWCHDNGVNYKIGEKWDRQGENGQMMSCCTCLNGKGFEKCDPHEATCYDDGKTYHVGEQWQ	2400
KEYLGAICSCCTCFGGQGRWRCDCNCRPGGEPSEGTGTSYNQYSQRYHQRTNTNVNCPICFMPLDVQADREDSRE	2477

Abbildung D.14 Aminosäuresequenz von Fibronectin

Eingezeichnet wurde die Lokalisation der einzelnen Fragmente des Proteins, die als mögliche Bindungsstelle für Procathepsin X betrachtet wurden. H-2064 (grün), H-2068 (orange), H-2094 (schwarz), H-3608 (blau).

Zum direkten Nachweis einer Bindung von Procathepsin X an eines der Fibronectinfragmente wurden Zellkulturplatten mit H-2064, H-2068, H-2094 und H-3608 (jeweils 50 μ M, alle Bachem AG, Weil am Rhein) sowie Fibronectin (0,02 μ M) beschichtet. Die Ansätze wurden mit Procathepsin X in unterschiedlichen Konzentrationen (2,2 - 280 μ M) inkubiert und danach gebundenes Procathepsin X im Bindungs-ELISA detektiert (Abb. D.15 A). Dabei wurde erneut eine konzentrationsabhängige Bindung von Procathepsin X an Fibronectin nachgewiesen, jedoch an keines der Fibronectin-Fragmente. Um die Interaktion indirekt durch Verdrängung zu zeigen, wurde die Zellkulturplatte mit 0,02 μ M Fibronectin beschichtet. Procathepsin X (35 -280 μ M) wurde mit den Fibronectin-Fragmenten (10 μ M) präinkubiert und das Gemisch auf die Fibronectin-beschichteten Zellkulturplatten pipettiert. Danach wurde das gebundene Procathepsin X im Bindungs-ELISA detektiert (Abb. D.15 B). Auch in diesem Versuch ergab sich kein Hinweis auf eine Bindung von Procathepsin X an eines der Fibronectinfragmente.

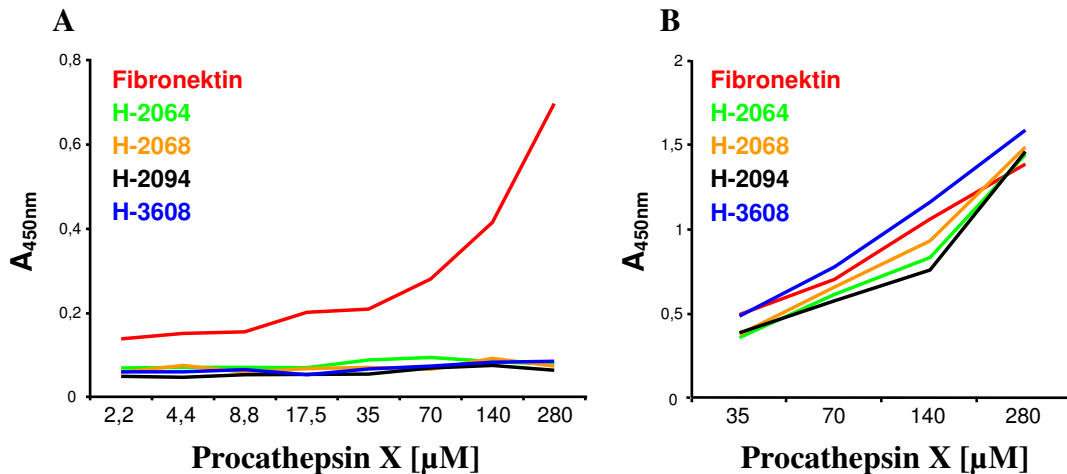


Abbildung D.15 Bindung von Procathepsin X an Fibronectin und Fibronectin-Fragmente

- A:** Eine 96-well-Platte wurde mit Fibronectin sowie den Fibronectinfragmenten H-2064, H-2068, H-2094 und H-3608 beschichtet und mit Procathepsin X in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Anti-Cath-X IgG (Ziege), Peroxidase-konjugiertem Anti-Ziege/Schaf-IgG und TMB als Substrat. Gemessen wurde die Absorption bei 450 nm (A_{450nm}). Die Bindung an Fibronectin wurde bestätigt, jedoch konnte für keines der Fibronectinfragmente eine Bindung nachgewiesen werden.
- B:** Eine 96-well-Platte wurde mit Fibronectin beschichtet. Anschließend wurde Procathepsin X mit je 10 μM der Fibronectin-Fragmente präinkubiert und anschließend auf die Platte pipettiert. Die Detektion erfolgte analog zu A. Es konnte keine Verdrängung der Bindung von Procathepsin X an Fibronectin durch eines der Fibronectin-Fragmente nachgewiesen werden.

D.3.4 Nachweis hochmolekularer (Pro)Cathepsin X-Formen im Plasma mittels Gelfiltration

Die potentielle Bindung von (Pro)Cathepsin X an Fibronectin führte zu der Frage, ob diese Bindung möglicherweise auch im Plasma vorliegt. Ein solch hochmolekularer Komplex kann zum Beispiel mittels Gelfiltration nachgewiesen werden.

D.3.4.1 Analytische Gelfiltration von humanem Plasma

Für diesen Versuch wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit Ferritin, BSA und RNase (GE Healthcare, München) kalibriert (Abb. D.16 A). Im Anschluss erfolgte die Auftrennung einer Citratplasma-Probe (Abb. D.16 B). Hierbei wurden Fraktionen von je 1 ml gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden unverdünnt im ELISA auf ihren (Pro)Cathepsin X-Gehalt untersucht. Zudem wurde der Gesamtproteingehalt der Fraktionen bestimmt (Abb. D.16).

Neben dem erwarteten Molekularmassenbereich für (Pro)Cathepsin X (31 – 48 kDa) wurde in der Tat eine hochmolekulare Fraktion (ca. 330 – 540 kDa) im ELISA positiv auf (Pro)Cathepsin X getestet. Bemerkenswert ist, dass diese Fraktion auch Fibronectin (ca. 250 kDa) enthält (Abb. D.16 C). Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Interaktion zwischen (Pro)Cathepsin X und Fibronectin.

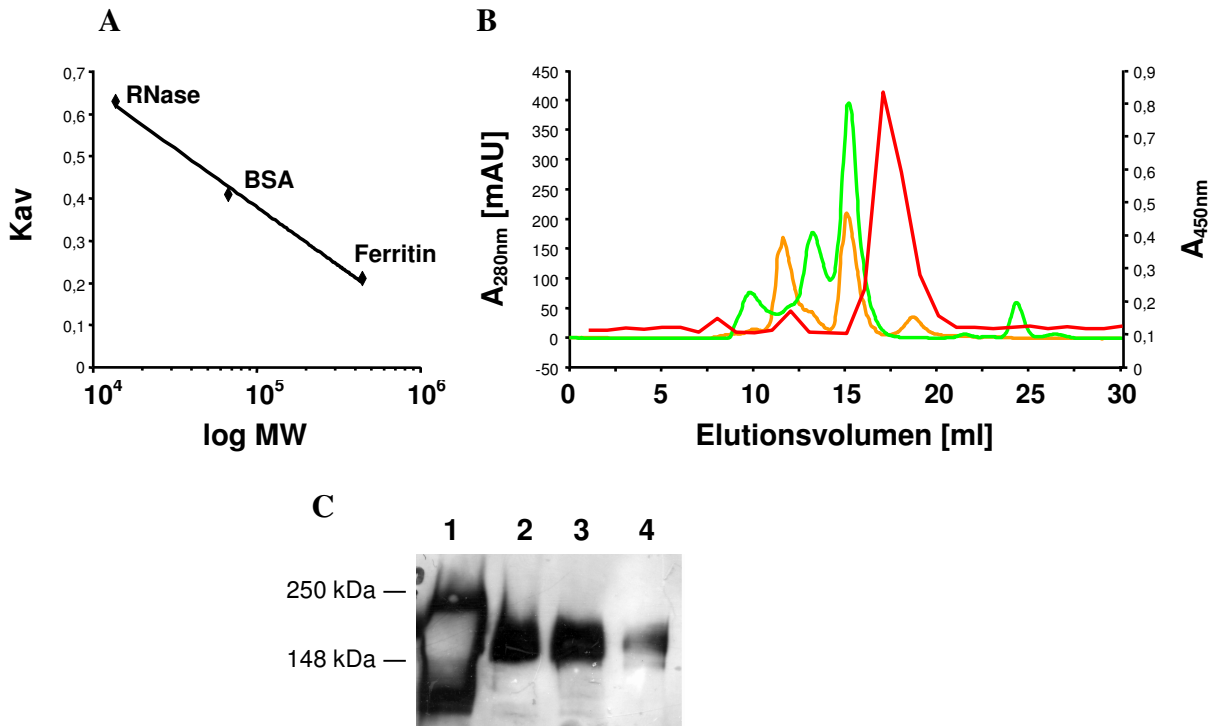


Abbildung D.16 Analytische Gelfiltration von humanem Plasma

A: Kalibrierung der Gelfiltrationssäule (Superdex 200 10/300 GL) mit Ferritin, BSA und RNase A. Gleichung der Regressionsgeraden: $y = -0,1206\ln(x) + 1,7687$

B: Chromatogramm des Standardgemischs (orange) mit Peaks für Ferritin (12 ml), BSA (15 ml) und RNase A (19 ml) und der Plasma-Fractionen (grün). Die Fractionen wurden im ELISA auf ihren (Pro)Cathepsin X-Gehalt getestet (rot).

