

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Stöckle

**Monolayer vs. Sphäroid: Einfluss auf die lokale Progression und Metastasierung
im orthotopen Prostatakarzinom Modell**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2024

vorgelegt von:

Julius Lars Daniel Bastian

geb. am 23.04.1999 in Homburg/Saar

| | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Tag der Promotion: | 10.10.2024 |
| Dekan: | Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Hannig |
| Erstberichterstatterin: | Prof. Dr. med. Kerstin Junker |
| Zweitberichterstatter: | Prof. Dr. med. Henning Madry |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Abbildungsverzeichnis | 8 |
| Tabellenverzeichnis | 10 |
| 1 Zusammenfassung/Summary | 11 |
| 2 Einleitung | 14 |
| 2.1 Das Prostatakarzinom | 14 |
| 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie | 14 |
| 2.1.2 Früherkennung und Diagnostik | 15 |
| 2.1.3 Therapie | 16 |
| 2.2 Limitationen der Diagnostik und Therapie | 20 |
| 2.3 In-vitro-Modelle des Prostatakarzinoms und ihre Limitationen | 22 |
| 2.4 Charakteristika der Sphäroidkultur | 23 |
| 2.5 In-vivo-Modelle des Prostatakarzinoms und ihre Limitationen | 25 |
| 2.6 Zielsetzung | 27 |
| 3 Material und Methodik | 28 |
| 3.1 Material | 28 |
| 3.1.1 Zelllinie | 28 |
| 3.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien für Zellkultur und In-vivo-Experimente | 28 |
| 3.1.3 Verbrauchsmaterialien Zellkultur | 28 |
| 3.1.4 Chemikalien | 30 |
| 3.1.5 Reagenzien und Kit für immunhistochemische Charakterisierungen | 30 |
| 3.1.6 Geräte und Programme | 31 |
| 3.1.7 Primärantikörper für Immunhistochemie | 33 |
| 3.1.8 Utensilien und Geräte für In-vivo-Experimente | 35 |
| 3.2 In-vitro-Methodik | 37 |
| 3.2.1 Zellkultur | 37 |
| 3.2.2 Auftauen von Zellen aus Stickstoff | 37 |
| 3.2.3 Medienwechsel | 37 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2.4 | Subkultivieren adhärenter Zellen | 38 |
| 3.2.5 | Kryokonservierung von Zellen in Stickstoff..... | 38 |
| 3.2.6 | Bestimmung der Verdopplungszeit und Anzahl vitaler Zellen | 38 |
| 3.2.7 | Kultivierung von Sphäroiden | 39 |
| 3.2.8 | Medienwechsel von Sphäroiden..... | 39 |
| 3.2.9 | Fotodokumentation..... | 40 |
| 3.2.10 | Ermittlung von Wachstumskurven durch Dissoziation von Sphäroiden..... | 40 |
| 3.2.11 | Fixierung und Einbettung von Sphäroiden in Agarosegel | 40 |
| 3.2.12 | Einbettung von Agarosegelzylinder mit Sphäroiden in Paraffinblöcke | 41 |
| 3.2.13 | Immunhistochemische Charakterisierung | 42 |
| 3.2.14 | Quantitative Analyse der Immunhistochemie | 43 |
| 3.3 | In-vivo-Methodik..... | 44 |
| 3.3.1 | Versuchstiere | 44 |
| 3.3.2 | Orthotope Xenograft Inokulation und Follow-Up..... | 44 |
| 3.3.3 | Sonographie und Blutentnahme | 45 |
| 3.3.4 | PSA-Analysen | 46 |
| 3.3.5 | Computertomographie..... | 46 |
| 3.3.6 | Autopsie..... | 47 |
| 3.3.7 | Anfertigung von Organschnitten | 47 |
| 3.3.8 | Hämatoxylin und Eosin Färbung..... | 48 |
| 3.4 | Statistik | 48 |
| 4 | Ergebnisse | 49 |
| 4.1 | In-vitro-Vorversuche | 49 |
| 4.1.1 | LNCaP Verdopplungszeit..... | 49 |
| 4.1.2 | Wachstums- und Viabilitätsanalysen von LNCaP Sphäroiden | 50 |
| 4.1.3 | Morphologische Veränderungen von LNCaP Sphäroiden | 51 |
| 4.1.4 | Immunhistochemische Charakterisierung von LNCaP Sphäroiden in vitro | 52 |
| 4.1.5 | Integrität von LNCaP Sphäroiden post injectionem..... | 52 |
| 4.2 | In-vivo-Ergebnisse..... | 53 |
| 4.2.1 | Entwicklung von orthotopen Tumoren und Metastasen..... | 53 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.2.2 | PSA-Werte im Verlauf der Tumorprogression..... | 55 |
| 4.2.3 | Sonographische Tumorprogression und CT-graphische Detektion von Metastasen | 56 |
| 4.2.4 | Tumor- und PSA-Verdopplungszeiten | 59 |
| 4.2.5 | Lineare Korrelationsanalyse des Tumorumens und des PSA-Wertes..... | 59 |
| 4.2.6 | Histologie und immunhistochemische Färbung der Primärtumore und Metastasen | 60 |
| 4.2.7 | Immunhistochemische Analysen der Ki-67 und Androgenrezeptor Expression | 65 |
| 5 | Diskussion | 67 |
| 5.1 | Diskussion der In-vitro-Vorversuche..... | 67 |
| 5.2 | Diskussion der In-vivo-Methodik | 74 |
| 5.3 | Diskussion der In-vivo-Ergebnisse | 77 |
| 5.4 | Schlussfolgerung und Ausblick | 82 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 83 |
| 7 | Publikationen..... | 98 |
| 8 | Danksagung..... | 100 |
| 9 | Lebenslauf..... | 101 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| µg | Mikrogramm |
| µl | Microliter |
| 2D | Zweidimensional |
| 3D | Dreidimensional |
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMACR | Alpha-Methylacyl-CoA Racemase |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| AR | Androgenrezeptor |
| AR-V7 | Androgenreceptor splice-variant 7 |
| ASA | American Society of Anesthesiologists |
| BCR-ABL | Breakpoint cluster region- Abelson Murine Leukemia Homolog |
| BRCA-Gen | Breast Cancer gene |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CAFs | Cancer-associated-fibroblasts |
| CK | Cytokeratin |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CT | Computertomographie |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| DRU | Digital-rektal-Untersuchung |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EBRT | External beam radiation therapy |
| ECLIA | Electro- Chemiluminescence Immuno-Assay |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ETS | Erythroblast Transformation Specific |
| EV | Extrazelluläre Vesikel |
| FCS | Fetal calf serum |
| FFPE | Formalin-fixed paraffin-embedded |
| FOXA1 | Forkhead Box A1 |
| g | Gramm |
| GnRH | Gonadotropin-Releasing-Hormon |
| h | Stunde |
| HCl | Hydrochloric acid |

| | |
|----------------------|--|
| HDR | High dose rate |
| IGRT | Image-guided Radiotherapy |
| IHC | Immunhistochemie |
| IQWiG | Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen |
| Konz. | Konzentration |
| LDR | Low dose rate |
| LHRH | Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon |
| Mets. | Metastasen |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mpMRT | Multiparametrische Magnetresonanztomographie |
| MVD | Microvessel-Density |
| NCCN | National Comprehensive Cancer Network |
| ng | Nanogram |
| PARP | Poly (ADP-Ribose)-Polymerase |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCa | Prostatakarzinom |
| PCMWG | Prostate Cancer Model Working Group |
| pH | Potential of Hydrogen |
| PSA | Prostata-spezifisches Antigen |
| PSMA | Prostata-spezifisches Membranantigen |
| PTEN | Phosphatase and Tensin homolog |
| Rankl | Receptor Activator of NF- κ B Ligand |
| RNA | Ribonucleic acid |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| s | Sekunde |
| SCID | Severe combined immunodeficiency |
| SCR | Subcapsular renal |
| SPECT | Single Photon Emission Computed Tomography |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| Ultra-Low-Attachment | ULA |
| VCaP | Vertebral-Cancer of the Prostate |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Aufbau eines Sphäroids. Modifiziert nach Lin, R. Z., & Chang, H. Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnology journal [112] | 25 |
| Abbildung 2: Herstellung eines LNCaP-Sphäroids..... | 39 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Einbettung von Sphäroiden in Agarosegel..... | 41 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Methodik des In-vivo-Experiments..... | 45 |
| Abbildung 5: Verdopplungszeit LNCaP in Monolayer und Sphäroiden unterschiedlicher Größe (**** $\cong p < 0,0001$; ** $\cong p < 0,01$) | 49 |
| Abbildung 6: Anzahl Zellen in LNCaP Sphäroiden..... | 50 |
| Abbildung 7: LNCaP Sphäroid Zellviabilität..... | 51 |
| Abbildung 8: Morphologische Veränderungen von LNCaP Sphäroiden in vitro..... | 51 |
| Abbildung 9: Immunhistochemische Charakterisierung von LNCaP Sphäroiden in vitro. Maßstab = 50 μm | 52 |
| Abbildung 10: Integrität von LNCaP Sphäroiden post injectionem in vitro..... | 52 |
| Abbildung 11: Sequenz der Tumorentwicklung..... | 53 |
| Abbildung 12: Intraoperativer Situs nach intraprostatischer Injektion eines Sphäroids und intraoperativer Situs nach 20 Wochen mit Ausbildung eines Tumors (Tu) nach Sphäroid und Monolayer-Implantation (10-fache Vergrößerung)..... | 54 |
| Abbildung 13: PSA-Anstieg im Verlauf der Tumorprogression..... | 55 |
| Abbildung 14: Individueller PSA-Verlauf der Mäuse..... | 56 |
| Abbildung 15: Sonographisches Tumolvolumen im zeitlichen Verlauf..... | 57 |
| Abbildung 16: Individuelle sonographische Tumorprogression..... | 58 |
| Abbildung 17: Detektion von Primärtumoren und Metastasen. A) Repräsentative Abdomen- und Lungen μCT -Querschnittsbilder [113]. Das Herz ist mit einem Sternchen (*) markiert. Repräsentative 3D Skelett Rekonstruktion. Maßstab= 3 mm. B) Exemplarische sonographische Darstellung eines Monolayer Tumors (50 mm^3) und Sphäroid Tumors (700 mm^3) nach 14 Wochen. Zu erkennen ist zudem die gefüllte Harnblase (Bl)..... | 58 |
| Abbildung 18: Verdopplungszeiten von Primärtumoren und der PSA-Werte in Tagen..... | 59 |
| Abbildung 19: Lineare Korrelationsanalyse des Tumolvolumens und des PSA-Wertes (**** $\cong p < 0,0001$)..... | 59 |
| Abbildung 20: Exemplarische histologische Evaluation (H&E-Färbung) der Sphäroid- und Monolayer-Primärtumore und Metastasen. Tumor- und Metastasen sind mit Pfeilen markiert. Zentrale Nekrosen sind mit einem Sternchen (*) markiert. Maßstab= 200 μm | 60 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 21: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin im Primärtumor eines LNCaP Sphäroids. Maßstab= 200 µm..... | 62 |
| Abbildung 22: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin im Primärtumor einer LNCaP Monolayerkultur. Maßstab= 200 µm..... | 62 |
| Abbildung 23: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin einer Lungenmetastase eines LNCaP Sphäroids. Maßstab= 200 µm..... | 63 |
| Abbildung 24: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin einer Lungenmetastase einer LNCaP Monolayerkultur. Maßstab= 200 µm..... | 63 |
| Abbildung 25: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin einer Lymphknotenmetastase eines LNCaP Sphäroids. Maßstab= 200 µm..... | 64 |
| Abbildung 26: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin einer Lymphknotenmetastase einer LNCaP Monolayerkultur. Maßstab= 200 µm..... | 64 |
| Abbildung 27: Androgenrezeptor Expression in LNCaP-Primärtumoren und Metastasen | 65 |
| Abbildung 28: Ki-67 Expression in LNCaP-Primärtumoren und Metastasen | 66 |
| Abbildung 29: Schematische Darstellung der hypothetischen Rationale für die raschere Tumorprogression und Metastasierung in LNCaP-Sphäroiden gegenüber LNCaP-Monolayern in Bezug zur natürlichen Tumorentwicklung. Modifiziert nach Szade et. al [175]. | 81 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Primärantikörper für die immunhistochemische Charakterisierung von Sphäroiden und von Organpräparaten aus In-vivo-Experimenten | 34 |
| Tabelle 2: Tumorentwicklung und Metastasierung | 53 |

1 Zusammenfassung/Summary

Das Prostatakarzinom zählt weltweit zu den häufigsten malignen Erkrankungen des Mannes. Es manifestiert sich vorwiegend im hohen Lebensalter und ist nach wie vor mit einer hohen Morbidität und Mortalität vergesellschaftet. Die Relevanz dieser Tumorerkrankung wird in Anbetracht des demographischen Wandels stetig zunehmen.

Die diagnostischen und therapeutischen Optionen sind aufgrund des mangelnden Verständnisses der ausgesprochen komplexen und heterogenen Biologie des Prostatakarzinoms limitiert. Bislang sind präklinische Modelle zur Erfassung und Abbildung dieser Tumorbiologie in In-vitro und In-vivo-Systemen rar. In den letzten Jahren sind in der onkologischen Forschung verstärkt dreidimensionale Zellkulturmodelle in den wissenschaftlichen Fokus gerückt. Dreidimensionale Sphäroid-Kulturen sind multizelluläre Tumore, welche einen natürlichen Sauerstoff- und Nährstoffgradienten ausbilden und somit das natürliche Tumormilieu repräsentativer rekapitulieren als konventionelle zweidimensionale Zellkulturmodelle.

Bisher existieren für das Prostatakarzinom keine detaillierten Untersuchungen über die Generierung und Charakterisierung von Sphäroiden aus Monolayer-Zellen in vitro. In-vivo-Xenograft-Modelle in der Prostatakarzinomforschung verwenden überwiegend zweidimensionale Monolayer-Zellen als Ausgangsmaterial. Orthotop sind bislang keine Prostatakarzinomzellen in dreidimensionaler Form implantiert worden. Es existieren also bisher keine Informationen zu potenziellen Effekten der dreidimensionalen Struktur auf das Tumorverhalten nach Implantation im In-vivo-Xenograft-Modell. Folglich war das Ziel dieser Arbeit, zunächst die Etablierung einer zuverlässigen Methode zur Herstellung von dreidimensionalen Prostatakarzinom-Sphäroiden aus LNCaP Monolayer-Zellen und anschließend die Analyse der Proliferation und Viabilität. Daraufhin wurde eine Methodik zur intraprostatatischen Implantation von LNCaP-Sphäroiden etabliert, um schließlich das Tumorwachstum und die Metastasierung von LNCaP-Sphäroiden und LNCaP Monolayer-Zellen im orthotopen Xenograftmodell zu vergleichen. Hierfür wurde das lokale Tumorwachstum mittels hochauflösender dreidimensionaler Kleintier-sonographie und Serum PSA-Bestimmungen über 20 Wochen beobachtet. Die Detektion von Metastasen erfolgte mit Kleintier-Computertomographie und einer abschließenden Autopsie. Die dabei gewonnenen Organpräparate wurden auf die Expression von prostatakarzinomtypischen Markern untersucht.

LNCaP-Zellen bildeten in Ultra-Low-Attachment Rundboden-Platten binnen drei Tagen spontan LNCaP-Sphäroide, welche im Verlauf kondensierten. Die Sphäroide proliferierten kontinuierlich und erreichten eine drei- bis zehnfache Zellzahl nach zehn Tagen. Die höchste Zellviabilität (ca. 70%) war nach sechs Tagen zu verzeichnen. In der Peripherie der Sphäroide waren Zellen stark proliferativ, während zentral Nekrosen zu erkennen waren. Sie zeigten positiv Signale für Ki67, Androgen-

Rezeptor, CK8, alpha-Methyl-CoA-Racemase und E-Cadherin, während CK5 sowie Vimentin negativ waren.

LNCaP-Sphäroide konnten erfolgreich in die Prostata von immundefizienten SCID-Mäusen injiziert werden. Die Entwicklung eines Prostatakarzinoms wurde in 50 % (4/8) der Mäuse nach Sphäroid-Inokulation und 50 % (4/8) der Mäuse nach Implantation einer Einzelzellsuspension beobachtet. Sphäroid-Karzinome bildeten zu 75 % Lungen- und Lymphknotenmetastasen, wohingegen nur jedes zweite Versuchstier nach Injektion einer Einzelzellsuspension aus einer Monolayerkultur Metastasen aufwies. Die Primärtumore von LNCaP-Sphäroiden entwickelten sich deutlich früher und zeigten eine kürzere Tumorverdopplungszeit mit Ausbildung von erheblich größeren Tumolvolumina. Dies spiegelte sich in einer stärkeren immunhistochemischen Expression des Proliferationsmarkes Ki-67 und des Androgenrezeptors wider. Weiterhin korrelierten die Serum PSA-Werte stark mit dem sonographischem Tumolvolumen.

Zusammenfassend ist es gelungen, ein dreidimensionales In-vivo-Sphäroid-Modell des Prostatakarzinoms zu etablieren, welches als Grundstein für die Implementierung von dreidimensionalen In-vivo-Modellen fungiert und die Entwicklung von neuen therapeutischen und diagnostischen Ansätzen anstoßen kann.

Summary

Monolayer versus spheroid: the impact on local progression and metastasis in an orthotopic prostate cancer mouse model

Prostate cancer is one of the most frequent malignant diseases in men worldwide. It predominantly occurs in the elderly and remains linked to a high morbidity and mortality rate. The relevance of prostate cancer will steadily increase in view of the demographic transformation.

Diagnostic and therapeutic options are limited due to the lack of understanding of the distinctly complex and heterogeneous biology of prostate cancer. To date, preclinical models to capture and recapitulate this complex tumor biology are scarce. In recent years, three-dimensional cell culture models have gained increased scientific interest in oncologic research. Three-dimensional spheroid cultures are multicellular tumors that form a natural oxygen and nutrient gradient and thus recapitulate the natural tumor environment more representatively than conventional two-dimensional cell culture models.

As for prostate cancer, detailed studies on the generation and characterization of spheroids from monolayer cells in vitro do not exist. In vivo xenograft models in prostate cancer research overwhelmingly utilize two-dimensional monolayer cells for implantation. Orthotopically, three-dimensional prostate cancer cells have not been implanted to date. Hence, information on potential

effects of the three-dimensional structure on tumor characteristics in in-vivo models do not exist up to this point. Consequently, the objective of this thesis was to first establish a reliable method for generating three-dimensional prostate cancer spheroids from LNCaP monolayer cells and to analyze their proliferation and viability. Subsequently, a methodology for intraprostatic implantation of LNCaP spheroids was established to ultimately compare tumor progression and metastasis of LNCaP spheroids and LNCaP monolayer cells in our orthotopic xenograft model. Herein, local tumor growth was monitored by high-resolution three-dimensional small animal ultrasonography and serum PSA measurements over 20 weeks. Metastases were detected by small animal computed tomography and by terminal autopsy. Retrieved organs were histologically analyzed for the expression of prostate carcinoma typical markers.

LNCaP cells spontaneously formed LNCaP spheroids in ultra-low attachment round-bottom plates within three days and progressively densified. The spheroids proliferated with a three- to tenfold increase in cell number by ten days. Cell viability peaked after six days (about 70%). The spheroids revealed proliferating cells in the periphery and central necrosis. They were positive for Ki67, CK8, androgen receptor, alpha-methyl-CoA racemase, and E-cadherin and negative for CK5 and vimentin.

LNCaP spheroids were successfully injected into the prostates of immunodeficient SCID mice. Prostatic tumor development was observed in 50% (4/8) of mice after spheroid implantation and 50% (4/8) of mice after implantation of a single cell suspension. Spheroid tumors formed lung and lymph node metastases in 75%, whereas only every second experimental animal showed metastases after monolayer cell injection. The primary tumors of LNCaP spheroids noticeably evolved at an earlier stage and exhibited a reduced tumor doubling time whilst developing substantially greater tumor volumes. Indeed, this was reflected in a stronger immunohistochemical expression of the proliferation marker Ki-67 and the androgen receptor in spheroid tumors. Furthermore, serum PSA levels correlated strongly with sonographic tumor volume.

In conclusion, we successfully established a three-dimensional in vivo spheroid model of prostate cancer, which may serve as a landmark for the implementation of three-dimensional orthotopic in vivo models and may stimulate the discovery of new therapeutic and diagnostic approaches.

2 Einleitung

2.1 Das Prostatakarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Prostatakarzinom ist mit 1,4 Millionen Neudiagnosen im Jahr 2020 der weltweit zweithäufigste maligne Tumor und mit 375.000 Todesfällen die fünfthäufigste Krebstodesursache unter Männern [174]. Die altersstandardisierte Inzidenz ist in entwickelten Ländern mit einem hohen Human Development Index über 3-fach höher als in Entwicklungs- und Schwellenländern (37,5 bzw. 11,3 pro 100.000). Die höchsten regionsspezifischen Inzidenzen liegen in Nord- und Westeuropa, in der Karibik, Ozeanien und in Nordamerika und die geringsten in Asien und Nordafrika. Vergleichsweise variiert die Mortalitätsrate weniger, mit den höchsten Raten in der Karibik und Subsahara-Afrika und den niedrigsten in Asien und Nordafrika [174]. Innerhalb Europas divergieren die Inzidenzraten um den Faktor 7 (25 bzw. 193 pro 100.000) zu einem Nord/West- Süd/Ost Gefälle bei invariablen Mortalitätsraten (13 bzw. 36 pro 100.000) [62]. Im europäischen Vergleich liegt die Inzidenz in Deutschland im unteren Drittel [58]. In Deutschland hat das Prostatakarzinom das Lungenkarzinom im Jahre 1998 als häufigste maligne Tumorerkrankung bei Männern abgelöst. 2018 machten 65.200 Prostatakarzinom-Neuerkrankungen mit 24,6% die häufigste Tumorentität und mit 12% die zweithäufigste zum Tode führende Krebserkrankung unter Männern in Deutschland aus [58]. Nach einem leichten Anstieg der Neuerkrankungsrate Anfang der 2000er Jahre mit der Einführung neuer Methoden zur Früherkennung ist die Inzidenz seit 2011 leicht rückläufig und in den letzten Jahren weitgehend konstant bei 99 je 100.000 Männern [58].

Das Alter gilt als wichtigster Risikofaktor für das Auftreten eines Prostatakarzinoms. Das durchschnittliche Erkrankungsalter im Jahr 2018 betrug 72 Jahre [58]. Ein 35-jähriger Mann erkrankt in den nächsten 10 Jahren mit einem Risiko von unter 0,1%, während das Risiko eines 75-jährigen Mannes etwa 6% beträgt [58]. Diese Alterserkrankung stellt das deutsche Gesundheitssystem im Hinblick auf die demographische Entwicklung vor neue Herausforderungen, denn der Anteil der über 60-jährigen wird bis zum Jahre 2060 von nur 27% im Jahre 2015 auf ca. 40% steigen. Zudem wächst das Durchschnittsalter der Bevölkerung um 6 Jahre auf 50 Jahre im Jahre 2060 [140]. Schon 2018 waren beinahe eine halbe Millionen Menschen in Deutschland mit einem bis zu zehn Jahre zurückliegenden Prostatakarzinom diagnostiziert worden [58]. Dieser demografischen Alterung müssen Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Prostatakarzinoms Rechnung tragen [107].

Neben dem Alter als gesichertem Risikofaktor geht eine positive Familienanamnese mit einem über zweifach höheren Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, einher [97]. Zudem werden

weitere mögliche Assoziationen wie sozioökonomische Faktoren, Ernährung und Prostatitis als Risikofaktoren diskutiert [44][81].

2.1.2 Früherkennung und Diagnostik

Die Zielgruppe der Früherkennung des Prostatakarzinoms sind insbesondere asymptomatische Patienten mit einem organbegrenzten, aggressiven Tumor und einer Lebenserwartung von über zehn Jahren. Dieses Konzept entspringt der Tatsache, dass das Prostatakarzinom nur im organbegrenzten Stadium kurativ behandelbar ist und unbehandelt oft einen langsamen Verlauf hat [107]. Eine systematische Früherkennung bedingt auch unvermeidlich ein gewisses Maß an Überdiagnose und Übertherapie von Prostatakarzinomen mit den damit verbundenen Nebenwirkungen [159].

Das gesetzliche Früherkennungsangebot in Deutschland beinhaltet die Anamnese, die Untersuchung der äußeren Geschlechtsorgane und der Lymphknoten sowie die digital-rektale Tastuntersuchung der Prostata für Männer ab 45 Jahren, bei positiver Familienanamnese ab 40 Jahren [20]. Hingegen wird der PSA-Test als Früherkennungsmethode ausschließlich als individuelle Gesundheitsleistung angeboten [180]. Dies begründet das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) damit, dass das Prostatakarzinomscreening mittels PSA-Test keinen Anhaltspunkt für einen Nutzen oder Schaden bezüglich des Gesamtüberlebens bietet und die Nachteile die Vorteile eines PSA-Screenings überwiegen [70]. Die Deutsche Gesellschaft für Urologie hat in einem Positionspapier entgegengehalten, dass vom PSA-Screening ein klarer Nutzen ausgeht, insbesondere in Hinblick auf die Reduktion der prostatakarzinomspezifischen Mortalität, der Metastasenentwicklung und die Verhinderung von nebenwirkungsträchtigen Systemtherapien [181]. Zweifelsohne sollte der Patient durch eine ausführliche Aufklärung befähigt werden, selbst zu entscheiden, inwieweit eine Früherkennung erwünscht ist.

Bei Vorliegen eines erhöhten PSA-Wertes gilt es, diesen zunächst mindestens einmalig zu kontrollieren, ehe eine weitere Diagnostik veranlasst wird. Besteht im Rahmen der Früherkennung der Verdacht auf ein Prostatakarzinom, beispielsweise durch eine karzinomsuspekte digital-rektale Untersuchung, einen auffälligen PSA-Anstieg oder einen im Verhältnis zu Patientenalter und Prostatavolumen zu hohen absoluten PSA-Wert, so wird eine Prostatastanziopsie empfohlen [16][21]. Hierbei wird die Prostata transrektal-sonographisch gesteuert systematisch oder bei Vorliegen einer multiparametrischen MRT (mpMRT) gezielt biopsiert. Bei einer systematischen Biopsie sollten zehn bis zwölf Gewebezylinder entnommen werden [107]. Die Kombination einer gezielten mpMRT gestützten Biopsie mit einer systematischen perinealen Biopsie erreicht bislang die höchste Sensitivität [4].

Bei bestätigter Diagnose ist für die weitere Therapieplanung die Bestimmung der lokalen Tumorausbreitung und des Metastasierungs- und Rezidivrisikos entscheidend. Die Beurteilung der lokalen Tumordinfiltration gelingt vorrangig anhand der DRU und der pathomorphologischen Befunde

der Biopsie [107] unter Berücksichtigung der bildgebenden Diagnostik, insbesondere des mpMRTs [17]. Die Feststellung des Rezidivrisikos erfolgt aus den Ergebnissen der PSA-Messung und dem Gleason Score anhand der D'Amico Klassifikation für lokal begrenzte Tumore oder etablierter Nomogramme [31][37][69]. Für Hochrisiko-Prostatakarzinome wird das Primärstaging mit weiteren Untersuchungen ergänzt. So sollten Tumorpatienten mit einem Gleason Score ≥ 8 oder einem PSA-Wert ≥ 10 ng/ml oder einem cT3/4 Befund oder Knochenschmerzen ergänzend zum CT oder MRT eine Skelettszintigraphie erhalten [2][107]. Supplementär erhöht eine kombinierte SPECT bzw. SPECT/CT die Sensitivität und Spezifität der Knochenszintigraphie [60].

Aktuelle Ergebnisse der proPSMA Studie von Hofmann et. al führten zu einer Neubewertung der bisherigen Empfehlungen zur bildgebenden Diagnostik im Rahmen des Stagings. Die Studie ergab eine höhere Präzision der Detektion von Metastasen von 97% bei initialer Bildgebung mittels Ga-68-PSMA-11 PET/CT gegenüber 75% in der Kontrollgruppe, welche konventionell ein CT mit einer Knochenszintigraphie erhielt [85]. Darüber hinaus offenbarte das PSMA-PET/CT eine höhere Spezifität und Sensitivität (98% bzw. 85% gegenüber 91% bzw. 38%). Die neueste deutsche S3-Leitlinie sieht, aufgrund der nicht belastbaren Datenlage zu Langzeitergebnissen, eine „Kann“- Empfehlung bezüglich der Durchführung des PSMA-PET/CT zum Staging bei high-risk Prostatakarzinomen vor [107].

2.1.3 Therapie

Wenige Tumorentitäten sind in ihrer klinischen Ausprägung und ihrem klinischen Verlauf derart heterogen wie das Prostatakarzinom. Diese Heterogenität reicht von hochaggressiven frühzeitig metastasierenden, über lokal langsam wachsende Karzinome, bis hin zu zunächst insignifikanten Tumoren, welche sich im Verlauf zu Hoch-Risiko-Prostatakarzinomen transformieren. Entsprechend facettenreich und komplex gestaltet sich die Therapie.

Wie bereits erläutert, richtet sich die Therapieplanung in erster Linie nach dem Tumorstadium und dem Metastasierungs- und Rezidivrisiko. Diese Befunde müssen ganzheitlich unter Einbeziehung des Alters des Patienten, dessen Komorbiditäten und der damit verbundenen Lebenserwartung interpretiert werden. Nichtsdestotrotz ist die Patientenpräferenz bei der Wahl der Therapie vordergründig.

Prinzipiell wird zwischen dem metastasierten oder rezidierten und nicht metastasierten Prostatakarzinom differenziert. Zudem wird im nicht metastasierten Stadium das lokal begrenzte vom lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom unterschieden. Die Metastasierung des Prostatakarzinoms ist von großer Relevanz, da in der Regel nur nicht metastasierte Prostatakarzinome kurativ behandelt werden können.

Für die Therapie des nicht metastasierten Prostatakarzinoms kann in kurativer Intention eine radikale Prostatektomie, eine extrakorporale Strahlentherapie (external beam radiation therapy, EBRT) oder eine LDR (low dose rate) Brachytherapie angeboten werden. Die radikale Prostatektomie beinhaltet

die vollständige Entfernung der Prostata, der Samenbläschen, der Endstücke der Samenleiter und ggf. eine pelvine Lymphadenektomie. Hierbei kommt zum einen ein offener retropubischer, zum anderen ein laparoskopischer Zugangsweg in Betracht. Die laparoskopischen Eingriffe werden zunehmend roboterassistiert durchgeführt, wodurch nicht nur der intraoperative Blutverlust verringert, sondern auch die Liegedauer verkürzt und der Schmerzmittelbedarf reduziert wird [132].

Ziel der Operation ist, neben der in toto Resektion der Prostata, die Erhaltung der Harnkontinenz und bei tumorchirurgisch geeigneten Patienten die Bewahrung der erektilen Funktion. Eine potenterhaltende Prostatektomie setzt eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Resektion der Prostata mit tumorfreien Resektionsrändern voraus. Laut EAU- Leitlinie ist ein hohes Risiko für extrakapsuläres Wachstum, beispielsweise bei einem Gleason-Score ≥ 7 oder einem \geq cT2c Karzinom, eine klare Kontraindikation für eine nerverhaltende Operation, da in einem solchen Fall durch ein nerverhaltendes Vorgehen die Wahrscheinlichkeit für eine R1-Resektion signifikant steigen würde [52].

Eine pelvine Lymphadenektomie im Rahmen der radikalen Prostatektomie bietet die beste Methode des Lymphknotenstagings, jedoch konnten ein prognostischer Vorteil der pelvinen Lymphadenektomie bisher nicht bewiesen werden.

Alternativ zur radikalen Prostatektomie ist die perkutane Strahlentherapie eine weitere kurative Therapieoption für lokale Prostatakarzinome. Hierbei wird eine Kombination aus bildgeführter Strahlentherapie (IGRT) und Intensitäts-modulierter Strahlentherapie (IMRT) angewendet. Durch die Kombination beider Techniken reduziert sich die Strahlendosis an Risikoorganen erheblich [83]. Beim lokal begrenzten Prostatakarzinom des mittleren und hohen Risikos wird die perkutane Strahlentherapie mit einer Hormontherapie für 6 Monate (mittleres Risiko) bzw. 2-3 Jahre (hohes Risiko) kombiniert [38][89].

Darüber hinaus ist eine kurative Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms mittels Brachytherapie möglich. Mithilfe von transperineal implantierten Jod-125 bzw. Palladium-103-Seeds kann die radioaktive Strahlung im Rahmen einer Low-Dose-Rate-Brachytherapie (LDR-Brachytherapie) das Prostatakarzinom des niedrigen Risikoprofils destruieren. Vorteile der LDR-Brachytherapie gegenüber den anderen Therapiemethoden des lokalisierte niedrig-Risiko Prostatakarzinoms zeigten sich hinsichtlich der Nebenwirkungen und der Lebensqualität [68]. Für Mittel- und Hochrisiko-Prostatakarzinome gilt die High-Dose-Rate-Brachytherapie (HDR-Brachytherapie) in Kombination mit einer perkutanen Strahlentherapie als weitere Therapieoption, welche jedoch nur in entsprechenden Zentren und sehr selten durchgeführt wird [43].

Doch nicht für jeden Patienten kommt eine aktive Therapie in Frage. Einige Patienten können aufgrund ihrer Komorbiditäten und des Alters nicht aktiv behandelt werden, andere Patienten entscheiden sich bewusst gegen eine Therapie. Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom von niedrigem Risikoprofil können über eine aktive Überwachung der Erkrankung als Alternative zu einer lokal-kurativen Therapie informiert werden. Die Strategie der Aktiven Überwachung setzt einen

PSA-Wert ≤ 10 ng/ml, einen Gleason-Score ≤ 6 , ein Tumorstadium cT1 oder cT2a sowie weniger als drei positive Stenzen in der Biopsie voraus [105][107]. Dabei sind PSA-Kontrollen, die DRU, das mpMRT und regelmäßige Kontrollbiopsien probate Instrumente, um den Verlauf der Erkrankungen in definierten Intervallen zu observieren. Im Falle der Überschreitung der Einschlusskriterien oder einer Verkürzung der PSA-Verdopplungszeit auf unter drei Jahre, wird eine Therapie in kurativer Absicht als sinnvoll erachtet [106][107].

Überdies bestehen fokale Therapiemöglichkeiten, um beim lokal begrenzten Prostatakarzinom minimalinvasiv lediglich die Karzinomherde der Prostata Drüse zu zerstören. Die Teildrüsentherapie steht der häufigen Multifokalität und Heterogenität des Prostatakarzinoms entgegen, weshalb hierbei eine engmaschige Kontrolle und genaue Diagnostik der Karzinomherde vorausgesetzt wird [107]. Aufgrund des niedrigen Nebenwirkungsprofils sind fokale Therapien, wie die vaskulär-gezielte photodynamische Therapie, bei Patienten sehr gefragt, jedoch ist die Datenlage bezüglich einer langfristigen onkologischen Effektivität mangelhaft, weshalb die Indikationsstellung auf Niedrig-Risiko Karzinome beschränkt ist [107].

Im Falle einer metastasierten Erkrankung ist das primäre Behandlungsziel, das Fortschreiten der Erkrankung unter Erhaltung der Lebensqualität zu verzögern, da eine kurative Therapie ausgeschlossen ist. Im metastasierten Stadium sind alleinige lokale Therapien unzureichend, weswegen systemische Therapien erforderlich werden. Dabei kommen als systemische Therapien eine Chemotherapie oder hormonablative Verfahren, ggf. in Kombination mit einer perkutanen Bestrahlung, zum Einsatz. Zu den hormonablativen Verfahren gehören die Orchiektomie und die chemische Androgendeprivation. Die chemische Androgendeprivation gelingt mithilfe von LHRH-Analoga, z.B. Goserelin und Leuprorelin oder mit den LHRH-Antagonisten wie Degarelix und Relugolix. Darüber hinaus kann eine Antagonisierung des Testosteronrezeptors mittels des Antiandrogens Bicalutamid erreicht werden.

