

**Aus der Abteilung Urologie  
(Prof. Dr. med. R.-H. Ringert)  
im Zentrum Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

---

Die Wirkung von Valproat auf die Knochenmetastasenzellen (VCaP) des  
Prostatakarzinoms

**INAUGURAL – DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Tanja Früchtenicht  
aus  
Rotenburg (Wümme)

Göttingen 2011

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**I. Berichtstatter:** PD Dr. rer. nat. P. Thelen (Betreuer)

**II. Berichtstatter/in:** Prof. Dr. med. Wulf (Korreferent)

**III. Berichtstatter/in:** Prof. Dr. med. Oppermann (Promotor)

**Tag der mündlichen Prüfung:** 20.09.2011

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Das Prostatakarzinom .....	6
1.1.1 Epidemiologie .....	6
1.1.2 Risikofaktoren .....	7
1.1.2.1 Alter .....	7
1.1.2.2 Genetische Faktoren .....	7
1.1.2.3 Umwelteinflüsse .....	7
1.1.2.4 Chronische Entzündung .....	7
1.1.2.5 Androgene .....	8
1.1.3 Lokalisation des Prostatakarzinoms .....	8
1.1.4 PSA-Wert-Bestimmung .....	8
1.1.5 Therapie .....	9
1.1.6 Fazit .....	11
1.2 Gene und Genprodukte .....	11
1.2.1 Androgenrezeptor .....	11
1.2.2 Markergene .....	12
1.2.2.1 PDEF .....	13
1.2.2.2 PSA (siehe auch 1.1.4) .....	13
1.2.2.3 DD3 (PCA3) .....	15
1.2.2.4 TMPRSS2 und ETS-Gene .....	16
1.2.3 IGF-Achse .....	16
1.2.3.1 IGFs .....	17
1.2.3.2 IGF-I-Rezeptor .....	17
1.2.3.3 IGFBPs und IGFBP-Proteasen .....	18
1.2.4 TIMP-3 .....	19
1.2.5 Östrogenrezeptor .....	20
1.2.6 Haushaltsgene .....	21
1.3 Die Zelllinie .....	22
1.4 Histone, Histondeacetylasen und Histondeacetylaseinhibitoren .....	22
1.4.1 Histone .....	22
1.4.2 Histondeacetylasen (HDACs) .....	23
1.4.3 HDAC-Inhibitoren .....	23
1.5 Valproinsäure (VPA) .....	24
1.6 Zielsetzung .....	24
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1 Material .....	26

2.1.1	Chemikalien, Zellen, Primer .....	26
2.1.2	Kits .....	27
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	27
2.1.4	Geräte .....	27
2.1.5	Software .....	28
2.2	Methoden .....	29
2.2.1	Zellkultur und Zellhaltung.....	29
2.2.1.1	Zellhaltung .....	29
2.2.1.2	Mediumwechsel und Passagieren der Zellkulturen .....	29
2.2.1.3	Konservierung von Zellen .....	29
2.2.2	Stimulation und Behandlung der Zellkultur.....	30
2.2.3	RNA.....	30
2.2.3.1	RNA-Isolation.....	30
2.2.3.2	Umgang mit RNA.....	31
2.2.3.3	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	32
2.2.3.3.1	Protokoll.....	32
2.2.3.3.2	Auswertung der Ergebnisse .....	32
2.2.4	Reverse Transkription der RNA .....	33
2.2.4.1	Allgemeines zur Reversen Transkription.....	33
2.2.4.2	Protokoll zur Reversen Transkription .....	34
2.2.5	PSA-Messung.....	35
2.2.6	PCR.....	35
2.2.6.1	Die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
2.2.6.2	Die Real-Time PCR (rtPCR) .....	36
2.2.6.3	Qualitative Bewertung der PCR .....	37
2.2.6.4	Das Amplifikationsdiagramm.....	37
2.2.6.5	Primerauswahl .....	38
2.2.6.6	Praktische Durchführung der rtPCR.....	40
2.2.6.7	Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration.....	41
2.2.6.8	Datenauswertung der rtPCR .....	42
2.2.7	Gelelektrophorese .....	42
2.2.8	Statistische Auswertung.....	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
3.1	Veränderungen der Genexpression nach Stimulation mit DHT und VPA .....	44
3.1.1	Androgenrezeptor .....	44
3.1.2	PDEF .....	46
3.1.3	PSA-Expression.....	47

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.4	PSA-Sekretion .....	48
3.1.5	DD3 (PCA3).....	49
3.1.6	TMPRSS2-ERG.....	50
3.1.7	IGF-I-Rezeptor.....	51
3.1.8	IGF-I .....	52
3.1.9	IGF-II .....	53
3.1.10	IGFBP-3 .....	54
3.1.11	TIMP-3.....	55
3.1.12	Östrogenrezeptor.....	56
3.1.13	Acetylierung.....	57
3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>59</b>
4.1	VPA und Karzinogenese .....	59
4.1.1	Hyperacetylierung durch VPA .....	59
4.1.2	Einfluss von VPA auf für das Prostatakarzinom relevante Markergene.....	63
4.1.2.1	Suppression der PDEF-Genexpression durch VPA.....	63
4.1.2.2	Suppression von PSA durch VPA .....	63
4.1.2.3	DD3 - ein vielversprechendes Markergen - .....	64
4.1.2.4	Reduktion der TMPRSS2-ERG-Fusion nach VPA-Behandlung.....	64
4.1.3	Der Einfluss von VPA auf die IGF-Achse .....	65
4.1.4	Hochregulation von TIMP-3 nach VPA-Behandlung.....	68
4.2	Ausblick.....	69
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>72</b>
6.1	Originalabbildungen.....	72
6.2	Verzeichnis der Abbildungen .....	73
6.3	Verzeichnis der Tabellen .....	74
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>

### Verzeichnis der Abkürzungen

AR	Androgenrezeptor
ARP	<i>aciolic ribosomal protein</i>
as	<i>anti-sense</i>
AT	Annealing-Temperatur
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPH	benigne Prostatahyperplasie
ca.	circa
cDNA	<i>complementary desoxyribonuclein acid</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Threshold cycle</i> (= Schwellenwertzyklus)
DD3	<i>differential display clone 3</i> (PCA3 in der klinischen Anwendung)
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	<i>desoxyribonuclein acid</i> (= Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	<i>double-stranded ribonuclein acid</i>
D+V	mit DHT und VPA behandelte Zellkultur
ECM	extrazelluläre Matrix
EK	Ethanolkontrolle
ER $\alpha$	<i>estrogen-receptor-alpha</i>
ER $\beta$	<i>estrogen-receptor-beta</i>
ERG	<i>ETS related gene</i>
ERSPC	<i>European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer</i>
EtOH	Ethanol
ETS	<i>erythroblast transformation-specific</i>
ETV	<i>ETS variant</i>
FADD	Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne
fl-AR	<i>full-length</i> Androgenrezeptor
g	Einheit für Beschleunigung
GH	<i>growth hormon</i>
GhRH	<i>growth hormon-releasing hormon</i>
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormon
H4Ac	Acetylierung des Histon H4
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDR	<i>high dose rate</i>
HGPIN	<i>high-grade</i> prostatistische intraepitheliale Neoplasie