C: Westernblot der Fractionen 10 (Spur 2), 11 (Spur 3) und 12 (Spur 4) zur Fibronectin-Detektion. In den hochmolekularen Fractionen ist neben (Pro)Cathepsin X auch Fibronectin nachweisbar.

D.3.4.2 Präparative Gelfiltration von humanem Plasma

Um die hochmolekulare, (Pro)Cathepsin X-positive Plasma-Fraktion weiter zu charakterisieren, wurde die Gelfiltration mit einer präparativen Säule (HiLoad26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare) wiederholt. Diese Säule erlaubt die Auftrennung größerer Probenmengen. Zunächst wurde die Säule mit RNase, BSA und Ferritin kalibriert. (Abb. D.17 A). Nach Re-Äquilibration der Säule wurden 5ml eines Plasma-PBS-Gemisches (Verhältnis 1:1) aufgetrennt und Fractionen von 10 ml gesammelt. In den einzelnen Fractionen wurde zum einen der Gesamtpoteingehalt (A_{280nm}) und zum anderen der (Pro)-Cathepsin X-Gehalt (ELISA) bestimmt (Abb. D.17 B).

(Pro)Cathepsin X eluierte im erwarteten Molekularbereich (30 kDa - 75 kDa). Dieses Ergebnis wurde auch im Immunoblot bestätigt (Abb. D. 17 C). Zudem konnte auf Grund des Laufverhaltens bestätigt werden, dass Cathepsin X im Plasma, ebenso wie zuvor im Überstand von PC-3-Kulturen gezeigt, in seiner Proform vorliegt. Erstaunlicherweise wurde im höhermolekularen Bereich eine Fraktion identifiziert, die unter anderem (Pro)Cathepsin X enthält und eine Molekularmasse von ca. 100 kDa besitzt. Der Nachweis der Protease im Molekulargewichtsbereich um 300 -500 kDa gelang dagegen nicht.

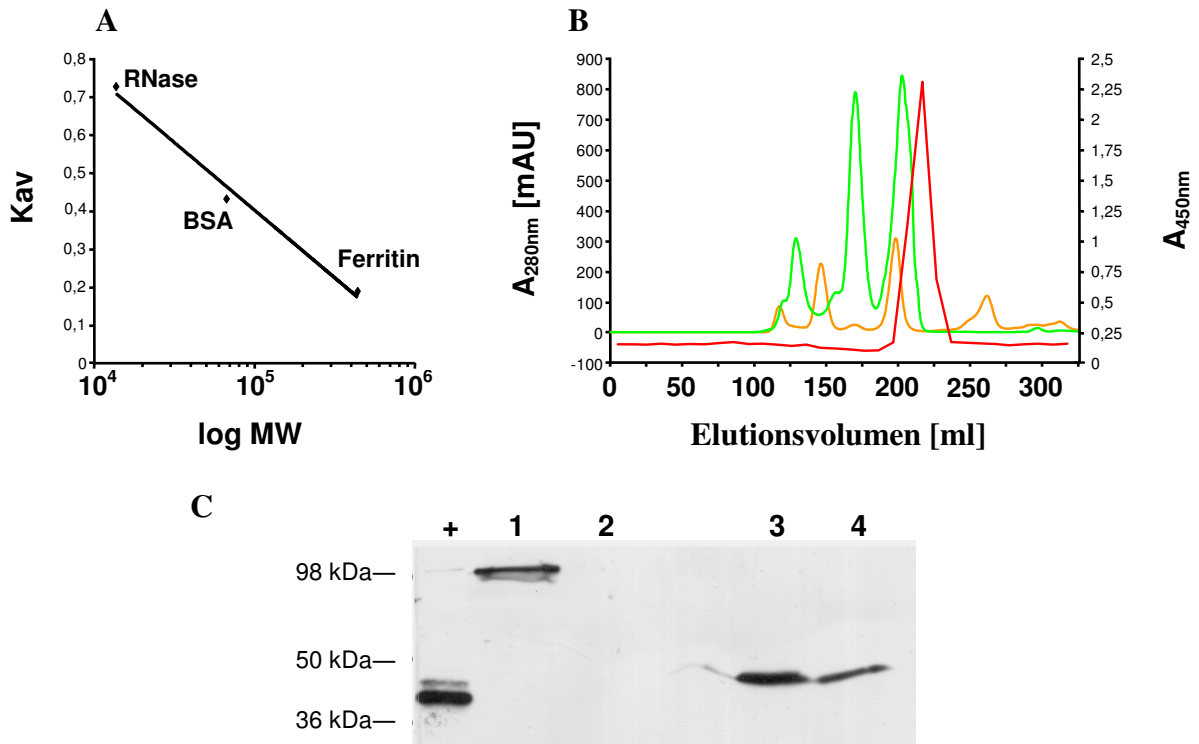


Abbildung D.17 Präparative Gelfiltration von humanem Plasma

- A:** Kalibrierung der HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade Säule mit Ferritin, BSA und RNase A in PBS gelöst. Gleichung der Regressionsgeraden: $y = -0,154 \times \ln(x) + 2,1739$
- B:** Chromatogramm des Standardgemisches (orange) mit Peaks für Ferritin (145 ml), BSA (197 ml) und RNase A (260 ml); des Plasmas (grün) sowie der Extinktion der gesammelten Fraktionen im ELISA für (Pro)Cathepsin X (rot).
- C:** Westernblot-Fraktionen nach Gelfiltration 20 (190-200 ml; Spur 1), 21 (201-210 ml; Spur 2) 22 (211-220 ml; Spur 3), 23 (221-230ml; Spur 4) zur Detektion von (Pro)Cathepsin X. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat aus HUVEC-Zellen eingesetzt.

D.3.5 Versuch der Identifizierung einer höhermolekularen (Pro)Cathepsin X-Form im Plasma

Die bereits beschriebene höhermolekulare (Pro)Cathepsin X-Form (ca. 100 kDa, Abb. D.17 C) sollte nun mittels N-terminaler Sequenzierung identifiziert werden. Zudem sollten Serpine als mögliche Bindungspartner für (Pro)Cathepsin X untersucht werden.

D.3.5.1 N-terminale Sequenzierung der 100 kDa-Bande aus den Affinitätschromatographie- und Gelfiltrationsversuchen

Für die N-terminale Sequenzierung wurden Fraktionen ausgewählt, die in den entsprechenden Westernblots eine Cathepsin X-reaktive Form mit einer Molekularmasse von ca. 100 kDa aufwiesen (Abb. D.6 B und Abb. D.17 C).

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (12%ig) aufgetrennt, wobei die Fraktion nach Gelfiltration zunächst um den Faktor 10 konzentriert wurde. Nach der Elektrophorese wurde das

Gel auf eine PVDF-Membran geblottet, mittels Coomassie gefärbt (Abb. D.18) und die mit dem Pfeil markierten Banden N-terminal sequenziert (R. Mentele, AG Prof. Lottspeich, Max-Plank-Institut, Martinsried). Das Ergebnis dieser Sequenzierung war in beiden Fällen Plasminogen, welches im Plasma bekanntermaßen in hoher Konzentration vorliegt und möglicherweise die Identifizierung eines Proteins der gleichen Molekularmasse verhindert hat.

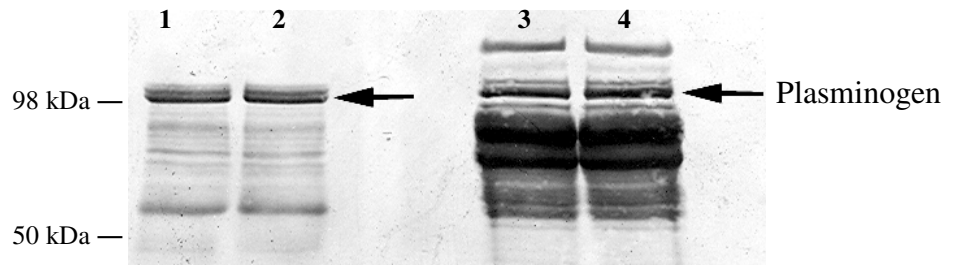


Abbildung D.18 Coomassie-gefärbte PVDF-Membran zur N-terminalen Sequenzierung der 100 kDa-Bande
Je 35 µl der entsprechenden Fraktionen wurden in zwei Geltaschen pipettiert, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die 100 kDa-Bande wurde ausgeschnitten und die Proteine durch N-terminale Sequenzierung identifiziert.

1,2: Fraktionen nach Affinitätschromatographie

3,4: Fraktionen nach Gelfiltration

D.3.5.2. Serpine als mögliche Bindungspartner von Cathepsin X

Die hochmolekulare (100 kDa) Form des Cathepsin X erwies sich als SDS-stabil. Es war daher naheliegend, nach Proteinen im Plasma zu suchen, die SDS-stabile Komplexe bilden können. Als aussichtsreichste Kandidaten erschienen die Serpine, eine Familie von Protease-inhibitoren. Aus der Familie dieser Inhibitoren wurden jene ausgewählt, welche in hoher Konzentration im Plasma vorliegen: Antithrombin III (58 kDa), α_1 -Antitrypsin (45 – 61 kDa) und α_2 -Antiplasmin (70 kDa).