Im metastasierten, kastrationssensitiven Stadium wird zusätzlich zur Androgendeprivation mittels LHRH-Analoga oder -Antagonisten das Chemotherapeutikum Docetaxel kombiniert, um ein verbessertes Gesamtüberleben zu erreichen [32]. Alternativ kann zusätzlich zur Androgendeprivation eine Hormontherapie mit einem Hormonpräparat der neuen Generation angeboten werden, wie Abirateron, Enzalutamid oder Apalutamid [107]. Grundlage für diese Empfehlungen sind die Ergebnisse aus den STAMPEDE, LATITUDE, ARCHES und TITAN- Studien [9][26][64][95]. Neueste Studiendaten deuten darauf hin, dass die Systemtherapie bei Patienten mit metastasiertem kastrationssensitivem Prostatakarzinom sogar weiter hin zu einer Triple-Therapie intensiviert werden sollte, um ein möglichst langes Gesamtüberleben bei guter Verträglichkeit zu erreichen [167]. Diese Triple-Therapie besteht aus einer Kombination von LHRH-Analoga oder -Antagonisten, dem Chemotherapeutikum Docetaxel und dem Androgenrezeptor-Antagonisten Darolutamid und hat sich

aktuell zum neuen Standard in der Therapie des metastasierten, kastrationssensitiven Prostatakarzinoms entwickelt.

Im Verlauf der Hormontherapie kann trotz niedriger Testosteronwerte das Prostatakarzinom fortschreiten. In diesem Stadium spricht man vom kastrationsresistenten Prostatakarzinom. In dieser Situation können neue antihormonelle Substanzen zum Einsatz kommen, wie beispielsweise die Testosteronrezeptor-Hemmer Apalutamid, Enzalutamid und Darolutamid. Eine weitere neue antihormonelle Substanz ist Abirateron, welches die Testosteronproduktion durch die Inhibition des Enzyms CYP17A1 hemmt.

An dieser Stelle sei die erhebliche Relevanz der einhergehenden Nebenwirkungen der Androgendeprivation erwähnt, die den Patienten zwar belasten können aber nur vergleichsweise selten zu einer Umstellung oder Abbruch der Therapie zwingen. Dazu gehören die erektile Dysfunktion, Libidoverlust, Gynäkomastie, Verlust an Knochendichte, Depressionen und Hitzewallungen [192].

Ansonsten kann im metastasierten kastrationsresistenten Stadium, neben den antihormonellen Medikamenten der neuen Generation, eine Chemotherapie mit Docetaxel in Kombination mit Prednison einen Überlebensvorteil bieten [177]. Bei Progress nach einer Docetaxel-Chemotherapie kann auch Cabazitaxel zum Einsatz kommen (TROPIC und CARD Studie) [41][42].

De Bono et. al zeigten für Patienten, die unter einer Therapie mit neuen antihormonellen Medikamenten einen Progress erlitten, dass eine Therapie mit dem PARP-Inhibitor Olaparib, bei Vorhandensein von Alterationen im *BRCA 1/2*- Gen im metastasierten kastrationsresistenten Stadium, das progressionsfreie Überleben und die mediane Gesamtüberlebenszeit signifikant verbesserte [40]. Auf Grundlage neuester Studien wird auch die Kombination von PARP-Inhibitoren mit antiandrogenen Substanzen der neuen Generation (z.B. Olaparib + Abirateron, Talazoparib + Enzalutamid) ein neuer Standard in der Therapie des metastasierten, kastrationsresistenten Prostatakarzinoms werden (PROPEL und TALAPRO2 Studie) [3][28].

Letztlich kann nach Ausschöpfung aller Therapieoptionen im metastasierten kastrationsresistenten Stadium nach Beschluss einer interdisziplinären Tumorkonferenz auch eine Radionuklidtherapie mit ¹⁷⁷-Lutetium-PSMA-Liganden angeboten werden [149]. Es handelt sich hierbei um einen β -Strahler, der an einen Liganden des prostata-spezifischen Membran Antigens (PSMA) gekoppelt ist, welches auf der Oberfläche von Prostatakarzinomzellen überexprimiert wird. Aktuelle wissenschaftliche Entwicklungen deuten darauf hin, dass die effektive und gut verträgliche PSMA-Ligandentherapie in den nächsten Jahren auch deutlich früher im Therapiealgorithmus des metastasierten Prostatakarzinoms eingesetzt werden wird.

Eine wichtige Säule der palliativen Therapie ist die Behandlung von durch Metastasen verursachten Schmerzen. Am häufigsten metastasiert das Prostatakarzinom in den Knochen, weshalb vielfach Knochenschmerzen die Erstmanifestation des Karzinoms darstellen. Typische Prädilektionsstellen sind die Wirbelsäule, das Becken und der Brustkorb [51]. Symptomatische ossäre Metastasen werden

insbesondere schmerztherapeutisch behandelt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer lokalen Bestrahlung der Metastasen, einer operativen Stabilisierung der pathologischen Fraktur sowie bei hormonnaiven Patienten die Option einer Hormonentzugstherapie. Kastrationsresistenten Patienten mit ossären Metastasen sollte außerdem der RANKL-Antikörper Denosumab oder das Bisphosphonat Zoledronsäure als osteoprotektive Therapie empfohlen werden. Dabei gilt zu beachten, dass im Rahmen dieser Therapie in 1-2 % der Fälle schwere Osteonekrosen des Kiefergelenks und sekundäre Malignome auftreten können [63]. Daher sollte vor Einleitung einer solchen Therapie unbedingt eine zahnärztliche Vorstellung erfolgen.

Entscheidet sich der Patient gegen eine kurative Therapie, kann auch im Rahmen des „Watchful-Waiting“ Konzeptes passiv zugewartet werden und sekundär symptomorientiert palliativ interveniert werden. Diese Methode kommt insbesondere für Patienten mit einer eingeschränkten Lebenserwartung von unter zehn Jahren in Betracht. Hierbei können mit dem Charlson-Score [24] und der ASA-Klassifikation [10] Komorbiditätsindizes zur Entscheidungsfindung herangezogen werden. Zudem muss auch der Ernährungsstatus [47] wie auch der Grad der Autonomie im täglichen Leben bewertet werden [103][110].

Ferner besteht die Möglichkeit, in einer palliativen Situation eine primäre Hormontherapie einzuleiten, wodurch eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens erreicht werden kann [137].

2.2 Limitationen der Diagnostik und Therapie

Durch verbesserte Diagnosemöglichkeiten und die weite Verbreitung des PSA-Screenings werden Prostatakarzinome zunehmend im frühen, klinisch lokalisierten Stadium diagnostiziert. Eine korrekte Risikostratifizierung ist hierbei ein Schlüsselement, um eine überflüssige Therapie zu vermeiden. Zudem ist eine auf den Patienten zugeschnittene Therapie mit dem bestmöglichen onkologischen und funktionellen Ergebnis eine zentrale Herausforderung [30].

Um der Heterogenität des Prostatakarzinoms gerecht zu werden, bedarf es einer Vielzahl an Parametern, welche präoperativ die Einschätzung der Aggressivität und der weiteren Therapie ermöglichen. Dazu gehören der Gleason-Score, der PSA-Wert, das Prostatavolumen, die Anzahl positiver Stenzen in der Biopsie, das Patientenalter und der Befund der digital-rektalen Untersuchung [161]. Um aus der Vielzahl an Parametern eine prognostische Wertigkeit abzuleiten, können Nomogramme angewendet werden, beispielweise von Chun et. al und der Arbeitsgruppe um Kattan [27][101]. Jedoch fehlen bislang Validierungen der Effektivität dieser statistischen Modelle in prospektiv randomisiert kontrollierten Studien [133]. Zudem zeigten Nomogramme interinstitutionell substanziell unterschiedliche Ergebnisse in ihrer klinischen Anwendung, weshalb zukünftig die Entwicklung eines globalen Nomogramms angestrebt wird [184]. Es ist jedoch zu erwarten, dass in Zukunft durch die Einbeziehung molekularbiologischer Faktoren und verbesserter statistischer Methoden die Prognoseabschätzung präziser wird [72]. Beispielweise hat erst kürzlich das National

Comprehensive Cancer Network (NCCN) die neuen Biomarker Assays OncotypeDX[®], Prolaris[®] und Decipher[®] für die klinische Anwendung in den USA zugelassen [30].

Wie bereits erörtert, werden die Patienten anhand der o.g. Kriterien in Risikogruppen eingeteilt, an denen sich auch die nötige Aggressivität der Therapie ableiten lässt. Die Behandlung orientiert sich dabei insbesondere am Gleason-Score, dem PSA-Wert und dem Staging als wichtigste prognostische Faktoren [71]. Ein hoher Gleason-Score prognostiziert eine schnellere Progression und indiziert somit eine aggressivere Therapie [121]. Ein wesentlicher Nachteil dieser Prognoseabschätzung ist allerdings die mangelnde Differenzierung der Patienten innerhalb der Risikogruppen. Eine individuelle Therapie im Rahmen einer personalisierten Medizin wird dem Patienten somit nicht gerecht. Zudem fehlt bislang die Berücksichtigung von molekularen Markern bei der Therapieentscheidung [121].

Weiterhin stellen klinisch insignifikante Karzinome ein Problem dar, die aufgrund ihrer langsamen Wachstumsrate die Lebenserwartung des Patienten zwar nicht verkürzen, jedoch prätherapeutisch von klinisch signifikante Karzinomen schwierig zu differenzieren sind [72]. Zwar können einige Prognosemodelle eine Abgrenzung ermöglichen, doch diese sind durch eine mangelnde Spezifität limitiert [11][102]. Auch hier bedarf es neuer molekularbiologischer Faktoren, Serummarker und präklinischer Modelle, damit durch eine bessere Differenzierung insignifikanter Karzinome von klinisch relevanten Tumoren eine Übertherapie vermieden werden kann.

Nicht nur eine Übertherapie stellt eine wesentliche Problematik dar, sondern auch die Wahl der Therapie im Progressionsverlauf des Karzinoms. Es ist bekannt, dass das Prostatakarzinom im Krankheitsverlauf ein uneinheitliches Ansprechen auf Therapeutika zeigt. Beispielsweise ist im frühen Stadium eine Androgendeprivation effektiver als eine Chemotherapie [74]. Im fortgeschrittenen, kastrationsresistenten Stadium ist die Chemotherapie oft effektiver als die Hormonablation [54][128]. Bis dato ist die Transformation vom kastrationssensitiven zum kastrationsresistenten Prostatakarzinom Gegenstand intensiver Forschung [25][39]. Durch ein verbessertes Verständnis der individuellen Tumorbiologie könnte der Einsatz einer radikalen Therapie bei Hoch-Risiko Karzinomen präziser selektiert und im Verlauf das Ansprechen evaluiert werden. Beispielhaft konnten Antanorakis et. al nachweisen, dass die Androgenrezeptor Splice-Variante AR-V7 in zirkulierenden Tumorzellen bei Patienten mit kastrationsresistenten Prostatakarzinomen mit einer Abirateron- und Enzalutamid Resistenz assoziiert ist [8]. Der Nachweis von Mutationen in DNA Mismatch-Reparaturgenen rechtfertigt den Einsatz von Poly-ADP Ribose Polymerase (PARP)- Inhibitoren und einer Platin-basierten Chemotherapie [33][178]. Daneben sind ETS-Fusionsgene und Mutationen am *PTEN*-Gen und *FOXAI*-Gen Prädiktoren eines letalen metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms und könnten somit eine radikalere Therapie indizieren [73].

Insgesamt stellen die intra- und interindividuell heterogenen histomorphologischen und molekularen Tumorcharakteristika eine große Herausforderung dar [122][130][170]. Zusätzlich zur Komplexität des Primärtumors zeigen Metastasen eine ähnliche genomische und phänotypische Heterogenität zum

Primarius [14][76]. Daraus ergibt sich die Schwierigkeit einer zielgerichteten individualisierten Therapie [118]. Aus den dargestellten Überlegungen und den zahlreichen offenen Fragestellungen wird deutlich, dass neue präklinische Modelle zur Evaluation neuer Therapieansätze und zur Reevaluation etablierter Therapien nötig sind.

2.3 In-vitro-Modelle des Prostatakarzinoms und ihre Limitationen

In-vitro-Modelle tragen entscheidend zum Verständnis der Tumorbiologie des Prostatakarzinoms bei. Insbesondere die Tumorgenese auf zellbiologischer Ebene, Resistenzentwicklungen und das Ansprechen auf Therapeutika können mit präklinischen In-vitro-Modellen erforscht werden. Ein eindrucksvolles Beispiel der Anwendung von präklinischen Modellen ist die Entdeckung des bcr-abl Onkogens und dessen Inhibierung durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib im Rahmen der chronisch myeloischen Leukämie [48]. Grundvoraussetzungen für funktionsfähige präklinische Modelle sind Reproduzierbarkeit, Expansionsfähigkeit und Kosteneffizienz [55].

Mit permanenten Karzinomzelllinien lassen sich am effektivsten In-vitro-Experimente durchführen. Karzinomzelllinien haben den entscheidenden Vorteil, dass sie durch ihre Immortalität und ihre Eignung für Hochdurchsatz-Screenings für präklinische Testungen von Medikamenten und Resistenzentwicklungen geeignet sind [124]. Die weit verbreitete Verwendung von permanenten Karzinomzelllinien verbessert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen. Ihre Fähigkeit, in immundefizienten Mäusen Xenograft-Tumore zu formieren, machen sie auch für methodisch komplexere In-vivo-Experimente einsetzbar.

Von über 1.700 etablierten Karzinomzelllinien lassen sich lediglich 11 dem Prostatakarzinom zuordnen [94]. Im Gegensatz dazu existieren über 200 verschiedene Karzinomzelllinien des Lungenkarzinoms und ca. 80 für das Mammakarzinom [94]. Zu den am häufigsten verwendeten Prostatakarzinomzellen gehören LNCaP [86], DU145 [126], PC3 [100][168] und VCaP [165]. Diese Zellen sind allesamt metastatischen Ursprungs. Während PC3 und DU145 weder PSA noch den AR exprimieren, zeigt LNCaP eine mutierte Version des Androgenrezeptors [138]. Mittlerweile existieren zahlreiche Subgruppen dieser Zelllinien, die u.a. durch eine Androgen- und Chemotherapie-Resistenz gekennzeichnet sind [34][176]. Die einzigen etablierten primären (aus einem nicht metastasierten Tumor stammenden) Prostatakarzinomlinien sind P4E6, 22RV, SHMAC4, SHMAC5 und WPE1NA22 [94]. Ein wesentlicher Nachteil der permanenten primären Prostatakarzinom-Zelllinien gegenüber den etablierten Zelllinien metastatischen Ursprungs sind deren anspruchsvolle Kultivierungsbedingungen [145].

Obwohl die genannten Zelllinien entscheidend zum Verständnis der Prostatakarzinom-Biologie beigetragen haben, ist die wissenschaftliche Aussagekraft von In-vitro-Modellen limitiert [145]. Zum einen sind die am häufigsten verwendeten Zelllinien metastatischen Ursprungs, wodurch Rückschlüsse auf das Verhalten des primären Prostatakarzinoms nicht uneingeschränkt möglich sind. Insbesondere

wird man hierdurch der Tatsache nicht gerecht, dass die Mehrzahl der diagnostizierten Prostatakarzinome, dank weitverbreiteten PSA-Screenings, organbeschränkt sind [160]. Zum anderen führen die häufigen Passagierungen zu Veränderungen der Genexpression und Wachstumsrate, wodurch sich die Zelllinien immer weiter von der eigentlichen Biologie humaner Prostatakarzinome entfernen und die mit ihnen durchgeführten Experimente fehleranfällig werden [59].

Einen essenziellen Nachteil stellt die Art der Kultivierung der Tumorzellen dar. Die Kultivierung der Zellen erfolgt meist in zweidimensionaler Monolayer-Form, d.h. die Tumorzellen wachsen adhärent und einzeln im Kulturmedium auf dem Boden einer Zellkulturflasche. Dadurch gelingt zwar eine effektive Kultivierung, jedoch ohne Berücksichtigung der komplexen Dreidimensionalität eines Tumors, da die Zellen lediglich 2D-Zell-Zell-Interaktionen eingehen [57].

Daher wurde in den letzten Jahren die Forschung an neueren Zellkultursystemen zur repräsentativeren Nachbildung des Tumors intensiviert [57]. Dies hat zur Entwicklung von verschiedenen 3D Modellen geführt. Dazu zählen Sphäroide und Organoide. Diese können entweder in einem Gerüst, in sogenannten scaffold-based Systemen, oder ohne Gerüst formiert werden. Sphäroide können monozellulär oder multizellulär aus etablierten Zelllinien oder aus Karzinomen von Patienten kultiviert werden. Organoide entstehen aus embryonischen, adulten oder pluripotent induzierten Stammzellen und bilden, eingebettet in einer extrazellulären Matrix, selbständig ein komplexes 3D-Konstrukt [29][77]. Tumor Organoide werden häufig aus primären Tumorgewebe hergestellt und bilden das komplexe ursprüngliche Karzinomgewebe histologisch nach [77]. Die anspruchsvolle Kultivierung von Organoiden stellt allerdings einen Nachteil gegenüber Sphäroiden dar [156]. Beispielsweise liegt die Rate erfolgreicher Generierungen von Organoiden aus dem Prostatakarzinom bei lediglich 15-20%, da nicht-maligne Zellen häufig die Kulturen überwuchern [187].

Ein weiterer sehr komplexer Ansatz, die 3D-Struktur und das Mikromilieu nachzubilden, wird mit der Organ-On-a-Chip Technologie verfolgt. Diese Technologie basiert auf einem 3D-Mikrofluidik-Biochip aus einem Polymer, in dessen zahlreichen Kanälen die In-vivo-Architektur durch Prostatakarzinomzellen und Zellen der extrazellulären Matrix nachgebildet werden kann [65].

2.4 Charakteristika der Sphäroidkultur

Ein Sphäroid ist ein dreidimensionales Konstrukt aus Zellen. Ein wesentliches Merkmal ist die selbständige Formierung des Sphäroids durch ein nicht-adhärentes Wachstum der Tumorzellen mit Ausbildung von 3D-Zell-Zell-Kontakten. Die Zell-Zell Kontakte formen ein komplexes Kommunikationsnetzwerk aus biochemischen und mechanischen Signalen, welche für die Zellphysiologie essenziell sind [75][143]. Der Verlust dieser gewebespezifischen Charakteristika in konventionellen 2D-Monolayer Kulturen hat zur intensivierten Forschung an Sphäroiden geführt [1][112].

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, Sphäroide herzustellen. Die populärste Methode ist die Kultivierung der Tumorzellen in Ultra-Low-Attachment Platten, da die Herstellung effektiv, mit einer hohen Erfolgsrate und niedrigen Materialkosten verbunden ist [112]. Eine weitere Option stellt die „Hanging-Drop“-Technik dar. Hierbei werden Tumorzellen nach dem gleichen Prinzip nicht-adhärenz kultiviert, allerdings in einem „hängenden“ Tropfen Kulturmedium, lokalisiert am Deckel der Kulturflasche [66]. Darüber hinaus können Tumorzellen in scaffold-based Systemen, beispielsweise in Kollagen, Matrigel oder Alginat, Sphäroide formieren [156].

Eine Option, Sphäroide in großen Massen zu generieren, beispielsweise für Hochdurchsatz-Screenings, gelingt mithilfe von Spinnerflaschen und rotatorischen Zellkultursystemen. Ein Nachteil ist allerdings die durch die starken Scherkräfte veränderte Zellphysiologie [93].

Aus der Architektur eines Sphäroids wird die Eignung zur Nachbildung der komplexen Dreidimensionalität eines Tumors deutlich. Die Geometrie einer Sphäre garantiert die maximale Nährstoffversorgung der Zellen. Dabei entstehen verschiedene Zonen innerhalb eines Sphäroids, welche den ursprünglichen Tumorcharakteristika ähneln [5]. Die äußeren Zellen nehmen am stärksten am Nährstoff- und Gasaustausch teil, weshalb hier eine Schicht proliferierender Tumorzellen entsteht (Abb. 1). Je zentraler eine Tumorzelle innerhalb des Sphäroids liegt, desto geringer die Lebensfähigkeit aufgrund des natürlichen Nähr- und Sauerstoff-Gradienten. Unter Hypoxie, Nährstoffmangel und einem Anfall an metabolischen Abbauprodukten entwickelt sich hier eine zentrale nekrotische Zone [36][134]. Im Übergang zur proliferativen Zone verbleiben die Zellen in einer nicht proliferativen „ruhigen“ Zone [5].

Neben den dargestellten Gradienten für den Nährstoff- und Gasaustausch existiert auch ein Gefälle der Penetration von Medikamenten. Dies bedingt eine erhöhte Resistenz von Sphäroiden gegenüber einer Chemo- und Radiotherapie im Vergleich zu konventionellen Monolayer Modellen [45][50][108]. Vermittelt werden die Resistenzen u.a. durch eine erhöhte Expression von E-Cadherin und Integrinen im Rahmen des Aggregationsprozesses [13][171]. Beispielsweise konnten Chambers et. al eine erhöhte Sensitivität von LNCaP-Zellen gegenüber Docetaxel in Monolayer-Form gegenüber LNCaP-Zellen zeigen, welche als Sphäroide kultiviert wurden [23]. Dieser Effekt annullierte nach Dissoziation der Sphäroide in die Monolayer-Form. Hierdurch wird das Ansprechen von Therapeutika in 2D Kulturen womöglich überschätzt. Diese Beobachtung untermauert erneut die fundamentalen Unterschiede der 2D und 3D Kultur und zeigt eindrücklich, dass in Zukunft die Forschung an 3D-Zellkulturmodellen intensiviert werden muss.

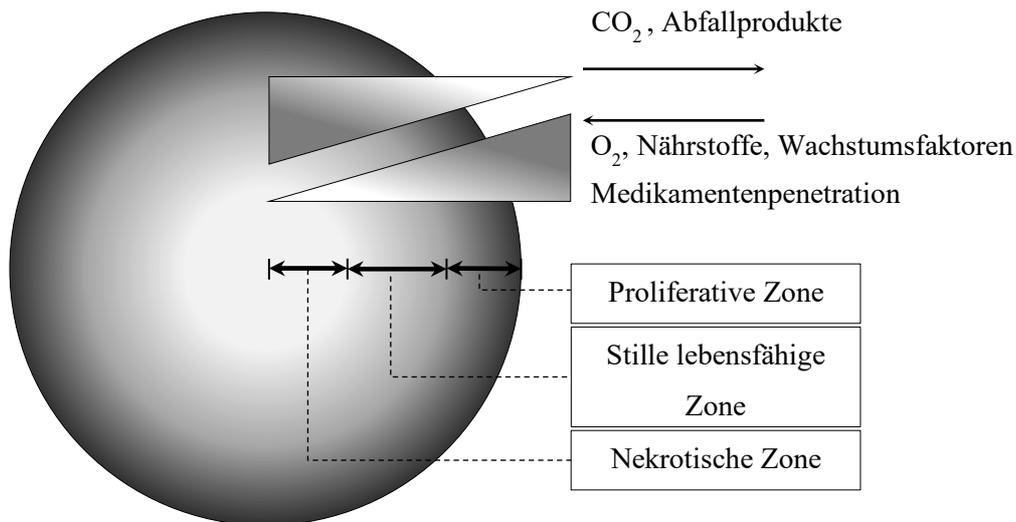


Abbildung 1: Aufbau eines Sphäroids. Modifiziert nach Lin, R. Z., & Chang, H. Y. (2008). *Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. Biotechnology journal* [112]

2.5 In-vivo-Modelle des Prostatakarzinoms und ihre Limitationen

Obwohl In-vitro-Modelle sicherlich weitreichende Erkenntnisse über das Prostatakarzinom erbracht haben, so sind diese Ergebnisse nicht vollkommen repräsentativ und nur eingeschränkt auf das humane In-vivo-Prostatakarzinom zu übertragen. Schließlich fehlen für viele Fragestellungen, beispielsweise das Ansprechen auf Therapeutika und Resistenzentwicklungen, die komplexe Komposition aus Immunsystem, Tumormikromilieu, Angiogenese und Metastasierung [57]. Daraus ergibt sich die logische Konsequenz der Ergänzung von In-vitro-Experimenten durch Versuche im In-vivo-Modell.

Am häufigsten werden humane Prostatakarzinom-Zelllinien als Xenograft im Mausmodell transplantiert [146]. Dabei existieren drei Implantationsmethoden: subkutan, orthotop und subkapsulär renal (SCR).

Die erste subkutane Xenograft Transplantation gelang Ende der 1970er Jahre durch die Arbeitsgruppe um Schröder [84]. Diese technisch einfache Methode zeigt allerdings eine geringe Rate erfolgreicher Implantationen, die in der Literatur lediglich bei 3 % bis 58 % beschrieben wird [185]. Grund dafür ist die spärliche Vaskularisation der Subkutis, wodurch es nur selten zu einem stabilen Anwachsen des Transplantats kommt und dessen metastatisches Potenzial, wenn überhaupt vorhanden, nur sehr gering ausgeprägt ist [35].

Stephenson et. al erkannten diese Problematik und entwickelten das orthotope Xenograft Modell, bei dem Prostatakarzinomzellen orthotop in das Prostatagewebe der Maus transplantiert werden [172]. Daraus resultiert eine höhere Anwachsrate von bis zu 72 % [188] und eine vermehrte Metastasierung [7][172]. Zudem gelingt, im Gegensatz zur subkutanen Methode [188], auch die erfolgreiche

Transplantation von weniger aggressiven Karzinomen [35]. Das orthotope Xenograft Modell rekapituliert das prostataspezifische Mikromilieu und ermöglicht dadurch Experimente zu Stroma-Tumor Interaktionen, welche für die Entwicklungen neuer Therapeutika und das Verständnis der Prostatakarzinombiologie entscheidend sind [85][144][156][190]. Für Fragestellungen bezüglich Tumorprogression und Metastasierung ist das orthotope Modell ideal. Problematisch sind hingegen die limitierte Menge injizierbarer Zellen und die anspruchsvolle Implantationstechnik [35].

Renal subkapsuläre Xenograft Transplantationen wurden zuerst von Wang et. al 2005 beschrieben und gehören somit zu den neueren In-vivo-Transplantationstechniken. Obwohl renal subkapsulär nicht das physiologische Prostatamilieu herrscht, konnte eine Anwachsrate von bis zu 93 % erreicht werden. Die Arbeitsgruppe um Wang weist jedoch darauf hin, dass diese je nach individueller Erfahrung des Operateurs stark variiert [188]. Des weiteren beschränkt sich die Prostatakarzinom-Forschung anhand von SCR-Transplantationen eher auf Fragestellungen zum Primarius als zur Metastasierung [35].

Ein weiterer wichtiger Aspekt von Xenograft-Transplantationen ist die Wahl der Trägersubstanz für den Transfer des Transplantats in das vivo Modell. Hier liefern Matrigel™, Poleythylenglykol oder Kollagen in einer Zellsuspension das nötige Tumormikromilieu für das initiale Tumorwachstum. Für Xenograft-Implantationen hat sich Matrigel™ in den letzten Jahren bewährt. Gleichartig wie die extrazelluläre Matrix besteht Matrigel vor allem aus Laminin, Kollagen Typ IV, Proteoglykanen, Wachstumsfaktoren und Proteasen [15].

Ferner sei an dieser Stelle erwähnt, dass Transplantationen von humanen Xenografts ausschließlich bei Verwendung immundefizienter Mäuse gelingen. Der Einfluss von Immunzellen auf die Tumorprogression und Metastasierung kann somit in diesen Modellen nicht untersucht werden. Dazu bedarf es einer Inokulation von Maus-Prostatakarzinomzellen in immunkompetente Mäuse (sogenannte Allografts). Duan et. al gelang dies durch die Co-Implantation der Maus-Prostatakarzinomzellen MPC2-luc mit T-Helfer 17 polarisierten Maus-Splenozyten in immunkompetenten C57Bl/6J Mäusen [49]. Darüber hinaus könnten zukünftig humanisierte Mäuse die Untersuchung der Rolle des Immunsystems und der Effektivität von immunbasierten Therapien beschleunigen [186]. Allerdings beschränkt sich die translationale Prostatakarzinomforschung an humanisierten Mäusen, vornehmlich aufgrund der hohen Kosten, bislang auf wenige Publikationen [152][182].

Bereits im Jahre 2007 hat die Prostate Cancer Model Working Group (PCMWG) fehlende Fortschritte zu Erkenntnissen über die Tumorgenese und die Entwicklung von effektiven Präventionen und therapeutischen Interventionen auf den Mangel an repräsentativen präklinischen Modellen zurückgeführt [146]. Insbesondere Modelle, welche die molekulare und biologische Heterogenität des humanen Prostatakarzinoms reflektieren, sind rar [141]. Hierfür sind präklinische In-vivo-Modelle am ehesten geeignet. Doch in aktuellen In-vivo-Studien werden Xenografts hauptsächlich in konventionellen Einzelzellsuspensionen in Form von Monolayern implantiert. Diese wesentliche

Limitation wird dem komplexen dreidimensionalen Tumormikromilieu nicht gerecht. Arbeiten zu heterotopen Injektionen von 3D-Zellverbänden wurden zwar schon publiziert [19][131][191], jedoch existieren für das Prostatakarzinom bis dato kaum etablierte orthotope Implantationstechniken für präformierte dreidimensionale Zellkultursysteme. Bislang konnten Patienten-abgeleitete Xenografts, welche bei Kultivierung zu Sphäroiden kleinere Zellverbände bilden, erfolgreich orthotop implantiert werden [116][115][114][183]. Die orthotope Implantation von größeren präformierten 3D-Zellverbänden, welche die Tumorarchitektur präzise nachbilden, gelang bis dato noch nicht. Dies stellt eine große Lücke der präklinischen Forschung dar. Diese Lücke gilt es mit dieser Promotionsarbeit zu schließen.

2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines präklinischen In-vivo-Modells, welches die präzisere Abbildung der Heterogenität des Prostatakarzinoms ermöglicht. Das Modell sollte die komplexe Dreidimensionalität des Tumors und das pathophysiologische Prostatamikromilieu berücksichtigen. So könnten zukünftig die bisher unzulänglich erforschten Mechanismen der intra- und interzellulären Interaktionen von Tumor und Stroma und ihr Einfluss auf die Tumorprogression untersucht werden. Im nächsten Schritt könnte die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze anhand dieses Modells systematisch und kostengünstig vorangetrieben werden.

Für die Entwicklung dieses Modells bedarf es zunächst der Entwicklung von dreidimensionalen Prostatakarzinom-Sphäroiden in vitro. Sobald diese typische Tumorcharakteristika vorweisen, beispielsweise das Vorhandensein von verschiedenen Proliferationszonen, können die Tumore in vivo im orthotopen Xenograft Modell transplantiert werden. Dadurch wird, im Gegensatz zur Inokulation von 2D-Einzelzellsuspension, die natürliche 3D-Form des Tumors bereits vor der Implantation realisiert.

Daraus ergeben sich folgende konkrete Fragestellungen:

- 1) Welches Wachstumsverhalten zeigen Sphäroide im Gegensatz zu Monolayer-Zellkulturen und welche Viabilität demonstrieren Sphäroide im zeitlichen Verlauf?
- 2) Welche Marker exprimieren Prostatakarzinomsphäroide und welche morphologischen Veränderungen finden im Verlauf statt?
- 3) Durch welche Methodik gelingt der Transfer von Sphäroiden in das In-vivo-Modell?
- 4) Hat die 3-Dimensionalität von Prostatatumoren bei Implantation einen Einfluss auf die Tumorprogression und Metastasierung im orthotopen Xenograft Modell?
- 5) Verändert sich im orthotopen Xenograft Modell nach Implantation von Sphäroiden im Vergleich zu Monolayer-Zellkulturen die Markerexpression von Primärtumoren und Metastasen nach Autopsie?

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Zelllinie

LNCaP gehört zu den am häufigsten verwendeten Zelllinien der Prostatakarzinom-Forschung. Die humanen, androgensensitiven Prostatakarzinomzellen wurden 1977 von einer Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Kaukasiers entnommen [86]. LNCaP-Zellen für diese Arbeit wurden vom Leibniz-Institut DSMZ bezogen.

3.1.2 Zellkulturmedien und Reagenzien für Zellkultur und In-vivo-Experimente

| Produkt | Hersteller | Bestellnummer |
|------------------------------------|----------------|---------------|
| DMSO | Serva | 20385.01 |
| Dulbecco's PBS | Sigma- Aldrich | D8573 |
| Fetal Bovine Serum (FCS) | Sigma- Aldrich | F7524 |
| Matrigel Matrix High Concentration | Corning | 354262 |
| RPMI- 1640 Medium | Sigma- Aldrich | R8758 |
| Trypanblau 0,4% | Sigma- Aldrich | T8154 |
| Trypsin-EDTA- Lösung | Sigma- Aldrich | T3924 |

3.1.3 Verbrauchsmaterialien Zellkultur

| Produkt | Hersteller | Bestellnummer |
|---|------------------|---------------|
| 96 Well Ultra Low Attachment Round Bottom | Corning | 7007 |
| Combitips 5 ml | Eppendorf | 0030 089.669 |
| Deckglas 24 x 60 mm | R. Langenbrinck | 7110405 |
| Easystrainer 40 µm | Greiner Bio- One | 542040 |

| | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|--------------|
| Einbettkassette groß | Roth | EE16.1 |
| Einfrierampullen | Tpp | 8904 |
| Filterpapier | GE Healthcare Life Sciences | 10 311 651 |
| LoBind Tubes 1,5 ml | Eppendorf | 0030 108.051 |
| Luna Cell Counting Slides | Logos Biosystems | 01191807 |
| Objektträger Superfrost 25 x 75 mm | R. Langenbrinck | 17019063 |
| Paraffinfilm | American National Can | Z01851 |
| Pasteur Pipette 150 mm | Hirschmann | 197734145 |
| Pasteur Pipetten 230 mm | Hirschmann | 7106804 |
| Pasteur Plastik Pipetten | Ratiolab | RL2600111 |
| Petrischale | Falcon | 353004 |
| Pipette 1 ml | Corning | 357521 |
| Pipette 10 ml | Greiner Bio- One | 607180 |
| Pipette 2 ml | Corning | 357507 |
| Pipette 25 ml | Greiner Bio- One | 760180 |
| Pipette 5 ml | Greiner Bio- One | 606180 |
| Pipettenspitze 10 µl | Ratiolab | 2530173 |
| Pipettenspitze 1000 µl | Sarstedt AG & Co. | 1053321 |
| Pipettenspitze 200 µl | Sarstedt AG & Co. | 1050821 |
| Pipettenspitze 3 µl | Sorenson BioScience | 078450 |
| Tubes 0,2 ml | Brand | 5059539 |
| Tubes 50 ml Cellstar | Greiner Bio- One | 227261 |
| Zellkulturflasche 25 cm ² | Greiner Bio- One | 690175 |
| Zellkulturflasche 75 cm ² | Greiner Bio- One | 658175 |
| Zentrifugenröhrchen Rundboden 14 ml | Greiner Bio- One | 101180 |

3.1.4 Chemikalien

| Produkt | Hersteller | Bestellnummer |
|--------------------------------|----------------------------|---------------|
| Agarose High Resolution | Roth | K297.1 |
| Aqua. Dest Ampuwa | Fresenius Kabi | 13QKP271 |
| Biotinblock- Lösung | LabLine | BL016R020 |
| Dako Real Detection System Kit | Dako | K5005 |
| Entellan | Zentr. Chem. Lager der UdS | 1.079.610.500 |
| Eosin G- Lösung 15% | Carl Roth | 3137.2 |
| Ethanol 99% vergällt mit MEK | Zentr. Chem. Lager der UdS | 702543 |
| HCl 37% | Zentr. Chem. Lager der UdS | 700998 |
| Mayer's Hämalau | Zentr. Chem. Lager der UdS | 1.092.490.500 |
| Mayer's Hämatoxylin | Sigma- Aldrich | MHS32-1L |
| Paraffinpellet | Engelbrecht | 17932A |
| Paraformaldehyd 4% | Otto Fischar GmbH | 27246 |
| Xylol | Zentr. Chem. Lager der UdS | 703440 |

3.1.5 Reagenzien und Kit für immunhistochemische Charakterisierungen

Zur immunhistochemischen Färbung mussten verschiedene Reagenzien vorbereitet werden. Zum einen wurden zwei verschiedene Demaskierungs-Puffer verwendet. Tris-EDTA Retrieval Puffer setzte sich aus 296,4 ml destilliertes Wasser, 3 ml 1 molarer Tris- Lösung und 600 µl 0,5 molarer EDTA-Lösung zusammen. Tris- Lösung wurde durch Vermengung von 12,11 g Tris mit 100 ml destilliertem Wasser hergestellt. Für die Fertigung der EDTA-Lösung wurden 93,06 g EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat in 300 ml destilliertem Wasser gelöst, anschließend der pH-Wert auf 8,0 eingestellt und zuletzt auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Tris-EDTA Lösung wurde stets frisch angesetzt und mittels HCl auf einen pH-Wert von 9,0 eingestellt.