## Abkürzungsverzeichnis

---

HSP90	Hitzeschockprotein 90
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFBP-3	<i>Insulin-like growth factor binding protein 3</i>
IGF-I-R	<i>Insulin-like growth factor receptor-I</i>
kb	Kilobasen
KLK3	Kallikrein 3
LBD	<i>ligand-binding domain</i> (Liganden-bindende Region)
LDR	<i>low dose rate</i>
LH-RH	luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
LNCaP	<i>Lymph node of cancer of the prostate</i>
MK	Mediumkontrolle
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger ribonuclein acid</i>
MT	<i>melt temperature</i>
p53	ein Tumorsuppressorgen
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PC-3	<i>prostate cancer cell 3</i>
PCA3	<i>prostate cancer gene 3</i> (Umbenennung für DD3)
PCR	<i>polymerase chain reaktion</i>
PDEF	<i>prostate-derived Ets factor</i>
PIA	proliferative inflammatorische Atrophie
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
PR	Progesteron-Rezeptor
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	<i>ribonuclein acid</i> (= Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Zellkulturmedium )
rRNA	ribosomale RNA
rtPCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
s	<i>sense</i>
sog.	sogenannt
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrix metalloprotease</i>
TSA	Trichostatin A
U/min	Umdrehungen pro Minute
VCaP	<i>Vertebral-Cancer of the Prostate</i>
VPA	<i>Valproic acid</i> (= Valproinsäure)
VPM	Valpromide
z. B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Mit 24,5% aller diagnostizierten Krebsarten stellt das Prostatakarzinom in Deutschland den häufigsten malignen Tumor der männlichen Bevölkerung dar. Die Neuerkrankungsrate lag in der BRD im Jahr 2004 bei 58.000 Männern pro Jahr, das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt um das 69. Lebensjahr. Mit 12.000 Todesfällen jährlich, steht das Prostatakarzinom hinter dem Bronchialkarzinom und den kolorektalen Karzinomen an dritter Stelle der zum Tode führenden Krebserkrankungen des Mannes. Insgesamt steht es an siebter Stelle der Todesursachen (Bertz et al. 2010; DGU 2009). Bis zum Jahr 2050 wird mit einer Verdopplung der an Prostatakarzinom Erkrankten, über 60-jährigen Männer gerechnet, die dann insgesamt 28 Millionen (37%) umfassen würden (Beske et al. 2007).

In der Zeit von 1980 bis 2004 stieg die Erkrankungsrate um 150%. Die absolute Zahl der jährlich aufgetretenen Neuerkrankungen ist aufgrund des demographischen Wandels sogar um 240% angestiegen (Bertz et al. 2010). Dieser starke Anstieg wird nicht nur auf die gestiegene Lebenserwartung und den demographischen Wandel, sondern auch auf eine verbesserte Diagnostik zur Früherkennung mittels PSA-Wert-Bestimmung zurückgeführt (Jemal et al. 2009).

Verbesserte Therapien und frühere Diagnostik führten seit 1980 zu einem Anstieg der 5-Jahres-Überlebensrate. Bei Diagnosestellung zwischen 2000 und 2004 lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 87%, wohingegen sie in den 80iger Jahren noch bei 70% lag (Bertz et al. 2010).

Geographisch zeigen sich große Unterschiede bezüglich der Inzidenzen. In ostasiatischen Ländern ist die Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen 10fach niedriger als in den westlichen Industrieländern. Weltweit findet sich die höchste Inzidenz in den USA (Haas et al. 2008). Neben den genetischen Faktoren spielt vor allem die Ernährung eine entscheidende Rolle. Vermutlich beinhaltet die westliche Ernährungsform geringere Mengen an protektiven Substanzen wie Vitaminen, Isoflavonen und Antioxidanzien, wohingegen sie reich an als Risikofaktoren angesehenen Bestandteilen, wie Fett und rotem Fleisch ist (Giovannucci 1999; Schmitz-Dräger et al. 2001; Schulz et al. 2003).

Bei der potentiellen Vorstufe des Prostatakarzinoms, der PIN (prostatistische intraepitheliale Neoplasie), findet sich interessanterweise kein großer Unterschied bezüglich des Vorkommens in westlichen und ostasiatischen Nationen (Dhom 1983).

### **1.1.2 Risikofaktoren**

#### **1.1.2.1 Alter**

Das Auftreten des klinisch erkennbaren Prostatakarzinoms ist stark mit dem Lebensalter der Patienten assoziiert. Es tritt in der Regel erst ab einem Alter von 60-70 Lebensjahren auf und stellt den bedeutendsten Risikofaktor dar. Die PIN kann hingegen schon wesentlich früher auftreten. Demzufolge finden schon in jungen Jahren die Initiation, sowie morphologische Veränderungen statt. Eine Progression in ein invasives Prostatakarzinom stellt ein selteneres Ereignis im Zuge des Alterns dar und betrifft lediglich eine begrenzte Anzahl von Männern (Abate-Shen und Shen 2000).

#### **1.1.2.2 Genetische Faktoren**

Männer mit einer positiven Familienanamnese für das Prostatakarzinom haben ein höheres Risiko für das Auftreten eines Prostatakarzinoms, als solche ohne familiär gehäuftes Vorkommen. Das Risiko nimmt bei jungem Erkrankungsalter des Verwandten sowie bei mehr als einem betroffenen Angehörigen zu (Johns und Houlston 2003). Die Suche nach Genen, die für eine erbliche Form des Prostatakarzinoms verantwortlich sind, hat sich als äußerst schwierig erwiesen. Am häufigsten sind die Chromosomen 8, 13, 7, 10, 16, 6 und 17 von Veränderungen betroffen. Es finden sich keine ausgeprägten chromosomalen Instabilitäten und auch die Anzahl der Veränderungen ist begrenzt. Dies legt nahe, dass die beobachteten Variationen im Bereich von Tumorsuppressor- und/oder Onkogenen lokalisiert sein müssen (Schulz et al. 2003). Wahrscheinlicher als chromosomale Veränderungen, liegen dem erhöhten Risiko für ein Prostatakarzinom genetische Polymorphismen zugrunde. Hierbei treten ein oder mehrere Genvarianten innerhalb eines Lokus auf, die zur phänotypischen Ausprägung führen können. Für das Prostatakarzinom ist unter anderem ein Polymorphismus für den Androgenrezeptor bekannt (Schulz et al. 2003).