In diesem Versuch wurde affinitätschromatographisch angereichertes Plasma (Anti-Procathepsin X-Affinitätschromatographie) im Immunoblot auf das Vorhandensein von Antithrombin III (AT III), α_1 -Antitrypsin (α_1 -PI) und α_2 -Antiplasmin getestet. Hierzu wurde die gleiche Fraktion eingesetzt, die bereits durch N-terminale Sequenzierung charakterisiert worden war (vgl. Kap D.3.5.1). Die entsprechenden Immunoblots sind in Abb. D19 dargestellt. Während bei AT III und α_2 -Antiplasmin nur eine der bekannten Molekularmasse entsprechende Form detektiert wurde, ließ sich für α_1 -Antitrypsin neben der erwarteten Bande bei ca. 55 kDa eine zweite Bande bei ca. 100 kDa nachweisen. Ob diese Bande tatsächlich einem Procathepsin X- α_1 -PI-Komplex entspricht, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

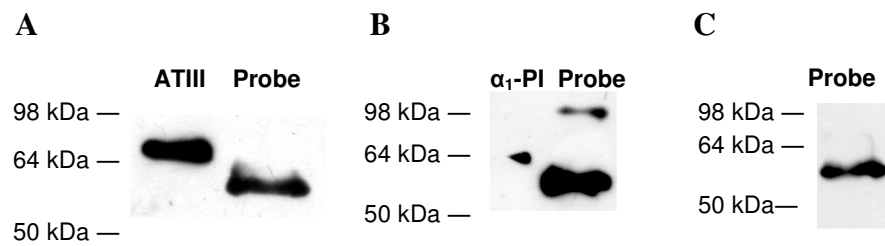


Abbildung D.19 Immunoblot zur Detektion von Serpinen aus humanem Plasma nach Affinitätschromatographie

Als Probe wurde affinitätschromatographisch (Kap. D.1.4.1) angereichertes Plasma eingesetzt

A: Immunoblot zur Detektion von AT III. AT III: 1 μ g rekombinantes Antithrombin III

B: Immunoblot zur Detektion von α_1 -Antitrypsin. α_1 -PI: 1 μ g rekombinantes α_1 -Antitrypsin

C: Immunoblot zur Detektion von α_2 -Antiplasmin im angereichten Plasma

E Diskussion

Cathepsine als Vertreter der Cysteinproteasen sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Vorgängen beteiligt. Hierzu gehören Zellmigration und Gewebedestruktion, insbesondere der Abbau der extrazellulären Matrix. Vor allem Cathepsin B gilt durch seine extrazelluläre Funktion als wichtiger Faktor für die Tumordinvasion und –metastasierung. Neuere Erkenntnisse lassen jedoch darauf schließen, dass auch Cathepsin X an diesen Prozessen beteiligt ist (SEVENICH et al., 2010). Eine Hochregulation dieser Protease konnte unter anderem beim Prostatakarzinom nachgewiesen werden (NÄGLER et al., 2004). Da Hormone und Komponenten der extrazellulären Matrix als wichtige Einflussgrößen in der Pathogenese von Neoplasien gelten, sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation ihr Einfluss auf die Überexpression von Cathepsin X untersucht werden.

E.1 Regulation von Expression und Sekretion von Cathepsin X in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP

Um den Einfluss von Dihydrotestosteron und Proteinen der extrazellulären Matrix auf die Regulation der Expression und Sekretion von Cathepsin X beim Prostatakarzinom zu untersuchen, wurden Versuche an LNCaP-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit den entsprechenden Proteinen ko-kultiviert und im Anschluss auf mögliche Änderungen der intra- und extrazellulären (Pro)Cathepsin X-Konzentrationen analysiert.

Dabei musste zunächst die DHT-Konzentration mit dem größten Effekt auf die Zelllinie LNCaP ermittelt werden. Als Parameter wurde die Zellteilungsrate unter Einfluss des Hormons herangezogen. Ein signifikanter Proliferationsunterschied zeigte sich beim Einsatz von 100 nM DHT. Dies deckt sich zum Teil mit Daten aus der Literatur (ARNOLD et al., 2005), während andere Arbeitsgruppen schon mit geringeren DHT-Konzentrationen deutliche Proliferationssteigerungen beobachteten (NUNLIST et al., 2004). Allerdings hat die Stimulation von LNCaP-Zellen mit DHT keinen Einfluss auf die intra- und extrazelluläre Cathepsin X-Konzentration. Anders verhält es sich bei weiteren Vertretern der Cathepsine. So führt eine Kastration und das damit verbundene Ausschalten von Testosteron und seinen Derivaten zu einer verminderten Konzentration an Cathepsin D im Nebenhoden von Ratten (CARVELLI et al., 2010). Eine erhöhte Zufuhr von DHT ist in Osteoklasten mit einer Abnahme der Cathepsin B-Konzentration vergesellschaftet (PEDERSON et al., 1999).

Der Einfluss des EZM-Proteins Vitronektin führt bei einer Reihe von unterschiedlichen Zelllinien (THP-1, HeLa, HEK293, HUVEC) und der nicht-maligne-entarteten Prostatazelllinie PNT1A zu einem signifikanten Anstieg der Cathepsin X-Expression. (LECHNER, 2008). Ebenso ist bekannt, dass dieser Effekt bei der maligne-entarteten Prostatazelllinie LNCaP nicht mehr beobachtet werden kann (LECHNER, 2008). Der Effekt von Vitronektin auf die Cathepsin X-Expression wird durch Bindung des Proteins an den Vitronektinrezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$ vermittelt (LECHNER et al., 2006). Neuere Studien zeigen, dass LNCaP-Zellen im

Vergleich zu anderen Prostatakarzinomzellen den Vitronektinrezeptor kaum exprimieren (TAYLOR et al., 2011). Dies könnte den fehlenden Effekt von Vitronektin auf diese Zelllinie erklären. Unklar war bisher, ob andere Vertreter der EZM-Proteine in LNCaP-Zellen die Expression von Cathepsin X beeinflussen können. Um dies zu untersuchen, wurden Versuche mit den EZM-Proteinen Kollagen I, Kollagen IV, Laminin, Osteopontin und Fibronektin durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Steigerungen der (Pro)Cathepsin-Konzentrationen intra- wie extrazellulär festgestellt werden. Stimulation mit löslichem Fibronektin führte dagegen zu einem signifikanten Abfall der extrazellulären (Pro)Cathepsin X-Konzentration und die Kultivierung von LNCaP auf Kulturplatten, die mit Laminin und Kollagen I beschichtet waren, führten zu einem signifikanten Abfall der intrazellulären Konzentration der Cysteinprotease.

Da weder DHT noch die obengenannten EZM-Proteine in der Lage sind die (Pro)Cathepsin X-Expression und Sekretion in LNCaP-Zellen zu steigern, liegt die Vermutung nahe, dass diese Zellen die Cysteinprotease bereits am oberen Limit sezernieren. Der Vorgang der malignen Entartung wird durch Interaktionen des Organepithels mit dem Organstroma gefördert (ARNOLD & ISAACS, 2002; CUNHA et al., 1992; HAYWARD et al., 1998; HAYWARD et al., 1997; ROWLEY, 1998; TUXHORN et al., 2001). Somit könnten die LNCaP-Zellen während der Karzinogenese durch den Einfluss der EZM-Proteine in ihrem Expressionsmuster bereits dauerhaft verändert worden sein, so dass eine weitere Steigerung der Proteinbiosynthese von Cathepsin X durch Stimulation mit extern zugeführten Substanzen wie DHT und EZM-Proteinen nicht mehr möglich ist. Allerdings deuten eigene, nicht gezeigte und nicht repräsentative Daten auf ein ungefähr gleiches Niveau der basalen Expression von Cathepsin X in LNCaP und PNT1A hin, wohingegen zur Bestätigung der oben genannten These ein vielfach höheres Expressionsniveau in LNCaP-Zellen zu erwarten wäre.

Das auffälligste Ergebnis der Versuche mit EZM-Proteinen und LNCaP-Zellen war der deutliche Abfall der extrazellulären (Pro)Cathepsin X-Konzentration nach Stimulation mit gelöstem Fibronektin. Gleichzeitig änderte sich intrazellulär die Proteasen-Konzentration nicht relevant. Dies legt die Vermutung nahe, dass (Pro)Cathepsin X im Zellkulturüberstand eventuell nicht detektiert werden konnte. Von Fibronektin ist bekannt, dass es an eine große Anzahl von Molekülen binden kann. Darunter finden sich Heparin, Kollagen, Fibrin, einige Integrine (POTTS & CAMPBELL, 1996) und Dermatan sulfat (SAITO & MUNAKATA, 2007). Damit ist auch eine Bindung des sezernierten (Pro)Cathepsin X an Fibronektin vorstellbar. Dieser Komplex könnte sich in der Folge der Detektion durch den ELISA entziehen. In den Versuchen mit Fibronektin-beschichteten Zellkulturplatten bleibt ein analoger Abfall des extrazellulär detektierten (Pro)Cathepsin X aus. Eventuell wird durch Adhäsion des EZM-Proteins an die Zellkulturplatte die entsprechende Bindungsstelle blockiert und die Cysteinprotease bleibt weiterhin im Überstand durch den ELISA messbar. Auf das Bindungsverhalten von Cathepsin X wird in Kap. E.3 noch weiter eingegangen.

E.2 Der Einfluss von Cathepsin X auf das Invasionsverhalten von PC-3-Zellen

Um die Bedeutung von (Pro)Cathepsin X auf das Invasionsverhalten von Prostatakarzinomzellen zu untersuchen, wurden Versuche mit PC-3-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinie wurde aus einer Knochenmetastase eines Patienten mit einem kastrations-resistenten Prostatakarzinom isoliert und besitzt ein ausgeprägtes tumorbildendes Verhalten (SOBEL & SADAR, 2005). Ausserdem zeigte sie in eigenen Versuchen eine deutlich höhere Expression von (Pro)Cathepsin X und ein aggressiveres Invasionsverhalten als LNCap-Zellen.