Zudem wurde ein Citrat-Puffer zur Demaskierung verwendet. Dieser bestand erstens aus 9 ml 0,1 molarer Zitronensäure, die in 1000 ml Aqua dest. verdünnt wurden. Zweitens enthielt der Citrat-Puffer 41 ml 0,1 molares Natriumcitrat, welches in 1000 ml Aqua dest. vermischt wurde. Letztlich wurde zu den beiden Stammlösungen 450 ml destilliertes Wasser hinzugefügt und der pH-Wert auf 6,0

angepasst. Wie der Tris-EDTA Puffer, wurde auch der Citrat-Puffer stets frisch generiert. Alle Reagenzien zur Herstellung der Puffer wurden bei 2-8 °C im Kühlschrank gelagert.

Für die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde 3 % BSA genutzt. Hierfür wurden 6 g BSA mit 190 ml PBS vermengt, danach der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und schließlich die Lösung mit PBS auf 200 ml aufgefüllt.

Das „Antibody Diluent“ als Verdünnungsmittel für Antikörper wurde aus einer Lösung von 195 ml PBS und 2 g BSA hergestellt. Damit entstand eine 1 %- BSA Lösung in PBS. Wieder erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 und die Auffüllung des Gemisches auf 200 ml mit PBS.

Zur Färbung wurde das Dako Real Detection Kit eingesetzt, welches als Detektionssystem mit der labelled Streptavidin Biotin (LSAB) Methode arbeitet. Dieses bestand aus einem biotinylierten Sekundär-Antikörper, einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex, Alkalischer Phosphatase, Levamisol sowie drei Chromogenen. Das „Fast Red Chromogen“ musste 10 Minuten vor Gebrauch aus fünf Komponenten des Kits generiert werden. Das Verhältnis von Alkalischer Phosphatase zu Chromogen 1, 2 und 3 musste 75:3:3:3 betragen. Zudem kam auf 10 ml Alkalische Phosphatase 50 µl Levamisol zur Blockierung der endogenen Alkalischen Phosphatase im Gewebe. Somit konnten für die Färbung von 8 Schnitten 750 µl Alkalische Phosphatase mit jeweils 30 µl der drei verschiedenen Chromogene, sowie 3,75 µl Levamisol vermengt werden.

Als weitere Reagenzien wurden Mayer's Hämatoxylin und Mayer's Hämalaun für die Gegenfärbung vorbereitet. Mayer's Hämalaun Lösung setzte sich aus 270 ml Aqua dest. und 30 ml Mayer's Hämatoxylin zusammen. Sowohl das Hämatoxylin als auch die daraus hergestellte Hämalaun-Lösung mussten vor Gebrauch durch ein Filterpapier gereinigt werden.

3.1.6 Geräte und Programme

| Name | Hersteller |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Brutschrank Heracell | Heraeus |
| Camera Control Unit | Nikon |
| cellSens Standard Software | Olympus |
| Combitip Dispenser | Eppendorf |
| Einbettstation Shandon Histocentre 2 | Thermo electron corporation |
| Exsikkator Set Duran Typ Novus | Carl Roth |
| Färbekasten aus Plastik | Kartell |

| | |
|---|-----------------------|
| Illustrator (27.9.0) | Adobe Acrobat |
| Inkubator Incucell | MMM- Group |
| inoLab pH Level 1 | WTW |
| LUNA II Automated Cell Counter | Logos Biosystems |
| Magnetrührer MR 2002 | Heidolph |
| Microtom RM 2125RT | Leica |
| Mikroliterpipette (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl) | Gilson |
| Mikroskop BX61 | Olympus |
| Mikrowelle „1026E“ | Privileg |
| NIS- Elements BR Software | Nikon |
| Objektträgerersatz für Färbekasten | Kartell |
| Pen für Schnittumrandung | Dako |
| Pipettierhilfe Pipetboy acu | Integra Biosciences |
| PowerPoint (16.73) | Microsoft |
| Prism (9.3.1) | GraphPad Software |
| Reiskocher „Classic 2“ | Tefal |
| SPSS Statistics 27 | IBM |
| Sterilbank HERAsafe | Heraeus |
| Stickstofftank Arpege | Air liquid medical |
| Thermometer „IP65 LT-101“ | TFA Dostmann |
| Tischzentrifuge MiniSpin plus | Eppendorf |
| Umkehrmikroskop Axiovert S100 | Zeiss |
| Umkehrmikroskop Eclipse TS100 | Nikon |
| Vakuum- Infiltrationsprozessor „Tissue-Tek VIP 5 Jr.“ | Sakura Finetek Japan |
| Vakuumpumpe, Vacusafe | Integra Biosciences |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Waage 770-12 | Kern |
| Wasserbad „1000“ | pfm medical ag |

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Wasserbad 1003 | GFL |
| Zentrifuge 5804 | Eppendorf |
| Zentrifuge 5804 R mit A-2-DWP Einsatz | Eppendorf |
| Zentrifuge Hyspin 16K | Anachem |

3.1.7 Primärantikörper für Immunhistochemie

Sowohl die Sphäroide vor Implantation in die Mäuse als auch die bei Autopsie gewonnenen Organpräparate wurden mittels immunhistochemischen Färbungen auf die Expressionen der gleichen Marker hin untersucht. Die Präparate wurden auf die Proteine Androgenrezeptor (AR), Ki-67, AMACR (Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase), Cytokeratin 8 (CK8), Cytokeratin 5 (CK5), Vimentin und E-Cadherin analysiert.

Dabei existierten je nach verwendetem Antikörper methodische Unterschiede. So wurden die Epitope des Androgenrezeptors, von CK8 und AMACR mit Citrat-Puffer demaskiert, wohingegen die Epitope von Ki-67, CK5, Vimentin und E-Cadherin mit Tris-EDTA Puffer demaskiert wurden.

Zudem variierten die Konzentrationen der Antikörper für die Färbung der Sphäroide im Vergleich zur immunhistochemischen Charakterisierung der In-vivo-Experimente. Der Anti-Androgenrezeptor Antikörper wurde für die Färbung der Sphäroide und der Primärtumore 1:2000 verdünnt, für die Metastasen-Präparate wurde eine Konzentration von 1:4000 genutzt.

Außerdem wurde für die Sphäroid-Färbung für AMACR eine Verdünnung von 1:500, für CK8 1:200 und für E-Cadherin 1:800 ausgewählt. Hingegen wurde bei der Färbung der Primärtumore und der Metastasen der Anti-CK8 Antikörper mit einer Verdünnung von 1:800 verwendet. Der Anti-E-Cadherin-Antikörper wurde für die Primärtumore und Lymphknotenmetastasen gleichermaßen 1:1600 verdünnt. AMACR wurde für die Primärtumore 1:200, für die Lymphknotenmetastasen 1:1000 und für die Lungenmetastasen 1:500 konzentriert. Sowohl die Organschnitte als auch die Sphäroide wurden mit der gleichen Antikörper-Konzentration für CK5 (1:50), Vimentin (1:100) und Ki-67 (1:100) gefärbt.

Tabelle 1: Primärantikörper für die immunhistochemische Charakterisierung von Sphäroiden und von Organpräparaten aus In-vivo-Experimenten

| Antikörper | Bezeichnung | Hersteller und Bestellnummer | Konz. Sphäroide | Konz. Primär-Tumor | Konz. Lymphknoten Metastase | Konz. Lungen Mets. |
|------------|---|--|-----------------|--------------------|-----------------------------|--------------------|
| AR | Polyclonal Rabbit Anti-Androgen Receptor Antibody | Sigma-Aldrich A9853 | 1:2000 | 1:2000 | 1:4000 | 1:4000 |
| AMACR | Polyclonal Rabbit Anti Alpha-Methylacyl-CoA racemase Antibody | Invitrogen PA5-23619 | 1:500 | 1:200 | 1:1000 | 1:500 |
| CK 5 | Monoclonal Mouse Anti- Cytokeratin 5 Antibody | Diagnostik Biosystems MOB361 <i>Klon XM26</i> | 1:50 | 1:50 | 1:50 | 1:50 |
| CK 8 | Monoclonal Mouse Anti-Cytokeratin Peptide 8 Antibody | Sigma-Aldrich C5301 <i>Klon M20</i> | 1:200 | 1:800 | 1:800 | 1:800 |
| E-Cadherin | Monoclonal Mouse Anti- E-Cadherin Antibody (HECD-1) | Invitrogen 13-1700 | 1:800 | 1:1600 | 1:1600 | 1:3000 |
| Ki- 67 | Monoclonal Mouse Anti-Ki-67 Antibody | Dako M7240 <i>Klon MIB-1</i> | 1:100 | 1:100 | 1:100 | 1:100 |
| Vimentin | Monoclonal Rabbit Vimentin (D21H3) XP Antibody | Cell Signaling 5741 | 1:100 | 1:100 | 1:100 | 1:100 |

3.1.8 Utensilien und Geräte für In-vivo-Experimente

| Name | Hersteller |
|---|-----------------------------------|
| 5/0 Vicryl- rapid Faden | Ethicon |
| Aesculap Exacta GT 416 Tierhaarschneider Kleintiere | Braun |
| Aquasonic 100 Ultraschallgel | Parker |
| COBAS 1 Immunoassay System | Roche |
| Dil Uni Elecsys Lösung | Roche |
| Eclipse-Needle 20 G x 1 ½ TW | Becton Dickinson |
| Einbettkassette Histosette mit Deckel | Simport |
| Einbettkassette Macrosette mit Deckel | Simport |
| Electro- ChemiLuminescence ImmunoAssay (ECLIA) | Roche |
| Enthaarungscreme | Balea |
| Extra Feine Graefe Zange No. 11150-10 | Fine Science Tools |
| Federschere No. 15024-10 | Fine Science Tools |
| Feine Schere No. 14084-08 | Fine Science Tools |
| Gewebezange No. 11021-12 | Fine Science Tools |
| Graefe Zange No. 11050-10 | Fine Science Tools |
| Hamilton Mikroliter Spritze | Roth |
| iPhone 12 | Apple |
| Isofluran | Baxter |
| Jod Kontrastmittel Accupaque 300 | GE healthcare, Chalfont St. Giles |
| Ketamin Urostamin 100 mg/ml | Serumwerk |
| Kompressen steril | Gazin |
| Leukotape | BSN medical |
| Mehrzweck-Becher für Biopsien | Sarstedt |
| Mikrokapillare Glas | Sigma- Aldrich |

| | |
|---|------------------------|
| Nadelhalter Halsey | Fine Science Tools |
| NRecon Rekonstruktions Software | Bruker Corporation |
| Osteosoft Entkalkungslösung | Sigma |
| Skyscan 1176 micro CT system | Bruker Corporation |
| Stereomikroskop M651 | Leica Microsystems AG |
| Tramadol | Winthrop GmbH, Berlin |
| Transducer MS400 | FUJIFILM Visual Sonics |
| Vevo 2100 Small Animal Ultrasonography System | FUJIFILM Visual Sonics |
| Vevo Lab Software | FUJIFILM Visual Sonics |
| Wattestäbchen steril | Hartmann |
| Xylazin Rompun 2% 25 ml | Bayer |

3.2 In-vitro-Methodik

3.2.1 Zellkultur

LNCaP-Zellen wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche mit 12 ml Medium ausgesät. In einem Inkubator wurden die Zellen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.2 Auftauen von Zellen aus Stickstoff

Die Zellen wurden in einem Flüssigstickstoff-Tank aufbewahrt. Um die Zellen für die Zellkultur einzusetzen, mussten sie zunächst aufgetaut werden.

Unter einer sterilen Werkbank wurde ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Medium vorbereitet. Zudem mussten eine 75 cm² Zellkulturflasche und ein Styroporbehälter mit Eis gerichtet werden.

Die Kryoröhrchen mit Zellen wurden aus dem Stickstoff Tank entfernt und auf Eis zur Werkbank transportiert. Damit eventuell eingedrungener Stickstoff entweichen konnte, wurde das Kryoröhrchen etwas aufgedreht.

Nun wurde mit Hilfe einer 150 mm Pasteur Pipette schrittweise Medium aus dem gerichteten Reagenzglas in die Caps überfüllt, LNCaP-Zellen anschließend aufgezogen und schließlich wieder in das Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde bis zur vollständigen Entleerung des Caps wiederholt.

Die in den Caps enthaltene DMSO-Lösung wurde mit der Zentrifuge 5804 für 3 Minuten bei 1100 Umdrehungen pro Minute (=U) von den Zellen getrennt und anschließend abgesaugt, ohne das Zellpellet zu lösen. Als nächstes erfolgte eine Resuspension mit 3 ml Medium und die Überführung der Suspension in die 75 cm² Kulturflasche.

Die Zellkulturflasche wurde in den Brutschrank gesetzt und am nächsten Tag ein Medienwechsel durchgeführt.

3.2.3 Medienwechsel

LNCaP-Zellen wurden mit einem Medium bestehend aus RPMI und 10 % fetalem Kälberserum kultiviert. Der Medienwechsel erfolgte im 48 Stunden Rhythmus. Durch Absaugen des Mediums mit einer Vakuumpumpe und einer 230 mm Pasteur Pipette konnte das alte Medium entfernt werden. Anschließend wurde durch vorsichtiges Hinzugeben von 12 ml Medium mit einer 20 ml Pipette an der nicht mit Zellen benetzten Flaschenseite frisches Medium zugesetzt.

3.2.4 Subkultivieren adhärenter Zellen

Subkultivierung ist ein wesentlicher Bestandteil der Zellkulturarbeit. Hierzu wurde das Medium in der Flasche zunächst abgesaugt. Daraufhin wurde 5 ml PBS-Puffer zum Waschen der Zellen hinzugesetzt. Nach Entfernung von PBS wurden die Zellen für 8-10 Minuten bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ mit 2 ml Trypsin-EDTA Lösung benetzt. Regelmäßiges Beklopfen der Flasche verstärkte das Lösen der Zellen von der Oberfläche. Nachfolgend wurde mit 5 ml Medium eine Suspension erzeugt, die bei 1100 U mit der Zentrifuge 5804 zentrifugiert wurde. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, 3 ml Medium hinzugegeben und das Zellpellet resuspendiert. Mit einer Pipette konnte die gewünschte Verdünnung in eine mit 12 ml Medium befüllten 75 cm² Kulturflasche überführt werden. LNCaP-Zellen wurden überwiegend in einer 1:10 Verdünnung subkultiviert.

3.2.5 Kryokonservierung von Zellen in Stickstoff

Das Einfrieren der Zellen verlief zunächst wie das „Subkultivieren adhärenter Zellen“. Im Gegensatz zur Subkultivierung, wurden die Zellen im letzten Schritt nicht mit Medium resuspendiert, sondern mit 2 ml DMSO. Dimethylsulfoxid hemmt die Bildung von zellschädigenden Eiskristallen während des Einfrierprozesses. Anschließend erfolgte eine kurze Resuspendierung und die Aufnahme in die vorbereitete sterile Einfrierampulle (Kryoröhrchen). Das Röhrchen musste zügig auf Eis gestellt und schnellstmöglich zu einem -80 °C Kühlregal befördert werden. Nach einem Tag konnte das Kryoröhrchen dann in einen Stickstofftank hineinsortiert werden.

3.2.6 Bestimmung der Verdopplungszeit und Anzahl vitaler Zellen

Die Verdopplungszeit (Generationszeit) ist die Zeit, in der sich die Anzahl der Zellen verdoppelt. Diese wurde zum einen für LNCaP-Zellen in Monolayerkultur und zum anderen für LNCaP-Sphäroide bestimmt. Hierfür musste vor dem Aussäen die zu kultivierende Anfangszellzahl ermittelt werden.

Dazu wurde ein 0.2 ml Eppendorf Tube mit 10 µl Trypanblau gerichtet. Bevor das Trypanblau aufgezogen wurde, mussten eventuelle Verklumpungen mit einem Vortex aufgelöst werden. Trypanblau diente der Bestimmung der Lebensfähigkeit der Zellen. Vitale Zellen nahmen Trypanblau nicht auf, wohingegen abgestorbene oder Zellen mit defekter Zellmembran sich dunkel verfärbten.

Aus der letzten Zellsuspension in 3.2.4 wurden 10 µl aufgenommen und mit 10 µl Trypanblau vermengt.

Die Suspension wurde auf einen „Luna Cell Counting Objektträger“ gegeben und schließlich mit der LUNA II Zählkammer ausgewertet.

Nun konnte mit der zu Beginn ausgesäten Zellzahl und der Zellzahl zum Zeitpunkt des Subkultivierens die Verdopplungszeit mit Hilfe folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Verdopplungszeit} = \log(2) \times \text{Kulturdauer} / \log(N) - \log(N_0)$$

wobei: N = Zellzahl nach Kulturdauer

N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt 0

3.2.7 Kultivierung von Sphäroiden

Die Sphäroide wurden mittels einer Ultra-Low-Attachment (ULA) 96-Well Platte hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die Schritte des „Subkultivierens adhärenter Zellen“ und die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen durch LUNA II durchgeführt.

Das Gesamtmedienvolumen pro Well musste 200 µl betragen. Entsprechend des zu pipettierenden Volumens der Zellsuspension wurde die Differenz an Medium, vor Hinzugabe der Zellsuspension, in die Wells hinzugesetzt. Im Anschluss konnte die gewünschte Zellzahl in die Wells pipettiert werden. Durch Kultivierung von 5000, 10000, 25000, 50000, 100000, 250000, und 500000 Zellen pro Well wurden Sphäroide verschiedenster Größen generiert. Diese wurden dann 10-12 Tage in Kultur gehalten.

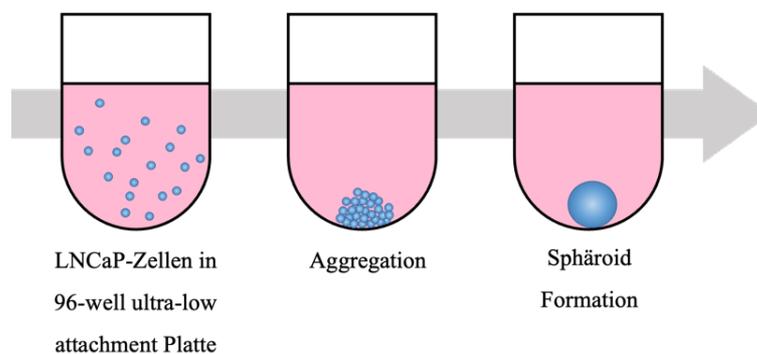


Abbildung 2: Herstellung eines LNCaP-Sphäroids

3.2.8 Medienwechsel von Sphäroiden

Im 48 Stunden Rhythmus war ein Medienwechsel notwendig. Hierfür wurde vorsichtig am Rand des Wells 100 µl Medium mit einer 100 µl Pipette entnommen und anschließend langsam 100 µl Medium mit einem 5 ml Combitip in das Well pipettiert. Dabei war eine Sichtkontrolle ausschlaggebend, denn insbesondere in den ersten Tagen der Kultivierung von Sphäroiden war die Gefahr einer Destruktion sehr groß.

3.2.9 Fotodokumentation

Mit dem Umkehrmikroskop Eclipse TS100 und einem 40x Objektiv wurde täglich eine Fotodokumentation der Sphäroide durchgeführt. Die Bilder wurden mit der Nikon Software NIS-Elements BR verarbeitet.

Die intraoperative Fotodokumentation der In-vivo-Experimente wurde mit einer iPhone 12 Kamera ausgeführt.

3.2.10 Ermittlung von Wachstumskurven durch Dissoziation von Sphäroiden

Die Bestimmung der Zellzahl der Sphäroide wurde im 48 Stunden Rhythmus bis zum zehnten Tag durchgeführt.

Zu Beginn wurden die Sphäroide für 5 Minuten bei 1700 U mit der Zentrifuge 5804 R zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde gleichermaßen, wie bei der Subkultivierung adhärenter Zellen, das Medium mit einer 200 µl Pipette entfernt und daraufhin das Well mit 200 µl PBS für eine Minute benetzt. Nach vorsichtigem Abpipettieren von PBS wurde 100 µl Trypsin hinzugegeben und die Well-Platte für 8-10 Minuten in den Inkubator gesetzt.

Nachfolgend musste eine mechanische Dissoziation der in Trypsin befindlichen Sphäroide mit einer 100 µl Pipette erfolgen. Nach mikroskopischer Kontrolle der vollständigen Lösung der Zell-Zell-Verbindungen konnte die Suspension aus Trypsin und LNCaP-Zellen in ein mit 2 ml Medium befülltes Reagenzröhrchen hinzugesetzt werden. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 1100 U für 3 Minuten.

Nachfolgend wurde der Überstand abgesaugt und eine Resuspension mit 1 ml Medium vollzogen. Nun konnte die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen, wie im Abschnitt „Bestimmung der Verdopplungszeit und Zellviabilität“ beschrieben, erfolgen.

3.2.11 Fixierung und Einbettung von Sphäroiden in Agarosegel

Vorbereitend für die Agarosegel-Einbettung der Sphäroide wurde von einem 200 µl Eppendorf Tube der Deckel abgetrennt, sodass ein Zylinder entstand. Dieser Zylinder wurde zur Fixierung in eine mit Paraffin benetzte Petrischale senkrecht gesetzt. Als Nächstes mussten die Sphäroide gewaschen und fixiert werden.

Dazu wurden die Sphäroide mit einer 1000 µl Pipette, deren Öffnung zuvor mit einer Schere erweitert und autoklaviert wurde, in ein 1,5 ml LoBind Eppendorf Tube überführt. Daraufhin erfolgte mit der Tischzentrifuge MiniSpin eine Zentrifugierung für 5 Minuten mit 4000 U. Nach behutsamen Absaugen des Überstands wurde 1 ml PBS hinzugesetzt. Darauffolgend wurde dieselbe Zentrifugation durchgeführt, der Überstand abgesaugt und schließlich zum Fixieren 4-prozentiges PFA hinzugegeben

und das Tube über Nacht in einem Kühlschrank platziert. Am nächsten Tag wurde erneut gleicherweise zentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und zuletzt nach einer weiteren Zentrifugation der Überstand entfernt.

In der Folge galt es, das Agarosegel herzustellen. Hierzu wurden 200 mg Agarose in 10 ml PBS gelöst. In einer Mikrowelle wurde bei 180 W für 120 Sekunden die Agarose aufgeköcht. Sobald die Agarose kochte, war zügiges Arbeiten essenziell. Durch abgeschnittene 200 μ l Pipetten wurden die Zylinder mit 80 μ l Agarosegel befüllt. Nun wurden die Sphäroide mit einer abgeschnittenen 200 μ l Pipette mit 80 μ l Agarosegel aufgenommen und in den vorbereiteten Zylinder mit Agarosegel pipettiert. In einer feuchten Kammer wurden die Zylinder, bis zum Zeitpunkt des Einbettens in Paraffin, im Kühlschrank gelagert.

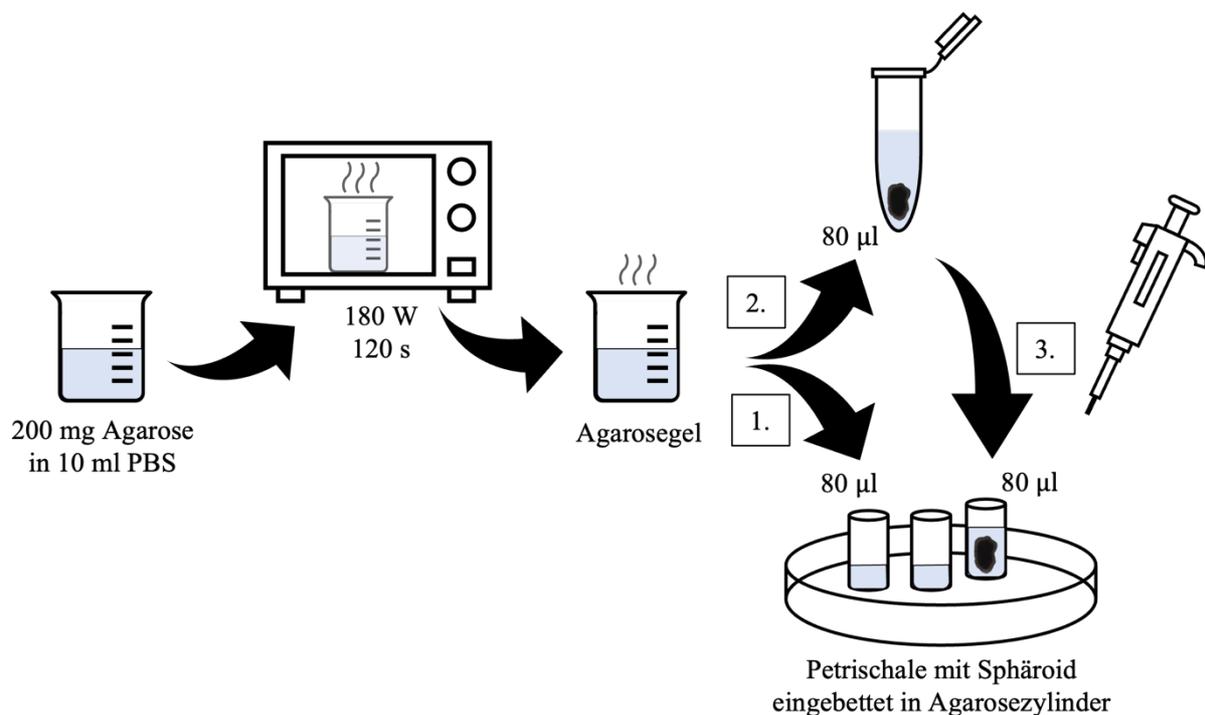


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Einbettung von Sphäroiden in Agarosegel

3.2.12 Einbettung von Agarosegelzylinder mit Sphäroiden in Paraffinblöcke

Die über Nacht im Kühlschrank gelagerten Gelzylinder wurden in eine Einbettkassette gelegt. Diese war mit einem Faden versehen, sodass die Kassette in einer Glasschliffküvette hängen konnte. In dieser Küvette wurden die Agarosegelzylinder in einer aufsteigenden Alkoholreihe dreimal mit 70 % und dreimal mit 100 % Alkohol für je zwei Stunden dehydriert. Nach zwei weiteren Waschungen in Xylol verweilten die Präparate über Nacht im letzten Behälter Xylol.

Am darauffolgenden Tag wurden die Kassetten in einem Exsikkator mit auf 60 °C erhitztem Paraffin versetzt. Der Exsikkator wurde in einem zuvor auf 70 °C erwärmten Wasserbad platziert und an eine

Wasserstrahlpumpe angeschlossen (2 x 1 h). Durch das Vakuum wurde den Zylindern das Xylol entzogen und durch Paraffin ersetzt.

Nach Beendigung des Vorgangs musste der Exsikkator kurz in einen Wärmeschrank gelegt werden, um den Deckel des Exsikkators leichter öffnen zu können.

An der Einbettstation wurden die Kassetten in die Paraffinwanne befördert. Daraufhin wurde 3-4 mm Paraffin in ein Förmchen gegossen, der Agarosegel-Zylinder aus der Kassette entnommen und in das Paraffin-Förmchen gestellt. Nach Erstarren auf der Cooling-Platte konnte das Kassettengitter auf das Förmchen aufgelegt und Paraffin aufgegossen werden. Nach erneutem Erstarren auf der Cooling-Platte wurden die eingeblockten Sphäroide über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und waren damit bereit zum Schneiden.

Mit einem Rotationsmikrotom wurden 4 µm dünne Schnitte schwimmend in einem Wasserbad auf Superfrost-Objektträger aufgezogen. Schließlich trockneten die Objektträger vor der Färbeprozedur über Nacht bei 37 °C oder bei Raumtemperatur über 48 Stunden.

3.2.13 Immunhistochemische Charakterisierung

Zu Beginn wurden die Objektträger für 1-2 Stunden bei über 60 °C in einem Inkubator erwärmt. Bei größeren Schnitten war eine längere Wärmebehandlung vonnöten. Im Anschluss wurden die Präparate für 3 x 10 Minuten in Xylol deparaffiniert und für jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100% - 100% - 70%- 70%- Ethanol) rehydriert.

Im nächsten Schritt fand das Demaskieren der Epitope statt. Hierfür musste der Puffer vor der Inkubation in einer Mikrowelle gekocht und in einem Wasserbad auf über 95 °C erhitzt werden. Konstante Temperaturen wurden durch den Einsatz eines Reiskochers als Wasserbad erreicht. Bei Erreichen der Temperatur konnten die Schnitte für 12,5 Minuten im Demaskierungspuffer inkubieren. Danach wurden die Küvetten aus dem Wasserbad entfernt und kühlten bei Raumtemperatur auf unter 50 °C ab.

Im Anschluss an drei Waschungen mit PBS (je 2 Minuten) fand die erste Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen statt. Hierfür mussten die Rückseiten und die schnittfreien Flächen der Objektträger getrocknet und der Schnitt mit einem Wachsstift (Dako Pen) umrandet werden. In einer feuchten Färbekammer konnten dann die Schnitte mit 200 µl 3%- BSA benetzt werden. Nach 45 Minuten wurden die Schnitte erneut mit PBS für 2 Minuten gewaschen. Es folgte die zweite Blockierung.

Der Biotinblock bestand aus zwei Lösungen, die für jeweils 20 Minuten aufgetragen wurden. Dazwischen wurden die Schnitte kurz mit PBS gewaschen. Nach Inkubation der zweiten Lösung des Biotinblocks wurde die Lösung lediglich abgeklopft.

Daraufhin konnte der Primärantikörper appliziert werden. Dieser wurde zuvor in der gewünschten Konzentration mit 1%- BSA verdünnt. Pro Schnitt wurden 100 µl Primärantikörperlösung pipettiert und über Nacht bei 4 °C in einem Kühlschrank aufbewahrt.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte 5-mal für je 2 Minuten in PBS gewaschen. Nun konnte der biotinylierte Sekundärantikörper aus dem DAKO Real Detection Kit auf die Schnitte geträufelt werden. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Objektträger in PBS gespült (3 x 2 Minuten). Anschließend wurde der Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte geträufelt. Während die Schnitte im Anschluss 3 x 2 Minuten mit PBS umspült wurden, wurde das Chromogensubstrat vorbereitet. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 100 µl Chromogensubstrat bedeckt und daraufhin dreimal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen.

Es folgte die Gegenfärbung mit dem angerichteten Mayer's Hämatoxylin für 5 Minuten oder Mayer's Hämalaun für 120 Sekunden und 5- minütiges Bläuen in fließendem kaltem Leitungswasser. Die Kernfärbung bei Einsatz des Citrat-Puffers wurde mit Mayer's Hämalaun umgesetzt, hingegen wurde bei Verwendung des EDTA- Puffers Mayer's Hämatoxylin eingesetzt.

Nachfolgend wurde eine Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%- 100%- 100%- 100%- Ethanol) und eine dreimalige Behandlung mit Xylol für je 2 Minuten durchgeführt. Schließlich wurden die Objektträger mit Entellan und einem Deckglas eingedeckt.

3.2.14 Quantitative Analyse der Immunhistochemie

Eine quantitative Analyse der Immunhistochemie gelang mit einem Add-on Java Plugin für ImageJ/FIJI. Das Plugin „Colour Deconvolution 2“ wurde von Gabriel Landini [109] entwickelt. Die Grundlage für die Separation und Quantifizierung immunhistochemischer Färbungen lieferten Ruifrok und Johnston [154]. Die Analysen wurden mithilfe des Protokolls von Jie Shu [164] umgesetzt.

3.3 In-vivo-Methodik

3.3.1 Versuchstiere

Die In-vivo-Experimente wurden mit 6-8 Wochen alten männlichen immundefizienten CB17-SCID Mäusen der Charles River Laboratories durchgeführt. SCID-Mäuse sind homozygote Träger des mutierten $Prkdc^{scid}$ Allels auf Chromosom 16, wodurch eine schwere kombinierte Immundefizienz entsteht. Die Mäuse wurden unter kontrollierten Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen bei 12 Stunden Umgebungsbeleuchtung in ventilierten und pathogenfreien Käfigen der Tierhaltung des Instituts für klinische-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gehalten. Die Kleintiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter und ihr Gesundheitsstatus wurde täglich kontrolliert. Die Experimente wurden von der zuständigen Landesbehörde genehmigt (Nr. 26/2020) und im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz umgesetzt.

3.3.2 Orthotope Xenograft Inokulation und Follow-Up

Sechzehn Mäuse wurden in eine Experimentgruppe (n=8) und eine Kontrollgruppe (n=8) aufgeteilt. Mittels einer orthotopen Inokulation in die Prostata wurden der Versuchsgruppe LNCaP-Sphäroide implantiert. Die Kontrollgruppe erhielt orthotope Injektionen einer Einzelzellsuspension von LNCaP-Zellen einer Monolayerkultur.

Die intraprostatiche Tumorzellinjektion wurde unter intraperitoneal applizierter Anästhesie mit 75 mg/kg Ketamin und 15 mg/kg Xylazin mithilfe eines Stereomikroskops (Leica M651) ausgeführt. Nach Fixierung der Tiere in Rückenlage wurde die Haut des unteren Abdomens median über ca. 10 mm inzidiert. Durch eine mediane Laparotomie konnten die Blase, die Vesiculae seminales und der anteriore Prostatalappen mobilisiert und außerhalb der Inzision exponiert werden. Der Kontrollgruppe wurden im 1:1 Verhältnis 10 μ l einer Suspension aus Matrigel und Medium mit 40000 LNCaP Einzelzellen in den links-anterioren Prostatalappen mit einer gekühlten Hamilton Spritze injiziert. Hierfür wurde die Prostatakapsel unterhalb des linken Vas deferens penetriert, die Spritze 5-6 mm lateral in die Prostata eingeführt und langsam die Tumorzellsuspension injiziert. Zur Verhinderung eines Rückflusses von Tumorzellen wurde, nach Entfernung der Nadel, die Einstichstelle für 60 s mit einem feuchten Wattestäbchen leicht komprimiert.