#### **1.1.2.3 Umwelteinflüsse**

Bei den Umwelteinflüssen spielen die geographisch variierenden Ernährungsgewohnheiten eine wichtige Rolle. Vor allem die fettreiche, an rotem Fleisch reichhaltige Ernährungsweise in den westlichen Industrienationen, gekoppelt mit einem Mangel an protektiven Substanzen wie Phytoöstrogenen, Vitaminen und Antioxidanzien, wird für die stark erhöhte Inzidenz in der westlichen Welt gegenüber der asiatischen Bevölkerung verantwortlich gemacht (Schulz et al. 2003).

#### **1.1.2.4 Chronische Entzündung**

Den chronischen Entzündungen der Prostata wird ein beträchtlicher Anteil zur Entstehung des Prostatakarzinoms zugeschrieben. Bei der Pathogenese des Prostatakarzinoms führen inflammatorische Prozesse durch Sauerstoffradikale und Karzinogene zu einer proliferativen,

inflammatorischen Atrophie (PIA) der Prostata. Die sehr wahrscheinlich daraus resultierende PIN wird durch zusätzliche, epigenetische Inaktivierung der Expression spezieller Gene (z. B. Tumorsuppressorgene) hervorgerufen. Den sexuell übertragenen Erkrankungen, mit einer daraus resultierenden Prostatitis, kann eine Relevanz zugesprochen werden, da PIA und PIN letztlich als Wegbereiter des Prostatakarzinoms beschrieben werden (Schmitz-Dräger et al. 2010).

### **1.1.2.5 Androgene**

Unter physiologischen Bedingungen und bei androgenabhängigen, bösartigen Tumoren der Prostata sind Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) hauptverantwortlich für die Proliferation der Prostatazellen (Vis und Schröder 2009). Im Blut nimmt Testosteron den größten Anteil der Androgene ein, wohingegen DHT in der Prostata in sechsfach höherer Konzentration als Testosteron vorliegt (Bruchovsky und Wilson 1968; Page et al. 2006) und für Androgen vermittelte Prozesse in der Prostata verantwortlich ist. Androgene wirken über den Androgenrezeptor (AR) (siehe auch 1.2.1). Die Anwesenheit von Androgenen führt zu Proliferation und Differenzierung der epithelialen und stromalen prostatistischen Zellen, wohingegen die Abwesenheit von Androgenen die Apoptose beider Zellkompartimente einleitet (Vis und Schröder 2009). Einen Therapieansatz zur Behandlung des Prostatakarzinoms stellt die Androgendeprivation dar. Sie führt in frühen Stadien der Erkrankung oft zu einer Remission. Häufig kommt es jedoch nach einigen Jahren zur Entwicklung eines androgenunabhängigen Karzinoms mit androgenunabhängiger Zellproliferation (siehe auch 1.1.5) (Graefen et al. 2000).

### **1.1.3 Lokalisation des Prostatakarzinoms**

Das Prostatakarzinom ist in 60-70% der Fälle in der peripheren Zone der Prostata lokalisiert, 10-20% der Karzinome finden sich in der Transitionszone und nur 5-10% entstehen in der Zentralzone. Im Gegensatz dazu findet sich die benigne Prostat hyperplasie (BPH) hauptsächlich im periurethralen Stroma und in den Drüsen der Transitionszone (Schulz et al. 2003). Dem Prostatakarzinom liegt histologisch ein Adenokarzinom zu Grunde, das sich in der Mehrzahl der Fälle in dem Rektum zugewandten Teil der Prostata ausbreitet. Im Gegensatz zur benignen Prostat hyperplasie führt es erst sehr spät zu Symptomen und zur Diagnosestellung. Um das Karzinom dennoch früh zu erkennen, wird für Männer ab dem 45. Lebensjahr eine regelmäßige, digital-rektale Untersuchung empfohlen. Eine weitere Möglichkeit zur Früherkennung stellt das PSA-Screening dar (Schröder et al. 2009).

### **1.1.4 PSA-Wert-Bestimmung**

Die Bestimmung des PSA-Wertes hat in den letzten Jahren immer mehr an Relevanz gewonnen. Mit dieser Methode zur Früherkennung können Karzinome im organbegrenzten

Stadium erkannt und kurativ behandelt werden. Von der Früherkennung und der daraus resultierenden kurativen Therapie, profitieren vor allem Patienten mit einer Lebenserwartung über 10-15 Jahren, da das Prostatakarzinom unbehandelt einen langsamen Verlauf hat und Patienten häufig an anderen Grunderkrankungen versterben, noch bevor das Prostatakarzinom zum Tode führen würde. Das PSA stellt keinen für das Prostatakarzinom spezifischen Marker dar. Eine PSA-Erhöhung findet sich ebenfalls bei benigner Prostatahyperplasie (BPH), bei Prostatitis und nach prostatistischer Manipulation (Haese et al. 2003). Die Früherkennung bringt vermutlich die Diagnose vieler nicht therapiebedürftiger Karzinome, da die Patienten zu Lebzeiten keine klinischen Symptome mehr zeigen würden. Diese Überdiagnose wurde in der Screening-Gruppe der ERSPC-Studie auf etwa 50% geschätzt (Draisma et al. 2003). Die ERSPC-Studie zeigte auch, dass sich 1410 Männer einem PSA-Screening unterziehen und 48 der erkannten Fälle behandelt werden müssten, um bei einem Patienten den Tod durch das Prostatakarzinom zu verhindern. Allerdings konnte ein positiver Effekt auf die krankheitsspezifische Mortalität gezeigt werden (Schröder et al. 2009). Zusammenfassend ist die Effektivität des PSA-Screenings beim Prostatakarzinom aktuell noch nicht endgültig belegt (Börgermann et al. 2010). Zur Erkennung eines Rezidivs nach kurativer Therapie des Prostatakarzinoms ist die regelmäßige Kontrolle des PSA-Wert-Spiegels jedoch unerlässlich (DGU 2009).

### 1.1.5 Therapie

Art und Umfang des multimodalen Konzepts der Therapie des Prostatakarzinoms richten sich nach der TNM-Klassifikation des Tumors und dem Allgemeinzustand des Patienten. Beim lokal begrenzten Prostatakarzinom (T1-2 N0 M0) bestehen zur kurativen Therapie die Möglichkeiten der radikalen Prostatektomie sowie die Radiotherapie. Es kann eine HDR (high dose rate)- Brachytherapie in Kombination mit perkutaner Bestrahlung oder eine LDR (low dose rate)- Brachytherapie durchgeführt werden. Die Therapieentscheidung sollte sowohl allgemeine Faktoren wie Lebensalter und Komorbidität des Erkrankten, als auch tumorspezifische Prognosefaktoren wie den Differenzierungsgrad und das Staging berücksichtigen (Wirth et al. 2005). Eine weitere Therapieoption bietet das sog. „*watchful waiting*“ (wartendes Beobachten), bei dem der Tumor beobachtet, aber zunächst nicht therapiert wird. Erst beim Auftreten von Symptomen wird der Patient behandelt. Dieses Konzept kommt vor allem für Patienten mit einer Lebenserwartung unter 10 Jahren in Frage, da ihnen eine nebenwirkungsreiche Therapie erspart werden kann. Neben dem „*watchful waiting*“ findet sich die aktive Überwachung („*active surveillance*“), bei der Patienten mit einem grundsätzlich kurativ zu behandelndem, jedoch zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht behandlungsbedürftigen Tumor in Form regelmäßiger PSA-Wert-Kontrollen, Ultraschalluntersuchungen und digital-rektaler Tastuntersuchungen beobachtet werden.