Nachdem in Vorversuchen die optimalen Bedingungen zur Niederregulation von Cathepsin X in den PC-3-Zellen etabliert wurden, konnten die entsprechenden Invasionsassays durchgeführt werden. Dabei zeigte sich neben einem signifikant niedrigeren Invasionsvermögen nach Transfektion mit den Cathepsin X-spezifischen siRNA CathX304 und CathX913, auch eine verminderte Invasivität unter dem Einfluss der *mismatch*-Variante von CathX304. Theoretisch sollte der Austausch eines einzelnen Nukleotids die siRNA unwirksam machen (ELBASHIR et al., 2001). Bei der *mismatch*-CathX304-siRNA wurden sogar 2 Nukleotide gegenüber der Originalsequenz verändert. Unspezifische *non-target*-Effekte sind jedoch ein häufiges Phänomen (JACKSON et al., 2006). So führt die *mismatch*-CathX304-siRNA bei Transfektion von HUVEC-Zellen (Nabelschnur-Endothelzellen) zu einem Anstieg der Invasionsfähigkeit im Vergleich zur *non-silencing*-siRNA (LECHNER, 2008). Die CathX913-siRNA scheint dagegen nicht Cathepsin X-spezifisch zu sein. Transfiziert man humane mesenchymale Stammzellen mit dieser siRNA-Variante, so lassen sich auch Effekte auf andere Cathepsine und eine erhöhte Zelltodrate beobachten (Daten nicht gezeigt).

Auch wenn die *mismatch*-Variante von CathX304 sich nicht als Negativkontrolle eignet und CathX913 nicht Cathepsin X-spezifisch zu sein scheint, zeigten die durchgeführten Invasionsassays mit CathX304 eine signifikant verminderte Invasionsrate der PC-3-Zellen nach Herunterregulation von (Pro)Cathepsin X. Schaltet man die Expression von Cathepsin X-mRNA durch Antisense-Oligonukleotide in Magenkarzinomzellen aus, sinkt deren Invasionsvermögen ebenfalls (KRUEGER et al., 2005). So stellte sich die Frage, auf welchem Mechanismus dieser Effekt beruht. Von einer Vielzahl an Proteasen ist bekannt, dass sie wichtige Rollen in kanzerösen Krankheitsgeschehen spielen (Übersicht in MASON & JOYCE, 2011). Unter anderem, weil sie in der Lage sind, die extrazelluläre Matrix abzubauen. Dies gilt auch für die Cathepsine B, L, S und K (REDDY et al., 1995; SERVEAU-AVESQUE et al., 2006) und möglicherweise Cathepsin H (FROHLICH et al., 2004; TSUSHIMA et al., 1991). Cathepsin B und L wirken dabei indirekt durch Aktivierung des Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA), welches für den Abbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembran verantwortlich ist (GORETZKI et al., 1992). Diese Prozesse wurden auch für das Prostatakarzinom beschrieben (DASS et al., 2008). Im Unterschied zu den genannten Cathepsinen verfügt Cathepsin X über eine reine Monopeptidyl-Carboxypeptidase-Spezifität (NÄGLER et al., 1999), die es ihm lediglich ermöglicht, einzelne Aminosäuren von einem Protein abzuspalten. Somit scheint es unwahrscheinlich, dass der direkte Abbau von EZM bzw. die Aktivierung anderer Proteasen

für die Bedeutung von (Pro)Cathepsin X auf das Invasionsverhalten von PC-3-Zellen eine Rolle spielt. Schaltet man die Cathepsin X-Aktivität durch antikatalytische Antikörper in Mamma-Karzinomzellen aus, zeigen diese ein unverändertes Invasionsverhalten auf Matrigel™ (KOS et al., 2005).

Es müssen also andere Eigenschaften von (Pro)Cathepsin X von entscheidender Bedeutung für die Invasionsfähigkeit der PC-3-Zellen sein. Die Proregion des Enzyms verfügt über ein Zell-Adhäsions-Motiv, das sog. RGD-Motiv. Über diese Aminosäuresequenz ist das Protein in der Lage, an den Vitronektinrezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$ zu binden (LECHNER et al., 2006). Somit wäre eine Art autokrine Stimulation der Tumorzellen durch Bindung der Protease an die Zelloberfläche mit konsekutivem Aktivieren von intrazellulären Signalwegen denkbar. Voraussetzung hierfür wäre, dass Procathepsin X von den Zellen freigesetzt wird und PC-3-Zellen das Integrin $\alpha_v\beta_3$ exprimieren. Das extrazelluläre Vorkommen von Procathepsin X konnte in vorliegender Arbeit sowohl für Zellkulturüberstände als auch für humanes Plasma gezeigt werden, die Expression von Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der PC-3-Zelloberfläche ist bereits seit längerer Zeit bekannt (ZHENG et al., 1999). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Cathepsin X-Defizienz zu einer vermehrten Zellseneszenz führt (KRAUS et al., 2011). Zellen, in denen die Cysteinprotease durch siRNA-Transfektion herunterreguliert wird, zeigen einen Seneszenz-typischen Phenotyp mit vergrößertem Zelldurchmesser, eine Hochregulation von Seneszenz-assoziierten Genen, einen verlangsamten Zellzyklus und ein verlangsamtes Zellwachstum (KRAUS et al., 2011). Dies verdeutlicht noch einmal, dass der invasionsfördernde Effekt von (Pro)Cathepsin X nicht auf seiner proteolytischen Aktivität, sondern auf der Regulation der Tumorzell-Eigenschaften beruht. Diese werden eventuell durch Bindung der Protease an die Zelloberfläche vermittelt, wobei die involvierten Signaltransduktionswege noch identifiziert werden müssen.

E.3 Identifizierung extrazellulärer Bindungspartner von Procathepsin X

Cathepsin X bzw. dessen Pro-Form ist in der Lage, an andere Proteine zu binden. Zum einen bindet Procathepsin X an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ über die in der Proregion lokalisierte RGD-Sequenz (LECHNER et al., 2006). Zum anderen wurde eine Bindung zwischen Cathepsin X und heparin-artigen Glykosaminoglykanen beschrieben (NASCIMENTO et al., 2005). Im Rahmen der Stimulationsversuche von LNCaP-Zellen mit Fibronektin entstand die Hypothese, dass extrazelluläres Cathepsin X an das EZM-Protein bindet. Auch der Nachweis einer extrazellulären hochmolekularen Form der Cysteinprotease legt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um einen Komplex mit anderen Proteinen handelt.

E.3.1. Bindung von Cathepsin X an Fibronectin

Zwar hatte Fibronectin keine nennenswerten Effekte auf die Cathepsin X-Expression in LNCaP-Zellen, jedoch war die extrazelluläre Konzentration der Protease in Anwesenheit des EZM-Proteins deutlich geringer. So entstand die Theorie, dass es zu einer Bindung der beiden Proteine kommt und so der Nachweis von (Pro)Cathepsin X im ELISA nicht mehr gelingt. In den Versuchen mit rekombinantem Procathepsin X und Fibronectin ließ sich die vermutete Interaktion zeigen. Auch die Experimente mit humanem Plasma deuten drauf hin, jedoch waren die Ergebnisse aus den Gelfiltrationen nicht eindeutig.

Postuliert man, dass es tatsächlich eine Bindung zwischen diesen Proteinen gibt, stellt sich zunächst die Frage nach der möglichen Bindungsstelle auf dem Fibronectin-Molekül. Die in den modifizierten Bindungs-ELISAs eingesetzten Fibronectin-Fragmente scheinen als Angriffsstelle für Procathepsin X nicht in Frage zu kommen. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da es sich bei dem EZM-Protein um ein verhältnismäßig großes Molekül handelt und durch die eingesetzten Fragmente nur ein kleiner Teil der Aminosäuresequenz abgedeckt wurde. Von Cathepsin X ist bekannt, dass es auch über elektrostatische Anziehung an hochmolekulare Moleküle wie Heparin binden kann (NASCIMENTO et al., 2005). Somit kann es auch sein, dass es keine definierte Bindungsstelle für die Protease am Fibronectin-Molekül gibt.

Welche Rolle der Interaktion von Procathepsin X und Fibronectin zukommt, ist ebenfalls zu diskutieren. Es wäre denkbar, dass es durch die Bindung zu einer Inhibition der proteolytischen Aktivität des Enzyms kommt. In ersten nicht gezeigten Versuchen führte die Anwesenheit des EZM-Proteins zu keiner Veränderung der Enzymaktivität, so dass oben genannte Hypothese unwahrscheinlich scheint. Eine Reihe von Cathepsinen sind in der Lage, Fibronectin zu verdauen, darunter auch die Cysteinproteasen Cath B (BUCK et al., 1992) und Cath L (YANG et al., 2007). Aufgrund der Monopeptidyl-Carboxypeptidase-Spezifität ist es Cathepsin X jedoch nicht möglich das EZM-Protein zu degradieren. Zwar traten im Rahmen der Affinitätschromatographie mit an Sepharose gekoppeltem Procathepsin X Fibronectinfragmente im Westernblot auf, diese sind jedoch auf die lange Exposition des Moleküls mit saurem pH im Rahmen der Elution zurückzuführen.

Sowohl Fibronectin als auch Cathepsin X sind an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Fibronectin dient unter anderem gramnegativen Bakterien als Angriffspunkt, um am Gewebe zu adhären (MENZIES, 2003) und Cathepsin X weist ein besonders hohes Vorkommen in Zellen der Immunabwehr wie Makrophagen und Monozyten auf (NÄGLER et al., 2006). Somit könnte eine Interaktion der beiden Proteine eine Rolle für die Immunantwort auf bakteriell hervorgerufene Entzündungsreaktionen spielen.