Sphäroide wurden in einer 96 Ultra-Low Attachment Platte in 100 μ l einer 1:1 Matrigel zu Medium Suspension vorbereitet. Mithilfe einer 1 ml Spritze und einer 20 G Kanüle wurde ein sechs Tage reifer Sphäroid aufgezogen und dieser im Anschluss mit 10-30 μ l der Suspension unter Sichtkontrolle gleichermaßen in den links-anterioren vorderen Prostatalappen injiziert.

Nach der intraprostatichen Injektion wurden die Muskelschicht und die Haut separat mit einem schnellresorbierenden 5/0 Vicryl-rapid Faden verschlossen. Zur Schmerzlinderung erhielten die Mäuse

am Ende der Operation subkutan 4 mg/kg Carprofen und am ersten präoperativen Tag bis zum dritten postoperativen Tag 20 mg/kg Tramadol über das Trinkwasser.

Um das Tumorwachstum nachzuverfolgen, wurden alle Mäuse ab der vierten Woche im zweiwöchigen Rhythmus sonographiert und es wurden ihnen Blutproben für PSA-Analysen entnommen. Abschließend erfolgte 20 Wochen nach Tumorzellinjektion eine CT-Untersuchung. Im Anschluss daran wurden die Mäuse unter Narkose zervikal disloziert und in der Autopsie der Prostatatumor, die Lungen, ein Femur-Knochen, die Leber, aortale Lymphknoten, das Gehirn und die Milz für histologische Analysen entfernt.

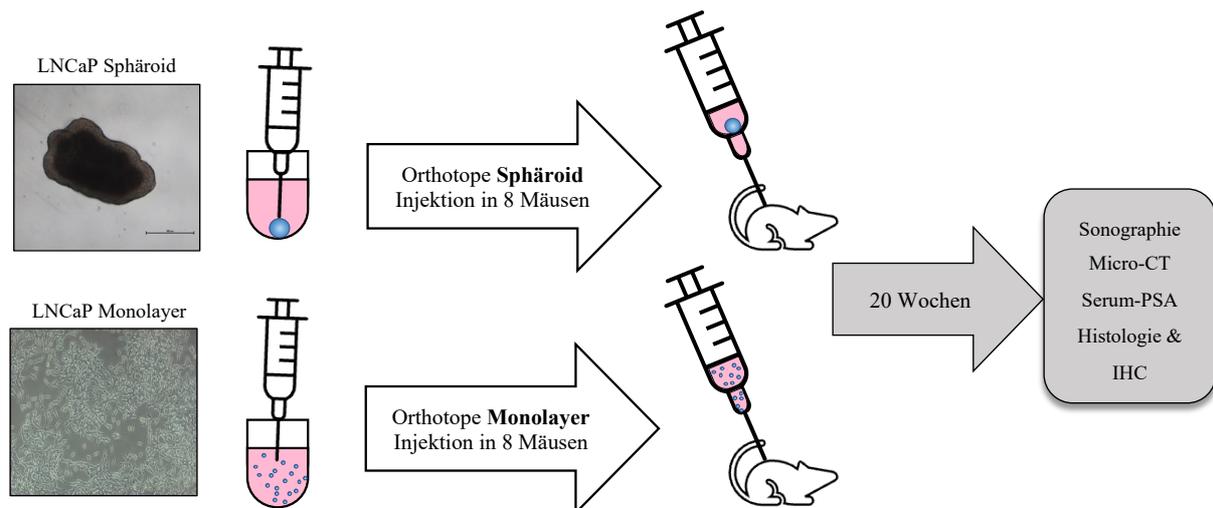


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Methodik des In-vivo-Experiments

3.3.3 Sonographie und Blutentnahme

Eine hochauflösende Ultraschalluntersuchung des Primärtumors wurde ab 4 Wochen nach der Tumorzellimplantation im 14-tägigen Rhythmus mithilfe des Visual Sonics Vevo 2100 Small Animal Ultrasonography Systems durchgeführt. Eine mit 400 ml/min umspülte Kammer von 4 % Isofluran diente der Narkoseeinleitung. Nach vollständiger Sedierung konnten die Mäuse auf die Sonographie-Einrichtung in Rückenlage mit Tapes fixiert werden und über einer Maske die Narkose mit 2 % Isofluran und 200 ml/min Durchfluss fortgesetzt werden. Es folgte eine Rasur des Abdomens und die Auftragung einer Enthaarungscreme. Nach Entfernung der restlichen Haare, konnte das Aquasonic Kontaktgel großzügig in Aprikosen-Größe aufgetragen werden. Nachdem die Prostata im Fokus mit dem Transducer MS400 zentriert wurde, konnte die 3D Erfassung gestartet werden. Ein motorisierter Mechanismus verschob den Ultraschall Kopf über die Haut des Abdomens hinweg und generierte hierbei in regelmäßigen 200 μm Intervallen über eine Länge von 2 cm 2D Aufnahmen der Prostataregion in transversaler Ausrichtung. Sobald die Aufnahmen generiert wurden, konnte die Isofluran Zufuhr unterbunden und die Maus von der Einrichtung entfernt werden.

Im Anschluss erfolgte noch im sedierten Zustand eine retroorbitale venöse Blutentnahme. Mit einer Mikrokapillare aus Glas ließen sich ca. 50-100 µl Blut entnehmen. Hierzu mussten die Halsvenen der Maus durch einen Nackengriff gestaut werden, um so im medialen Augenwinkel, von ventral-kaudal in Richtung des kontralateralen Ohres, bis zum retroorbitalen Sinus einzustechen. Das Blut wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt. Nach vorsichtigem Abtupfen des Auges, wurden die Mäuse schließlich in die Aufwachkammer versetzt und weiter beobachtet. Die Blutentnahme verlief alle zwei Wochen im jeweils anderem Auge.

Die gesammelten Blutproben wurden für 10 Minuten bei 6000 U mit der Zentrifuge Hyspin 16K zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Dieses wurde für die PSA-Bestimmung eingefroren.

Schließlich erfolgte die Berechnung des Tumorumfangs durch die Markierung der Tumorpherimetrie in der Vevo LAB Software.

3.3.4 PSA-Analysen

Die PSA-Analysen wurden durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Hierfür mussten die Serumproben aufgetaut und in spezielle Proben-Röhrchen des Zentrallabors pipettiert werden. Daraufhin mussten die Serumproben mit einer Verdünnungslösung von Roche auf 120 µl aufgefüllt werden. Die Serumproben wurden mittels eines Electro-ChemiLuminescence ImmunoAssay (ECLIA) in einem COBAS 1 Immunoassay System (Roche, Basel, Schweiz) analysiert. Zunächst wurden die Proben mit einem biotinylierten monoklonalen PSA-spezifischen Antikörper als auch einem Ruthenium markierten PSA-spezifischen Antikörper inkubiert. Zu dem gebildeten Sandwich Komplex wurden Streptavidin- markierte Mikropartikel hinzugefügt, die nun an dem Sandwich Komplex via Biotin-Streptavidin Interaktionen banden. Schließlich wurde die Lösung in das Immunoassay System transferiert, in dem die Mikropartikel an den Elektrodenoberflächen durch magnetische Interaktion hafteten. Nach einer Waschung zur Entfernung von ungebundenen Substanzen wurde eine Chemiluminescence durch Anbringung einer Elektrodenspannung induziert, die mit einem Photoelektronenvervielfacher gemessen wurde. Die Sensitivität des Assays betrug 0,03 ng/ml. Die Ergebnisse der PSA-Messungen des Zentrallabors mussten schließlich mit einem Umrechnungsfaktor verrechnet werden:

$$\text{Faktor} = 120 \mu\text{l} / \text{Volumen (Serum)}$$

3.3.5 Computertomographie

Kontrastmittelgestützte Thorax- und Abdomen Computertomographie Aufnahmen wurden durch das Bruker Skyscan Kleintier- CT einmalig am Ende des Experiments angefertigt. Wie in 3.3.3. beschrieben, wurden die Mäuse zunächst in eine mit 400 ml/min umspülte Kammer von 4 % Isofluran

narkotisiert. Unmittelbar nach Sedierung konnte jodhaltiges Kontrastmittel intravenös retroorbital appliziert werden (300 mg Jod /ml und 0,5 µl/g Körpergewicht). Danach wurden die Mäuse in der CT-Einrichtung in Rückenlage fixiert. Unter Atemfrequenzkontrolle wurde während der Untersuchung die Narkotisierung durch eine Maske aufrechterhalten. Nach einem allgemeinen Körperscan zur Identifizierung der Region of Interest (ROI), wurde der CT Scan mit folgenden Einstellungen gestartet: A1 0,5 mm Filter, Staffelung 2, 180° Scanning, 0,7° Schritte, 18 µm Auflösung, Expositionszeit 220 ms pro Aufnahme mit 304 erforderlichen Aufnahmen pro Scan, Quellenstrom 497 µA, Quellenspannung 50 kV. Zur Sichtbarmachung des Primärtumors als auch pulmonaler oder skelettaler Metastasen wurden Aufnahmen des gesamten Thorax, des Beckens und des Abdomens angefertigt. Die CT- Bilder wurden mit einem etablierten Protokoll mithilfe der NRecon Software rekonstruiert. Nach Beendigung des Scans wurden die Mäuse in einem Aufwachkäfig versetzt und beobachtet.

3.3.6 Autopsie

Eine Autopsie wurde 14-20 Wochen nach Tumorzellinjektion zur pathologischen Feststellung von orthotop wachsenden Tumoren und Metastasen durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse unter intraperitoneal applizierter Anästhesie mit 75 mg/kg Ketamin und 15 mg/kg Xylazin in Rückenlage fixiert und das Abdomen rasiert. Nach einer medianen Laparotomie wurden mittels eines Stereomikroskops in 250-facher Vergrößerung der Peritonealraum und die intraperitonealen Organe auf Metastasen untersucht. Dafür wurden die Glandulae vesiculosae, die Harnblase sowie die Prostata sauber dargestellt. Nach Freilegung des gastrointestinalen Traktes und Darstellung der Vena cava inferior, wurde mit einer Kanüle aus dieser 1 ml Blut entnommen. Bei Vorliegen eines Primarius wurden der Prostatatumor und sichtbare Lymphknoten reseziert. Zudem waren die Milz, die Leber, die Lungen, das Gehirn und ein Tibia-Knochen Gegenstand histologischer Evaluationen. Alle Präparate wurden in 4%- PFA über Nacht fixiert. Die Knochenpräparate wurden 2 bis 4 Tage in einer Entkalkungslösung enthärtet. Am Ende der Autopsie erfolgte zur Sicherheit zusätzlich eine zervikale Dislokation der Tiere.

3.3.7 Anfertigung von Organschnitten

Nach erfolgter Fixierung der Organe in 4 %- PFA und Erweichen der Knochenpräparate wurden die organenthaltenden Kassetten zur automatischen Dehydrierung im Tissue-Tek VIP 5 Jr. platziert. Am nächsten Tag folgte die Einbettung in Paraffin wie in 3.2.12 beschrieben. Von diesen FFPE-Blöcken wurden für histologische und immunhistochemische Analysen mittels eines Rotationsmikrotoms 4 µm dünne Schnitte angefertigt und auf Superfrost Objektträgern aufgezogen. Alle Präparate wurden zunächst histologisch mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und morphologisch auf das Vorhandensein

von Metastasen analysiert. Die Primärtumore und Metastasen wurden anschließend weiter immunhistochemisch charakterisiert wie in 3.2.13 beschrieben.

3.3.8 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Im ersten Schritt der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Paraffinschnitte in Xylol deparaffiniert (3 x 10 Minuten). Daraufhin wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 99%- und 3 x 70%- Ethanol) rehydriert, in Aqua dest. versetzt und im nächsten Schritt in Mayer's Hämalaun für 10 Minuten inkubiert. Nach einer Spülung in drei mit Wasser gefüllten Küvetten erfolgte die Differenzierung mit HCl- Alkohol durch dreimaliges Eintauchen in die HCl- Küvette. Im Anschluss wurden die Präparate für 10 Minuten in fließendem kaltem Wasser gebläut, wodurch die Zellkerne sich blauviolett färbten. Daraufhin konnten die Schnitte mit 1 % Eosin für 30 Sekunden tingiert und danach in Wasser gespült werden. Darauffolgend wurden die Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%- 100%- 100%- 100%- Ethanol) und dreimalig Xylol dehydriert (je 2 Minuten). Letztlich konnten die Objektträger mit einem Deckglas und Entellan eingedeckt werden.

3.4 Statistik

Die statistischen Analysen wurden unter Verwendung von IBM SPSS Statistics 27 ausgeführt. Hierbei wurden für die Auswertung des sonographischen Tumorumfanges als auch der Entwicklung der PSA-Werte und der immunhistochemischen Expressionen des Androgenrezeptors und Ki-67 Mann-Whitney-U-Tests für zwei unabhängige Stichproben durchgeführt. Weiterhin wurden die Verdopplungszeiten mit Mann-Whitney-U-Tests auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Die zwei unabhängigen Stichproben waren zum einen die Kontrollgruppe mit Inokulation einer Einzelzellsuspension aus einer Monolayerkultur und zum anderen die Experimentalgruppe mit Sphäroid-Injektion. Ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ wurde angenommen. Zudem konnte durch eine umgekehrte Überlebenskurve der kumulative Anteil der Mäuse mit Tumor über die Zeit grafisch dargestellt werden. Darüber hinaus konnte mit einer linearen Korrelationsanalyse der Zusammenhang zwischen Tumorprogression und dem PSA-Wert ermittelt werden. Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse wurden mit GraphPad Prism 9 realisiert und die schematischen Abbildungen wurden mit Microsoft® PowerPoint (Version 16.73) und Adobe Acrobat Illustrator (Version 27.9.0) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 In-vitro-Vorversuche

4.1.1 LNCaP Verdopplungszeit

Die Verdopplungszeit von LNCaP-Monolayer war 60 Stunden, während sich die durchschnittliche Generationszeit in Sphäroiden mit zunehmender Anfangsgröße verlängerte (Abb. 5). Sphäroide mit einer Anfangszellzahl von 5000 LNCaP-Zellen verdoppelten ihre Anzahl an Zellen nach 77 Stunden, während Sphäroide mit einer initialen Zellzahl von 10000 nach 97 Stunden eine Verdopplung erreichten. Die größten Sphäroide, welche zu Beginn aus 25000 Zellen entstanden, zeigten dementsprechend die längste Generationszeit von 150 Stunden.

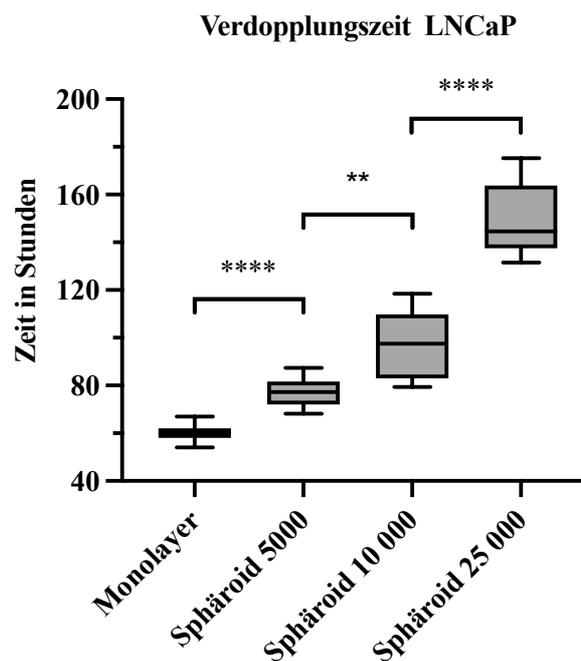


Abbildung 5: Verdopplungszeit LNCaP in Monolayer und Sphäroiden unterschiedlicher Größe (**** $\triangleq p < 0,0001$; ** $\triangleq p < 0,01$)

4.1.2 Wachstums- und Viabilitätsanalysen von LNCaP Sphäroiden

Sphäroide aus LNCaP-Zellen wiesen über zehn Tage ein stetiges Wachstum auf. Zwei Tage nach initialer Kultivierung verringerte sich die Gesamtzellzahl in wenigen Sphäroiden. Alle Sphäroide erreichten ihre größte totale Zellzahl nach zehn Tagen (Abb. 6). Je höher die Anfangszellzahl, desto höher war auch die final errechnete Anzahl an LNCaP-Zellen. Dabei erreichten Sphäroide mit initial 25000 Zellen eine Zellzahl von im Durchschnitt 77000 nach zehn Tagen, während Sphäroide mit 10000 Zellen auf eine Größe von 59000 nach zehn Tagen anwuchsen. Die kleinsten Sphäroide mit 5000 LNCaP-Zellen erreichten eine totale Anzahl von 44000 Zellen nach zehn Tagen.

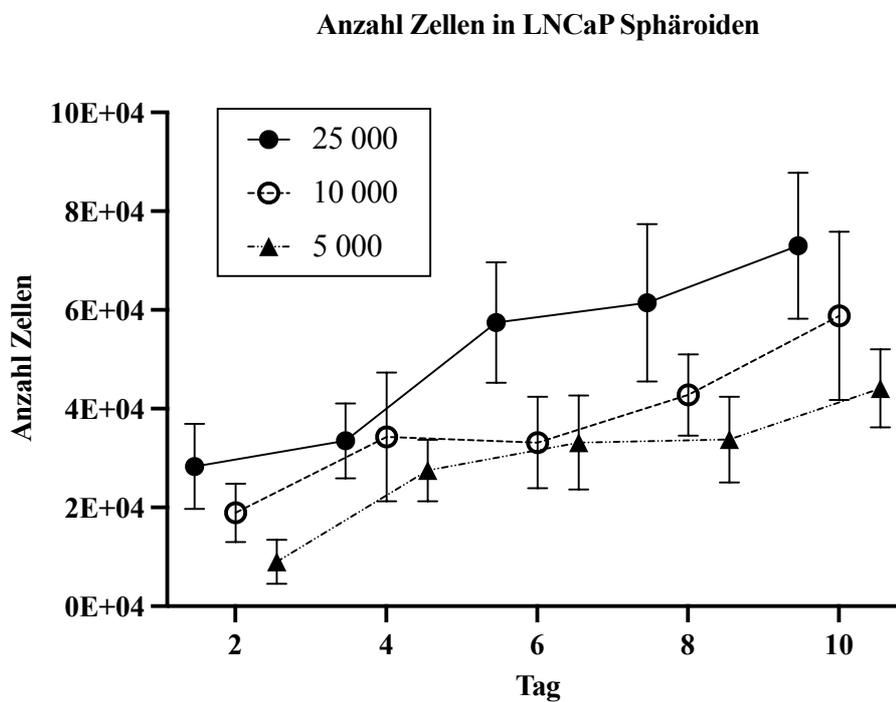


Abbildung 6: Anzahl Zellen in LNCaP Sphäroiden

Der Lebendzellanteil in allen drei Sphäroid-Gruppen variierte zwischen 50 % und 85 % (Abb. 7). Die Zellviabilität in der Gruppe der 25000 und 5000 Sphäroide nach sechs Tagen war mit über 70 % im Durchschnitt am höchsten innerhalb der zehn Tage. Während Sphäroide mit einer Anfangszellzahl von 10000 eine geringe Abnahme der Zellviabilität von im Mittel 75 % auf 65 % erkennen ließen, konnte dieser Abfall für die anderen Gruppen nicht eruiert werden.

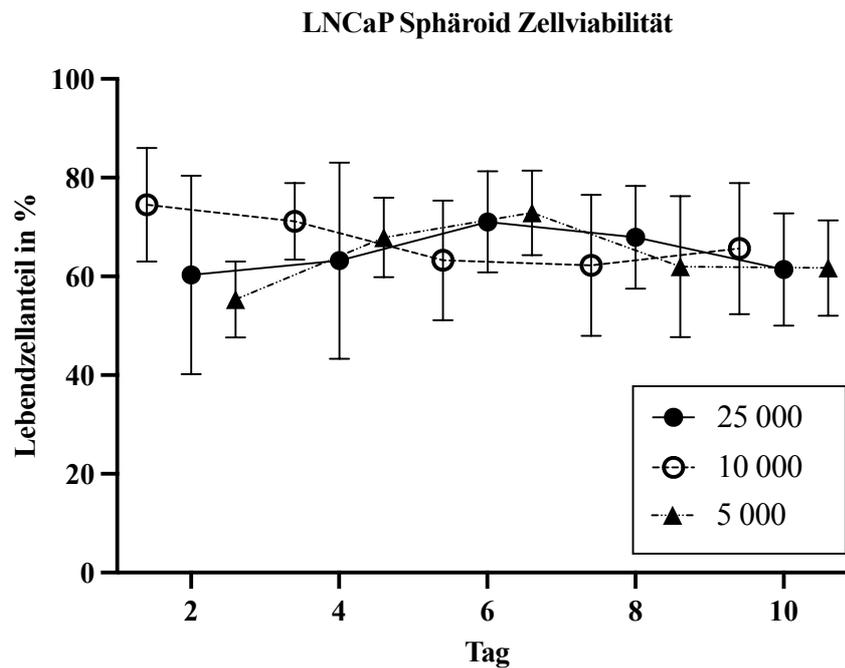


Abbildung 7: LNCaP Sphäroid Zellviabilität

4.1.3 Morphologische Veränderungen von LNCaP Sphäroiden

Die Kultivierung von 25000 LNCaP-Zellen in nicht-adhärenenten Kulturplatten führte nach einem Tag zur Etablierung kleinerer Zellnester. Nach zunehmender Aggregation war nach drei Tagen ein zusammenhängendes dreidimensionales Zellkonstrukt in Form eines Sphäroids zu erkennen. Bis zum zehnten Tag konsolidierte der Sphäroid bis zu einer konstanten Größe von ca. 1000 μm .

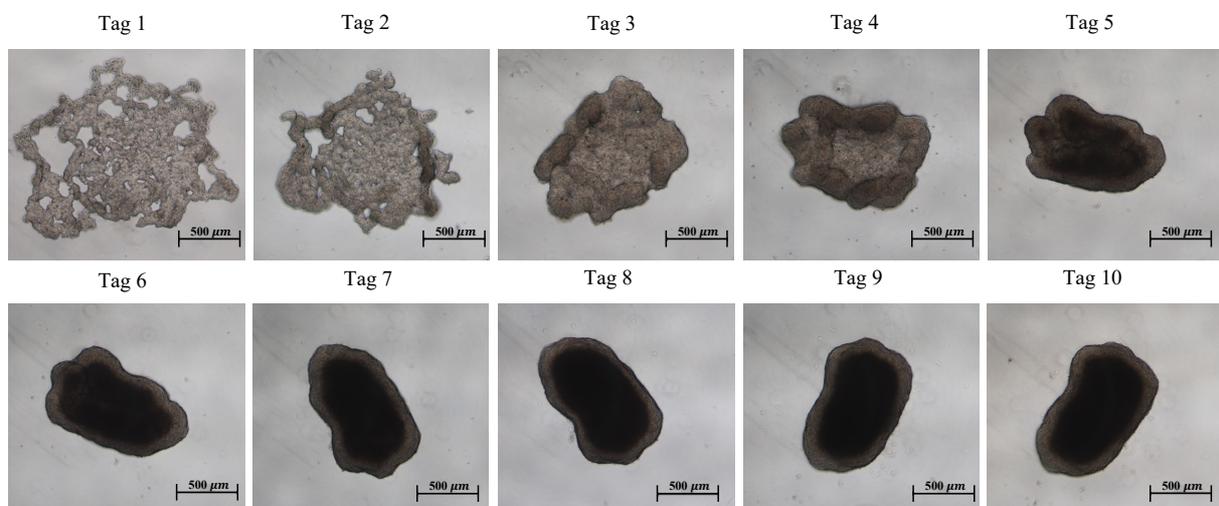


Abbildung 8: Morphologische Veränderungen von LNCaP Sphäroiden in vitro

4.1.4 Immunhistochemische Charakterisierung von LNCaP Sphäroiden in vitro

Die immunhistochemischen Analysen der LNCaP-Sphäroide in vitro offenbarten ein Prostatakarzinom-typisches Marker-Expressionsmuster (Abb. 9). Die Zellen der äußeren proliferativen Zone des Sphäroids exprimierten mehr Ki-67 und Androgenrezeptor als in der Transformationszone und im nekrotischen Kern. Die Expression von E-Cadherin, Cytokeratin 8 und AMACR war in der Proliferationszone und Übergangszone gleichermaßen zu erkennen. Darüber hinaus waren Vimentin und Cytokeratin 5 in allen in LNCaP-Sphäroiden negativ.

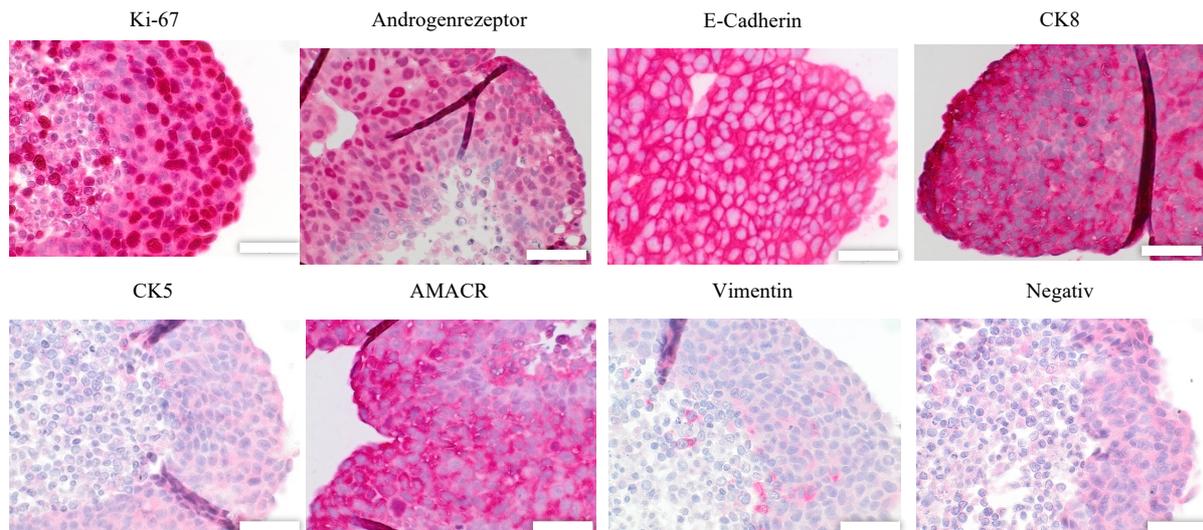


Abbildung 9: Immunhistochemische Charakterisierung von LNCaP Sphäroiden in vitro. Maßstab = 50 μm

4.1.5 Integrität von LNCaP Sphäroiden post injectionem

Eine nicht zu vernachlässigende Problematik der intraprostatistischen Injektion von Sphäroiden war die Frage der Integrität der dreidimensionalen Struktur der Sphäroide nach Injektion durch die 20 G Kanüle. Lichtmikroskopisch konnte die morphologische Unversehrtheit der sphäroidalen Struktur bewiesen werden (Abb. 10).

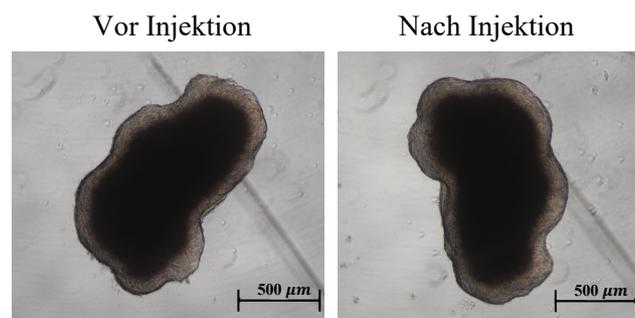


Abbildung 10: Integrität von LNCaP Sphäroiden post injectionem in vitro

4.2 In-vivo-Ergebnisse

4.2.1 Entwicklung von orthotopen Tumoren und Metastasen

Von insgesamt acht operierten Versuchstieren, welche konventionell mit LNCaP-Monolayer Zellen transplantiert wurden, konnten an vier Mäusen Tumore detektiert werden (Tabelle 2). Dabei gingen aus zwei Prostatakarzinomen jeweils Lungen- und Lymphknotenmetastasen hervor. Eine Sphäroid-Inokulation in acht Mäusen resultierte in einer Tumorentwicklung in vier Mäusen. Aus drei dieser Tumore entsprangen Lungen- und Lymphknotenmetastasen.

| | Tumor | Lungenmetastasen | Lymphknotenmetastasen |
|--------------------------|-------|------------------|-----------------------|
| LNCaP Monolayer (n=8) | n = 4 | n = 2 | n = 2 |
| LNCaP Sphäroid (n=8) | n = 4 | n = 3 | n = 3 |

Tabelle 2: Tumorentwicklung und Metastasierung

Die ersten detektierbaren Tumore waren bereits nach vier Wochen in der Gruppe der Sphäroide zu identifizieren (Abb. 11). Hier konnten bei drei Mäusen Tumore festgestellt werden, während in der Monolayer-Injektions-Gruppe nach vier Wochen keine Tumore nachgewiesen werden konnten. Diese waren erst nach sechs bzw. zehn Wochen detektierbar. Eine detektierbare Tumorprogression von Sphäroiden konnte zwei bzw. sechs Wochen früher als in Monolayer-Tumoren festgestellt werden. Nach vierzehn Wochen zeigte eine weitere Maus in beiden Gruppen eine Tumorentwicklung.

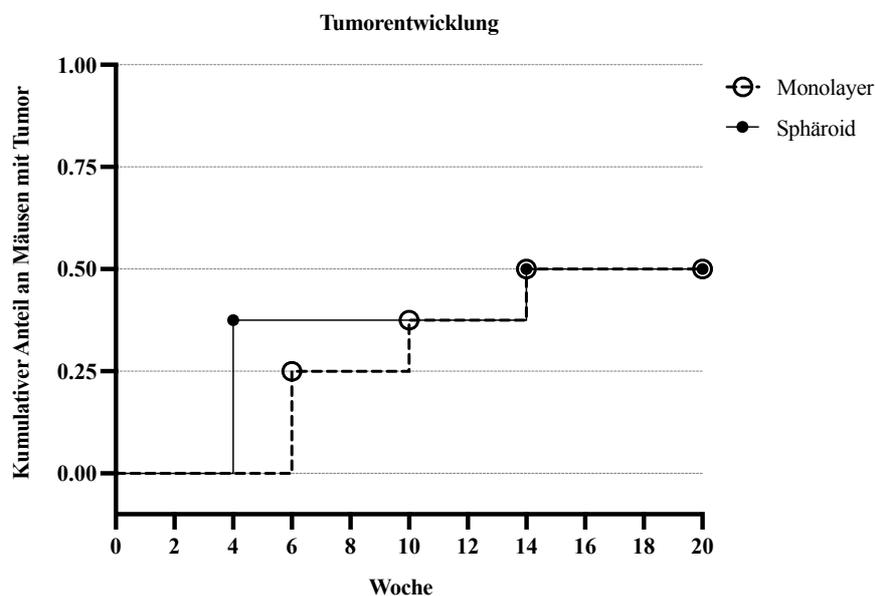


Abbildung 11: Sequenz der Tumorentwicklung

Die orthotope Sphäroid-Transplantation mithilfe einer 20 G Kanüle gelang unter mikroskopischer Kontrolle. Ein Rücklauf von injizierten Zellen bzw. Matrigel konnte nicht identifiziert werden. Die prostatiscche Kapsel wurde in zwei Fällen bei Inokulation von Sphäroiden rupturiert (25%), woraufhin eine Inokulation in den kontralateralen rechts-anterioren Prostatalappen erfolgte. Der intraoperative Situs (Abb. 12) visualisiert exemplarisch die erfolgreiche intraprostatiscche Implantation eines LNCaP-Sphäroiden (grüner Pfeil). Zu erkennen sind die Glandulae vesiculosae (Gv), die Glandulae praeputiales (Gp), die Harnblase (Bl), die Nieren (Ni) und der links-anteriore Prostatalappen (Pr). Nach zwanzig Wochen proliferierte der implantierte Sphäroid zu einem großen Tumor (Tu) mit Ausbildung von Lymphknotenmetastasen (Lk). Ebenso waren nach Monolayer-Injektionen makroskopisch Tumorentwicklungen in der Autopsie zu identifizieren, welche exemplarisch im rechten Bild dargestellt sind.

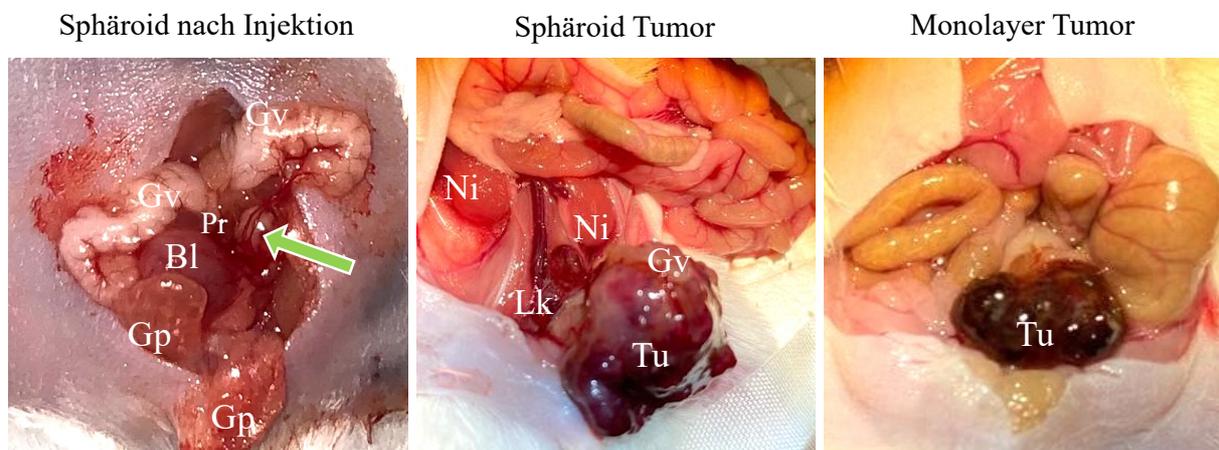


Abbildung 12: Intraoperativer Situs nach intraprostatisccher Injektion eines Sphäroids und intraoperativer Situs nach 20 Wochen mit Ausbildung eines Tumors (Tu) nach Sphäroid und Monolayer-Implantation (10-fache Vergrößerung).

4.2.2 PSA-Werte im Verlauf der Tumorprogression

Die PSA-Werte in Sphäroid-Tumoren lagen zwischen 0,11 ng/ml und 238,29 ng/ml, während sich der Wertebereich von Monolayer-Tumoren zwischen 0,27 ng/ml und 260 ng/ml erstreckte (Abb. 13). Bereits vor sonographischer Detektion von soliden Tumoren konnte die Analyse der PSA-Werte die Entwicklung eines Prostatakarzinoms nachweisen. Beispielsweise konnte an zwei Mäusen nach Monolayer-Inokulation nach vier Wochen eine leichte Erhöhung des PSA-Werts auf 3,52 ng/ml und 1,32 ng/ml gemessen werden, allerdings ohne sonographische Darstellung eines Prostatakarzinoms. Auf der anderen Seite wiesen fünf Mäuse nach orthotoper Sphäroid-Transplantation bereits nach vier Wochen erhöhte PSA-Werte auf, von denen drei im selbem Follow-Up sonographisch Prostatakarzinome bildeten. Die restlichen zwei Mäuse der Sphäroid-Gruppe zeigten im gesamten Beobachtungszeitraum leicht erhöhte PSA-Werte unter 1 ng/ml, wobei eine Maus ein Prostatakarzinom entwickelte. Ein Versuchstier der Monolayer-Gruppe zeigte erst nach vierzehn Wochen einen PSA-Anstieg auf 7,35 ng /ml, bei dem im Verlauf ein Prostatakarzinom detektiert wurde. In den darauffolgenden sechs Wochen stiegen die PSA-Werte dieses Versuchstieres bis auf 230 ng/ml an. In Woche vierzehn waren die PSA-Werte nach intraprostatischer Sphäroid- Injektion mit einem Mittelwert von 88,75 ng/ml deutlich höher als nach Monolayer-Injektion mit im Mittel 23,15 ng/ml.