Treten Anzeichen der Progression auf, wird mit einer kurativen Therapie begonnen (Weißbach et al. 2010).

Das lokal fortgeschrittene Prostatakarzinom ist durch ein Tumorstadium außerhalb der Kapsel gekennzeichnet. Auch hier kann zur kurativen Therapie eine radikale Prostatektomie, die Strahlentherapie, sowie eine zusätzliche Hormontherapie angestrebt werden.

Formen der Hormontherapie:

Die Hormontherapie wird bei lokal fortgeschrittenem und bereits metastasiertem Prostatakarzinom angewandt. Huggins und Hodges beschrieben in ihrer Arbeit von 1941 erstmals die Bedeutung der Androgene für die Entstehung des Prostatakarzinoms (Huggins und Hodges 1972). Aus dem Wissen um die Androgenabhängigkeit des Prostatakarzinoms entwickelten sich verschiedene Konzepte zur Hormontherapie. Grundsätzlich kann die Hormonentzugstherapie von der Hormonblockade unterschieden werden. Die Hormonentzugstherapie wird in Form von chirurgischer (bilaterale Orchiectomie) oder medikamentöser (früher mittels Östrogenen oder LH-RH-Analoga) Kastration durchgeführt, die Hormonblockade mittels Antiandrogenen. Da die adrenale Hormonproduktion von einer Kastration unbeeinflusst bleibt, bietet sich in späteren Stadien eine Kombinationstherapie aus Kastration und antiandrogener Therapie an (Ganzer et al. 2007). Nach einer zunächst meist deutlichen Verbesserung der Symptomatik unter Hormontherapie kommt es im Verlauf nach einigen Jahren meist zu einem hormonunabhängigen Wachstum der Tumorzellen. Dafür werden unterschiedliche Faktoren verantwortlich gemacht. Neben dem vermehrten Wachstum androgenunabhängiger Tumorzellen (klonale Selektionstheorie) sind nach heutigen Erkenntnissen besonders Mutationen im Androgenrezeptor und eine erhöhte Androgenrezeptorpräsenz relevant (Graefen et al. 2000). Im Stadium des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms, früher als androgenrefraktäres Prostatakarzinom bezeichnet, kommt es unter einer medikamentös induzierten Verringerung des Hormonspiegels zum Ansprechen in Form des Androgenentzugssyndroms (stellvertretend können Östrogene, Hydrokortison und Ketokonazol oder Somatostatin-Analoga verabreicht werden). Im Verlauf kann es trotz dieser sekundären, hormonellen Manipulation zum Progress kommen, der durch einen erneuten PSA-Anstieg gekennzeichnet ist. Bei diesem Stadium steht eine systemische Chemotherapie zur Diskussion, die auf Docetaxal basiert und eine statistisch signifikante Lebensverlängerung von 2,5 Monaten mit sich bringt (Heidenreich und Ohlmann 2005). Im metastasierten Stadium kommt ein palliatives Konzept mit Hormon- und Strahlentherapie zum Tragen.

Derzeit wird nach neuen Möglichkeiten zur Behandlung des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms gesucht, für das es bisher nur einen palliativen Ansatz gibt. Von besonderem Interesse ist dabei der AR-Antagonist MDV-3100, der an die Liganden-

bindende Region (LBD) des ARs bindet, aber selbst keine agonistische Wirkung auf den AR hat und somit hemmend auf den AR-Signalweg wirkt. MDV-3100 führte in einer klinischen Phase-I/II-Studie auch bei Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom zu einem PSA-Abfall (Attard et al. 2009; Tran et al. 2009). *Abiratorone Acetat* ist eine weitere Substanz, die als Inhibitor von CYP17 hemmend auf die Biosynthese von Androgenen wirkt. Auch hier zeigte sich selbst beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom ein Abfall des PSA-Wertes unter Therapie. Beide Substanzen zeigen offenbar auch bei solchen Patienten Potenzial, die bisher nicht von herkömmlichen Hormontherapien profitierten (Attard et al. 2009; Thelen et al. 2010).

### 1.1.6 Fazit

Im Hinblick auf den weiter fortschreitenden demographischen Wandel wird die Anzahl der diagnostizierten Prostatakarzinome in den nächsten Jahren weiter zunehmen. Ebenso wird die sich weiter verbreitende Früherkennung durch PSA-Wert-Bestimmung zur Diagnostik früher Prostatakarzinom-Stadien führen. Patienten, die sich im frühen Stadium der Erkrankung befinden oder solche, die eine geringe Lebenserwartung haben, benötigen Therapieverfahren, deren Nebenwirkungen so gering wie möglich sind. Der Therapieprofit sollte gegenüber dem Nebenwirkungsspektrum überwiegen. Wichtig ist auch die Entwicklung weiterer systemischer Ansätze, um auch bei kastrationsresistentem Prostatakarzinom schonende, lebensverlängernde Therapien bieten zu können. Die seit vielen Jahren in der Klinik zur Epilepsitherapie etablierten Histondeacetylaseinhibitoren, wie das Valproat, könnten eine schonende, aber nachhaltige Therapieoption mit „antionkogenem Charakter“ darstellen. Insbesondere die Wirkung von VPA auf die Zelle des lokal fortgeschrittenen, metastasierten Prostatakarzinoms soll in dieser Arbeit an der VCaP-Zelllinie untersucht und diskutiert werden.

## 1.2 Gene und Genprodukte

### 1.2.1 Androgenrezeptor

Der humane Androgenrezeptor (AR) ist ein Steroidhormon-bindendes Protein. Das AR-Gen ist auf Chromosom Xq11-q13 lokalisiert und umfasst etwa 180kb DNA. Es sind 8 Exons bekannt. Das NH<sub>2</sub>-terminale Ende des AR-Proteins reguliert die Transkription, das COOH-terminale Ende bildet die Liganden-bindende Region (LBD), in der Mitte befindet sich die DNA-bindende Domäne (Vis und Schröder 2009). In Liganden-ungebundenem und somit inaktivem Zustand befindet sich das AR-Protein im Zytoplasma an verschiedene Chaperone (z.B HSP90) gebunden. Kommt es zur Bindung von Androgenen im Bereich der Liganden-bindenden Region, tritt eine Konformationsänderung ein. Der Komplex dissoziiert vom HSP und bildet ein Homodimer und damit einen Transkriptionsfaktor, der im Zellkern an spezielle

DNA-Sequenzen, sog. Androgen-responsive Elemente bindet und dort die Transkription Androgen-regulierter-Gene stimuliert (Edwards und Bartlett 2005; Evans 1988). Für die Initiation sind verschiedene Koaktivatoren unerlässlich, andere Korepressoren hemmen die Transkriptionsaktivität. Mit dem AR werden Eigenschaften wie Zellüberleben und Proliferation assoziiert. Das bekannteste Androgen-regulierte-Gen (KLK3) kodiert für PSA (Knudsen und Penning 2010).