E.3.2 Bindung von Cathepsin X an Serpine

Bei den Experimenten mit humanem Plasma wurden im Immunoblot zur Detektion von Cathepsin X Banden auf der Höhe von ca. 100 kDa nachgewiesen. Eine direkte Identifizierung über N-terminale Sequenzierung war nicht erfolgreich, da die Bande auf der PVDF-Membran von Plasminogen überlagert wurde. Es liegt daher Nahe, dass (Pro)Cathepsin X einen Komplex mit einem anderen Plasmaprotein eingeht. Damit dieser Komplex nach SDS-Gelelektrophorese im Immunoblot sichtbar ist, muss er zusätzlich SDS-stabil sein.

Vertreter der Proteinfamilie der Serpine können SDS-stabile Komplexe mit anderen Proteasen eingehen (HWANG et al., 2005). Obwohl der Begriff „Serpine“ eine alleinige Inhibition von Serinproteasen impliziert (**Ser**in-**Pro**tease-**In**hibitor), konnte gezeigt werden, dass auch Cathepsine (SCHICK et al., 1998) und Caspasen (ANNAND et al., 1999) durch diese Proteine inhibiert werden können. Die meisten Vertreter dieser Proteine weisen ein Molekulargewicht zwischen 40 und 60 kDa auf (OLEY, 2006). Als mögliche Bindungspartner von Procathepsin X wurden in der vorliegenden Arbeit die Serpine Antithrombin III, α_1 -Antitrypsin und α_2 -Antiplasmin ausgewählt, die im Plasma in hoher Konzentration vorliegen. Das Molekulargewicht der zu erwartenden Komplexe lag im Bereich von 80 – 105 kDa, also ungefähr dem Bereich in dem im Westernblot eine hochmolekulare Form von (Pro)Cathepsin X nachweisbar ist.

Von einer Plasmaprobe, die affinitätschromatographisch aufgereinigt wurde (Anti-Procathepsin X-Sepharose), wurde ein Immunoblot zum Nachweis der o.g. Serpine durchgeführt. Die Probe enthielt erstaunlicherweise alle drei Proteaseinhibitoren. Allerdings war α_1 -Antitrypsin zusätzlich zur erwarteten Bande zwischen 50 und 64 kDa auch auf einer Höhe von knapp 100 kDa detektierbar. Der Versuchsaufbau wurde so gewählt, dass in der Probe nur Proteine zu finden sind, welche spezifisch an den gekoppelten Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X binden. Der eingesetzte Antikörper gegen (Pro)Cathepsin X wies bereits in anderen, nicht gezeigten Versuchen, eine Kreuzreaktion mit Fibronectin auf. Weitere Kreuzreaktionen könnten erklären, warum jedes der getesteten Serpine im Immunoblot nachweisbar war. Zudem könnte jedes untersuchte Serpin zunächst an (Pro)Cathepsin X binden, ohne jedoch einen SDS-stabilen Komplex zu bilden und die Interaktion im Verlauf der Detektion gelöst wird.

Bei der 100 kDa-Form des α_1 -Antitrypsins könnte es sich in der Tat um einen Serpintypischen SDS-stabilen Komplex mit Procathepsin X handeln. Bisher konnten nur im Fall von Endopin 2C und Cathepsin L (HIGGINS et al., 2010; HWANG et al., 2005) SDS-stabile Bindungen zwischen Serpinen und Cysteinproteasen nachgewiesen werden. Dabei ist der genaue Mechanismus dieser Interaktion noch unklar. Typischerweise verfügen Serpine über eine sog. exponierte reaktive Schleife (*reactive centre loop*, RCL), die der Zielprotease als Pseudo-substrat angeboten wird und diese so bindet. Da Cathepsin X eine Mono-peptidyl-Carboxypeptidase ist, scheint eine Schleife aus Aminosäuren kein geeignetes Substrat für dieses Enzym zu sein, das lediglich einzelne Aminosäuren vom C-terminalen Ende eines Proteins

abspalten kann. Dies schließt eine Bindung jedoch nicht aus, da insgesamt noch einige Unklarheiten über die Interaktion von Serpinen und Cysteinproteasen in der Literatur bestehen.

Zusammengefasst ist der gleichzeitige Nachweis von Antithrombin III, α_1 -Antitrypsin und α_2 -Antiplasmin und Cathepsin X nach Affinitätschromatographie zur Anreicherung der Cysteinprotease ein erster Hinweis auf mögliche Interaktionen zwischen den Serpinen und Cathepsin X. Der gleichzeitige Nachweis einer Bande auf Höhe von ca. 100 kDa im Westernblot zur Detektion von Cathepsin X und α_1 -Antitrypsin lässt sogar die Möglichkeit eines SDS-stabilen Komplexes der beiden Proteine zu. Ob Cathepsin X im Plasma tatsächlich an Serpine gebunden vorliegt, muss jedoch noch in weiteren Versuchen evaluiert werden.

E.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Erkenntnisse für die Bedeutung der Cysteinprotease Cathepsin X und dessen Proform für das Invasionsverhalten von Prostatakarzinomzellen gewonnen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit der Protease für die Fähigkeit der entarteten Zellen durch die extrazelluläre Matrix zu invadieren, essentiell ist. Da die proteolytische Aktivität des Enzyms hierbei unbedeutend zu sein scheint, müssen andere Prozesse verantwortlich sein. Nachdem in dieser Arbeit zudem gezeigt werden konnte, dass Cathepsin X extrazellulär hauptsächlich in seiner Proform vorliegt, sollte eine mögliche autokrine Stimulation durch Bindung von Procathepsin X an Rezeptoren der Zelloberfläche erwogen werden. Dass eine solche Interaktion möglich ist, wurde schon im Rahmen früherer Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe gezeigt (LECHNER et al., 2006). Nun sollte untersucht werden, ob hierdurch Signaltransduktionswege an- oder abgeschaltet werden, die mit dem Invasionsverhalten der Prostatakarzinomzellen in Verbindung stehen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden einige Vertreter der EZM-Proteine sowie Dihydrotestosteron auf ihren Einfluss für die Expression von (Pro)Cathepsin X untersucht. Keine der eingesetzten Substanzen bewirkte eine signifikante Steigerung der Expression bzw. Sekretion des Enzyms. Eine mögliche Erklärung ist, dass im Rahmen der malignen Entartung die Genexpression soweit angeregt wird, dass eine Steigerung nicht mehr möglich ist. Die Substanzgruppe der Wachstumsfaktoren, die in malignen Geschehen ebenfalls eine wichtige Rolle spielen (YANG et al., 2011), wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Stimulationsversuche mit LNCaP-Zellen und Wachstumsfaktoren wie IGF (*insulin-like growth factor*), TGF (*transforming growth factor*) oder auch Interleukinen könnten Aufschluss darüber geben, ob die (Pro)Cathepsin X-Expression der Zelllinie noch steigerbar ist oder durch die Entartung ein oberes Limit erreicht wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass (Pro)Cathepsin X mit mehreren Plasmaproteinen Interaktionen eingehen kann. Sowohl Fibronektin als auch α_1 -Antitrypsin scheinen in der Lage zu sein, mit der Cysteinprotease eine Bindung einzugehen. Für beide Bindungspartner bleiben nach ersten Ergebnissen noch einige Fragen offen. Im Fall von Fibronektin muss geklärt werden, ob diese Bindung im Plasma tatsächlich eingegangen wird oder ein in-vitro-

Phänomen darstellt. Die bisherigen Versuche dazu blieben in ihrem Ergebnis uneinheitlich. Unklar ist weiterhin, wo die Bindungsstelle für Cathepsin X auf dem Fibronectin-Molekül liegt. Hier konnten bisher nur einzelne Regionen ausgeschlossen werden. Auch die Funktion dieser Bindung muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Erste nicht gezeigte Ergebnisse weisen darauf hin, dass Fibronectin nicht in der Lage ist, die katalytische Aktivität der Protease zu beeinflussen.

Auch für α_1 -Antitrypsin als möglichen Bindungspartner für (Pro)Cathepsin X, müssen noch Details geklärt werden. Nach ersten Hinweisen, die eine SDS-stabile Komplexbildung zwischen den beiden Molekülen vermuten lassen, muss dies weiter verifiziert werden. So könnten mittels Fluoreszenzspektrometrie weitere Hinweise auf eine mögliche Bindung gewonnen werden. Aktivitätsassays von Cathepsin X in Anwesenheit von α_1 -Antitrypsin würden neben dem Nachweis einer Interaktion gleichzeitig auch Aussagen über Funktion und Mechanismus dieser Komplexbildung zulassen.

Cathepsin X beeinflusst die Invasionsfähigkeit von Prostatakarzinomzellen maßgeblich. Dabei spielt seine proteolytische Aktivität keine Rolle. Gleichzeitig ist vor allem die Proform in der Lage an eine Reihe von Molekülen zu binden. Diese Aspekte sollten die Protease auch als Therapieansatz für maligne Erkrankungen interessant machen. Ein selektives Ausschalten der Enzymexpression oder -sekretion könnte das organüberschreitende Wachstum und die Metastasierung eines Malignoms hemmen.