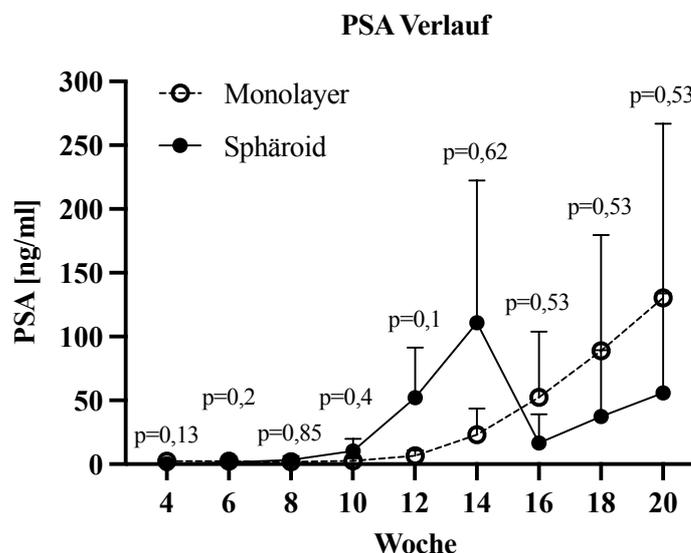


Abbildung 13: PSA-Anstieg im Verlauf der Tumorprogression

Bei Betrachtung des PSA-Anstiegs im Verlauf der Tumorprogression (Abb. 13) sticht der abrupte Abfall des PSA-Anstiegs nach Woche vierzehn hervor. Die Erklärung hierfür liefert die Analyse der individuellen PSA-Verläufe der Mäuse (Abb. 14). Diese illustriert den Abbruch zweier PSA-Erhebungen nach Woche vierzehn in der Gruppe der Sphäroide, da hier zwei Mäuse Abbruchkriterien erreicht hatten und für weitere Analysen somit nicht berücksichtigt werden konnten. Überdies wird hier deutlich, dass die höchsten PSA-Werte in Sphäroid-Tumoren mit 238 ng/ml und 168 ng/ml bereits nach vierzehn Wochen erreicht wurden, während die Spitzen-PSA-Werte von 260 ng/ml und 230 ng/ml der Monolayer-Gruppe nach zwanzig Wochen gemessen wurden.

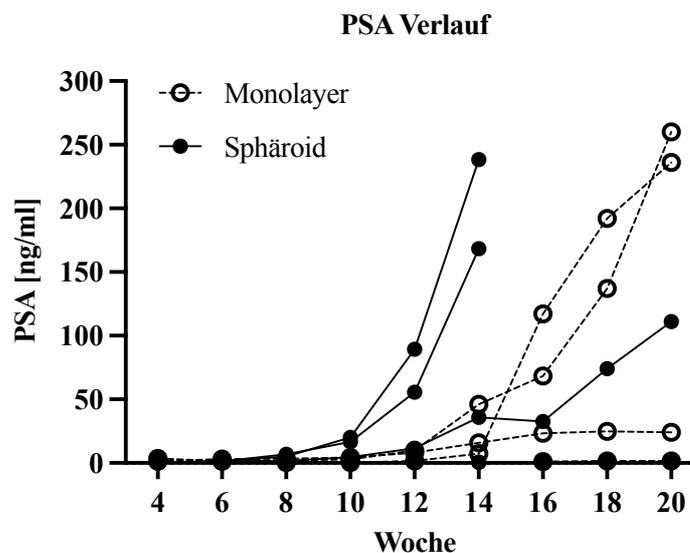


Abbildung 14: Individueller PSA-Verlauf der Mäuse

4.2.3 Sonographische Tumorprogression und CT-graphische Detektion von Metastasen

Während der Sonographie konnten wichtige Strukturen wie der Darm, die Hoden und Nebenhoden, die Vasa deferentia und die Harnblase sicher von der Prostata differenziert werden. Das lokale Tumorwachstum konnte an allen tumortragenden Mäusen mittels Ultraschall visualisiert werden (Abb. 17B).

Die Primärtumore wuchsen rasch und erreichten nach vierzehn Wochen ein mittleres Tumolvolumen von 766 mm^3 in Sphäroid-Tumoren und 55 mm^3 in Monolayer-Tumoren, bzw. 835 mm^3 und 850 mm^3 nach zwanzig Wochen (Abb. 15). Die Größe der Sphäroid-Tumoren lag zwischen $5,82 \text{ mm}^3$ und 2041 mm^3 , während sich der Wertebereich von Monolayer-Tumoren zwischen $7,71 \text{ mm}^3$ und 2395 mm^3 erstreckte. Nach vier Wochen waren die ersten sonographisch detektierbaren Tumore der Sphäroid-Gruppe mit einem Tumolvolumen von 5 mm^3 bis 10 mm^3 zu erkennen. Zwei dieser Tumore proliferierten stark exponentiell und erreichten bereits nach vierzehn Wochen Volumina von ca. 700 mm^3 und 2041 mm^3 . Die dritte Maus mit einer frühen Tumordetektion erreichte eine Tumorgöße von über 700 mm^3 vier Wochen später.

Auf der anderen Seite konnten die ersten Monolayer-Tumore nach sechs Wochen mit einem Tumolvolumen von 8 mm^3 bzw. 13 mm^3 und nach zehn Wochen mit einer Größe von 9 mm^3 detektiert werden. Die zuerst detektierten Tumore proliferierten weniger exponentiell als Sphäroid-Tumore und erzielten nach zwanzig Wochen eine Größe von 750 mm^3 bzw. 220 mm^3 (Abb. 16). Der dritte Tumor mit einem Anfangsvolumen von 9 mm^3 proliferierte stark von einem Volumen von ca. 30 mm^3 in Woche vierzehn auf ca. 1000 mm^3 zwei Wochen später. Dieser entwickelte sich zudem zum größten Tumor in der Gruppe der Monolayer mit 2395 mm^3 .

Nach vierzehn Wochen entwickelte jeweils eine Maus beider Gruppen ein Prostatakarzinom mit einem Volumen von ca. 10 mm^3 . Diese erreichten lediglich eine Größe von 14 mm^3 bzw. 35 mm^3 im Beobachtungszeitraum.

Die individuelle Analyse der Tumorumfänge (Abb. 16) verdeutlicht, gleichermaßen wie die individuellen PSA-Verläufe in Abb. 14, den Abbruch der Beobachtungen zweier Mäuse nach Woche vierzehn in der Sphäroid-Gruppe. Diese Mäuse trugen zu diesem Zeitpunkt die größten Prostatakarzinome mit 700 mm^3 und 2041 mm^3 . Im Vergleich dazu maßen die beiden größten Monolayer-Tumore 130 mm^3 und 50 mm^3 zu diesem Follow-Up Zeitpunkt. CT-graphisch konnten in diesem Experiment keine Metastasen zweifelsfrei differenziert werden (Abb. 17A).

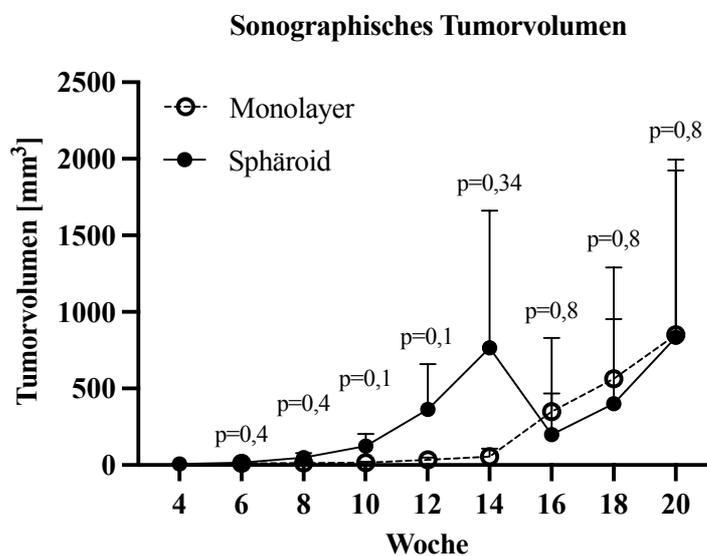


Abbildung 15: Sonographisches Tumolvolumen im zeitlichen Verlauf

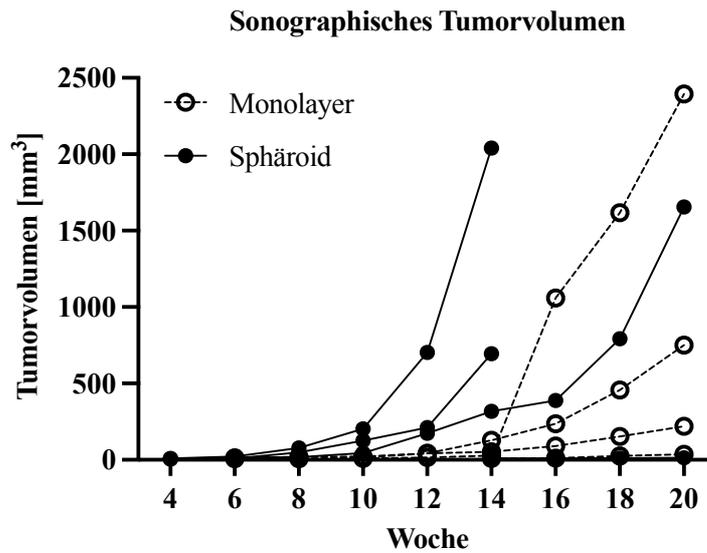


Abbildung 16: Individuelle sonographische Tumorprogression

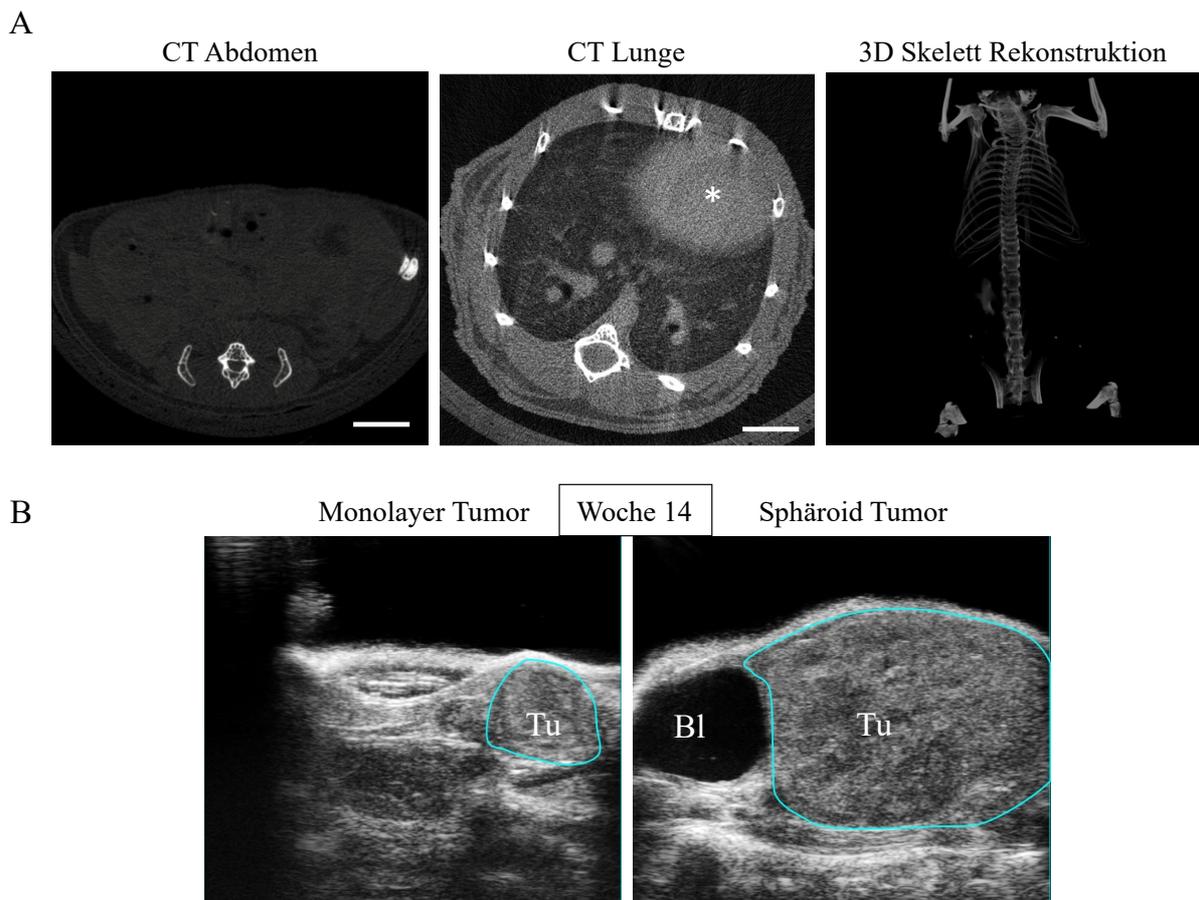


Abbildung 17: Detektion von Primärtumoren und Metastasen. A) Repräsentative Abdomen- und Lungen μ CT-Querschnittsbilder [113]. Das Herz ist mit einem Sternchen (*) markiert. Repräsentative 3D Skelett Rekonstruktion. Maßstab= 3 mm. B) Exemplarische sonographische Darstellung eines Monolayer Tumors (50 mm^3) und Sphäroid Tumors (700 mm^3) nach 14 Wochen. Zu erkennen ist zudem die gefüllte Harnblase (Bl).

4.2.4 Tumor- und PSA-Verdopplungszeiten

Das Tumolvolumen von LNCaP-Sphäroiden verdoppelte sich im Schnitt nach 10,5 Tagen, während Prostatakarzinome von Monolayern nach 19,5 Tagen ein verdoppeltes Tumolvolumen präsentierten (Abb. 18). Die PSA-Verdopplungszeit in Mäusen mit Sphäroid-Tumoren lag im Mittel bei 9 Tagen, wohingegen sie bei Mäusen mit Monolayer-Tumoren ca. 16 Tage betrug (Abb. 18).

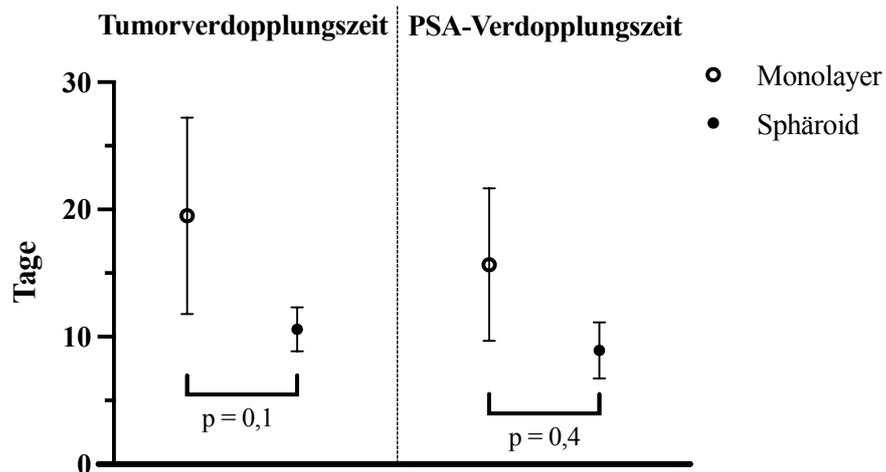


Abbildung 18: Verdopplungszeiten von Primärtumoren und der PSA-Werte in Tagen

4.2.5 Lineare Korrelationsanalyse des Tumolvolumens und des PSA-Wertes

Die Tumorumfänge von Monolayer- und Sphäroid-Tumoren zeigten einen starken positiven linearen Zusammenhang mit dem PSA-Wert (Abb. 19; $r^2 = 0,82$ bzw. $r^2 = 0,74$ und $p < 0,0001$).

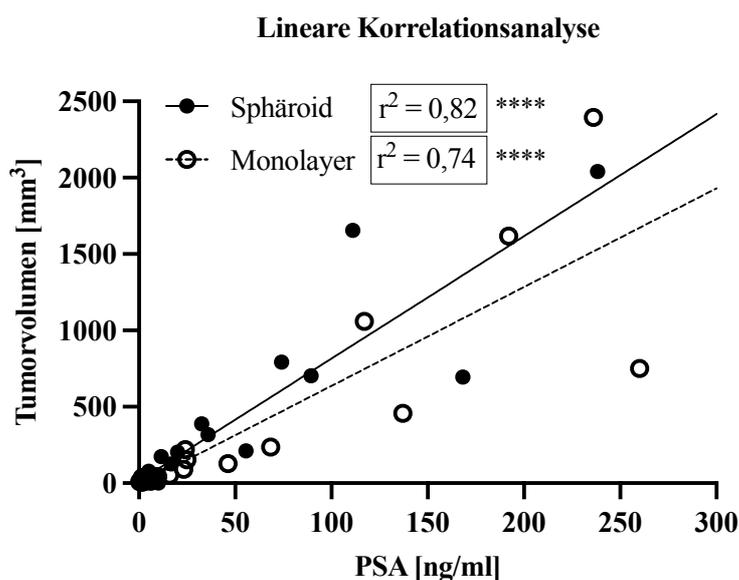


Abbildung 19: Lineare Korrelationsanalyse des Tumolvolumens und des PSA-Wertes (**** $\triangleq p < 0,0001$).

4.2.6 Histologie und immunhistochemische Färbung der Primärtumore und Metastasen

Die histologische Auswertung der Primärtumore nach Hämatoxylin und Eosin Färbung offenbarte eine solide Tumormasse mit gelegentlich zentralen Nekrosezonen und intratumoralen Hämorrhagien (Abb. 20). Die pleomorphen Tumorzellen präsentierten einen vergrößerten Zellkern und prominente Nucleoli sowie eine hohe Kern-Plasma-Relation. Zudem konnten zahlreiche mitotische Figuren erkannt werden. In der Tumorperipherie wurde ein infiltratives Tumorwachstum und teilweise die Ausbildung einer pseudofibrotischen Kapsel beobachtet. Bei kleineren Primärtumoren waren oft noch gesunde Maus-Prostataadrüsen zu erkennen (Abb. 20), während größere Tumore die Mausprostate komplett verdrängt hatten. Tumormetastasen der Lungen präsentierten sich in Form multipler Tumorzellnester aus wenigen Zellen, welche sich teils auch zu tubulären oder sphärischen Strukturen organisierten. Dabei erreichten die größten Lungenmetastasen einen Durchmesser von ca. 200 μm . Auch hier stellten sich die Tumorzellen als große pleomorphe Zellen mit prominentem Zellkern dar. Lymphknotenmetastasen bestanden aus einer soliden kohäsiven Tumormasse und nekrotischen Zonen. Die Histoarchitektur aus Cortex, Paracortex und Medulla war in den meisten Fällen noch gut differenzierbar. Zudem war die Lymphknotenkapsel mit Randsinus intakt. Auch diese Tumorzellen waren pleomorph mit deutlich vergrößertem Zellkern und hohem Kern-Plasma-Verhältnis. Histomorphologische Unterschiede zwischen den Gruppen konnten weder bei den Primärtumoren noch bei den Tumormetastasen ausgemacht werden.

Hämatoxylin und Eosin Färbung

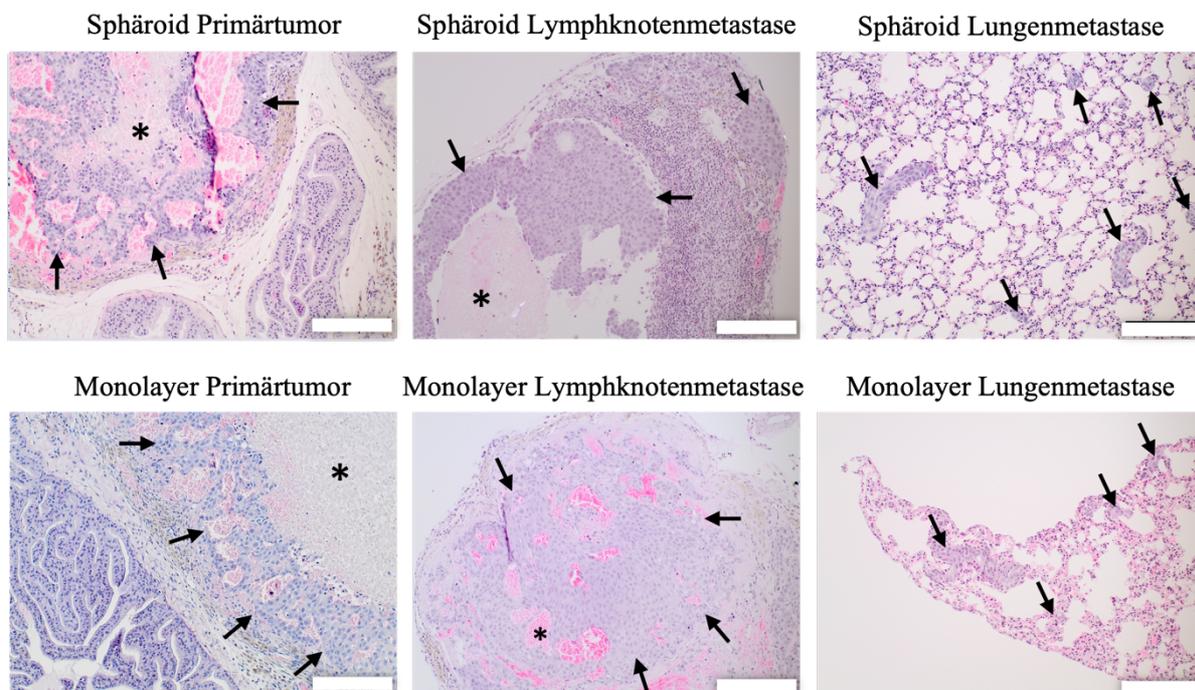


Abbildung 20: Exemplarische histologische Evaluation (H&E-Färbung) der Sphäroid- und Monolayer-Primärtumore und Metastasen. Tumor- und Metastasen sind mit Pfeilen markiert. Zentrale Nekrosen sind mit einem Sternchen (*) markiert. Maßstab= 200 μm

Die Primärtumore zeigten eine ausgeprägte Kernfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Androgenrezeptors (Abb. 21-22). Die Androgenrezeptorexpression war zudem zytoplasmatisch zu detektieren. Darüber hinaus war eine starke Expression des Intermediärfilament- Proteins Cytokeratin 8 und ein negatives Signal für das Cytokeratin 5 zu erkennen. Ferner war E-Cadherin und AMACR ubiquitär exprimiert. Daneben waren positive Vimentin Signale im Stroma zu identifizieren.

Neben den Primärtumoren zeigten auch die Lungen- und Lymphknotenmetastasen die charakteristischen Marker Expressionen (Abb. 23-26). Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich ihrer Expression konnten nicht ausgemacht werden. Darüber hinaus zeigte das gesunde Lungenparenchym ebenfalls eine geringe zytoplasmatische Bindung des Androgenrezeptor-Antikörpers.

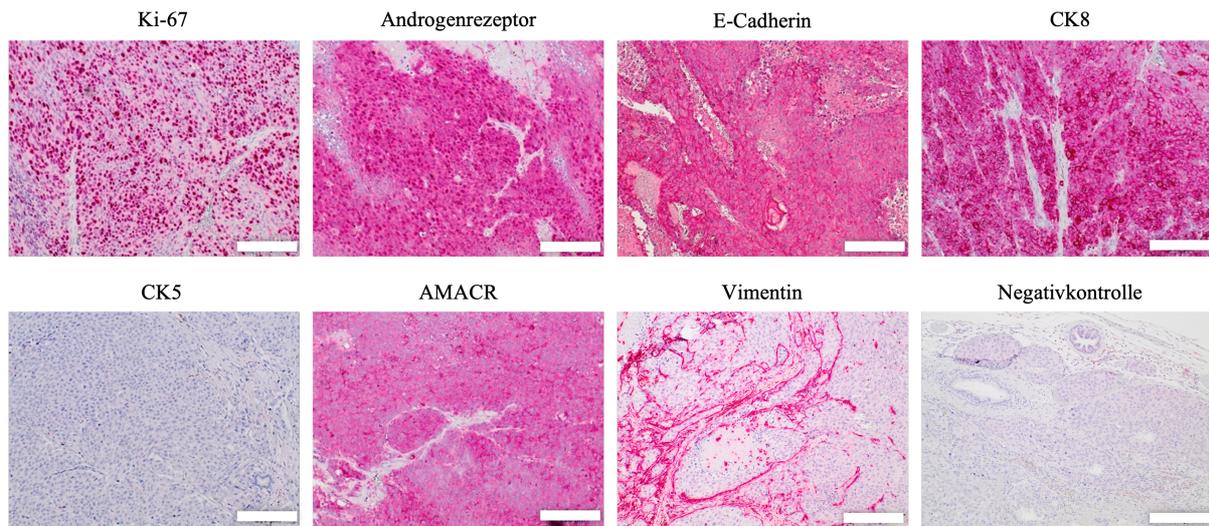
LNCaP Sphäroid Primärtumor

Abbildung 21: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin im Primärtumor eines LNCaP Sphäroids. Maßstab= 200 μm

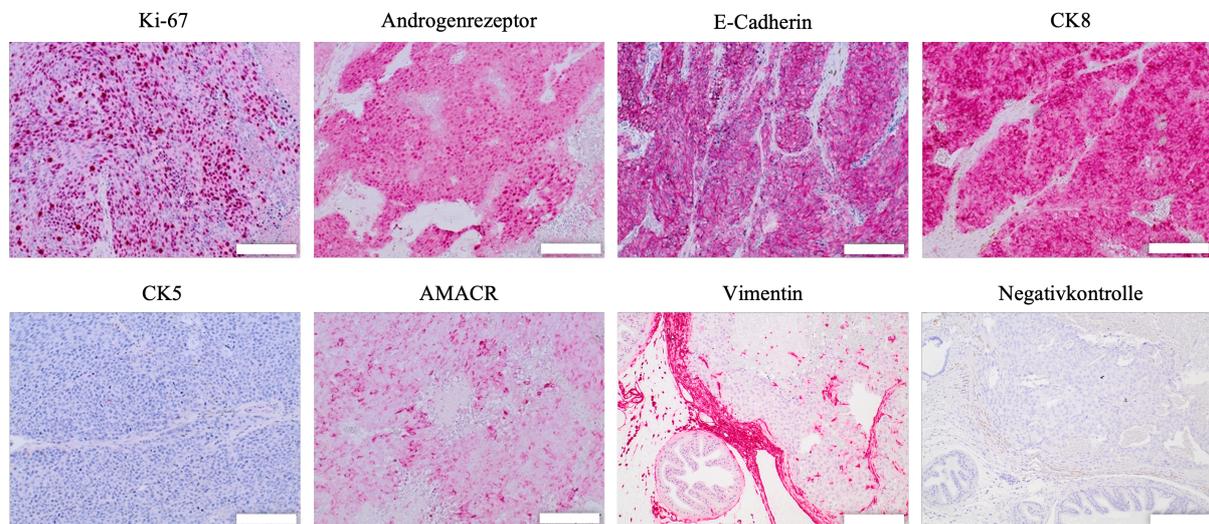
LNCaP Monolayer Primärtumor

Abbildung 22: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin im Primärtumor einer LNCaP Monolayerkultur. Maßstab= 200 μm

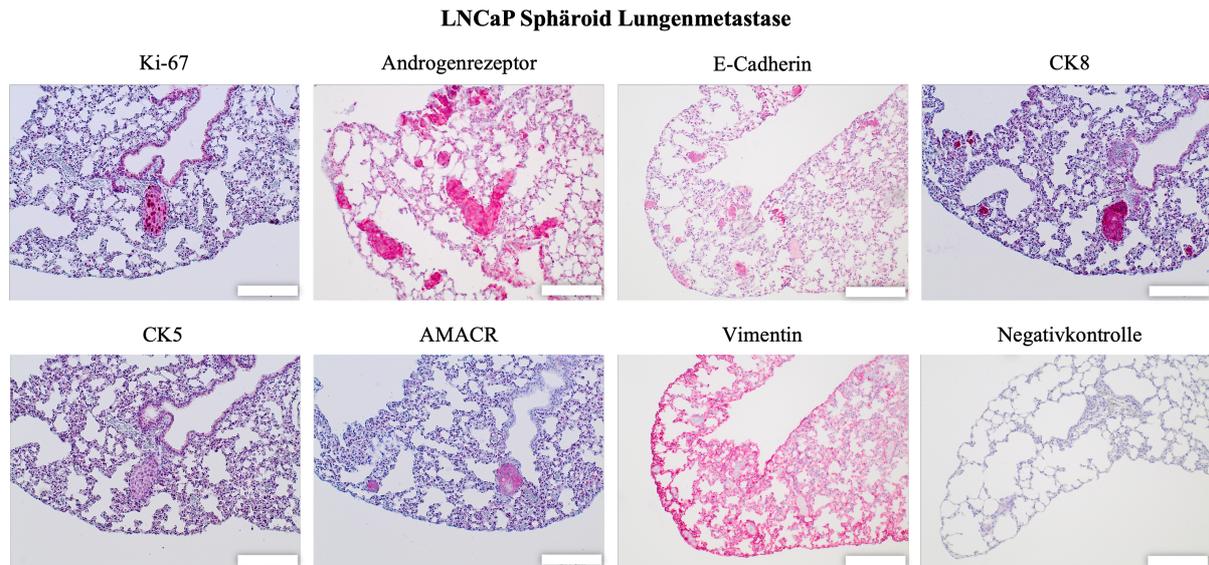


Abbildung 23: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin einer Lungenmetastase eines LNCaP Sphäroids. Maßstab= 200 μ m

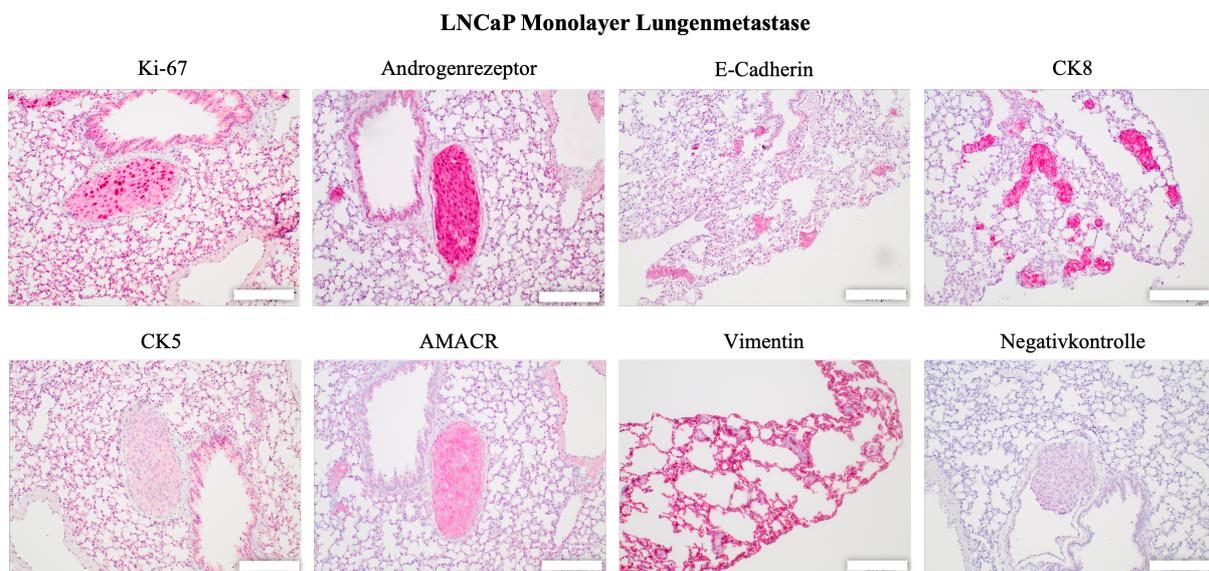


Abbildung 24: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin einer Lungenmetastase einer LNCaP Monolayerkultur. Maßstab= 200 μ m

LNCaP Sphäroid Lymphknotenmetastase

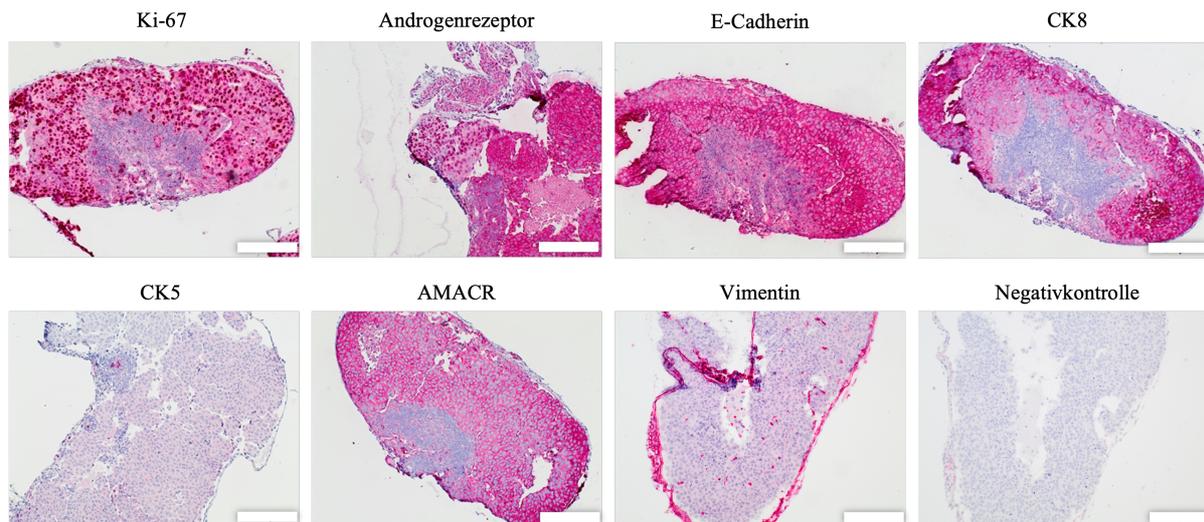


Abbildung 25: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin einer Lymphknotenmetastase eines LNCaP Sphäroids. Maßstab= 200 μ m

LNCaP Monolayer Lymphknotenmetastase

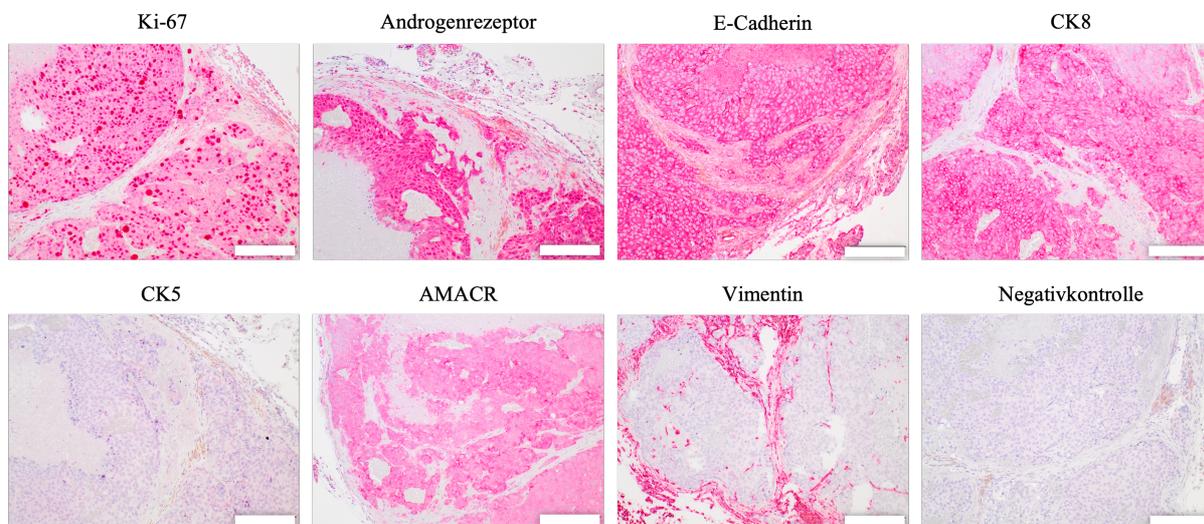


Abbildung 26: Exemplarische immunhistochemische Darstellung der Expression von Ki-67, AR, E-Cadherin, CK8, CK5, AMACR und Vimentin einer Lymphknotenmetastase einer LNCaP Monolayerkultur. Maßstab= 200 μ m

4.2.7 Immunhistochemische Analysen der Ki-67 und Androgenrezeptor Expression

Der Anteil an Androgenrezeptor exprimierenden Tumorzellen war in Sphäroid-Primärtumoren mit über 60 % im Mittel höher als in Monolayer Primärtumoren mit ca. 45 % (Abb. 27). In Lungenmetastasen von Monolayer-Tumoren demonstrierten 60 % der Tumorzellen eine starke Kernfärbung des Androgenrezeptors. Lungenmetastasen von Sphäroid-Tumoren zeigten im Schnitt eine um 10 % höhere nukleäre Expression des Androgenrezeptors im Vergleich zu Monolayer-Metastasen. Die Expression in Lymphknotenmetastasen der Sphäroid-Gruppe lag ebenso wie in Monolayer-Metastasen bei ca. 65 %.