Im kastrationsresistenten Prostatakarzinom kommt es trotz reduzierter Androgenspiegel über verschiedene Funktionen des ARs zum Progress der Erkrankung. Die Basalschicht des epithelialen Prostatagewebes ist generell androgenunabhängig, der AR wird in diesen Bereichen nicht exprimiert. Gleichzeitig befinden sich dort die Stammzellen und die Proliferationsschicht. Die Expression des ER $\alpha$  und des PR ermöglichen über Estradiol und Progesteron ein androgenunabhängiges Wachstum. Im Krankheitsverlauf kommt es zu einer positiven Selektion dieser Zellen, die zur Entwicklung des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms beiträgt (Knudsen und Penning 2010). Deregulation der AR-Expression durch Überexpression und Amplifikation, Mutationen mit einem Zugewinn an Funktion, sowie abweichende Modifikationen sind Mechanismen auf Ebene des ARs. Mutationen können eine sog. promiskuitive Ligandenbindung initiieren, bei der Antagonisten des ARs plötzlich agonistisch fungieren (Brooke und Bevan 2009; Taplin 2007; Yuan und Balk 2009). Eine ligandenunabhängige Funktion des ARs kann Folge alternativer Splicevorgänge sein (Dehm et al. 2008). Auf posttranskriptionaler Ebene führen Veränderungen von Koaktivatoren, Kofaktoren und Korepressoren zu einer Androgenunabhängigkeit ohne direkte Veränderung des ARs. Die intratumorale Synthese von Androgenen über intrakrine oder parakrine Mechanismen führt letztlich auch zu einer Therapieresistenz (Knudsen und Penning 2010). Der AR spielt bei zahlreichen Signaltransduktionen in der Pathogenese des Prostatakarzinoms die entscheidende Rolle und ist somit ein wichtiger Fokus bei der Suche nach erfolgreichen und langfristigen Therapieansätzen zur Behandlung des Prostatakarzinoms. MDV-3100 setzt beispielsweise an der LBD des ARs an und blockiert dadurch den AR-Signalweg (siehe auch Kapitel 1.1.5).

### 1.2.2 Markergene

Das Ziel, Erkrankungen mit möglichst kostengünstigen und nicht-invasiven Methoden bereits in frühen Stadien zu erkennen, führt zur ständigen Suche nach Markern, die spezifisch als Indikator für eine maligne Erkrankung dienen können. Für das Prostatakarzinom findet das PSA und das DD3 (in der klinischen Anwendung PCA3 genannt) bereits Anwendung im klinischen Alltag. Es gibt jedoch noch weitere Gene, die Potenzial als Indikatoren für das Prostatakarzinom haben. Im Folgenden sollen diese Gene und ihre Relevanz beim

Prostatakarzinom, sowie ihre Anwendung zur Früherkennung oder zum Nutzen bei der Klassifizierung eines Prostatakarzinoms erläutert werden.

### 1.2.2.1 PDEF

PDEF (*prostate-derived Ets factor*) gehört zur ETS-Familie der Transkriptionsfaktoren, die unter anderem an der Regulation von Zielgenen mit Einfluss auf Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose, Angiogenese, Transformation und Invasion beteiligt sind (Ghadersohi et al. 2008). Beim Mann sind 27 verschiedene Mitglieder bekannt. Sie alle verfügen über eine DNA-Bindungsdomäne, mit der sie an core-DNA-Sequenzen binden. Über die Interaktion mit anderen Proteinen oder via posttranslationale Modifikation werden sie aktiviert oder supprimiert. Ein Großteil aktiviert die Transkription und nur wenige hemmen sie. Abweichende Aktivität oder Expression kann Leukämien, Sarkome und solide epitheliale Tumore induzieren. Im Gegensatz zu den meisten ETS-Faktoren zeigt PDEF eine geringe Expression in normalem Gewebe und eine veränderte Struktur der DNA-Bindungsdomäne (Sood 2010). Ghadersohi et al. stellten 2004 in ihren Untersuchungen eine hohe Tumorassoziation von PDEF im Vergleich zu anderen krebsassoziierten Molekülen fest und wiesen auf eine mögliche Nutzung von PDEF als Zielgen für eine spezifische Krebstherapie hin (Ghadersohi et al. 2004). In der Prostata konnte ein PDEF-Anstieg mit steigender Malignität der Tumoren festgestellt werden. Es zeigten sich signifikante Anstiege der Expression im Vergleich zwischen benignem Gewebe und Prostatakarzinom-Gewebe, sowie zwischen PIN und Prostatakarzinom. Einen signifikanten Anstieg beim Übergang des benignen Prostataepithels in eine PIN gab es nicht. Gegenüber niedrig malignen Karzinomen zeigte sich bei Tumoren mit intermediärem oder hohem Gleason-Score eine noch stärkere Expression von PDEF ( $p < 0,01$ ). Möglicherweise ist eine starke Expression mit einem aggressiveren Phänotyp assoziiert (Sood et al. 2007). PDEF agiert in der Prostata unter anderem als Transkriptionsaktivator der PSA-Promotorregion. Es findet jedoch auch eine direkte Interaktion über die DNA-bindende Domäne des Androgenrezeptors statt, die in einer Androgen-vermittelten Aktivierung des PSA-Promotors resultiert. Die PDEF-vermittelten Wirkungen beinhalten sowohl eine androgenunabhängige als auch eine androgenabhängige Komponente (Oettgen et al. 2000). Der Einfluss von PDEF wird kontrovers diskutiert. In Zelllinien wie der PC3, in der der AR nicht exprimiert wird, führte eine fehlende Expression von PDEF zu einer erhöhten Migration und Invasion von Tumorzellen (Gu et al. 2007). Dabei ist jedoch zu bedenken, dass diese androgenunabhängigen Zelllinien nicht das Modell des in dieser Arbeit untersuchten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms repräsentieren können.

### 1.2.2.2 PSA (siehe auch 1.1.4)

Das prostataspezifische Antigen - eigentlich Kallikrein-3 - ist eine in den prostatistischen Epithelzellen synthetisierte Serinprotease, die androgenabhängig über das KLK3-Gen

kodiert wird. PSA wird in die prostatistischen Ausführungsgänge sezerniert und dient der Verflüssigung des Samens.