F Literaturverzeichnis

- AMERICAN-CANCER-SOCIETY. (2011). *Cancer Facts & Figures 2011*. American Cancer Society, Atlanta.
- ANNAND, R. R., DAHLEN, J. R., SPRECHER, C. A., DE DREU, P., FOSTER, D. C., MANKOVICH, J. A., TALANIAN, R. V., KISIEL, W. & GIEGEL, D. A. (1999). Caspase-1 (interleukin-1 β -converting enzyme) is inhibited by the human serpin analogue proteinase inhibitor 9. *Biochem J* **342**, 655-665.
- ARNOLD, J. T. & ISAACS, J. T. (2002). Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault. *Endocr Relat Cancer* **9**, 61-73.
- ARNOLD, J. T., LE, H., MCFANN, K. & BLACKMAN, M. R. (2005). Comparative effects of DHEA vs. testosterone, dihydrotestosterone, and estradiol on proliferation and gene expression in human LNCaP prostate cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E573-584.
- ARORA, S. & CHAUHAN, S. S. (2002). Identification and characterization of a novel human cathepsin L splice variant. *Gene* **293**, 123-31.
- BAUE, A. E. (2000). Multiple organ failure--the discrepancy between our scientific knowledge and understanding and the management of our patients. *Langenbecks Arch Surg* **385**, 441-53.
- BERQUIN, I. M., YAN, S., KATIYAR, K., HUANG, L., SLOANE, B. F. & TROEN, B. R. (1999). Differentiating agents regulate cathepsin B gene expression in HL-60 cells. *J Leukoc Biol* **66**, 609-16.
- BLUTT, S. E. & WEIGEL, N. L. (1999). Vitamin D and prostate cancer. *Proc Soc Exp Biol Med* **221**, 89-98.
- BOSSARD, M. J., TOMASZEK, T. A., THOMPSON, S. K., AMEGADZIE, B. Y., HANNING, C. R., JONES, C., KURDYLA, J. T., McNULTY, D. E., DRAKE, F. H., GOWEN, M. & LEVY, M. A. (1996). Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem* **271**, 12517-24.
- BROMME, D., LI, Z., BARNES, M. & MEHLER, E. (1999). Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry* **38**, 2377-85.
- BRUBAKER, K. D., VESSELLA, R. L., TRUE, L. D., THOMAS, R. & COREY, E. (2003). Cathepsin K mRNA and Protein Expression in Prostate Cancer Progression. *J Bone Miner Res* **18**, 222-230.
- 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.
- BUSSARD, K. M., GAY, C. V. & MASTRO, A. M. (2008). The bone microenvironment in metastasis; what is special about bone? *Cancer Metastasis Rev* **27**, 41-55.
- BYLAITE, M., MOUSSALI, H., MARCIUKAITIENE, I., RUZICKA, T. & WALZ, M. (2006). Expression of cathepsin L and its inhibitor hurpin in inflammatory and neoplastic skin diseases. *Exp Dermatol* **15**, 110-8.
- CARVELLI, L. F., BANNOUD, N., AGUILERA, C. A., MORALES, C. R. & SOSA, M. A. (2010). Castration induces changes in the cation-dependent mannose-6-phosphate receptor in rat epididymis: possible implications in secretion of lysosomal enzymes. *J Cell Biochem* **110**, 1101-10.
- CELIS, J. E. (1994). *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press, Toronto.
- CLAPP, R. W., JACOBS, M. M. & LOECHLER, E. L. (2008). Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Environ Health* **23**, 1-37.
- COFFEY, J. W. & DE DUVE, C. (1968). Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes. *J Biol Chem* **243**, 3255-63.
- COLOGNATO, H. & YURCHENCO, P. D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* **218**, 213-34.
- COSTA, A. G., CUSANO, N. E., SILVA, B. C., CREMERS, S. & BILEZIKIAN, J. P. (2011). Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* **7**, 447-56.
- CUNHA, G., BATTLE, E., YOUNG, P., BRODY, J., DONJACOUR, A., HAYASHI, N. & KINBARA, H. (1992). Role of epithelial-mesenchymal interactions in the differentiation and spatial organization of visceral smooth muscle. *Epithelial Cell Biol* **1**, 76 - 83.
- DAMBER, J. E. & AUS, G. (2008). Prostate cancer. *Lancet* **371**, 1710-21.
- DARRIBERE, T. & SCHWARZBAUER, J. E. (2000). Fibronectin matrix composition and organization can regulate cell migration during amphibian development. *Mech Dev* **92**, 239-50.
- DASS, K., AHMAD, A., AZMI, A. S., SARKAR, S. H. & SARKAR, F. H. (2008). Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev* **34**, 122-36.
- DEO, D. D., RAO, A. P., BOSE, S. S., OUHTIT, A., BALIGA, S. B., RAO, S. A., TROCK, B. J., THOUTA, R., RAJ, M. H. & RAO, P. N. (2008). Differential effects of leptin on the invasive potential of androgen-dependent and -independent prostate carcinoma cells. *J Biomed Biotechnol* **2008**, 163902.
- DEUTSCHE-KREBSGESELLSCHAFT. (2002). Leitlinie - PSA-bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik.

- DRAKE, S. L., VARNUM, J., MAYO, K. H., LETOURNEAU, P. C., FURCHT, L. T. & MCCARTHY, J. B. (1993). Structural features of fibronectin synthetic peptide FN-C/H II, responsible for cell adhesion, neurite extension, and heparan sulfate binding. *J Biol Chem* **268**, 15859-15867.
- EATON, N. E., REEVES, G. K., APPLEBY, P. N. & KEY, T. J. (1999). Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* **80**, 930-4.
- ELBASHIR, S. M., MARTINEZ, J., PATKANIEWSKA, A., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* **20**, 6877-88.
- FELSENBERG, D. (2001). [Supporting function of collagen and hydroxyapatite. Structure and function of bone]. *Pharm Unserer Zeit* **30**, 488-94.
- FERNÁNDEZ, P. L., XAVIER, F., NADAL, A., FERNÁNDEZ, E., PEIRÓ, 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.
- FREEDLAND, S. J., WEN, J., WUERSTLE, M., SHAH, A., LAI, D., MOALEJ, B., ATALA, C. & ARONSON, W. J. (2008). Obesity Is a Significant Risk Factor for Prostate Cancer at the Time of Biopsy. *Urology*.
- FROHLICH, E., MOHRLE, M. & KLESSEN, C. (2004). Cathepsins in basal cell carcinomas: activity, immunoreactivity and mRNA staining of cathepsins B, D, H and L. *Arch Dermatol Res* **295**, 411-21.
- GANN, P. H., HENNEKENS, C. H., MA, J., LONGCOPE, C. & STAMPFER, M. J. (1996). Prospective Study of Sex Hormone Levels and Risk of Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst* **88**, 1118-1126.
- GAY, N. J. & WALKER, J. E. (1985). Molecular cloning of a bovine cathepsin. *Biochem J* **225**, 707-12.
- 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.
- GLEASON, D. F. & MELLINGER, G. T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* **111**, 58-64.
- GORETZKI, L., SCHMITT, M., MANN, K., CALVETE, J., CHUCHOŁOWSKI, 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**, 112-118.
- HAMMARSTEN, J. & HOGSTEDT, B. (2005). Hyperinsulinaemia: a prospective risk factor for lethal clinical prostate cancer. *Eur J Cancer* **41**, 2887-95.
- HAYWARD, S., GROSSFELD, G., TLSTY, T. & CUNHA, G. (1998). Genetic and epigenetic influences in prostatic carcinogenesis. *Int J Oncol* **13**, 35 - 47.
- HAYWARD, S., ROSEN, M. & CUNHA, G. (1997). Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br J Urol* **79**, 18 - 26.
- HIGGINS, W. J., FOX, D. M., KOWALSKI, P. S., NIELSEN, J. E. & WORRALL, D. M. (2010). Heparin enhances serpin inhibition of the cysteine protease cathepsin L. *J Biol Chem* **285**, 3722-9.
- HSING, A. W. & DEVESA, S. S. (2001). Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? *Epidemiol Rev* **23**, 3-13.
- HSING, A. W., REICHARDT, J. K. & STANCZYK, F. Z. (2002). Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* **52**, 213-35.
- HSING, A. W., TSAO, L. & DEVESA, S. S. (2000). International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* **85**, 60-7.
- HUGGINS, C. & HODGES, C. V. (1941). Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Res* **1**, 293-297.
- HUGHES, S. J., GLOVER, T. W., ZHU, X. X., KUICK, R., THORAVAL, D., ORRINGER, M. B., BEER, D. G. & HANASH, S. (1998). A novel amplicon at 8p22-23 results in overexpression of cathepsin B in esophageal adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12410-5.
- HWANG, S. R., STOKA, V., TURK, V. & HOOK, V. Y. H. (2005). The Novel Bovine Serpin Endopin 2C Demonstrates Selective Inhibition of the Cysteine Protease Cathepsin L Compared to the Serine Protease Elastase, in Cross-Class Inhibition. *Biochemistry* **44**, 7757-7767.
- HYNES, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-9.
- JACKSON, A. L., BURCHARD, J., LEAKE, D., REYNOLDS, A., SCHELTER, J., GUO, J., JOHNSON, J. M., LIM, L., KARPILOW, J., NICHOLS, K., MARSHALL, W., KHVOROVA, A. & LINSLEY, P. S. (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *Rna* **12**, 1197-205.
- JEDESZKO, C. & SLOANE, B. F. (2004). Cystein cathepsins in human cancer. *Biol Chem* **385**, 1017 - 1027.
- KEFALIDES, N. A. (1966). A collagen of unusual composition and a glycoprotein isolated from canine glomerular basement membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **22**, 26-32.
- KHOSHNOODI, J., PEDCHENKO, V. & HUDSON, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* **71**, 357-70.
- KIEFER, J., ALEXANDER, A. & FARACH-CARSON, M. C. (2004). Type I collagen-mediated changes in gene expression and function of prostate cancer cells. *Cancer Treat Res* **118**, 101-24.