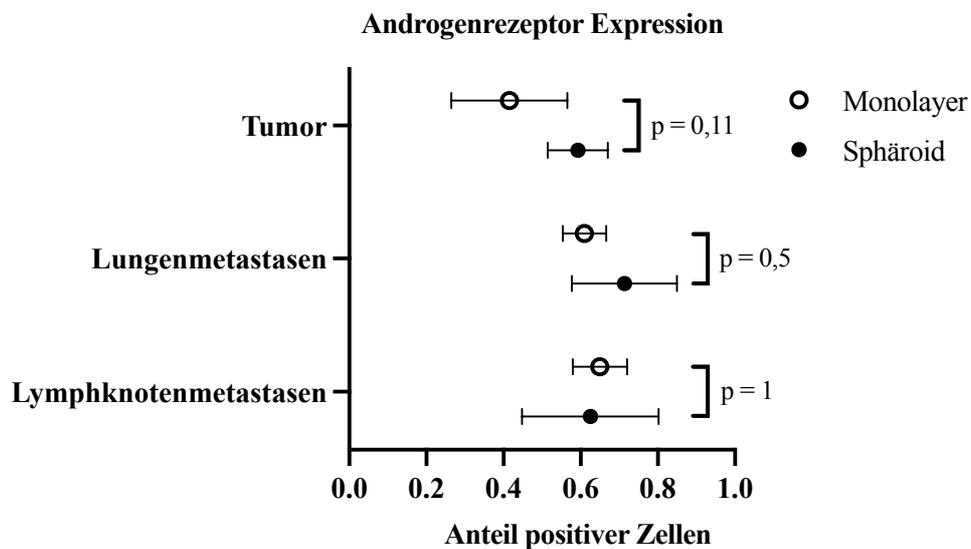


Abbildung 27: Androgenrezeptor Expression in LNCaP-Primärtumoren und Metastasen

Die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 war im Schnitt in allen Präparaten der Sphäroid-Gruppe höher als in der Monolayergruppe (Abb. 28). Dabei war der Anteil positiver Zellen in Sphäroid-Primärtumoren mit ca. 60 % im Mittel 20 % höher als in Monolayer-Primärtumoren. Weiterhin war der Anteil an positiven Kernfärbungen in Lungenmetastasen von Sphäroiden mit 60 % ausgeprägter im Vergleich zu Monolayer-Lungenmetastasen mit 50 %. In Lymphknotenmetastasen beider Gruppen exprimierte ungefähr jede zweite Tumorzelle Ki-67, wobei der Anteil in Sphäroid-Metastasen 4 % größer war.

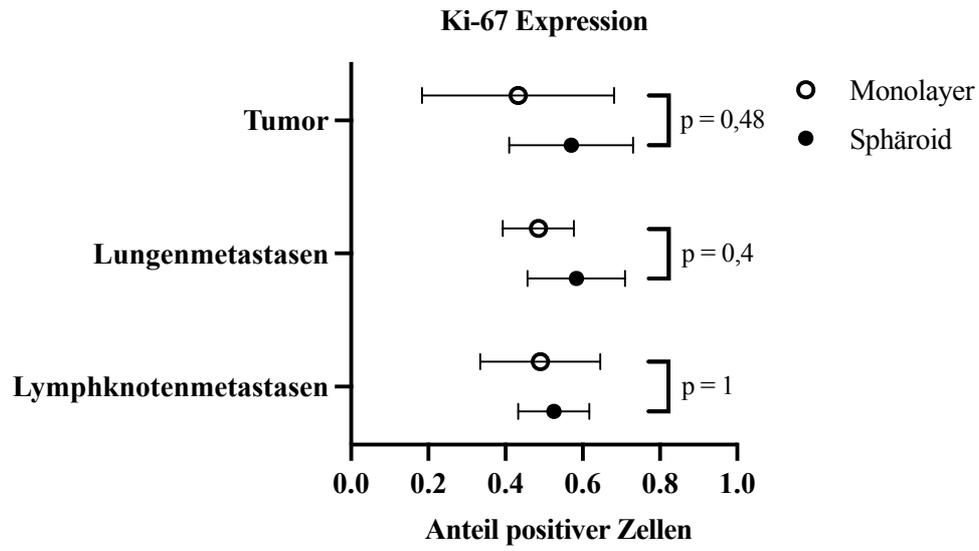


Abbildung 28: Ki-67 Expression in LNCaP-Primärtumoren und Metastasen

5 Diskussion

In dieser experimentellen Dissertation wurde ein Modell zur orthotopen Xenograft-Transplantation von dreidimensionalen LNCaP-Sphäroiden entwickelt. Dabei wurde der Einfluss der Dreidimensionalität des Xenografts bei Implantation auf das Tumorwachstum und die Metastasierung mit der konventionellen Transplantation von Zellsuspensionen aus zweidimensionalen LNCaP-Monolayern verglichen. Schließlich wurden die Gruppen hinsichtlich ihrer Expression von Prostatakarzinom-typischen Markern analysiert.

5.1 Diskussion der In-vitro-Vorversuche

Die Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP ist die am häufigsten verwendete Zelllinie mit über 9800 publizierten Veröffentlichungen auf PubMed® [125]. Demgegenüber stehen ca. 6600 Publikationen, die sich mit der am zweithäufigsten verwendeten Zelllinie DU145 auseinandersetzen [125]. Eine bedeutende Limitation der verwendeten Zelllinie ist ihr metastatischer Ursprung, wodurch Implikationen auf das nicht metastasierte primäre Prostatakarzinom mit Einschränkungen verbunden sind [86]. Weiterhin verändern LNCaP-Zellen aufgrund von hochfrequenten Passagierungen ihre Genexpression [59]. Daher wurden in dieser Dissertation lediglich LNCaP-Zellen mit bis zu acht Passagierungen verwendet. Dem Bedarf nach primären Prostatakarzinomzelllinien und patienten-abgeleiteten Tumoren wird zunehmend nachgegangen, doch LNCaP-Zellen bleiben aufgrund ihrer hervorragenden Kulturbedingungen für präklinische Forschungen essenziell [156]. Dennoch wäre eine perspektivisch anzustrebende Methode die orthotope Implantation von primärem Prostatakarzinomgewebe, welche in dreidimensionaler Form kultiviert wurden. Sphäroide aus dem primärem Prostatakarzinom wurden bereits erfolgreich generiert und in vitro charakterisiert [99][115].

Die Kultivierbarkeit von LNCaP-Tumorzellen in 96-Well Ultra-Low-Attachment (ULA) Platten erwies sich als hervorragend. Nichtsdestotrotz traten bei der Herstellung von Sphäroiden in ULA-Platten einige Probleme auf. Während sich das Aussäen der Zellen unproblematisch gestaltete, war der Austausch des Mediums besonders diffizil, bedingt durch die schlechte Visibilität der Sphäroide. Insbesondere kleinere Sphäroide mit einer Anfangszellzahl von 5000 konnten schlecht identifiziert werden und wurden somit bei einem Medienwechsel häufig destruiert oder aspiriert. Ein Schwenken der Platte verbesserte durch die verschiedenen Reflexionen des Lichts die Sichtbarkeit der Sphäroide, woraufhin das Medium müheloser gewechselt werden konnte. Die Firma Corning, von denen die ULA-Platten bezogen wurden, hat neuerdings ULA-Platten in schwarzer Farbe entwickelt, wodurch eine verbesserte Sichtbarkeit von kleineren Sphäroiden zu erwarten ist [92].

Die Generierung von Sphäroiden in ULA-Mikrowell-Platten erzeugt, im Gegensatz zur „Hanging Drop“-Technik und Liquid-Overlay-Technik, Sphäroide in konstanter Größe und Form [56]. Ein Vergleich von Sphäroiden des Urothelkarzinoms in ULA-Mikrowell-Platten gegenüber Hanging-Drop-Sphäroiden zeigte eine fehlende Eignung der Hanging-Drop-Technik für Medikamenten- und Zytotoxizitäts-Assays [6]. Dies unterstreicht die gute methodische Eignung der ULA-Well-Platten für die Generierung und weiterführende Analysen von Sphäroiden. In dieser Arbeit konnten hingegen leichte Variationen in der Form beobachtet werden. In den In-vitro-Vorversuchen entwickelten die Sphäroide elliptische, runde und längliche Formen. Für die In-vitro und In-vivo-Experimente wurden allerdings nur runde Sphäroide selektiert.

Methodische Schwierigkeiten ergaben sich im Rahmen der Dissoziation von Sphäroiden zur Bestimmung ihrer Zellzahl. Sphäroide mit einer Anfangszellzahl von 5000 und 10000 besaßen, insbesondere vor dem dritten Tag in Kultur, nur spärliche Zell-Zell Kontakte und bildeten zu diesem Zeitpunkt nur kleinere Zellverbände. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass wie im obigen Abschnitt beschrieben, einige Zellen beim Austausch des Mediums verloren gingen und damit die tatsächliche Zellanzahl unterschätzt wurde. Darüber hinaus bestanden möglicherweise Messungenauigkeiten des Zellzähl-Instruments LUNA II für sehr kleine Zellzahlen mit ca. 5000, da LUNA II lediglich für die Größenordnung zwischen 5×10^4 bis 1×10^7 pro ml konzipiert wurde [120]. Eine alternative Zählmethode, beispielsweise mit einer Neubauer-Zählkammer, wäre für die kleinsten Sphäroide eine Option gewesen. Aufgrund der erwarteten Messungenauigkeiten, zum einen durch die marginal unterschiedlichen Sphäroid-Größen innerhalb einer Gruppe und zum anderen aufgrund des Zellzählinstruments, wurden mindestens zehn Analysen pro Sphäroid-Gruppe ausgeführt. Für die in vivo eingesetzten Sphäroide (Tag 6) mit zu Beginn 25000 Zellen wurden doppelt so viele Zellzahl-Analysen erhoben, um eine präzise Abbildung der tatsächlichen Anzahl an Zellen nach sechs Tagen zu erhalten.

Insgesamt existieren nur wenige Publikationen, welche sich mit der Charakterisierung von LNCaP-Sphäroiden beschäftigen. Dadurch liefert die vorliegende Arbeit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis von LNCaP-Sphäroiden. Andererseits sind Vergleiche zu anderen Publikationen limitiert. Die ermittelte Verdopplungszeit von LNCaP-Zellen in Monolayer-Form stimmte mit den in der Literatur beschriebenen Verdopplungszeiten von 60 Stunden überein [168]. Die Generationszeiten der LNCaP-Sphäroide unterschieden sich hingegen von den Verdopplungszeiten, welche von Ballangrud et al. beschrieben wurden [12]. Ballangrud et al. ermittelten für LNCaP-Sphäroide eine Verdopplungszeit von 30 Stunden in einem Beobachtungszeitraum von 60 Tagen, jedoch wurde hier mit der Liquid-Overlay-Technik eine andere Methodik zur Generierung von Sphäroiden gewählt und ein längerer Beobachtungszeitraum berücksichtigt. Obwohl die Arbeitsgruppe erheblich größere Sphäroide mit einer Zellzahl von 2000000 verwendeten, ermittelten sie einen Durchmesser von lediglich 500 μm nach zwölf Tagen. Dies entspricht ungefähr der Hälfte der errechneten Durchmesser in Sphäroiden mit einer beginnenden Zellzahl von 25000 in der vorliegenden Arbeit. Die

entscheidenden methodischen Unterschiede limitieren die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, jedoch untermauern die abweichenden Resultate die Relevanz der Methodik zur Herstellung von Sphäroiden. Eine weitere Arbeit, die sich mit den Charakteristika von LNCaP-Sphäroiden auseinandersetzte, stammt von einer japanischen Arbeitsgruppe um Watanabe und Takagi [189]. Im Einklang mit Ballangrud konnten Watanabe et. al eine Differenzierung der Sphäroide in drei verschiedenen Zonen erkennen. Ab einer Größe von 500 μm entwickelten die Sphäroide eine zentrale Nekrose, eine Übergangszone und eine äußere Proliferationszone. In der Proliferationszone exprimierten die Tumorzellen vermehrt Ki-67, ebenso wie in der hier vorliegenden Arbeit.

Jouberton et. al ermittelten für LNCaP-Sphäroide mit 1000 Zellen, welche ebenso in nicht-adhärenenten Well-Platten generiert wurden, eine Verdopplungszeit von ca. 33 Stunden und eine Größe von bis zu 500 μm nach 7 Tagen [98]. Die im Vergleich zu dieser Arbeit sehr kurze Verdopplungszeit war wahrscheinlich bedingt durch die sehr geringe Generationszeit der analysierten LNCaP-Monolayer von nur 19 Stunden. Dennoch korrespondiert die Anzahl an Zellen nach 6 Tagen von ca. 29000 mit den errechneten Zellzahlen von 33000 der kleinsten Sphäroide in dieser Dissertation [98].

Eine Arbeit von Ohya et. al demonstrierte die morphologische Entwicklung von Sphäroiden aus Einzelzellen in Ultra-Low-Attachment-Well-Platten nach 5-7 Tagen und beschrieb eine Größe von ca. 500 μm nach 7 Tagen bei Kultivierung von 100000 Zellen [142]. Die Etablierungszeit von Sphäroiden stimmt mit den Beobachtungen in dieser Arbeit überein. Allerdings waren die LNCaP-Sphäroide in der vorliegenden Arbeit, trotz vierfach geringerer Anfangszellzahl, nach 7 Tagen nahezu zweimal größer. Eine Ursache für die abweichende Größe der Sphäroide kann nicht vollends eruiert werden. Ein möglicher Faktor könnten methodische Feinheiten darstellen, da beispielsweise beim Austausch des Mediums ein allzu zügiges Aspirieren die Integrität der Sphäroide zerstört und die Zellen mit schwachen interzellulären Verbindungen folglich entfernt werden.

Untersuchungen hinsichtlich der Viabilität von LNCaP-Sphäroiden verschiedener Größen im zeitlichen Verlauf existieren bis dato nicht. Die intensiv charakterisierten Sphäroide von Melanozyten präsentieren allerdings vergleichbare Zellviabilitäten von 70 % bis 90 % über einem Zeitraum von 9 Tagen [88]. Wie im obigen Abschnitt erwähnt, bilden LNCaP-Sphäroide ab einer Größe von ca. 500 μm einen nekrotischen Kern, welcher ca. die Hälfte des Sphäroids ausmacht [98][189]. Dementsprechend müsste der Anteil an vitalen Zellen zur Gesamtzahl an Zellen eine ähnliche Ratio bilden. Die in dieser Arbeit errechneten Viabilitäten von 50 % bis 80 % untermauern diese Hypothese. Es muss jedoch betont werden, dass die ermittelten Zellviabilitäten eventuell unterschätzt wurden. Aufgrund der mehrfachen Dissoziationen der Sphäroide waren die Zellmembranen Scherkräften ausgesetzt, wodurch die möglicherweise nicht mehr intakten Zellmembranen der Tumorzellen einen Einstrom von Trypanblau ermöglichten und somit fälschlicherweise als avitale Zellen interpretiert wurden. Die Ermittlung der Viabilität anhand anderer häufig verwendeter Assays, wie dem CellTiterGlo® Assay (Promega), könnte perspektivisch als eine repräsentativere Option angewandt werden [91][139].

Eine weitere Herausforderung stellten die immunhistochemischen Färbungen der In-vitro-Sphäroide und der Organpräparate dar. Zuallererst war die Einbettung von In-vitro-Sphäroiden in Agarosegel methodisch außerordentlich anspruchsvoll, da sich zum einen das Pipettieren von Sphäroiden ohne Integritätsverlust schwierig gestaltete und zum anderen die Fixierung in Agarosegel ein sehr zügiges Arbeiten erforderte. Dies war dem schnellen Abkühlen des Agarosegels geschuldet, wodurch dieses erstarrte und die Sphäroide in der Pipettenspitze fixierte. Das großzügige Erweitern des Lumens der 200 µl Pipettenspitze vereinfachte das Pipettieren des Sphäroids erheblich. Die nächste komplexe Aufgabe ergab sich bei der Optimierung der immunhistochemischen Charakterisierung, denn das Ausmaß der Demaskierung der Epitope variierte bemerkenswert zwischen den Präparaten. Dies konnte einerseits auf die unterschiedlichen Temperaturen der zahlreichen Objektträger im Reiskocher zurückgeführt werden. Daraufhin wurde die Anzahl der zu färbenden Objektträger auf acht pro Färbeprozedur beschränkt, um so eine gleichmäßige Hitze-Distribution zu erreichen. Andererseits verringerte die Verkürzung der Demaskierungsdauer von 20 Minuten auf 12,5 Minuten insignifikante Färbungen in der Immunhistochemie. Eine weitere entscheidende Veränderung war die Auswahl des Demaskierungspuffers. Ein Citrat-Puffer erwies sich als optimal für die Epitop-Demaskierung von CK8, AMACR und AR, während die Epitope von Ki-67, CK5, Vimentin und E-Cadherin mit Tris-EDTA demaskiert wurden. Weiterhin differierten die Konzentrationen der Primärantikörper erheblich von den empfohlenen Verdünnungen der Hersteller. Eindrücklich war dies am Androgenrezeptor-Antikörper zu erkennen [166], der für die Färbung der In-vitro-Sphäroide mit 1:2000 verdünnt wurde und für die Charakterisierung der Lungenmetastasen sogar mit 1:4000 gewählt wurde und somit weniger als ein Zehntel der empfohlenen Dosierung des Herstellers entsprach. Höhere Konzentrationen zeigten eine nahezu vollständige unspezifische Färbung des gesamten Präparats. Eine mögliche Ursache für die hohe Bindungsaffinität des Anti-Androgenrezeptor-Antikörpers in Lungenpräparaten könnte die konstitutive Expression des Androgenrezeptors in Typ II Pneumozyten des Lungenepithels sein [127]. Die Auswahl der Konzentrationen für Ki-67, CK5 und Vimentin stimmten mit zuvor publizierten Charakterisierungen von LNCaP-Tumoren überein [116]. Hingegen wurden AMACR, CK8 und AR ungefähr zehnfach stärker als in vorherigen Veröffentlichungen verdünnt [114].

Die anschließenden quantitativen Analysen der immunhistochemischen Färbung konnten mit der Software von ImageJ und dem Plugin „Colour Deconvolution 2“ für die Kernfärbungen von AR und Ki-67 problemlos angewendet werden. Im Vergleich zu anderen Methoden, in denen zumeist die relativen Anteile an positiven Zellen manuell erfasst werden, konnte die verwendete Software in dieser Arbeit das gesamte Präparat effizient und verlässlich analysieren und limitierte dabei Defizite von beobachterbasierten subjektiven Methoden [164]. Anhand der entsprechenden Wellenlängenbereiche der Chromogene konnte das Auftreten einer Kernfärbung kalkuliert werden. Darüber hinaus konnte

die Anzahl aller Tumorzellen im Präparat mit ImageJ schnell erfasst werden, woraus das Verhältnis der AR bzw. Ki-67 exprimierenden Zellen präzise ermittelt werden konnte.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Primärtumore von LNCaP-Sphäroiden und LNCaP-Einzelzellsuspensionen aus Monolayerkultur demonstrierten ein Prostatakarzinom-typisches Expressionsmuster.

In vorherigen Studien präsentierten Patienten-abgeleitete Xenografts eine mit den Primärtumoren von LNCaP-Sphäroiden vergleichbare Ki-67 Expression von ca. 70 % und ähnliche CK8-Ausprägungsmuster [147]. Eine Publikation von Song et. al illustrierte zudem einen abnehmenden Gradienten von Ki-67 positiven Zellen innerhalb eines Sphäroids [169]. Darüber hinaus zeigten sie einen Anteil von ca. 70 % Ki-67 exprimierender Zellen in der äußeren Proliferationszone. Dies steht im Einklang zu den Beobachtungen der Immunhistochemie der In-vitro-Sphäroide in dieser Promotionsarbeit. In einer In-vitro-Studie wurde in Western-Blot Analysen eine höhere Expression von Ki-67 in zweidimensionalen LNCaP-Zellen im Gegensatz zu LNCaP-Sphäroiden beschrieben [79]. Dies widerspricht der in dieser Arbeit ermittelten immunhistochemisch stärkeren Ki-67 Expression des In-vivo-Prostatakarzinoms nach Inokulation von Sphäroiden im Vergleich zu Monolayern. Allerdings muss auch an dieser Stelle angemerkt werden, dass die quantitative Bestimmung des auf zellulärer Ebene vorrangig qualitativen Markers mittels Western-Blot ungewöhnlich ist.

Interessanterweise war eine bis zu 20 % höhere Expression von Ki-67 in Primärtumoren und Metastasen von LNCaP-Sphäroiden zu erkennen. Dies spricht für einen positiven Einfluss der dreidimensionalen Form auf die Proliferation von LNCaP-Zellen in vivo. Postulierend könnten die ausgeprägten interzellulären Verbindungen im dreidimensionalen Konstrukt pro-proliferatorische Signalwege aktivieren, da die engen Zell-Zell-Kontakte eine intensive Chemokommunikation befähigen. Weiterhin könnte eine proliferationsfördernde Wirkung aus der speziellen Architektur des Sphäroids mit der Ausbildung eines nekrotischen Kerns hervorgehen. Aufgrund der Nekrose der zentral gelegenen LNCaP-Zellen könnte ein extrinsischer Proliferationsanreiz für die Zellen der äußeren Zone entstehen. Andererseits könnte die stärkere Proliferation auf das höhere Ressourcen-Angebot in der äußeren Proliferationszone zurückzuführen sein, da die zentral gelegenen Zellen weitestgehend vom Nährstoffaustausch separiert sind. Letztlich muss festgehalten werden, dass die hohen Proliferationsindizes in Sphäroid-Tumoren die hervorragende Eignung der orthotopen Sphäroid-Implantation als präklinisches Modell untermauern.

Eine positive Androgenrezeptor- Expression konnte analog zu Härmä et. al sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch festgestellt werden [79]. Vorherige Analysen der Expression des Androgenrezeptors von In-vitro-Sphäroiden im Vergleich zu LNCaP-Zellen aus Monolayerkultur demonstrierten unveränderte AR-Expressionsniveaus [53]. Diese Ergebnisse sind nicht kohärent zu den bis zu 15 %

erhöhten AR-Expressionsniveaus der In-vivo-Sphäroid-Karzinome in dieser Arbeit. Eine plausible Erklärung könnte eine veränderte Genexpression aufgrund des spezifischen Tumormikromilieus eines Sphäroids und der In-vivo-Interaktion mit dem prostataspezifischen Milieu sein. Insbesondere Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAF) können maßgeblich die Androgensensitivität und Chemoresistenz beeinflussen [53][139]. Eine von Sharma et. al veröffentlichte Studie zeigte, dass in vitro kultivierte 2D-Zelllinien im Vergleich zu Xenotransplantaten und menschlichem PCa-Gewebe ein deutlich divergierendes Profil von AR-regulierten Genen aufweisen [162]. So wies das AR-Promotor-Bindungsprofil der Zelllinien LNCaP, VCaP und 22Rv1 nur eine dreiprozentige Überschneidung mit dem kastrationsresistenten Prostatakarzinom auf [157][162]. Dies deutet darauf hin, dass sich das AR-Transkriptom im Gewebe von dem in kultivierten Zelllinien unterscheidet, was potenziell erhebliche Auswirkungen auf präklinische Studien mit neuartigen AR-Wirkstoffen haben könnte [157]. Interessant wäre die Analyse des AR-Transkriptionsprofils von LNCaP-Sphäroiden in vitro und in vivo, um festzustellen, inwieweit sie das humane Prostatakarzinom präziser rekapitulieren als zweidimensionale LNCaP-Zellen in vitro und in vivo.

Das Zell-Zell-Adhäsions Protein E-Cadherin nimmt eine Schlüsselrolle in der epithelialen Morphogenese und Differenzierung ein, da durch dessen Hochregulation das lokale Tumorwachstum verstärkt wird, wohingegen die verminderte Expression eine Metastasierung fördert [22]. E-Cadherin war ubiquitär in allen Tumorzellen stark exprimiert, wodurch eine starke interzelluläre Verbindung der LNCaP-Zellen in allen Präparaten bewiesen wurde. Unterschiede hinsichtlich der E-Cadherin-Ausprägung konnten methodisch nicht ermittelt werden. Eine Studie von Eder et. al beobachtete einen signifikanten Anstieg der E-Cadherin-Proteinspiegel in LNCaP-Sphäroiden im Vergleich zu LNCaP-Monolayern, was für eine Hochregulation der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion in Sphäroiden spricht [53]. Auch Härmä et. al konnten für dreidimensionale LNCaP-Zellen eine stärkere E-Cadherin Expression im Vergleich zu 2D-LNCaP-Zellen identifizieren [79]. Dies steht im Einklang mit früheren Studien, in denen eine Überexpression von E-Cadherin in Ovarialkarzinomzellen [173] und primären Hepatozyten [123] unter 3D-Bedingungen beschrieben wurde. Arbeiten zur vergleichenden Expression von E-Cadherin in In-vivo-2D- und 3D- Prostatakarzinomen existieren bislang nicht. Eine zukünftige quantitative Analyse der E-Cadherin Expression (beispielsweise anhand des Transkriptionsprofils oder Western-Blotting) in Sphäroid-Tumoren in vivo im zeitlichen Verlauf in Vergleich zu 2D-Monolayern in vivo, könnte Hinweise für die in dieser Arbeit beobachtete höhere Rate an Metastasierung in Sphäroid-Tumoren liefern. Demnach müsste zum Zeitpunkt der Migration und Metastasierung E-Cadherin in Sphäroid-Tumoren vermehrt herunterreguliert werden, da das metastatische Potenzial bekanntlich durch E-Cadherin beeinflusst wird [135].

Die epitheliale Differenzierung der LNCaP-Zellen wurde anhand der Expression des Intermediärfilament-Proteins Cytokeratin 8 als luminalem epitheliale Marker [163] und des Verlusts

des Cytokeratins 5-Signals als Basalzellmarker belegt [18]. Dies steht im Einklang mit systematischen geno- und phänotypischen Charakterisierungen von LNCaP-Zellen [129].

Vimentin ist üblicherweise mit einer mesenchymalen Differenzierung assoziiert, dennoch ist eine Expression auch im Prostatakarzinom beschrieben worden [80], allerdings nicht für LNCaP-Zellen [136]. Mitchell et. al wiesen eine Vimentin-Expression in nur 2 % der LNCaP-Zellen nach [129]. Diese Erhebungen stimmen mit dem fehlendem Nachweis von Vimentin in LNCaP-Zellen in dieser Arbeit überein. Positive Vimentin Signale konnten lediglich im umgebenden Stroma der LNCaP-Zellen dokumentiert werden.

AMACR ist entscheidend an der Gallensäuresynthese und Beta-Oxidation von verzweigtkettigen Fettsäuren beteiligt. Dabei katalysiert das Enzym die Racemisierung von α -Methyl-verzweigten Carboxyl-Coenzym-A-Thioestern in Peroxisomen und Mitochondrien [96]. Eine Überexpression von AMACR wurde u.a. für das kolorektale Karzinom, das Mammakarzinom und insbesondere für das Prostatakarzinom beschrieben [119]. Eine immunhistochemische AMACR-Expression in Prostatagewebe ist diagnostisch hinweisend für ein Prostatakarzinom [96] und besitzt eine prognostische Bedeutung [18]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine konstitutive Überexpression von AMACR in allen LNCaP-Tumorzellen nachgewiesen werden.

Insgesamt sind Arbeiten zum Vergleich der Expressionsmuster von prostata-typischen Markern in zweidimensionalen und dreidimensionalen Prostatakarzinomzellen rar. Härmä et. al analysierten die alterierten mRNA-Genexpression, Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle in Prostatakarzinomzelllinien [79]. Die relevanten Signalwege für die Formation von Sphäroiden waren in erster Linie mit dem Lipid- und Steroidstoffwechsel assoziiert. Als prominenteste Schlüssel-moleküle wurden der IGF1/IGF2-Rezeptor, NF κ B, proinflammatorische Chemokine (IL-1 α , TNF α und CCL2) sowie AKT und PI3-Kinase identifiziert [79]. Die Expression von Transkriptionsfaktoren des NF κ B-Signalwegs und JAK/STAT-Signalwegs war in Sphäroiden im Vergleich zu 2D durchweg reduziert [79]. Als Korrelat dazu waren I κ B α - und I κ B ϵ -Proteine als Hemmer des proinflammatorischen NF κ B vermehrt exprimiert [79]. Diese Ergebnisse suggerieren eine gezielte Regulierung proinflammatorischer Prozesse in der Sphäroid-Formation in Prostatakarzinomzellen.

In der vorliegenden Arbeit könnten ergänzende quantitative Analysen der prostata-typischen Marker anhand von Transkriptionsanalysen und Western-Blotting von LNCaP-Tumoren und Metastasen aus Einzelzellsuspensionen von Monolayerkulturen im Vergleich zu Sphäroiden zusätzlich zur immunhistochemischen Charakterisierung aufschlussreiche Informationen zur veränderten Tumorbilogie in 3D-Tumoren liefern. Dadurch könnte perspektivisch eine präzisere Aussage zum Ausmaß der biologischen Vergleichbarkeit von 3D-LNCaP Tumoren im In-vivo-Modell und dem humanen Prostatakarzinom getroffen werden.

5.2 Diskussion der In-vivo-Methodik

Das Ziel der In-vitro-Vorexperimente war u.a., einen Sphäroiden mit optimaler Größe für die orthotope In-vivo-Injektion zu selektieren. Die Sphäroide sollten zur Erhöhung der Rate erfolgreicher Transplantationen einen größtmöglichen Durchmesser mit einer hohen Viabilität vorweisen. Der limitierende Faktor war dabei die Größe der Maus-Prostata und damit einhergehend der Durchmesser der verwendeten Injektionskanüle. Eine Größe der Injektionskanüle von 20 G bewahrte noch die Integrität der Prostata. Zur orthotopen LNCaP-Sphäroid Transplantation wurden Tag 6 Sphäroide mit einer initialen Zellzahl von 25000 LNCaP-Zellen ausgewählt. Dies liegt zum einen darin begründet, dass diese Sphäroide morphologisch eine solide sphäroideale Form präsentierten und zum anderen im Mittel eine hohe Zellviabilität aufwiesen. Sphäroide dieses Durchmessers bewahrten ihre Integrität bei Aspiration und Injektion mit einer 20 G Injektionskanüle im Gegensatz zu Sphäroiden höherer Zellzahlen. Für Sphäroide mit zu Beginn 25000 LNCaP-Zellen wurde nach sechs Tagen eine durchschnittliche Zellzahl von 40000 LNCaP-Zellen errechnet. Analog wurden in der Vergleichsgruppe eine Suspension aus 40000 LNCaP-Zellen aus einer Monolayerkultur orthotop inokuliert.

Präoperativ wurden die Sphäroid-Xenografts in Matrigel versetzt, wohingegen die Zellen der Monolayerkultur in Matrigel suspendiert wurden. Wie bereits erwähnt, ist Matrigel eine essenzielle Trägersubstanz für das initiale Wachstum in vivo, da die enthaltenden Wachstumsfaktoren Laminin, Kollagen und Proteoglykane ideale Wachstumsbedingungen gewährleisteten [15]. Je höher die Matrigel-Konzentration, desto visköser war die Suspension. Eine erfolgreiche Aspiration eines Sphäroids gelang leichter unter geringer Viskosität. Aufgrund dessen wurde eine niedrige Konzentration Zellkultur-Medium zu Matrigel von 1:1 gewählt, welche in Relation zu bereits publizierten orthotopen Xenograft Implantationen (Konz. Medium zu Matrigel 1:3) eine niedrige Konzentration von Matrigel darstellte [116].

Eine Herausforderung stellte die methodisch komplexe intraprostatiche Injektion des Sphäroids dar. Zum einen war bei Aspiration des Sphäroids das aspirierte Volumen im Kontrast zur Injektion der Einzelzellsuspension aus Monolayerkultur sehr variabel. Dadurch war die Menge an injiziertem Matrigel nicht konstant und folglich der Anteil an Wachstumsfaktoren ungleich verteilt. Dies hatte eventuell einen geringen Einfluss auf die initiale Anwachsrate.

Verkomplizierend war zum anderen die Notwendigkeit einer großen Kanüle für die intraprostatiche Injektion zur Bewahrung der Integrität des Sphäroids. Dadurch resultierte in wenigen Fällen eine Perforation der prostatistischen Kapsel mit Integritätsverlust des links-anterioren Prostatalappens. Aufgrund der paarigen Anlage der Prostata in Mäusen konnte in diesen Fällen die Injektion im kontralateralen Prostatalappen erfolgreich umgesetzt werden. Die routinemäßige orthotope Injektion von LNCaP-Einzelzellsuspensionen verlief hingegen komplikationslos. Die orthotope Xenograft

Transplantation von Prostatakarzinomzellen wird allerdings von nur wenigen Zentren beherrscht und entsprechend selten in der Forschung implementiert. Bereits für die orthotope Injektion einer Einzelzellsuspension aus einer Monolayerkultur bedarf es der Expertise eines geübten Kleintieroperators. Eine zukünftige standardmäßige Implementierung von orthotopen Sphäroid-Transplantation im Prostatakarzinom wird dementsprechend eine Herausforderung darstellen, allerdings kann bei adäquatem Training dieses Modell in Forschungszentren mit etablierten Kleintieroperationen höchstwahrscheinlich umgesetzt werden.