1971 beschrieben Hara et al. erstmals das Antigen, das später als prostataspezifisches Antigen bezeichnet wurde. Papsidero et al. konnten in den 80er Jahren PSA im Serum von an metastasiertem Prostatakarzinom erkrankten Männern nachweisen und zeigen, dass das PSA im Blut mit dem PSA in der Samenflüssigkeit identisch war. 1987 veröffentlichten Stamey et al. die Ergebnisse einer großen Studie mit dem Ziel, PSA als einen Tumormarker zu etablieren. Es wurde eine Korrelation zwischen steigenden PSA-Konzentrationen im Serum von Patienten und voranschreitendem Tumorwachstum festgestellt. Ein PSA-Abfall in nicht messbare Bereiche nach radikaler Prostatektomie konnte ebenfalls gezeigt werden (Papsidero et al. 1980; Rao et al. 2008; Stamey et al. 1987). Die Bedeutung des PSA als Tumormarker hat bis zum heutigen Tag angehalten, sie wurde jedoch in den letzten Jahren auch immer wieder diskutiert und hinterfragt. Ein Problem stellt die Tatsache dar, dass PSA-Serumkonzentrationen auch durch Pharmaka, urologische Manipulationen und prostatistische Erkrankungen wie die Prostatitis und die BPH erhöht sein können (Börgermann et al. 2006). Zudem kommt es mit steigendem Alter und steigendem Prostatavolumen zu altersspezifischen Erhöhungen des Gesamt-PSA. Derzeit werden drei Gesamt-PSA Bereiche unterschieden. Bei einem Gesamt-PSA von  $< 4\text{ng/ml}$  liegt ein niedriges Risiko vor und eine Prostatabiopsie wird nicht routinemäßig empfohlen. Im Bereich zwischen  $4\text{-}10\text{ng/ml}$  besteht die größte Unsicherheit, Erhöhungen die in diesem Bereich liegen, finden sich auch bei den nicht malignen Erkrankungen der Prostata. Die empfohlenen Biopsien bieten ebenfalls keine abschließende Sicherheit, sofern der Tastbefund negativ ist. Liegt der Gesamt-PSA im Bereich  $> 10\text{ng/ml}$ , ist die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms bei 50% (Catalona et al. 1993; Haese et al. 2003). Problem des PSA-Screenings stellt die Überdiagnose dar. Es werden zu viele Karzinome diagnostiziert, die nur geringfügige Bedeutung für die Lebenserwartung des Patienten haben und trotzdem therapiert werden. Eine Differenzierung zwischen therapiebedürftigem und nicht behandlungsbedürftigem Prostatakarzinom kann mit diesem Marker nicht erfolgen (Haese et al. 2003). Potenzial hinsichtlich dieser Fragestellung bietet die in Kapitel 1.2.2.4 erwähnte TMPRSS2-ERG-Genfusion. Ein wirklicher Nutzen von PSA als Screening-Marker ist nach wie vor umstritten und noch nicht endgültig belegt (Börgermann et al. 2010).

Da die PSA-Sekretion auf Genebene (KLK3-Gen) letztlich über den AR als Transkriptionsfaktor initiiert wird, bietet die Verlaufsbeobachtung der PSA-Werte gleichzeitig Rückschluss auf die AR-Aktivität (Knudsen und Penning 2010). Diese Erkenntnis wird bei der Verlaufskontrolle nach therapiertem Prostatakarzinom genutzt. So kann ein Progress oder ein Übergang in ein hormonunabhängiges Prostatakarzinom erkannt werden.

### 1.2.2.3 DD3 (PCA3)

Im Jahr 1999 wurde von Bussemakers et al. ein neues prostataspezifisches Gen im Prostatagewebe nach radikaler Prostatektomie identifiziert. DD3 (*differential display clone 3*), ein auf Chromosom 9q21-22 lokalisiertes, nicht kodierendes Gen ist in prostatistischen Tumoren stark überexprimiert. Die regulatorischen Mechanismen der DD3-Expression sind noch unbekannt. DD3 konnte nur auf RNA-Ebene nachgewiesen werden und ein korrespondierendes Protein wurde bisher nicht identifiziert. In gesundem Gewebe und in anderen maligne entarteten Geweben, wie beim Mammakarzinom, Cervixkarzinom, Endometriumkarzinom, Hodenkarzinom oder in Zelllinien aus Blasen-, Nieren- und Ovarialkarzinomen, konnte eine DD3-Expression nicht nachgewiesen werden. In den Prostatakarzinom-Zelllinien LNCaP und 22Rv1 wurde eine Überexpression gezeigt (Bussemakers et al. 1999; Popa et al. 2007). Um den Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom zu verdeutlichen, wurde DD3 später in PCA3 (*prostate cancer gene 3*) umbenannt. Im Prostatakarzinom fand sich im Vergleich zu normalem Prostatagewebe eine Hochregulation der PCA3-mRNA im Mittel um das 66fache. Selbst in Proben, die weniger als 10% Tumorzellen aufwiesen, konnte noch eine um das 11fach erhöhte Expression nachgewiesen werden (Hessels et al. 2003). Popa et al. konnten 2007 zeigen, dass sowohl in der HGPIN als auch im Prostatakarzinom eine Expression des PCA3-Gens vorliegt. Im normalen Drüsengewebe wurde der Marker nur dann exprimiert, wenn es in unmittelbarer Nähe zum entarteten Gewebe lokalisiert war (Popa et al. 2007).

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurden Tests zur PCA3-Expressionsbestimmung entwickelt. Die dafür benötigten Zellen bzw. Zellfragmente werden nach digital-rektaler Massage der Prostata aus dem Urin des Patienten gewonnen. Inzwischen findet der Test Anwendung in der urologischen Praxis. Da PCA3 im Gegensatz zum PSA weder bei der BPH, noch bei entzündlichen Prozessen der Prostata verstärkt exprimiert ist, eröffnet es die Möglichkeit, zwischen Patienten mit einer BPH und einem Prostatakarzinom zu differenzieren und somit die Rate an ergebnislosen, risikobehafteten Stanzbiopsien zu reduzieren. Auch für Patienten mit persistierenden erhöhten PSA-Werten bei negativer Stanzbiopsie kann die PCA3-Bestimmung richtungsweisend sein. Eine steigende PCA3-Expression korreliert laut Haese et al. mit dem steigenden Risiko einer positiven Stanzbiopsie bei vorangegangener negativer Stanze. Es zeigte sich in den Tests ebenfalls eine Überlegenheit gegenüber dem PSA-Wert (Haese et al. 2008). PCA3 stellt somit ein vielversprechendes Prostatakarzinom-spezifisches Markergen für die Diagnostik und Differenzierung prostatistischer Erkrankungen dar, welches zunehmend in den klinischen Alltag integriert wird und an Relevanz gewinnt. Aufmerksamkeit könnte diesem Gen auch bei der möglichen Entwicklung neuer Targettherapien gewidmet werden.