- KJELLMAN, A., AKRE, O., NORMING, U., TORNBLOM, M. & GUSTAFSSON, O. (2008). Dihydrotestosterone levels and survival in screening-detected prostate cancer: a 15-yr follow-up study. *Eur Urol* **53**, 106-11.
- KOS, J., SEKIRNIK, A., PREMZL, A., ZAVASNIK BERGANT, V., LANGERHOLC, T., REPNIK, U., TURK, B., WERLE, B., GOLOUH, R., JERAS, M. & TURK, V. (2005). Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res* **306**, 103-113.
- KRAUS, S., BUNSEN, T., SCHUSTER, S., CICHON, M. A., TACKE, M., REINHECKEL, T., SOMMERHOFF, C. P., JOCHUM, M. & NÄGLER, D. K. (2011). Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation. *Eur J Cell Biol* **90**, 678-86.
- KRUEGER, S., KALINSKI, T., HUNDERTMARK, T., WEX, T., KÜSTER, D., PEITZ, U., EBERT, M., NÄGLER, D.K., KELLNER, U., MALFERTHEINER, P., NAUMANN, M., RÖCKEN, C. & ROESSNER, A. (2005). Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol* **207**, 32-42.
- LECHNER, A. M. (2008). Regulation der Sekretion und Zelloberflächenassoziation von Cathepsin X durch Interaktionen mit dem Integrin $\alpha v \beta 3$ und seinem Liganden Vitronektin, Ludwig-Maximilians-Universität.
- 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 $\{\alpha\}v\beta 3$ Mediates Cell-adhesive Properties. *J Biol Chem* **281**, 39588-39597.
- LILJA, H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* **76**, 1899-903.
- LILJA, H., ULMERT, D. & VICKERS, A. J. (2008). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* **8**, 268-78.
- LIN, L., AGGARWAL, S., GLOVER, T. W., ORRINGER, M. B., HANASH, S. & BEER, D. G. (2000). A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene. *Cancer Res* **60**, 1341-7.
- LÖFFLER, G. & PETRIDES, P. E. (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- LUCIA, M. S., BOSTWICK, D. G., BOSLAND, M., COCKETT, A. T., KNAPP, D. W., LEAV, I., POLLARD, M., RINKER-SCHAEFFER, C., SHIRAI, T. & WATKINS, B. A. (1998). Workgroup I: rodent models of prostate cancer. *Prostate* **36**, 49-55.
- MANNICK, J. A., RODRICK, M. L. & LEDERER, J. A. (2001). The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* **193**, 237-44.
- MASON, S. D. & JOYCE, J. A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol* **21**, 228-37.
- MENZIES, B. E. (2003). The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis* **16**, 225-9.
- MISTRY, T., DIGBY, J. E., DESAI, K. M. & RANDEVA, H. S. (2008). Leptin and adiponectin interact in the regulation of prostate cancer cell growth via modulation of p53 and bcl-2 expression. *BJU Int* **101**, 1317-22.
- MOHAMED, M. M. & SLOANE, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 764-775.
- MOLL, I. (2005). *Duale Reihe - Dermatologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- MORGAN, M., SABA, S. & GOWER, W. (2000). Fibronectin influences cellular proliferation and apoptosis similarly in LNCaP and PC-3 prostate cancer cell lines. *Urol Oncol* **5**, 155-159.
- NAGLE, R. B. (2004). Role of the extracellular matrix in prostate carcinogenesis. *J Cell Biochem* **91**, 36-40.
- NÄGLER, D. K. (2007). Cathepsin X: Identifizierung und Charakterisierung einer neuartigen lysosomalen Cysteinprotease. Habilitation thesis, Ludwig-Maximilians-Universität.
- NÄGLER, D. K., KRÜGER, S., KELLNER, A., ZIOMEK, E., MENARD, R., BUHTZ, P., KRAMS, M., ROESSNER, A. & KELLNER, A. (2004). Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* **60**, 109-119.
- NÄGLER, D. K., LECHNER, A. M., OETLL, A., KOZACZYNSKA, K., SCHEUBER, H.-P., GIPPNER-STEPPERT, C., BOGNER, V., BIBERTHALER, P. & JOCHUM, M. (2006). An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *J Immunol Methods* **308**, 241 - 250.
- NÄGLER, D. K. & 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**, 135-9.
- NÄGLER, D. K., ZHANG, R., TAM, W., SULEA, T., PURISIMA, E. O. & MENARD, R. (1999). Human Cathepsin X: A Cysteine Protease with Unique Carboxypeptidase Activity. *Biochemistry* **38**, 12648-12654.
- NAKAGAWA, T., ROTH, W., WONG, P., NELSON, A., FARR, A., DEUSSING, J., VILLADANGOS, J. A., PLOEGH, H., PETERS, C. & RUDENSKY, A. Y. (1998). Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-3.
- NASCIMENTO, F. D., RIZZI, C. C. A., 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**, 323-332.

- NELSON, C. M. & BISSELL, M. J. (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 287-309.
- NUNLIST, E. H., DOZMOROV, I., TANG, Y., COWAN, R., CENTOLA, M. & LIN, H.-K. (2004). Partitioning of 5 α -dihydrotestosterone and 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol activated pathways for stimulating human prostate cancer LNCaP cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **91**, 157 - 170.
- OLEY, M. (2006). Identifizierung von Zielproteasen für das multifunktionelle Serpin-Gen Spn4. *Dissertation*.
- PANKOV, R. & YAMADA, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* **115**, 3861-3.
- PARSONS, J. K., CARTER, H. B., PLATZ, E. A., WRIGHT, E. J., LANDIS, P. & METTER, E. J. (2005). Serum testosterone and the risk of prostate cancer: potential implications for testosterone therapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 2257-60.
- PEDERSON, L., KREMER, M., JUDD, J., PASCOE, D., SPELSBERG, T. C., RIGGS, B. L. & OURSLER, M. J. (1999). Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 505-10.
- POTTS, J. R. & CAMPBELL, I. D. (1996). Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol* **15**, 313-20; discussion 321.
- RAUCH, F. & GLORIEUX, F. H. (2004). Osteogenesis imperfecta. *Lancet* **363**, 1377-85.
- RAWLINGS, N. D. & BARRETT, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290** (Pt 1), 205-18.
- REDDY, V. Y., ZHANG, Q. & 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 U S A* **92**, 3849-3853.
- REYNOLDS, A., LEAKE, D., BOESE, Q., SCARINGE, S., MARSHALL, W. S. & KHVOROVA, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**, 326-30.
- RIEDE, U.-N., WERNER, M. & SCHÄFER, H.-E. (2004). *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT & KREBSREGISTER, E. (2008). *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch Institut, epidemiologisches Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT & KREBSREGISTER, E. (2010). *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010*. Robert Koch Institut, epidemiologisches Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin.
- RODRIGUES, L. R., TEIXEIRA, J. A., SCHMITT, F. L., PAULSSON, M. & LINDMARK-MANSSON, H. (2007). The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 1087-97.
- 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**, 2075-86.
- ROWLEY, D. (1998). What Might A Stromal Response Mean to Prostate Cancer Progression? . *Cancer Metastasis Rev* **17**, 411 - 419.
- SAITO, A. & MUNAKATA, H. (2007). Analysis of plasma proteins that bind to glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* **1770**, 241-6.
- SANTAMARIA, I., VELASCO, G., PENDAS, A. M., FUEYO, A. & LOPEZ-OTIN, C. (1998). Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* **273**, 16816-23.
- SCHICK, C., PEMBERTON, P. A., SHI, G. P., KAMACHI, Y., CATALTEPE, S., BARTUSKI, A. J., GORNSTEIN, E. R., BRÖMME, D., CHAPMAN, H. A. & SILVERMAN, G. A. (1998). Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* **37**, 5258 - 5266.
- SCHILLING, A. F., MULHAUSEN, C., LEHMANN, W., SANTER, R., SCHINKE, T., RUEGER, J. M. & AMLING, M. (2007). High bone mineral density in pycnodysostotic patients with a novel mutation in the propeptide of cathepsin K. *Osteoporos Int* **18**, 659-69.
- SCHRÖDER, F. H. (2009). PSA screening--a review of recent studies. *Eur J Cancer* **45 Suppl 1**, 402-4.
- SERVEAU-AVESQUE, C., MARTINO, M. L. F.-D., HERVE-GREPINET, V., HAZOUARD, E., GAUTHIER, F., DIOT, E. & LALMANACH, G. (2006). Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol Cell* **98**, 15-22.
- SEVENICH, L., SCHURIGT, U., SACHSE, K., GAJDA, M., WERNER, F., MULLER, 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 U S A* **107**, 2497-502.
- SEVERI, G., MORRIS, H. A., MACINNIS, R. J., ENGLISH, D. R., TILLEY, W., HOPPER, J. L., BOYLE, P. & GILES, G. G. (2006). Circulating steroid hormones and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 86-91.