Darüber hinaus limitierend war die Tatsache, dass die implantierten Sphäroide ausschließlich aus LNCaP-Zellen bestanden, weshalb sie korrekterweise als Homosphäroid bezeichnet werden müssen. Allerdings werden durch Homosphäroide die essenziellen Interaktionen der Karzinomzellen mit anderen Zellen des Tumormikromilieus nicht berücksichtigt. Dabei beeinflussen Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten und Immunzellen entscheidend die Tumorproliferation und Metastasierung [111]. Die genauen Mechanismen sind bis dato Gegenstand intensiver Forschung. Eine relevante Rolle könnten dabei extrazelluläre Vesikel (EV) einnehmen [117]. Diese kleinen Partikel werden von allen Zellen sezerniert und tragen entscheidend zur interzellulären Kommunikation bei [179]. Demnach wäre in weiterführenden Experimenten die Analyse von LNCaP-Heterosphäroiden, also Sphäroide bestehend aus LNCaP-Zellen und beispielsweise Tumor-assoziierten Fibroblasten (CAF), von großer Relevanz, insbesondere im Hinblick auf neue Therapieansätze. In vitro konnten Neuwirt und Kollegen bereits eine durch Tumor-assoziierte Fibroblasten induzierte Steigerung der Cholesterin- und Steroidsynthese und eine damit einhergehende Androgenresistenz nachweisen [139]. Gewiss wäre eine Implantation von Heterosphäroiden anhand der in dieser Arbeit beschriebenen orthotopen Injektion nur unter bestimmten Umständen möglich. Die Heterosphäroide müssten für eine intraprostatiche Injektion präoperativ in vitro kultiviert werden. Die Ko-Kultivierung von LNCaP-Zellen und CAFs in dreidimensionaler Form wurde bereits mehrfach publiziert und ist methodisch noch nicht vollends etabliert, da die Fibroblasten entweder nicht anwachsen oder die Kultur sogar überwuchern können [75]. Bereits publizierte Arbeiten zu In-vivo-Untersuchungen des Tumormikromilieus wurden durch Ko-Injektionen von 2D-LNCaP-Zellen und Fibroblasten umgesetzt [116]. Eine Transplantation von LNCaP-Sphäroiden zusammen mit Fibroblasten im Sinne einer Ko-Injektion ist methodisch unerprobt, aufgrund der im obigem Abschnitt beschriebenen Variabilität der intraprostatich injizierten Volumina. Eine sequentielle Injektion würde bei der unumgänglichen Größe der Injektionskanüle für Sphäroid-Inokulationen die Integrität der prostatistischen Kapsel verletzen. Eine erfolgsversprechende alternative Transplantationsmöglichkeit wäre die Transplantation eines in einer ausreichend harten Trägersubstanz eingebetteten Heterosphäroids mithilfe einer Inzision der Prostatakapsel.

Obwohl das orthotope Xenograft-Modell eine herausragende Möglichkeit darstellt, die Interaktion von Prostatakarzinomzellen im natürlichen Prostatamilieu zu analysieren, geht die Methodik mit einer

entscheidenden Limitation einher. Wie bereits erläutert, können humane Prostatakarzinomzelllinien lediglich in immundefizienten Versuchstieren transplantiert werden.

Durch die Verwendung von immundefizienten SCID-Mäusen bleibt ein möglicher Effekt von infiltrativen B- und T-Lymphozyten aus, da die unreifen Lymphozyten aufgrund einer Mutation auf Chromosom 16 im CD4⁺/CD8⁻ pro B-Lymphozyten Stadium verharren. Die Bildung von myeloiden antigen-präsentierenden Zellen, Stammzellen und natürlichen Killerzellen in SCID-Mäusen ist hingegen nicht beeinträchtigt [158].

Trotz dieser Limitation muss auch festgehalten werden, dass die Erforschung der Rolle des Immunsystems in der Pathogenese des Prostatakarzinoms zwar erstrebenswert ist, andererseits präsentiert sich das Prostatakarzinom im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten wie dem Melanom als schwach-immunogener Tumor [153]. In den letzten Jahren kam es jedoch zunehmend zu einer Neubewertung der immunologischen Faktoren im Prostatakarzinom. Beispielsweise konnten Tumorantigene wie Differenzierungs- und Cancer-Testis-Antigene im Prostatakarzinom entdeckt werden [46]. Im Stroma lassen sich zudem spezifisch gegen Karzinomzellen gerichtete CD4- und CD8-Lymphozyten nachweisen [153]. Dies war zudem der Grundstein für die Erforschung von antigenspezifischen Immuntherapien, die unter anderem in einer FDA-Zulassung von Sipuleucel-T für Patienten mit metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakarzinom mündeten [82]. Demnach könnten weitere Untersuchungen immunologischer Faktoren im In-vivo-Modell zukünftig neue therapeutische Perspektiven eröffnen.

In dieser Arbeit wurden das lokale Tumorwachstum und die Detektion von Metastasen anhand von hochauflösender Sonographie, In-vivo-Micro-CT und histologischen bzw. immunhistochemischen Analysen der explantierten Organe beurteilt. Diese Techniken ermöglichen eine sehr sensitive und spezifische Verlaufsbeobachtung des Tumorwachstums und der Metastasierung. Zur Darstellung des Primärtumors erwies sich allerdings der Weichteilkontrast im CT als unzureichend, weshalb hierfür in Zukunft eher andere bildgebende Methoden wie MRT herangezogen werden müssten. Weitere moderne Methoden wie die Biolumineszenz und die PCR für humane Alu-Sequenzen könnten eine noch exaktere Quantifizierung der Metastasierung realisieren [116].

5.3 Diskussion der In-vivo-Ergebnisse

Die Hälfte der transplantierten Mäuse in beiden Gruppen bildeten nach orthotoper Xenograft Transplantation ein Prostatakarzinom. Die Rate erfolgreicher Transplantationen erscheint mit 50 % zunächst gering. Indes muss diese Anwachsrate in Anbetracht der deutlich niedrigeren Anzahl an transplantierten Zellen von 25000 als Erfolg gewertet werden. In aktuellen Publikationen zu orthotopen Xenograft Implantationen von Prostatakarzinomzellen wurden zwar Anwachsrate von 90 % erreicht, allerdings mit einer bis zu 20-fach höheren Zellzahl zwischen 50000 und 500000 [114][155]. Darüber hinaus verwendeten diese Arbeiten eine höhere Konzentration von Medium zu Matrigel von 1:3, im Gegensatz zu 1:1 in der vorliegenden Arbeit. Aufgrund des optimierten Nährstoffmilieus entfaltet Matrigel als Vehikel für Karzinomzellinokulationen eine wachstumsfördernde Wirkung [67][104][148]. In Anbetracht der niedrigen Matrigel-Konzentration und der geringen Anzahl an LNCaP-Zellen ist die erreichte Anwachsrate von 50 % als sehr positiv zu werten. Für orthotope Inokulationen der Prostatakarzinomzelllinie DU-145 wurde allerdings kürzlich ein ausbleibender wachstumsfördernder Effekt von Matrigel beschrieben, doch die Autoren interpretierten dies als eine modellspezifische Beobachtung [155].

Wie bereits erläutert, ist die in Relation niedrige Anwachsrate bedingt durch die geringe Zahl transplantierte Zellen, welche unweigerlich an die Größe der Maus-Prostata gebunden ist. Implantationen mit einer gesteigerten Zahl an LNCaP-Zellen würden auch vermehrt in erfolgreichen Transplantationen münden. Potenziell könnte die Transplantation von größeren Sphäroiden durch die Einbettung von LNCaP-Sphäroiden in einer soliden Trägersubstanz und eine anschließende Transplantation des sogenannten „Plugs“ unter die Prostata kapsel gelingen. Je nach Fragestellung könnten entweder ein großes Sphäroid mit beispielsweise 100000 Zellen oder mehrere Sphäroide mit kleineren Zellzahlen implantiert werden. Letztere Option wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer HOMFOR-Förderung bereits untersucht. Dazu wurden fünf LNCaP-Sphäroide zusammen in einer soliden Kollagen-Matrix eingebettet und im Anschluss intraprostatisch implantiert. Um ein Rückfluss zu verhindern, wurde die Inzision der Prostata kapsel mit Fibrinkleber verschlossen. Von vier erfolgreich operierten Mäusen entwickelten zwei Mäuse Prostatakarzinome in einem Beobachtungszeitraum von 10 Wochen.

Grundlage für den Versuch der Implantation mithilfe von Kollagen war eine aktuelle Publikation, in der Melanom- und Lungenkarzinom-Sphäroide in Kollagen-Plugs eingebettet und im subkutanem Gewebe erfolgreich transplantiert wurden [175]. Die Autoren entdeckten im Sphäroid-Plug-Modell allerdings ein langsames Tumorwachstum begleitet von einer reduzierten Nekrose. Interessanterweise garantierte das Modell eine gesteigerte und stabilere Vaskularisation des Tumors als bei klassischer subkutaner Injektion [175].

Trotz des Ausbleibens der erhofften Steigerung der Rate an erfolgreichen Transplantation mithilfe der Implantation von mehr LNCaP-Sphäroiden im Sphäroid-Plug-Modell, bleibt dieses Modell für

zukünftige Experimente eine spannende Option und sollte mit weiteren soliden Trägersubstanzen erneut erprobt werden. Eine Alternative zur Steigerung der Anwachsrate wäre die Injektion von LNCaP-Sphäroiden in größeren Versuchstieren, wodurch die Verwendung einer Kanüle mit höherem Lumen und damit die Transplantation von größeren Sphäroiden möglich wäre.

Interessanterweise war das lokale Wachstum von Prostatakarzinomen in LNCaP-Sphäroiden im Beobachtungszeitraum rascher als in Tumoren von einer Einzelzellsuspension aus Monolayerkultur. Dies spiegelte sich in der kürzeren Tumor- und PSA-Verdopplungszeit von LNCaP-Sphäroiden im Vergleich zu Monolayer-Karzinomen wider. Die stärkere Proliferation von LNCaP-Sphäroiden bedingte nicht nur eine frühere Entwicklung eines soliden Karzinoms, sondern auch die Ausbildung von größeren Tumorumfängen innerhalb kürzester Zeit. Nach vierzehn Wochen war das Tumorumfang von LNCaP-Sphäroiden im Mittel beinahe 14-fach größer als in LNCaP-Monolayer Karzinomen. Die beträchtlichen Umfänge der beiden voluminösesten LNCaP-Tumoren in Woche vierzehn erzwangen die vorzeitige Opfertung dieser Mäuse, da ein vordefiniertes Abbruchkriterium erreicht wurde. Bei weiterer Beobachtung wären bei dieser Wachstumsdynamik sicherlich der Vergleich der Tumorumfänge statistisch signifikant zu erwarten gewesen. Vergleichbare Tumorumfänge von LNCaP-Tumoren in Sphäroiden nach vierzehn Wochen wurden in Monolayer-Tumoren erst zwei bis sechs Wochen später erreicht. Die hohen Mittelwerte des sonographischen Tumorumfanges in Sphäroiden nach vierzehn Wochen waren in Monolayer-Tumoren erst nach zwanzig Wochen zu erkennen. Diese Ergebnisse demonstrieren eindrücklich eine stärkere Proliferation von Sphäroid-Tumoren.

Die Messung der PSA-Werte bestätigte die sonographisch beobachtete Wachstumsdynamik der Tumore und lieferte somit eine ergänzende Aussage. Die stark positive Korrelation des Tumorumfanges mit dem PSA-Wert untermauerte die Relevanz des PSA-Wertes als Verlaufsmarker des manifesten Prostatakarzinoms. Dies steht im Einklang mit früheren Arbeiten zur orthotopen Inokulation von Prostatakarzinomzellen [114][155].

Interessanterweise imponierten niedrig erhöhte PSA-Werte in zwei Versuchstieren der Sphäroid-Gruppe im gesamten Beobachtungszeitraum, von dem ein Tier ein Prostatakarzinom hatte. Dieses Prostatakarzinom entwickelte sich gegenüber den restlichen Sphäroid-Tumoren mit einer zeitlichen Latenz bei erstmaliger sonographischer Detektion nach vierzehn Wochen. Entsprechend präsentierte dieses Versuchstier das kleinste Sphäroid-Karzinom. Ebenso konnte in der Monolayer-Gruppe die späte Entwicklung eines Monolayer-Karzinoms nach vierzehn Wochen beobachtet werden. Dieser Monolayer-Tumor bildete folglich auch für die Monolayer-Gruppe das kleinste Karzinom. Dieses Phänomen der Entstehung von Tumoren mit einer zeitlichen Latenz ist überraschend und für das orthotope Xenograft-Modell des Prostatakarzinoms noch nicht beschrieben. Ursächlich hierfür könnte die im Vergleich zu anderen Studien außerordentlich geringe Zahl an transplantierten Prostatakarzinomzellen sein. Die gering erhöhten PSA-Messungen des einen Versuchstieres der

Sphäroid-Gruppe ohne Bildung eines Prostatakarzinoms könnte einerseits Artefakt bedingt sein oder andererseits tatsächlich auf das Vorhandensein eines kleinen LNCaP-Sphäroids sein, welcher kein sonographisch detektierbares Prostatakarzinom bildete. Ein Prostatakarzinom konnte in der Autopsie allerdings ebenso nicht detektiert werden. Für das Vorhandensein eines Prostatakarzinoms in diesem Fall spricht eine Arbeit von Stephenson und Kollegen, in der erhöhte PSA-Werte sogar in sehr kleinen LNCaP-Tumoren von bis zu 1.5 mm Größe gemessen wurden [172].

Zu diskutieren ist zudem das explosive Tumorwachstum des final voluminösesten Monolayer-Prostatakarzinoms. Dieses war zunächst nach zehn Wochen detektierbar und wuchs in den darauffolgenden vier Wochen nur langsam. Erstaunlicherweise expandierte das Volumen danach auf über das 30-fache von ca. 30 mm³ auf über 1000 mm³ innerhalb von zwei Wochen. Eine derart sprunghafte Tumolvolumenzunahme eines Karzinoms konnte in Sphäroid-Tumoren nicht gefunden werden. Hier war eine ca. 6-fache Volumensteigerung eines Versuchstieres die rasanteste innerhalb von zwei Wochen. Da die restlichen Prostatakarzinome der Monolayer-Kohorte lediglich ein geringes exponentielles Wachstum vorwiesen, insbesondere im Vergleich zur Sphäroid-Gruppe, ist das observierte Phänomen am ehesten als Ausreißer zu bewerten.

Die Metastasierung wurde zum einen einmalig unmittelbar vor Opferung der Tiere CT-graphisch untersucht und schließlich in der Autopsie und Histologie bestätigt. CT- graphisch konnten keine Metastasen sicher differenziert werden, da sie möglicherweise für die Detektion zu klein waren. Zudem entstanden unerwartet nicht-behebbar Softwareprobleme, welche die Auswertung der CT-Bilder behinderten. In der Autopsie und Histologie war die Feststellung der Metastasierung hingegen zweifelsfrei möglich.

Im Einklang mit vorherigen Publikationen konnte nach orthotoper Inokulation von LNCaP-Zellen in SCID-Mäusen eine Metastasierung in Lymphknoten und Lungengewebe festgestellt werden [116][151][158][172]. Zu diskutieren ist der fehlende Nachweis von Metastasen im Knochengewebe, welche typischerweise im humanen Prostatakarzinom zu erwarten sind und nicht selten die klinische Erstmanifestation des Prostatakarzinom darstellen [51]. Für die orthotope Transplantation von LNCaP-Zellen ist dieses Phänomen schon mehrfach beschrieben worden [158][168]. Der Grund für die ausbleibende Knochenmetastasierung bei orthotoper LNCaP-Transplantation bleibt offen und muss sicherlich in Zukunft weiter erforscht werden. Eine spannende Beobachtung in dieser Arbeit ist die höhere Rate an Metastasierungen in Mäusen mit LNCaP-Sphäroiden von 75 % gegenüber Versuchstieren mit einer Einzelzellsuspension von LNCaP-Zellen aus einer Monolayerkultur mit einer Metastasierungsrate von 50 %.

Die bemerkenswerten Unterschiede hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung von lokalen Prostatakarzinomen und der Entwicklung von Metastasen müssen an dieser Stelle diskutiert werden. Die raschere Entstehung von detektierbaren Tumoren in der Sphäroid-Gruppe und die höhere Metastasierungsrate könnten, kongruent zu den erhöhten Proliferationsindizes in der

Immunhistochemie in Sphäroid Tumoren- und Metastasen, auf eine stärkere Proliferation von Sphäroid-Tumoren zurückzuführen sein. Wie bereits erläutert, nehmen Prostatakarzinom-assoziierte EV des Tumormikromilieus eine zentrale Rolle bei der Beeinflussung des Tumorverhaltens ein. Die von LNCaP-Zellen unter hypoxischen Bedingungen sezernierten EV induzierten in einer Arbeit von Ramteke und Kollegen beachtenswerte Veränderungen des Tumormikromilieus [150]. Sie verstärkten die Invasivität und Proliferation und verminderten die Apoptose in benachbarten Tumorzellen [87][117]. Diese Beobachtungen könnten in Anbetracht der Charakteristika eines Sphäroids, bestehend aus intensiven Zell-Zell-Kontakten im dreidimensionalen Konstrukt und einer ausgeprägten zentralen Hypoxie, durchaus ursächlich für die starke Proliferation in Sphäroid-Tumoren in vivo sein. Eine weitere Rationale für die stärkere Proliferation der Sphäroid-Tumore ist eine ausgeprägtere Vaskularisation von Sphäroid-Tumoren. Eine aktuelle Arbeit von Szade et. al. beschrieb eine stärkere Vaskularisation von subkutan injizierten Sphäroid-Tumoren des B16-Melanoms und des Lewis-Lungenkarzinoms im Vergleich zu konventionell transplantierten Einzelzellsuspensionen nach zwei Wochen [175]. Zudem reichte in Sphäroid-Tumoren die Neoangiogenese bis in den Kern des Tumors im Gegensatz zu einer rein peripheren Vaskularisation in Monolayer-Tumoren [175].

Möglicherweise könnten die beschriebenen Zusammenhänge von Szade et. al. auf das vorliegende orthotope Sphäroid-Transplantationsmodell von LNCaP-Zellen übertragen werden (Abb. 29). Eine ausgeprägtere Neoangiogenese könnte die höhere Rate an Metastasierungen in LNCaP-Sphäroid Tumoren erklären. Um diese Hypothese zu beweisen, müsste in zukünftigen Experimenten die Tumor-Angiogenese, beispielsweise mit hochauflösender Doppler-Sonographie und der immunhistochemischen Bestimmung der Dichte von Mikrogefäßen (sog. „microvessel density“ / „MVD“) untersucht werden.

Die weitreichende Vaskularisation von Sphäroid-Tumoren könnte zudem die Infiltration von weiteren Zellen erleichtern, welche die Tumorproliferation begünstigen. Es ist bekannt, dass verschiedenste Progenitorzellen nicht-hämatopoetischen und hämatopoetischen Ursprungs in Tumore einwandern und die Tumorproliferation fördern können [61][90]. Tatsächlich konnte in der Arbeit von Szade et. al. eine gesteigerte Infiltration von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen mit Progenitorphänotyp in Sphäroiden des B16-Melanoms im Vergleich zur Einzelzellsuspension gezeigt werden [175]. Inwieweit diese Beobachtungen auf das Prostatakarzinom und im Besonderen auf LNCaP-Zellen zu übertragen sind, bleibt Gegenstand von zukünftigen Forschungen.

Als weitere Ursache für die raschere Tumorentwicklung in LNCaP-Sphäroiden könnte die Präformation des Sphäroids in vitro diskutiert werden. Die konventionelle Implantation von LNCaP-Zellen in einer Einzelzellsuspension als Monolayer führt zu einer Entwicklung von kleineren Tumor-Kolonien, welche im zeitlichen Verlauf zu einer Tumormasse verschmelzen (Abb. 29) [175]. Hingegen lässt die Transplantation einer bereits organisierten Tumormasse in Form eines Sphäroids eine kursorische Proliferation vermuten. Die Organisation der Einzelzellsuspension ist hingegen mit einer zeitlichen Latenz verbunden im Gegensatz zum Sphäroid. Humane Karzinome entwickeln sich

initial aus einer oder einigen normalen Zellen [78]. In diesem Zusammenhang muss betont werden, dass die Etablierung eines Karzinoms aus einem Sphäroid die Entwicklung eines humanen Karzinoms aus einer gesunden Zelle besser widerspiegelt als die Tumorentstehung aus einer Suspension von mehreren Karzinomzellen (Abb. 29).

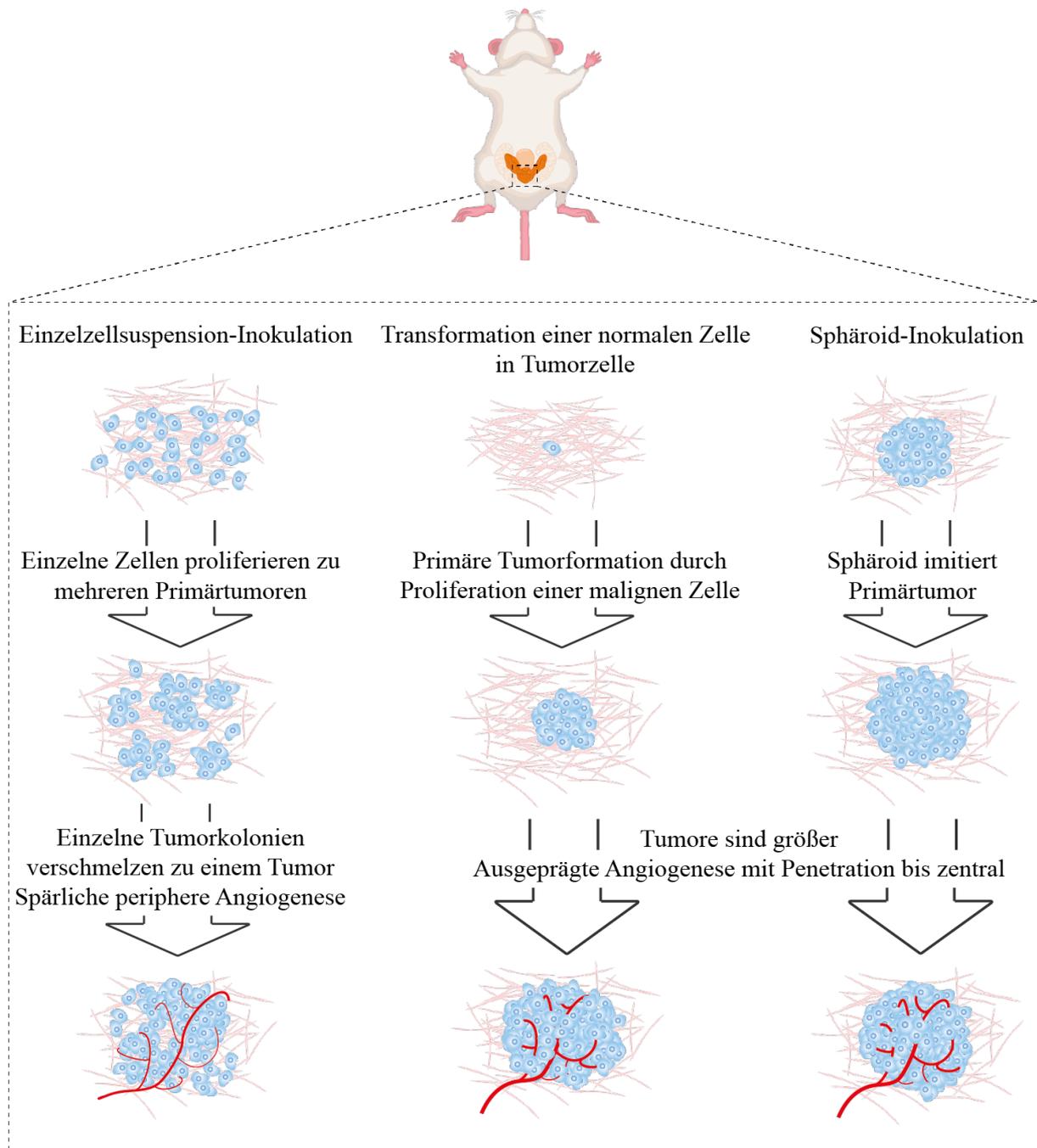


Abbildung 29: Schematische Darstellung der hypothetischen Rationale für die raschere Tumorprogression und Metastasierung in LNCaP-Sphäroiden gegenüber LNCaP-Monolayern in Bezug zur natürlichen Tumorentwicklung. Modifiziert nach Szade et. al [175].

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Etablierung einer Methode zur orthotopen Transplantation von dreidimensionalen Prostatakarzinomzellaggregaten, um dabei den Vergleich zur konventionellen orthotopen Inokulation von Einzelzellsuspensionen aus einer Monolayerkultur zu ermöglichen. Hierbei stellte sich die zentrale Frage, inwieweit die Implantation eines dreidimensionalen Prostatakarzinomzellaggregats die Tumorprogression und Metastasierung beeinflusst.

Die orthotope Inokulation von LNCaP-Sphäroiden stellt eine vielversprechende Methode zur Erforschung des Prostatakarzinoms *in vivo* dar. Ein eindeutiger Vorteil gegenüber konventionellen Implantationen von Einzelzellsuspensionen ist die präzisere Abbildung der Tumorarchitektur des Prostatakarzinoms bereits *in vitro* vor Implantation. Die intraprostatiche Injektion von Sphäroiden resultierte in dieser Arbeit in einer tendenziell früheren Entwicklung von Prostatakarzinomen mit einer höheren Rate an Lungen- und Lymphknotenmetastasierungen gegenüber Monolayer-Tumoren. Darüber hinaus demonstrierten Prostatakarzinome aus Sphäroiden eine stärkere Proliferation, welche sich in der Ausbildung von größeren Tumorumfängen und einer stärkeren immunhistochemischen Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 und des Androgenrezeptors ausdrückte. In diesem Zusammenhang ergeben sich weitere interessante Forschungsfragen, wie die Frage der veränderten Angiogenese in Sphäroid-Tumoren und die Migration von tumorassoziierten Stromazellen als mögliche Faktoren der früheren Tumorentwicklung und der stärkeren Metastasierung. Die zeitliche Dynamik der Neoangiogenese könnte anhand von Doppler-Sonographie und der Analyse der Tumor-Microvessel-Density (MVD) besser nachvollzogen werden.

Eine Limitation dieses Modells stellte die geringe Rate erfolgreiche Transplantation von 50 % dar, die mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die sehr geringe Anzahl der transplantierten LNCaP-Zellen bedingt war. Zukünftig gilt es, dieser Limitation mit neuen methodischen Ansätzen entgegenzuwirken, wie der Implantation von Sphäroiden, welche in soliden Trägersubstanzen wie Kollagen eingebettet sind und der damit einhergehenden Option der Transplantation von Sphäroiden mit größeren Zellzahlen. Sofern es dadurch gelingen sollte, eine Anwachsrate vergleichbar zu konventionellen orthotopen Injektionen von LNCaP-Einzelzellsuspensionen zu generieren, kann postuliert werden, dass sich in Zukunft die orthotope Implantation von LNCaP-Sphäroiden gegenüber der Einzelzellsuspension aus Monolayerkultur als präferierte *In-vivo*-Methodik in der Prostatakarzinomforschung durchsetzen kann.

Diese Arbeit stellt somit eine fundierte Grundlage für den Transfer von zweidimensionalen zu dreidimensionalen *In-vivo*-Modellen in der Prostatakarzinomforschung und damit für die Entwicklung von neuartigen diagnostischen und therapeutischen Strategien dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbott A (2003) Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 424:870-872
2. Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H (2004) Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *J Urol* 171:2122-2127
3. Agarwal N, Azad AA, Carles J, Fay AP, Matsubara N, Heinrich D, Szczylik C, De Giorgi U, Young Joung J, Fong PCC, Voog E, Jones RJ, Shore ND, Dunshee C, Zschäbitz S, Oldenburg J, Lin X, Healy CG, Di Santo N, Zohren F, Fizazi K (2023) Talazoparib plus enzalutamide in men with first-line metastatic castration-resistant prostate cancer (TALAPRO-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 402:291-303
4. Ahdoot M, Wilbur AR, Reese SE, Lebastchi AH, Mehralivand S, Gomella PT, Bloom J, Gurram S, Siddiqui M, Pinsky P, Parnes H, Linehan WM, Merino M, Choyke PL, Shih JH, Turkbey B, Wood BJ, Pinto PA (2020) MRI-Targeted, Systematic, and Combined Biopsy for Prostate Cancer Diagnosis. *N Engl J Med* 382:917-928
5. Alvarez-Pérez J, Ballesteros P, Cerdán S (2005) Microscopic images of intraspheroidal pH by 1H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *Magma* 18:293-301
6. Amaral RLF, Miranda M, Marcato PD, Swiech K (2017) Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Front Physiol* 8:605
7. An Z, Wang X, Geller J, Moossa AR, Hoffman RM (1998) Surgical orthotopic implantation allows high lung and lymph node metastatic expression of human prostate carcinoma cell line PC-3 in nude mice. *Prostate* 34:169-174
8. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Lubner B, Nakazawa M, Roeser JC, Chen Y, Mohammad TA, Chen Y, Fedor HL, Lotan TL, Zheng Q, De Marzo AM, Isaacs JT, Isaacs WB, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J (2014) AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med* 371:1028-1038
9. Armstrong AJ, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, Holzbeierlein J, Villers A, Azad A, Alcaraz A, Alekseev B, Iguchi T, Shore ND, Rosbrook B, Sugg J, Baron B, Chen L, Stenzl A (2019) ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 37:2974-2986
10. ASA ASoA (2020). ASA Physical Status Classification System
11. Augustin H, Hammerer PG, Graefen M, Erbersdobler A, Blonski J, Palisaar J, Daghofer F, Huland H (2003) Insignificant prostate cancer in radical prostatectomy specimen: time trends and preoperative prediction. *Eur Urol* 43:455-460
12. Ballangrud AM, Yang WH, Dnistrian A, Lampen NM, Sgouros G (1999) Growth and characterization of LNCaP prostate cancer cell spheroids. *Clin Cancer Res* 5:3171s-3176s
13. Bates RC, Lincz LF, Burns GF (1995) Involvement of integrins in cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 14:191-203
14. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, Marotz C, Giannopoulou E, Chakravarthi BV, Varambally S, Tomlins SA, Nanus DM, Tagawa ST, Van Allen EM,

-
- Elemento O, Sboner A, Garraway LA, Rubin MA, Demichelis F (2016) Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med* 22:298-305
15. Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I (2011) Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer* 128:1751-1757
16. Berger AP, Deibl M, Strasak A, Bektic J, Pelzer AE, Klocker H, Steiner H, Fritsche G, Bartsch G, Horninger W (2007) Large-scale study of clinical impact of PSA velocity: long-term PSA kinetics as method of differentiating men with from those without prostate cancer. *Urology* 69:134-138
17. Böni RA, Hutter BE, Trinkler F, Jochum W, Pestalozzi D, Krestin GP (1996) [Preoperative T-staging of prostatic carcinoma: endorectal magnetic resonance tomography compared with other imaging and clinical methods]. *Rofo* 165:152-158
18. Bonkhoff H (2005) [Differential diagnosis of prostate cancer: impact of pattern analysis and immunohistochemistry]. *Pathologe* 26:405-421
19. Borgström P, Bourdon MA, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N (1998) Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* 35:1-10
20. Bundesausschuss G (2020). Krebsfrüherkennungs-Richtlinie/KFE-RL. In Bundesanzeiger
21. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, DeKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, Waters WB, MacFarlane MT, Southwick PC (1994) Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 151:1283-1290
22. Cavallaro U, Christofori G (2004) Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1014:58-66
23. Chambers KF, Mosaad EM, Russell PJ, Clements JA, Doran MR (2014) 3D Cultures of prostate cancer cells cultured in a novel high-throughput culture platform are more resistant to chemotherapeutics compared to cells cultured in monolayer. *PLoS One* 9:e111029
24. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR (1987) A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis* 40:373-383
25. Cheng Q, Butler W, Zhou Y, Zhang H, Tang L, Perkinson K, Chen X, Jiang XS, McCall SJ, Inman BA, Huang J (2022) Pre-existing Castration-resistant Prostate Cancer-like Cells in Primary Prostate Cancer Promote Resistance to Hormonal Therapy. *Eur Urol* 81:446-455
26. Chi KN, Agarwal N, Bjartell A, Chung BH, Pereira de Santana Gomes AJ, Given R, Juárez Soto Á, Merseburger AS, Özgüroğlu M, Uemura H, Ye D, Deprince K, Naini V, Li J, Cheng S, Yu MK, Zhang K, Larsen JS, McCarthy S, Chowdhury S (2019) Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 381:13-24
27. Chun FK, Briganti A, Graefen M, Montorsi F, Porter C, Scattoni V, Gallina A, Walz J, Haese A, Steuber T, Erbersdobler A, Schlomm T, Ahyai SA, Currlin E, Valiquette L, Heinzer H, Rigatti P, Huland H, Karakiewicz PI (2007) Development and external validation of an extended 10-core biopsy nomogram. *Eur Urol* 52:436-444
-

-
28. Clarke NW, Armstrong AJ, Thiery-Vuillemin A, Oya M, Shore N, Loreda E, Procopio G, Menezes Jd, Giroto G, Arslan C, Mehra N, Parnis F, Brown E, Schlürmann F, Joung JY, Sugimoto M, Virizuela JA, Emmenegger U, Navratil J, Buchschacher GL, Poehlein C, Harrington EA, Desai C, Kang J, Saad F (2022) Abiraterone and Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *NEJM Evidence* 1:EVIDoa2200043
 29. Clevers H (2016) Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165:1586-1597
 30. Colicchia M, Morlacco A, Cheville JC, Karnes RJ (2017) Genomic tests to guide prostate cancer management following diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 17:367-377
 31. Cooperberg MR, Hilton JF, Carroll PR (2011) The CAPRA-S score: A straightforward tool for improved prediction of outcomes after radical prostatectomy. *Cancer* 117:5039-5046
 32. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross T, Henry AM, Joniau S, Lam TB, Mason MD, van der Poel HG, van der Kwast TH, Rouvière O, Wiegel T, Mottet N (2017) EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol* 71:630-642
 33. Cucchiara V, Cooperberg MR, Dall'Era M, Lin DW, Montorsi F, Schalken JA, Evans CP (2018) Genomic Markers in Prostate Cancer Decision Making. *Eur Urol* 73:572-582
 34. Culig Z, Hoffmann J, Erdel M, Eder IE, Hobisch A, Hittmair A, Bartsch G, Utermann G, Schneider MR, Parczyk K, Klocker H (1999) Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. *Br J Cancer* 81:242-251
 35. Cunningham D, You Z (2015) In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods* 2
 36. Curcio E, Salerno S, Barbieri G, De Bartolo L, Drioli E, Bader A (2007) Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials* 28:5487-5497
 37. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Jama* 280:969-974
 38. D'Amico AV, Chen MH, Renshaw AA, Loffredo M, Kantoff PW (2008) Androgen suppression and radiation vs radiation alone for prostate cancer: a randomized trial. *Jama* 299:289-295
 39. Dai C, Heemers H, Sharifi N (2017) Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7
 40. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, Chi KN, Sartor O, Agarwal N, Olmos D, Thiery-Vuillemin A, Twardowski P, Mehra N, Goessl C, Kang J, Burgents J, Wu W, Kohlmann A, Adelman CA, Hussain M (2020) Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 382:2091-2102
 41. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO (2010) Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 376:1147-1154
-