### 1.2.2.4 TMPRSS2 und ETS-Gene

TMPRSS2, ein prostataspezifisches, androgenreguliertes Gen mit einer Bindungsstelle für den AR codiert eine transmembranöse Serinprotease 2. Schon geringe Mengen von Androgenen (wie unter Hormonsuppression) reichen aus, um das an die TMPRSS2-Region gekoppelte Androgen-responsive Promotorelement zu stimulieren (Kumar-Sinha et al. 2008; Perner et al. 2007). In der VCaP-Zelllinie findet sich eine somatische Mutation, bei der die TMPRSS2-Region mit einem Gen der ETS-Familie fusioniert. Die ETS-Gene gehören zu den Transkriptionsfaktoren und wurden bereits im Zusammenhang mit onkogener Translokation von Sarkomen und Leukämien beschrieben (Perner et al. 2007). Die Fusion von TMPRSS2 und ERG stellt den onkogenetischen Transkriptionsfaktor ERG nun unter Kontrolle des ARs (Tomlins et al. 2005). Die TMPRSS2-ERG-Fusion findet sich beim lokal begrenzten, lokal fortgeschrittenen und metastasierten Prostatakarzinom in mehr als 50% aller Fälle. Die Mutation findet sich bereits in der high-grade PIN, was auf ein in frühen Stadien stattfindendes Ereignis schließen lässt. In der BPH und im physiologischen Gewebe konnte die Fusion dagegen nicht sicher nachgewiesen werden (Kumar-Sinha et al. 2008; Perner et al. 2007). Neben ERG wurden weitere, jedoch seltener auftretende Fusionen mit den Mitgliedern der ETS-Familie gefunden (z. B. ETV1, ETV4 und ETV5). TMPRSS2-ERG-Fusion tragende Tumoren werden mit aggressivem Wachstum und letalem Phänotyp assoziiert. Die VCaP-Zelllinie stellt als Derivat einer Knochenmetastase mit dieser Fusion ein sehr realistisches Krankheitsmodell dar (Kumar-Sinha et al. 2008). An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass ERG ein hohes Potenzial als möglicher Biomarker für klinische, therapeutische Versuche an ERG-positiven Prostatakarzinom-Zellen bietet (Björkman et al. 2008). Es wird bereits nach kleinmolekularen Inhibitoren von ERG, die als therapeutische Targets genutzt werden können, gesucht (Kumar-Sinha et al. 2008). Das weitere Verständnis der pathogenetischen Prozesse sowie die Suche nach neuen Prädiktoren, Screeningverfahren und Therapieansätzen sind Gegenstand aktueller Forschung. Bereits jetzt lässt sich die mögliche Relevanz des Nachweises einer TMPRSS2-ERG-Fusion bei Patienten als möglicher Indikator für die Malignität eines Karzinoms vorstellen. Eine Kombination aus dem Nachweis der in Kapitel 1.2.2.3 beschriebenen PCA3-Expression und der TMPRSS2-ERG-Genfusion konnte die Sensitivität des Urintests für die Diagnose des Prostatakarzinoms noch erhöhen, ohne dabei an Spezifität zu verlieren (Hessels et al. 2007).

### 1.2.3 IGF-Achse

Das IGF-System ist ein komplexes System, bestehend aus den beiden Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II, den entsprechenden IGF-Rezeptoren I und II sowie insgesamt sechs Bindungsproteinen (IGFBP1-6). In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Serumkonzentrationen der IGF-System-Komponenten, dem Krebsrisiko und dem

Überleben gezeigt werden (Moschos und Mantzoros 2002). Besonders beim Prostatakarzinom zeigt sich eine große Relevanz der IGF-Achse, da zwischen dem AR und den Komponenten des IGF-Systems zahlreiche Wechselwirkungen existieren. IGFs können beispielsweise zu einer direkten Aktivierung des ARs führen (Culig et al. 1994; Grzmil et al. 2004). Beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom findet sich eine Dysregulation der IGF-I-Achse (Thelen et al. 2010).

### 1.2.3.1 IGFs

IGF-I und IGF-II sind einkettige Polypeptide, die nicht gewebsspezifisch gespeichert werden, sondern von nahezu allen Zellen des Körpers produziert werden können. Hauptsächlich in der Leber gebildet, zirkulieren sie in 1000fach höherer Konzentration als andere Peptidhormone im Blut und wirken auf diesem Weg endokrin. Im Blut an IGF-BPs gebunden, wird die Halbwertszeit von einigen Minuten auf mehrere Stunden erhöht und die Bioverfügbarkeit reguliert. Parakrin und autokrin vermitteltes Wachstum findet sich vor allem in den extrahepatisch gelegenen Geweben, wie z. B. beim Wachstum von Knochen und Muskeln (Rassow et al. 2006).

IGF-I ist in der Embryonalphase nur in geringen Mengen vorhanden. Unter dem Einfluss der Wachstumshormone *growth hormon* (GH) und *growth hormon releasing hormon* (GhRH) stehend ist es für postnatales Wachstum verantwortlich. IGF-I reguliert Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und Transformation und wirkt antiapoptotisch. Ein Anstieg der IGF-I-Serumkonzentration wurde im Zusammenhang mit Stress und Rauchen beobachtet während eine chronische Mangelernährung herabgesetzte Serumkonzentrationen bewirkt. In der Kanzerogenese wirkt IGF-I mitogen. In der Prostata fördert IGF-I die Entwicklung des Prostataepithels (Abate-Shen und Shen 2000). Beim Prostatakarzinom wurde eine Überexpression im Stroma, jedoch nicht in den Tumorzellen selbst beobachtet, erhöhte Serumkonzentrationen korrelierten mit einem erhöhten Krebsrisiko (Kaklamani et al. 1999; Moschos und Mantzoros 2002; Nickerson et al. 2001; Thissen et al. 1994).

IGF-II ist in der Embryonal- und Fetalzeit für Wachstumsprozesse unerlässlich, seine postnatale Bedeutung ist weniger fundamental, was durch die 2-15fach geringere Affinität zum IGF-I-Rezeptor als die des IGF-I, sowie die gleiche bis erhöhte Affinität zum IGF-BP erklärt werden kann. Agiert es über den IGF-I-Rezeptor, wirkt es wie IGF-I proliferationsfördernd und antiapoptotisch (Moschos und Mantzoros 2002).

### 1.2.3.2 IGF-I-Rezeptor

IGF-I-R und IGF-II-R sind in der Zellmembran lokalisierte Glykoproteine. Sie unterscheiden sich erheblich in Struktur und Funktion (LeRoith et al. 1995; Stewart und Rotwein 1996).