- 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.
- SINHA, A. A., QUAST, B. J., WILSON, M. J., REDDY, P. K., GLEASON, D. F. & SLOANE, B. F. (1998). Codistribution of procathepsin B and mature cathepsin B forms in human prostate tumors detected by confocal and immunofluorescence microscopy. *Anat Rec* **252**, 281-289.
- SINHA, A. A., WILSON, M. J., REDDY, P. K., GLEASON, D. F., SAMENI, M. & SLOANE, B. F. (1995). Immunohistochemical localization of cathepsin B in neoplastic human prostate. *Prostate* **26**, 171-178.
- SMITH, J. R., FREIJE, D., CARPTEN, J. D., GRONBERG, H., XU, J., ISAACS, S. D., BROWNSTEIN, M. J., BOVA, G. S., GUO, H., BUJNOVSZKY, P., NUSSKERN, D. R., DAMBER, J. E., BERGH, A., EMANUELSSON, M., KALLIONIEMI, O. P., WALKER-DANIELS, J., BAILEY-WILSON, J. E., BEATY, T. H., MEYERS, D. A., WALSH, P. C., COLLINS, F. S., TRENT, J. M. & ISAACS, W. B. (1996). Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**, 1371-4.
- SOBEL, R. E. & SADAR, M. D. (2005). Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 2. *J Urol* **173**, 360-72.
- STATTIN, P., LUMME, S., TENKANEN, L., ALFTHAN, H., JELLUM, E., HALLMANS, G., THORESEN, S., HAKULINEN, T., LUOSTARINEN, T., LEHTINEN, M., DILLNER, J., STENMAN, U. H. & HAKAMA, M. (2004). High levels of circulating testosterone are not associated with increased prostate cancer risk: a pooled prospective study. *Int J Cancer* **108**, 418-24.
- STEUER, T., HELO, P. & LILJA, H. (2007). Circulating biomarkers for prostate cancer. *World J Urol* **25**, 111-9.
- STEWART, D. A., COOPER, C. R. & SIKES, R. A. (2004). Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Reprod Biol Endocrinol* **2**, 2.
- STYPMANN, J., GLASER, K., ROTH, W., TOBIN, D. J., PETERMANN, I., MATTHIAS, R., MONNIG, 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 U S A* **99**, 6234-9.
- SUERBAUM, S. & MICETTI, P. (2002). Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med* **347**, 1175-86.
- SUN, J., LANGE, E. M., ISAACS, S. D., LIU, W., WILEY, K. E., LANGE, L., GRONBERG, H., DUGGAN, D., CARPTEN, J. D., WALSH, P. C., XU, J., CHANG, B. L., ISAACS, W. B. & ZHENG, S. L. (2008). Chromosome 8q24 risk variants in hereditary and non-hereditary prostate cancer patients. *Prostate* **68**, 489-97.
- TAYLOR, R. M., SEVERNS, V., BROWN, D. C., BISOFFI, M. & SILLERUD, L. O. (2011). Prostate cancer targeting motifs: Expression of alpha(v) beta(3), neurotensin receptor 1, prostate specific membrane antigen, and prostate stem cell antigen in human prostate cancer cell lines and xenografts. *Prostate*.
- TEPEL, C., BROMME, D., HERZOG, V. & BRIK, K. (2000). Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci* **113 Pt 24**, 4487-98.
- TOOMES, C., JAMES, J., WOOD, A. J., WU, C. L., MCCORMICK, D., LENCH, N., HEWITT, C., MOYNIHAN, L., ROBERTS, E., WOODS, C. G., MARKHAM, A., WONG, M., WIDMER, R., GHAFAR, K. A., PEMBERTON, M., HUSSEIN, I. R., TEMTAMY, S. A., DAVIES, R., READ, A. P., SLOAN, P., DIXON, M. J. & THAKKER, N. S. (1999). Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat Genet* **23**, 421-4.
- TRAVIS, R. C., KEY, T. J., ALLEN, N. E., APPLEBY, P. N., RODDAM, A. W., RINALDI, S., EGEVAD, L., GANN, P. H., ROHRMANN, S., LINSEISEN, J., PISCHON, T., BOEING, H., JOHNSEN, N. F., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., KIEMENEY, L., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., BINGHAM, S., KHAW, K. T., TUMINO, R., SIERI, S., VINEIS, P., PALLI, D., QUIROS, J. R., ARDANAZ, E., CHIRLAQUE, M. D., LARRANAGA, N., GONZALEZ, C., SANCHEZ, M. J., TRICHOPOULOU, A., BIKOU, C., TRICHOPOULOS, D., STATTIN, P., JENAB, M., FERRARI, P., SLIMANI, N., RIBOLI, E. & KAKS, R. (2007). Serum androgens and prostate cancer among 643 cases and 643 controls in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* **121**, 1331-8.
- TSAI, C. J., COHN, B. A., CIRILLO, P. M., FELDMAN, D., STANCZYK, F. Z. & WHITTEMORE, A. S. (2006). Sex steroid hormones in young manhood and the risk of subsequent prostate cancer: a longitudinal study in African-Americans and Caucasians (United States). *Cancer Causes Control* **17**, 1237-44.
- TSUSHIMA, H., UEKI, A., MATSUOKA, Y., MIHARA, H. & HOPUSU-HAVU, V. K. (1991). Characterization of a cathepsin-H-like enzyme from a human melanoma cell line. *Int J Cancer* **48**, 726-32.
- TUXHORN, J. A., AYALA, G. E. & ROWLEY, D. R. (2001). Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* **166**, 2472-2483.
- TZU, J. & MARINKOVICH, M. P. (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 199-214.
- VALENICK, L. V., HSIA, H. C. & SCHWARZBAUER, J. E. (2005). Fibronectin fragmentation promotes alpha4beta1 integrin-mediated contraction of a fibrin-fibronectin provisional matrix. *Exp Cell Res* **309**, 48-55.
- WAGHRAY, A., KEPPLER, D., SLOANE, B. F., SCHUGER, L. & CHEN, Y. Q. (2002). Analysis of a Truncated Form of Cathepsin H in Human Prostate Tumor Cells. *J Biol Chem* **277**, 11533-11538.
- WAI, P. Y. & KUO, P. C. (2008). Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 103-18.

- WANG, B., SUN, J., KITAMOTO, S., YANG, M., GRUBB, A., CHAPMAN, H. A., KALLURI, R. & SHI, G. P. (2006). Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* **281**, 6020-9.
- WEISS, J. M., HUANG, W. Y., RINALDI, S., FEARS, T. R., CHATTERJEE, N., HSING, A. W., CRAWFORD, E. D., ANDRIOLE, G. L., KAAKS, R. & HAYES, R. B. (2008). Endogenous sex hormones and the risk of prostate cancer: a prospective study. *Int J Cancer* **122**, 2345-50.
- WILLSTÄTTER, R. & BAMANN, E. (1929). Über die Proteasen der Magenschleimhaut. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie* **180**, 127-143.
- WIRÉN, S., STOCKS, T., RINALDI, S., HALLMANS, G., BERGH, A., STENMAN, U.-H., KAAKS, R. & STATTIN, P. (2007). Androgens and prostate cancer risk: A prospective study. *Prostate* **67**, 1230-1237.
- WOODHOUSE, E. C., CHUAQUI, R. F. & LIOTTA, L. A. (1997). General mechanisms of metastasis. *Cancer* **80**, 1529-37.
- YANG, M., ZHANG, Y., PAN, J., SUN, J., LIU, J., LIBBY, P., SUKHOVA, G. K., DORIA, A., KATUNUMA, N., PERONI, O. D., GUERRE-MILLO, M., KAHN, B. B., CLEMENT, K. & SHI, G. P. (2007). Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance. *Nat Cell Biol* **9**, 970-7.
- YANG, S. Y., MIAH, A., PABARI, A. & WINSLET, M. (2011). Growth Factors and their receptors in cancer metastases. *Front Biosci* **16**, 531-8.
- YASUDA, Y., KALETA, J. & BROMME, D. (2005). The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 973-93.
- YEAGER, M., ORR, N., HAYES, R. B., JACOBS, K. B., KRAFT, P., WACHOLDER, S., MINICHELLO, M. J., FEARNHEAD, P., YU, K., CHATTERJEE, N., WANG, Z., WELCH, R., STAATS, B. J., CALLE, E. E., FEIGELSON, H. S., THUN, M. J., RODRIGUEZ, C., ALBANES, D., VIRTAMO, J., WEINSTEIN, S., SCHUMACHER, F. R., GIOVANNUCCI, E., WILLETT, W. C., CANCEL-TASSIN, G., CUSSENOT, O., VALERI, A., ANDRIOLE, G. L., GELMANN, E. P., TUCKER, M., GERHARD, D. S., FRAUMENI, J. F., JR., HOOVER, R., HUNTER, D. J., CHANOCK, S. J. & THOMAS, G. (2007). Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat Genet* **39**, 645-9.
- ZHENG, D.-Q., WOODARD, A. S., FORNARO, M., TALLINI, G. & LANGUINO, L. R. (1999). Prostatic Carcinoma Cell Migration via $\alpha v \beta 3$ Integrin Is Modulated by a Focal Adhesion Kinase Pathway. *Cancer Res* **59**, 1655 - 1664.

G Danksagung

Auch wenn die vorliegende Arbeit ohne das Heranziehen von illegalen Hilfsmitteln entstanden ist, wäre sie ohne die Unterstützung folgender Personen nicht möglich gewesen. Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann, Leiter des Lehrstuhles "Bakteriologie" des Max von Pettenkofer-Institutes, der mir die Möglichkeit gab, am Promotionsstudiengang "Molekulare Medizin" teilzunehmen.

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

Frau PD Dr. Dorit Nägler für die geduldige Betreuung bei den Experimenten und der Erstellung der Promotionsschrift sowie die motivierenden Worte, in den Momenten, als es mal nicht so gut lief.

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

Dr. Carolin Nikolaus für die freundschaftliche Begleitung und den moralischen Beistand.

Annemarie Oettl, Ruza Hell und Lourdes Ruiz-Heinrich für die technische Unterstützung.

Herrn Reinhard Mentele (Max-Planck Institut, Martinsried) für die Proteinsequenzierungen.

Allen Mitarbeitern, Doktoranden und Arbeitsgruppen-Leitern der Abteilung, die dafür gesorgt haben, dass trotz der Arbeit auch der Spaß während der Dissertation nicht zu kurz kam.

Zu guter Letzt danke ich ganz besonders meinen Eltern, ohne deren permanente Unterstützung meine bisherige Karriere nicht möglich gewesen wäre. Nicht vergessen möchte ich meinen Bruder Philipp Fruth, dem ich für die Motivation, nicht aufzugeben, sehr verbunden bin.