-
42. de Wit R, de Bono J, Sternberg CN, Fizazi K, Tombal B, Wülfing C, Kramer G, Eymard J-C, Bamias A, Carles J, Iacovelli R, Melichar B, Sverrisdóttir Á, Theodore C, Feyerabend S, Helissey C, Ozatilgan A, Geffriaud-Ricouard C, Castellano D (2019) Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* 381:2506-2518
 43. Deger S, Boehmer D, Roigas J, Schink T, Wernecke KD, Wiegel T, Hinkelbein W, Budach V, Loening SA (2005) High dose rate (HDR) brachytherapy with conformal radiation therapy for localized prostate cancer. *Eur Urol* 47:441-448
 44. Dennis LK, Lynch CF, Torner JC (2002) Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 60:78-83
 45. Desoize B, Gimonet D, Jardiller JC (1998) Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Res* 18:4147-4158
 46. Drake CG (2010) Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10:580-593
 47. Droz JP, Balducci L, Bolla M, Emberton M, Fitzpatrick JM, Joniau S, Kattan MW, Monfardini S, Moul JW, Naeim A, van Poppel H, Saad F, Sternberg CN (2010) Management of prostate cancer in older men: recommendations of a working group of the International Society of Geriatric Oncology. *BJU Int* 106:462-469
 48. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2:561-566
 49. Duan Z, Miller HD, Fu X, Ge D, Jin B, Moustafa AA, Lan R, Zhang K, Chen Z, You Z (2019) Th17 cells promote tumor growth in an immunocompetent orthotopic mouse model of prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol* 7:249-261
 50. Dubessy C, Merlin JM, Marchal C, Guillemin F (2000) Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 36:179-192
 51. Eaton CL, Coleman RE (2003) Pathophysiology of bone metastases from prostate cancer and the role of bisphosphonates in treatment. *Cancer Treat Rev* 29:189-198
 52. EAU (2023). EAU Guidelines
 53. Eder T, Weber A, Neuwirt H, Grünbacher G, Ploner C, Klocker H, Sampson N, Eder IE (2016) Cancer-Associated Fibroblasts Modify the Response of Prostate Cancer Cells to Androgen and Anti-Androgens in Three-Dimensional Spheroid Culture. *Int J Mol Sci* 17
 54. Efstathiou E, Logothetis CJ (2010) A new therapy paradigm for prostate cancer founded on clinical observations. *Clin Cancer Res* 16:1100-1107
 55. Ekert JE, Deakye J, Pribul-Allen P, Terry R, Schofield C, Jeong CG, Storey J, Mohamet L, Francis J, Naidoo A, Amador A, Klein JL, Rowan W (2020) Recommended Guidelines for Developing, Qualifying, and Implementing Complex In Vitro Models (CIVMs) for Drug Discovery. *SLAS Discov* 25:1174-1190
 56. El Harane S, Zidi B, El Harane N, Krause K-H, Matthes T, Preynat-Seauve O (2023) Cancer Spheroids and Organoids as Novel Tools for Research and Therapy: State of the Art and Challenges to Guide Precision Medicine. *Cells* 12:1001
-

-
57. Ellem SJ, De-Juan-Pardo EM, Risbridger GP (2014) In vitro modeling of the prostate cancer microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev* 79-80:214-221
 58. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Treml K, Vollmer G, Weg-Remers S, Barnes B, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Franke M, Gurung-Schönfeld I, Haberland J, Imhoff M, Kraywinkel K, Starker A, von Berenberg-Gossler P, Wienecke A (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018 (Robert Koch-Institut), pp. 172
 59. Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G (1997) LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62:391-399
 60. Even-Sapir E, Metser U, Mishani E, Lievshitz G, Lerman H, Leibovitch I (2006) The detection of bone metastases in patients with high-risk prostate cancer: 99mTc-MDP Planar bone scintigraphy, single- and multi-field-of-view SPECT, 18F-fluoride PET, and 18F-fluoride PET/CT. *J Nucl Med* 47:287-297
 61. Fang S, Salven P (2011) Stem cells in tumor angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 50:290-295
 62. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F (2013) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49:1374-1403
 63. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H, Jiang Q, Tadros S, Dansey R, Goessl C (2011) Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet* 377:813-822
 64. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, Özgüroğlu M, Ye D, Feyerabend S, Protheroe A, De Porre P, Kheoh T, Park YC, Todd MB, Chi KN (2017) Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 377:352-360
 65. Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Sommariva M, Gagliano N, Limonta P (2020) Three-Dimensional Cell Cultures as an In Vitro Tool for Prostate Cancer Modeling and Drug Discovery. *Int J Mol Sci* 21
 66. Foty R (2011) A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*
 67. Fridman R, Kibbey MC, Royce LS, Zain M, Sweeney M, Jicha DL, Yannelli JR, Martin GR, Kleinman HK (1991) Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *J Natl Cancer Inst* 83:769-774
 68. G-BA GB (2020). Qualitätssicherungs-Richtlinie zur interstitiellen LDR- Brachytherapie beim lokal begrenzten Prostatakarzinom mit niedrigem Risikoprofil: Beschluss. 2020
 69. Gandaglia G, Martini A, Ploussard G, Fossati N, Stabile A, De Visschere P, Borgmann H, Heidegger I, Steinkohl F, Kretschmer A, Marra G, Mathieu R, Surcel C, Tilki D, Tsaour I, Valerio M, Van den Bergh R, Ost P, Gontero P, Montorsi F, Briganti A (2020) External Validation of the 2019 Briganti Nomogram for the Identification of Prostate Cancer Patients Who Should Be Considered for an Extended Pelvic Lymph Node Dissection. *Eur Urol* 78:138-142
-

-
70. Gesundheitswesen IfrQtuWi (2020). Prostatakrebscreening mittels PSA-Test
 71. Gleason DF, Mellinger GT (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111:58-64
 72. Graefen MH, Hartwig; Pientka, Ludger; Miller, Kurt; Rübber, Herbert (2004) Serie Prostatakarzinom: Indikation zur kurativen Therapie des Prostatakarzinoms Stellenwert von Nomogrammen in der Prognoseabschätzung und Therapieberatung. *Dtsch Arztebl* 101: A 2619–2622
 73. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, Quist MJ, Jing X, Lonigro RJ, Brenner JC, Asangani IA, Ateeq B, Chun SY, Siddiqui J, Sam L, Anstett M, Mehra R, Prensner JR, Palanisamy N, Ryslik GA, Vandin F, Raphael BJ, Kunju LP, Rhodes DR, Pienta KJ, Chinnaiyan AM, Tomlins SA (2012) The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487:239-243
 74. Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Priou F, Esterni B, Latorzeff I, Delva R, Krakowski I, Laguerre B, Rolland F, Théodore C, Deplanque G, Ferrero JM, Pouessel D, Mourey L, Beuzeboc P, Zanetta S, Habibian M, Berdah JF, Dauba J, Baciuchka M, Platini C, Linassier C, Labourey JL, Machiels JP, El Kouri C, Ravaud A, Suc E, Eymard JC, Hasbini A, Bousquet G, Soulie M (2013) Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 14:149-158
 75. Griffith LG, Swartz MA (2006) Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:211-224
 76. Gundem G, Van Loo P, Kremeyer B, Alexandrov LB, Tubio JMC, Papaemmanuil E, Brewer DS, Kallio HML, Högnäs G, Annala M, Kivinummi K, Goody V, Latimer C, O'Meara S, Dawson KJ, Isaacs W, Emmert-Buck MR, Nykter M, Foster C, Kote-Jarai Z, Easton D, Whitaker HC, Neal DE, Cooper CS, Eeles RA, Visakorpi T, Campbell PJ, McDermott U, Wedge DC, Bova GS (2015) The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 520:353-357
 77. Gunti S, Hoke ATK, Vu KP, London NR, Jr. (2021) Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers (Basel)* 13
 78. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674
 79. Härmä V, Virtanen J, Mäkelä R, Happonen A, Mpindi JP, Knuutila M, Kohonen P, Lötjönen J, Kallioniemi O, Nees M (2010) A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS One* 5:e10431
 80. Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, Toner P (1995) Vimentin and cytokeratin expression in nodular hyperplasia and carcinoma of the prostate. *J Clin Pathol* 48:1031-1034
 81. Hebert JR, Hurley TG, Olendzki BC, Teas J, Ma Y, Hampl JS (1998) Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *J Natl Cancer Inst* 90:1637-1647
 82. Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, Provost N, Frohlich MW (2009) Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 115:3670-3679
-

-
83. Hodapp N (2017) [Comparison of combined IMRT and IGRT with conventional 3D-CRT in the irradiation of prostate cancer : Studying the advantages strongly depends on the conditions]. *Strahlenther Onkol* 193:431-432
 84. Hoehn W, Schroeder FH, Reimann JF, Joebsis AC, Hermanek P (1980) Human prostatic adenocarcinoma: some characteristics of a serially transplantable line in nude mice (PC 82). *Prostate* 1:95-104
 85. Hofman MS, Lawrentschuk N, Francis RJ, Tang C, Vela I, Thomas P, Rutherford N, Martin JM, Frydenberg M, Shakher R, Wong LM, Taubman K, Ting Lee S, Hsiao E, Roach P, Nottage M, Kirkwood I, Hayne D, Link E, Marusic P, Matera A, Herschtal A, Iravani A, Hicks RJ, Williams S, Murphy DG (2020) Prostate-specific membrane antigen PET-CT in patients with high-risk prostate cancer before curative-intent surgery or radiotherapy (proPSMA): a prospective, randomised, multicentre study. *Lancet* 395:1208-1216
 86. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43:1809-1818
 87. Hosseini-Beheshti E, Choi W, Weiswald LB, Kharmate G, Ghaffari M, Roshan-Moniri M, Hassona MD, Chan L, Chin MY, Tai IT, Rennie PS, Fazli L, Tomlinson Guns ES (2016) Exosomes confer pro-survival signals to alter the phenotype of prostate cells in their surrounding environment. *Oncotarget* 7:14639-14658
 88. Hsiao WC, Young TH (2019) Characteristics of melanocyte spheroids formed through different biomaterial-induced processes. *J Formos Med Assoc* 118:152-161
 89. Hu J, Xu H, Zhu W, Wu F, Wang J, Ding Q, Jiang H (2015) Neo-adjuvant hormone therapy for non-metastatic prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of 5,194 patients. *World J Surg Oncol* 13:73
 90. Huang WH, Chang MC, Tsai KS, Hung MC, Chen HL, Hung SC (2013) Mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of tumors in mice. *Oncogene* 32:4343-4354
 91. Iannelli F, Roca MS, Lombardi R, Ciardiello C, Grumetti L, De Rienzo S, Moccia T, Vitagliano C, Sorice A, Costantini S, Milone MR, Pucci B, Leone A, Di Gennaro E, Mancini R, Ciliberto G, Bruzzese F, Budillon A (2020) Synergistic antitumor interaction of valproic acid and simvastatin sensitizes prostate cancer to docetaxel by targeting CSCs compartment via YAP inhibition. *J Exp Clin Cancer Res* 39:213
 92. Incorporated C (2015). 3D Spheroids Simplified with Corning Life Sciences
 93. Ingram M, Techy GB, Saroufeem R, Yazan O, Narayan KS, Goodwin TJ, Spaulding GF (1997) Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33:459-466
 94. Institute B (2023). Cancer Dependency Map Portal
 95. James ND, de Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Ritchie AWS, Amos CL, Gilson C, Jones RJ, Matheson D, Millman R, Attard G, Chowdhury S, Cross WR, Gillessen S, Parker CC, Russell JM, Berthold DR, Brawley C, Adab F, Aung S, Birtle AJ, Bowen J, Brock S, Chakraborti P, Ferguson C, Gale J, Gray E, Hingorani M, Hoskin PJ, Lester JF, Malik ZI, McKinna F, McPhail N, Money-Kyrle J, O'Sullivan J, Parikh O, Protheroe A, Robinson A, Srihari NN, Thomas C, Wagstaff J, Wylie J, Zarkar A, Parmar MKB, Sydes MR (2017) Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N Engl J Med* 377:338-351
-

-
96. Jiang N, Zhu S, Chen J, Niu Y, Zhou L (2013) A-methylacyl-CoA racemase (AMACR) and prostate-cancer risk: a meta-analysis of 4,385 participants. *PLoS One* 8:e74386
 97. Johns LE, Houlston RS (2003) A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int* 91:789-794
 98. Jouberton E, Voissiere A, Penault-Llorca F, Cachin F, Miot-Noirault E (2022) Multicellular tumor spheroids of LNCaP-Luc prostate cancer cells as in vitro screening models for cytotoxic drugs. *Am J Cancer Res* 12:1116-1128
 99. Jung V, Saar M, Grobholz R, Stöckle M, Unteregger G, Kamradt J (2008) [Development of a three-dimensional primary prostate cancer cell culture model]. *Urologe A* 47:1199-1204
 100. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17:16-23
 101. Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT (1998) A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:766-771
 102. Kattan MW, Eastham JA, Wheeler TM, Maru N, Scardino PT, Erbersdobler A, Graefen M, Huland H, Koh H, Shariat S, Slawin KM, Ohori M (2003) Counseling men with prostate cancer: a nomogram for predicting the presence of small, moderately differentiated, confined tumors. *J Urol* 170:1792-1797
 103. Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW (1963) STUDIES OF ILLNESS IN THE AGED. THE INDEX OF ADL: A STANDARDIZED MEASURE OF BIOLOGICAL AND PSYCHOSOCIAL FUNCTION. *Jama* 185:914-919
 104. Kleinman HK, Koblinski J, Lee S, Engbring J (2001) Role of basement membrane in tumor growth and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 10:329-338, ix
 105. Klotz L (2005) Active surveillance for prostate cancer: for whom? *J Clin Oncol* 23:8165-8169
 106. Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A (2010) Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 28:126-131
 107. Krebsgesellschaft D, Krebshilfe D, AWMF (2021) Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Vol Langversion 6.2).
 108. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R (2004) The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9:273-285
 109. Landini G, Martinelli G, Piccinini F (2020) Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging. *Bioinformatics* 37:1485-1487
 110. Lawton MP, Brody EM (1969) Assessment of older people: self-maintaining and instrumental activities of daily living. *Gerontologist* 9:179-186
 111. Leibovici J, Itzhaki O, Huszar M, Sinai J (2011) The tumor microenvironment: part 1. *Immunotherapy* 3:1367-1384
 112. Lin RZ, Chang HY (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 3:1172-1184
-

-
113. Linxweiler J, Körbel C, Müller A, Jüngel E, Blaheta R, Heinzelmann J, Stöckle M, Junker K, Menger MD, Saar M (2017) Experimental imaging in orthotopic renal cell carcinoma xenograft models: comparative evaluation of high-resolution 3D ultrasonography, in-vivo micro-CT and 9.4T MRI. *Sci Rep* 7:14249
 114. Linxweiler J, Körbel C, Müller A, Hammer M, Veith C, Bohle RM, Stöckle M, Junker K, Menger MD, Saar M (2018) A novel mouse model of human prostate cancer to study intraprostatic tumor growth and the development of lymph node metastases. *Prostate* 78:664-675
 115. Linxweiler J, Hammer M, Muhs S, Kohn M, Pryalukhin A, Veith C, Bohle RM, Stöckle M, Junker K, Saar M (2019) Patient-derived, three-dimensional spheroid cultures provide a versatile translational model for the study of organ-confined prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 145:551-559
 116. Linxweiler J, Hajili T, Körbel C, Berchem C, Zeuschner P, Müller A, Stöckle M, Menger MD, Junker K, Saar M (2020) Cancer-associated fibroblasts stimulate primary tumor growth and metastatic spread in an orthotopic prostate cancer xenograft model. *Sci Rep* 10:12575
 117. Linxweiler J, Junker K (2020) Extracellular vesicles in urological malignancies: an update. *Nat Rev Urol* 17:11-27
 118. Lipinski KA, Barber LJ, Davies MN, Ashenden M, Sottoriva A, Gerlinger M (2016) Cancer Evolution and the Limits of Predictability in Precision Cancer Medicine. *Trends Cancer* 2:49-63
 119. Lloyd MD, Darley DJ, Wierzbicki AS, Threadgill MD (2008) α -Methylacyl-CoA racemase – an ‘obscure’ metabolic enzyme takes centre stage. *The FEBS Journal* 275:1089-1102
 120. Logos Biosystems I (2017). LUNa II Automated Cell Counter User Manual
 121. Logothetis CJ, Gallick GE, Maity SN, Kim J, Aparicio A, Efstathiou E, Lin SH (2013) Molecular classification of prostate cancer progression: foundation for marker-driven treatment of prostate cancer. *Cancer Discov* 3:849-861
 122. Løvf M, Zhao S, Axcróna U, Johannessen B, Bakken AC, Carm KT, Hoff AM, Myklebost O, Meza-Zepeda LA, Lie AK, Axcróna K, Lothe RA, Skotheim RI (2019) Multifocal Primary Prostate Cancer Exhibits High Degree of Genomic Heterogeneity. *Eur Urol* 75:498-505
 123. Luebke-Wheeler JL, Nedredal G, Yee L, Amiot BP, Nyberg SL (2009) E-cadherin protects primary hepatocyte spheroids from cell death by a caspase-independent mechanism. *Cell Transplant* 18:1281-1287
 124. McDermott U, Sharma SV, Dowell L, Greninger P, Montagut C, Lamb J, Archibald H, Raudales R, Tam A, Lee D, Rothenberg SM, Supko JG, Sordella R, Ulkus LE, Iafrate AJ, Maheswaran S, Njauw CN, Tsao H, Drew L, Hanke JH, Ma XJ, Erlander MG, Gray NS, Haber DA, Settleman J (2007) Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19936-19941
 125. *Medicine NLo* (2023)
 126. Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, Mickey GH, Vollmer RT, Paulson DF (1977) Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res* 37:4049-4058
-

-
127. Mikkonen L, Pihlajamaa P, Sahu B, Zhang FP, Jänne OA (2010) Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung. *Mol Cell Endocrinol* 317:14-24
128. Millikan RE, Wen S, Pagliaro LC, Brown MA, Moomey B, Do KA, Logothetis CJ (2008) Phase III trial of androgen ablation with or without three cycles of systemic chemotherapy for advanced prostate cancer. *J Clin Oncol* 26:5936-5942
129. Mitchell S, Abel P, Ware M, Stamp G, Lalani E (2000) Phenotypic and genotypic characterization of commonly used human prostatic cell lines. *BJU Int* 85:932-944
130. Mitchell T, Neal DE (2015) The genomic evolution of human prostate cancer. *Br J Cancer* 113:193-198
131. Monterosso ME, Futrega K, Lott WB, Vela I, Williams ED, Doran MR (2021) Using the Microwell-mesh to culture microtissues in vitro and as a carrier to implant microtissues in vivo into mice. *Sci Rep* 11:5118
132. Moretti TBC, Magna LA, Reis LO (2022) Surgical Results and Complications for Open, Laparoscopic, and Robot-assisted Radical Prostatectomy: A Reverse Systematic Review. *Eur Urol Open Sci* 44:150-161
133. Morlacco A, Modonutti D, Motterle G, Martino F, Dal Moro F, Novara G (2021) Nomograms in Urologic Oncology: Lights and Shadows. *J Clin Med* 10
134. Mueller-Klieser W (1984) Method for the determination of oxygen consumption rates and diffusion coefficients in multicellular spheroids. *Biophys J* 46:343-348
135. Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM (2020) The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:5931-5937
136. Nagle RB, Ahmann FR, McDaniel KM, Paquin ML, Clark VA, Celniker A (1987) Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res* 47:281-286
137. Nair B, Wilt T, MacDonald R, Rutks I (2002) Early versus deferred androgen suppression in the treatment of advanced prostatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev*:Cd003506
138. Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S (2019) Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells* 8
139. Neuwirt H, Bouchal J, Kharraishvili G, Ploner C, Jöhrer K, Pitterl F, Weber A, Klocker H, Eder IE (2020) Cancer-associated fibroblasts promote prostate tumor growth and progression through upregulation of cholesterol and steroid biosynthesis. *Cell Commun Signal* 18:11
140. Nowossadeck E, Kowalski C, Barnes B (2018) Demografische Alterung und Krebs. *Onkologie heute* 3:48-50
141. Ocana A, Pandiella A, Siu LL, Tannock IF (2011) Preclinical development of molecular-targeted agents for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 8:200-209
142. Ohya S, Kajikuri J, Endo K, Kito H, Matsui M (2021) K(Ca)1.1 K(+) Channel Inhibition Overcomes Resistance to Antiandrogens and Doxorubicin in a Human Prostate Cancer LNCaP Spheroid Model. *Int J Mol Sci* 22
-

-
143. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:839-845
 144. Parajuli KR, Zhang Q, Liu S, You Z (2016) Aminomethylphosphonic acid inhibits growth and metastasis of human prostate cancer in an orthotopic xenograft mouse model. *Oncotarget* 7:10616-10626
 145. Peehl DM (2005) Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer* 12:19-47
 146. Pienta KJ, Abate-Shen C, Agus DB, Attar RM, Chung LW, Greenberg NM, Hahn WC, Isaacs JT, Navone NM, Peehl DM, Simons JW, Solit DB, Soule HR, VanDyke TA, Weber MJ, Wu L, Vessella RL (2008) The current state of preclinical prostate cancer animal models. *Prostate* 68:629-639
 147. Porter LH, Lawrence MG, Wang H, Clark AK, Bakshi A, Obinata D, Goode D, Papargiris M, Mural, Clouston D, Ryan A, Norden S, Corey E, Nelson PS, Isaacs JT, Grummet J, Kourambas J, Sandhu S, Murphy DG, Pook D, Frydenberg M, Taylor RA, Risbridger GP (2019) Establishing a cryopreservation protocol for patient-derived xenografts of prostate cancer. *Prostate* 79:1326-1337
 148. Pretlow TG, Delmoro CM, Dilley GG, Spadafora CG, Pretlow TP (1991) Transplantation of human prostatic carcinoma into nude mice in Matrigel. *Cancer Res* 51:3814-3817
 149. Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C, Haberkorn U, Schäfers M, Essler M, Baum RP, Kulkarni HR, Schmidt M, Drzezga A, Bartenstein P, Pfestroff A, Luster M, Lützen U, Marx M, Prasad V, Brenner W, Heinzl A, Mottaghy FM, Ruf J, Meyer PT, Heuschkel M, Eveslage M, Bögemann M, Fendler WP, Krause BJ (2017) German Multicenter Study Investigating ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J Nucl Med* 58:85-90
 150. Ramteke A, Ting H, Agarwal C, Mateen S, Somasagara R, Hussain A, Graner M, Frederick B, Agarwal R, Deep G (2015) Exosomes secreted under hypoxia enhance invasiveness and stemness of prostate cancer cells by targeting adherens junction molecules. *Mol Carcinog* 54:554-565
 151. Rembrink K, Romijn JC, van der Kwast TH, Rübber H, Schröder FH (1997) Orthotopic implantation of human prostate cancer cell lines: a clinically relevant animal model for metastatic prostate cancer. *Prostate* 31:168-174
 152. Roth MD, Harui A (2015) Human tumor infiltrating lymphocytes cooperatively regulate prostate tumor growth in a humanized mouse model. *J Immunother Cancer* 3:12
 153. Rothschild S, Zippelius A (2012) [Cancer immunotherapy - novel perspectives]. *Ther Umsch* 69:559-563
 154. Ruifrok AC, Johnston DA (2001) Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 23:291-299
 155. Saar M, Körbel C, Linxweiler J, Jung V, Kamradt J, Hasenfus A, Stöckle M, Unteregger G, Menger MD (2015) Orthotopic tumorgrafts in nude mice: A new method to study human prostate cancer. *Prostate* 75:1526-1537
 156. Sailer V, von Amsberg G, Duensing S, Kirfel J, Lieb V, Metzger E, Offermann A, Pantel K, Schuele R, Taubert H, Wach S, Perner S, Werner S, Aigner A (2023) Experimental in vitro, ex vivo and in vivo models in prostate cancer research. *Nature Reviews Urology* 20:158-178

-
157. Sampson N, Neuwirt H, Puhr M, Klocker H, Eder IE (2013) In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 20:R49-64
158. Sato N, Gleave ME, Bruchovsky N, Rennie PS, Beraldi E, Sullivan LD (1997) A metastatic and androgen-sensitive human prostate cancer model using intraprostatic inoculation of LNCaP cells in SCID mice. *Cancer Res* 57:1584-1589
159. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Zappa M, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Määttä L, Lilja H, Denis LJ, Recker F, Paez A, Bangma CH, Carlsson S, Puliti D, Villers A, Rebillard X, Hakama M, Stenman UH, Kujala P, Taari K, Aus G, Huber A, van der Kwast TH, van Schaik RH, de Koning HJ, Moss SM, Auvinen A (2014) Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* 384:2027-2035
160. Shao YH, Demissie K, Shih W, Mehta AR, Stein MN, Roberts CB, Dipaola RS, Lu-Yao GL (2009) Contemporary risk profile of prostate cancer in the United States. *J Natl Cancer Inst* 101:1280-1283
161. Shariat SF, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Kattan MW (2008) An updated catalog of prostate cancer predictive tools. *Cancer* 113:3075-3099
162. Sharma NL, Massie CE, Ramos-Montoya A, Zecchini V, Scott HE, Lamb AD, MacArthur S, Stark R, Warren AY, Mills IG, Neal DE (2013) The androgen receptor induces a distinct transcriptional program in castration-resistant prostate cancer in man. *Cancer Cell* 23:35-47
163. Sherwood ER, Berg LA, Mitchell NJ, McNeal JE, Kozlowski JM, Lee C (1990) Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J Urol* 143:167-171
164. Shu J, Dolman GE, Duan J, Qiu G, Ilyas M (2016) Statistical colour models: an automated digital image analysis method for quantification of histological biomarkers. *Biomed Eng Online* 15:46
165. Sienkiewicz K, Yang C, Paschal BM, Ratan A (2022) Genomic analyses of the metastasis-derived prostate cancer cell lines LNCaP, VCaP, and PC3-AR. *Prostate* 82:442-451
166. Sigma-Aldrich I (2004). Anti-Androgen Receptor Developed in Rabbit Affinity Isolated Antibody
167. Smith MR, Hussain M, Saad F, Fizazi K, Sternberg CN, Crawford ED, Kopyltsov E, Park CH, Alekseev B, Montesa-Pino Á, Ye D, Parnis F, Cruz F, Tammela TLJ, Suzuki H, Utriainen T, Fu C, Uemura M, Méndez-Vidal MJ, Maughan BL, Joensuu H, Thiele S, Li R, Kuss I, Tombal B (2022) Darolutamide and Survival in Metastatic, Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 386:1132-1142
168. Sobel RE, Sadar MD (2005) Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J Urol* 173:342-359
169. Song H, David O, Clejan S, Giordano CL, Pappas-Lebeau H, Xu L, O'Connor KC (2004) Spatial composition of prostate cancer spheroids in mixed and static cultures. *Tissue Eng* 10:1266-1276
170. Spratt DE, Zumsteg ZS, Feng FY, Tomlins SA (2016) Translational and clinical implications of the genetic landscape of prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 13:597-610
-

-
171. St Croix B, Kerbel RS (1997) Cell adhesion and drug resistance in cancer. *Curr Opin Oncol* 9:549-556
172. Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordóñez NG, Killion JJ, Fidler IJ (1992) Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 84:951-957
173. Sun Y, Li S, Yang L, Zhang D, Zhao Z, Gao J, Liu L (2019) CDC25A Facilitates Chemoresistance in Ovarian Cancer Multicellular Spheroids by Promoting E-cadherin Expression and Arresting Cell Cycles. *J Cancer* 10:2874-2884
174. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209-249
175. Szade K, Zukowska M, Szade A, Collet G, Kloska D, Kieda C, Jozkowicz A, Dulak J (2016) Spheroid-plug model as a tool to study tumor development, angiogenesis, and heterogeneity in vivo. *Tumour Biol* 37:2481-2496
176. Takeda M, Mizokami A, Mamiya K, Li YQ, Zhang J, Keller ET, Namiki M (2007) The establishment of two paclitaxel-resistant prostate cancer cell lines and the mechanisms of paclitaxel resistance with two cell lines. *Prostate* 67:955-967
177. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351:1502-1512
178. Teyssonneau D, Margot H, Cabart M, Anonnay M, Sargos P, Vuong NS, Soubeyran I, Sevenet N, Roubaud G (2021) Prostate cancer and PARP inhibitors: progress and challenges. *J Hematol Oncol* 14:51
179. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach JM, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkinsop C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan M, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang YT, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försönits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszi RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano SI, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinke DJ, 2nd, Kornek M, Kosanović MM, Kovács Á F, Krämer-Albers EM, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S,
-

- Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee MS, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lőrincz Á M, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Jr., Meehan KL, Mertens I, Minciocchi VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsun P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loughlin A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G, Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, 2nd, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ, Jr., Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang JY, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7:1535750
180. Thomas DS (2017). IGeL-Monitor: PSA-Test zur Früherkennung von Prostata-Krebs, (MDS) MDdSBdKeV, ed.
181. Urologie DGf (2020). Positionspapier der Deutschen Gesellschaft für Urologie zum Vorbericht: Prostatakrebscreening mittels PSA-Test (S19-01) des IQWiG
182. Valta M, Ylä-Pelto J, Lan Y, Kähkönen T, Taimen P, Boström PJ, Ettala O, Khan S, Paulin N, Elo LL, Koskinen PJ, Härkönen P, Tuomela J (2020) Critical evaluation of the subcutaneous engraftments of hormone naïve primary prostate cancer. *Transl Androl Urol* 9:1120-1134
183. Valta MP, Zhao H, Saar M, Tuomela J, Nolley R, Linxweiler J, Sandholm J, Lehtimäki J, Härkönen P, Coleman I, Nelson PS, Corey E, Peehl DM (2016) Spheroid culture of LuCaP 136 patient-derived xenograft enables versatile preclinical models of prostate cancer. *Clinical & Experimental Metastasis* 33:325-337
184. Van Hemelrijck M, Ji X, Helleman J, Roobol MJ, Nieboer D, Bangma C, Frydenberg M, Rannikko A, Lee LS, Gnanapragasam V, Kattan MW (2021) A first step towards a global nomogram to predict disease progression for men on active surveillance. *Transl Androl Urol* 10:1102-1109
185. van Weerden WM, Romijn JC (2000) Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. *Prostate* 43:263-271

186. Verma B, Ritchie M, Mancini M (2017) Development and Applications of Patient-Derived Xenograft Models in Humanized Mice for Oncology and Immune-Oncology Drug Discovery. *Current Protocols in Pharmacology* 78:14.41.11-14.41.12
187. Wang S, Gao D, Chen Y (2017) The potential of organoids in urological cancer research. *Nat Rev Urol* 14:401-414
188. Wang Y, Revelo MP, Sudilovsky D, Cao M, Chen WG, Goetz L, Xue H, Sadar M, Shappell SB, Cunha GR, Hayward SW (2005) Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue. *Prostate* 64:149-159
189. Watanabe M, Takagi A (2008) [Biological behavior of prostate cancer cells in 3D culture systems]. *Yakugaku Zasshi* 128:37-44
190. Xiang Y, Qiu Q, Jiang M, Jin R, Lehmann BD, Strand DW, Jovanovic B, DeGraff DJ, Zheng Y, Yousif DA, Simmons CQ, Case TC, Yi J, Cates JM, Virostko J, He X, Jin X, Hayward SW, Matusik RJ, George AL, Jr., Yi Y (2013) SPARCL1 suppresses metastasis in prostate cancer. *Mol Oncol* 7:1019-1030
191. Young SR, Saar M, Santos J, Nguyen HM, Vessella RL, Peehl DM (2013) Establishment and serial passage of cell cultures derived from LuCaP xenografts. *Prostate* 73:1251-1262
192. Ziółkowska E, Zarzycka M, Wiśniewski T, Zyromska A (2012) The side effects of hormonal therapy at the patients with prostate cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 16:491-497

7 Publikationen

Scientific Reports 2024 (Impact factor: 4,9) 17.04.2024

DOI: 10.1038/s41598-024-59052-0

Tumor promoting effects of spheroids in an orthotopic prostate cancer mouse model

Julius Lars Daniel Bastian¹, Philip Zeuschner¹, Michael Stöckle¹, Kerstin Junker¹, Johannes Linxweiler¹

¹Saarland University, Department of Urology, Homburg/Saar, Germany

Vorträge:

37th Annual European Association of Urology Congress 2022 (EAU22), Amsterdam

Monolayer versus spheroid: an *in-vivo* comparison regarding local progression and metastasis in prostate cancer

Julius Lars Bastian¹, Philip Zeuschner¹, Michael Stöckle¹, Kerstin Junker¹, Johannes Linxweiler¹

¹Saarland University, Department of Urology, Homburg/Saar, Germany

74. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie 2022 (DGU22), Hamburg

Monolayer versus Sphäroid: Einfluss auf lokale Tumorprogression und Metastasierung im orthotopen Prostatakarzinommodell?

Julius Lars Bastian¹, Philip Zeuschner¹, Michael Stöckle¹, Kerstin Junker¹, Johannes Linxweiler¹

¹Universität des Saarlandes, Klinik für Urologie und Kinderurologie, Homburg/Saar

62. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie (SWDGU22), Koblenz

Monolayer vs. Sphäroid: Ein *in vivo* Vergleich im Hinblick auf Tumorprogression und Metastasierung im Prostatakarzinom

Julius Lars Bastian¹, Philip Zeuschner¹, Michael Stöckle¹, Kerstin Junker¹, Johannes Linxweiler¹

¹Universität des Saarlandes, Klinik für Urologie und Kinderurologie, Homburg/Saar

Jahrestagung Deutsches Prostatakarzinom Konsortium 2022 (DPKK22), Homburg

Monolayer vs. Sphäroid: Ein *in vivo* Vergleich hinsichtlich lokaler Tumorprogression und Metastasierung

Julius Lars Bastian¹, Philip Zeuschner¹, Michael Stöckle¹, Kerstin Junker¹, Johannes Linxweiler¹

¹Universität des Saarlandes, Klinik für Urologie und Kinderurologie, Homburg/Saar

Poster:

28th Meeting of the EAU Section of Urological Research (ESUR22), Innsbruck

2D vs. 3D: An in vivo comparison of local tumor progression and metastases in an orthotopic prostate cancer mouse model

Julius Lars Bastian¹, Philip Zeuschner¹, Michael Stöckle¹, Kerstin Junker¹, Johannes Linxweiler¹

¹Saarland University, Department of Urology, Homburg/Saar, Germany

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Linxweiler und meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Kerstin Junker für die Leitung des Projekts. Ihr habt mir ermöglicht, Teil eines fantastischen Projekts in einer inspirierenden Arbeitsgruppe zu werden. Die gemeinsamen Diskussionen und eure Ratschläge haben mir oft eine andere Perspektive auf meine Experimente aufgezeigt. Dank eurer unermüdlichen Unterstützung war es mir möglich, auf nationalen und internationalen Kongressen zu referieren und dort meinen Horizont zu erweitern.

Danke Johannes für deine inspirierende Art. Wenn ich dir um 1 Uhr nachts ein Abstract schickte, kam es eine Stunde später korrigiert zurück. Deine Energie und dein Scharfsinn sind eine Inspiration. Danke für das Bestärken meines Interesses an der Wissenschaft, für amüsante Abende und die einzigartige Zusammenarbeit.

Zudem möchte ich den Mitarbeitern des Forschungslabors danken, insbesondere Helga Angeli für die detaillierte Einarbeitung in die Zellkultur, Michelle Ip und Silke Süß für die Unterstützung bei den In-vivo-Experimenten und Maria Link für die unerschöpfliche Hilfe in der Immunhistochemie und allen anderen für die großartige Arbeitsatmosphäre, rege Diskussionen und lustige Mittagspausen.

Danke an meine Freunde für die unerbittliche Motivation, für unvergessliche Momente und für eine Freundschaft fürs Leben.

Danke Vanessa für deine Warmherzigkeit, für deine Geduld und die vielen Abenteuer, die mir geholfen haben den Kopf freizubekommen, um neue Kreativität und Motivation zu schöpfen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner wundervollen Familie bedanken. Mein ganzes Leben seid ihr mein Rückgrat und unterstützt mich bei der Erfüllung meiner Träume. Vielen Dank für eure Liebe, Ausdauer und Inspiration.

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