Der *Insulin-like growth factor receptor-1* (IGF-I-Rezeptor) ist ein Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, der in nahezu allen Zellen des Körpers exprimiert wird. Er ist für prä-

und postnatales Wachstum verantwortlich und induziert in Muskeln, Knorpel und Knochen Differenzierung und Wachstum. Aktiviert wird der Rezeptor durch seine Liganden IGF-I und IGF-II, die Dichte an IGF-I-Rezeptoren bestimmt die Antwort auf IGF-I (Butler et al. 1998). Über mehrere Signalkaskaden werden auf Ligandenbindung vielschichtige, teils gegensätzliche Zellantworten generiert. Die MAPK-Signalkaskade induziert Wachstum und Proliferation, über die PI-3-Kaskade wird Schutz vor Proliferation und Apoptose erlangt. Tumorsuppressorgene wie p53 oder BRCA1, sowie IGF-I können einen Expressionsrückgang induzieren, wohingegen Hormone (Steroidhormone, hypophysäre Hormone, Schilddrüsenhormone u.a.) eine verstärkte Expression bewirken können. Der IGF-I-Rezeptor liegt sowohl im Anfangsstadium als auch im metastasierten Stadium des Prostatakarzinoms in überexprimierter Form vor. Bei der Entwicklung eines androgenunabhängigen Wachstums von LNCaP-Zellkulturen in vivo zeigte sich sogar eine signifikante Hochregulation des IGF-I-Rezeptors und des IGF-1 (Hellowell et al. 2002; Nickerson et al. 2001). Eine Überexpression des IGF-I-Rezeptors induziert Wachstum, neoplastische Transformation und Tumorgenese sowie Proliferation und Metastasierung in der Tumorzelle selbst. (Moschos und Mantzoros 2002; Petley et al. 1999; Pollak et al. 2004). Bezüglich der Behandlung des Prostatakarzinoms ist es somit naheliegend, dass zunehmend nach IGF-I-Rezeptor-Antagonisten oder Antikörpern gesucht wird (Chitnis et al. 2008).

Der IGF-II-R verfügt über keine Kinaseaktivität und bindet im Gegensatz zum IGF-I-R ausschließlich IGF-II als Liganden. Der IGF-II-R agiert als ein Antagonist des IGF-II, indem er über dessen Bindung zum Abbau desselben führt. Die Aktivität von IGF-II wird somit gemindert (Oates et al. 1998). Aufgrund dieses Effektes wird der IGF-II-R auch als potentieller Tumorsuppressor betrachtet.

### 1.2.3.3 IGFBPs und IGFBP-Proteasen

Die Regulation der Genexpression der sechs IGFBPs ist abhängig von Zelltyp und Mediator. Hormone, Wachstumsfaktoren und Tumorsuppressorgene können die Transkription stimulieren oder hemmen. Die IGFBPs verlängern die Halbwertszeit der zu 99% an IGFBP gebundenen zirkulierenden IGFs und regulieren somit deren Bioverfügbarkeit. Überschießendes Zellwachstum und exzessive Apoptose können verhindert werden. Die Interaktion zwischen extra- und intrazellulären Kompartimenten sowie die Rezeptorinteraktion wird über die Bindung der IGFs moduliert. Das größte Protein, mit der höchsten Affinität zu IGFs, ist das IGFBP-3. Es formt einen Komplex mit IGF und *acid labile subunit* (ALS). Zum Durchtritt durch die kapilläre Membran ist es zu groß. Das IGFBP-3 kann neben der Regulation der mitogenen Aktivität der IGFs auch den antiapoptotischen Effekt hemmen. IGF-unabhängige Effekte auf Zellproliferation-hemmende und Apoptose-induzierende Prozesse sind ebenfalls bekannt. Die Konzentration von IGFBP-3 wird

wiederum vom PSA beeinflusst, welches das IGFBP-3 spaltet und demzufolge die Bioverfügbarkeit des pro-proliferativen Faktors IGF-I erhöht, da das IGFBP-3 seine Affinität zum IGF-1 verliert. Daraus resultiert ein Anstieg der mitogenen Aktivität des IGF-1 mit gesteigerter Proliferation der Prostatakarzinom-Zellen (Kanety et al. 1993; Moschos und Mantzoros 2002). Über PSA wird die enge Verknüpfung zwischen dem AR und der IGF-Achse deutlich, da eine gesteigerte AR-Expression mit erhöhtem PSA einhergeht und es folglich zu einem Abbau des IGFBP-3 kommt, was in dem oben beschriebenen Ungleichgewicht zwischen IGF-1 und dem IGFBP-3 resultiert. Zusätzlich kann das IGF-1 wiederum direkt den AR aktivieren (siehe 1.2.3).

Die IGFBP-Proteasen umfassen eine heterogene Gruppe von Molekülen wie *kallikrein-like* Serinproteasen, Cathepsine und Matrix-Metalloproteasen. Ihre Aufgabe besteht in der Proteolyse der IGFBPs und somit in einer durch Affinitätsreduktion zum IGF hervorgerufenen, erhöhten Bioverfügbarkeit der IGFs. Die Regulationsmechanismen der Proteolyse werden durch Veränderungen der physiologischen Bedingungen, der Hormonspiegel von Insulin, IGF-I und Östrogenen, sowie durch weitere noch wenig verstandene Mechanismen beeinflusst.

In Prostatakarzinomzellen findet sich sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine verminderte Expression der IGFBPs. Die gesteigerte Expression des als Protease wirkenden PSA verstärkt zudem das Ungleichgewicht innerhalb der IGF-Achse (Moschos und Mantzoros 2002).

### 1.2.4 TIMP-3

Die Mitglieder der TIMP-Gen-Familie (*Tissue inhibitors of matrixmetalloproteases*) fungieren als Inhibitoren der Matrix-Metalloproteasen (MMPs), die wiederum Bestandteil der Extrazellulärmatrix (ECM) sind. Die ECM ist für den mechanischen Zusammenhalt der Zellen in Geweben und Organen verantwortlich. Die Kontrolle des Umsatzes der ECM, die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und das Durchwandern der ECM wird mittels Bildung verschiedener proteolytischer Enzyme durch die Zelle reguliert. Neben dem Plasminsystem und lysosomalen Enzymen sind die MMPs an der Degradierung der Makromoleküle der ECM beteiligt. Einige MMPs sind in der Lage nahezu alle Bestandteile der ECM zu lysieren (Woessner 2001). Im physiologischen Zellverband sind die TIMPs für die Inhibition der MMPs verantwortlich, sodass der Umsatz der ECM kontrolliert abläuft. Kommt es zu einem Anstieg der MMPs ohne konkordante Erhöhung der TIMPs, führt dies zu Gewebedestruktion. Tumorzellen können über diesen Mechanismus die Basalmembran und die Tumorkapsel durchbrechen, invasiv in gesundes Gewebe einwachsen und über das Eindringen in Blutgefäße hämatogen metastasieren.

Es sind fünf TIMPs bekannt. Die außergewöhnlichsten Eigenschaften weist das TIMP-3 auf. TIMP-3 ist das einzige TIMP, das an die ECM assoziiert vorliegt. Es bindet wahrscheinlich

über sein N-terminales Ende an Heparansulfat und Chondroitinsulfat enthaltende Proteoglykane (Yu WH et al. 2000) und ist dort lokalisiert, wo eine Durchwanderung der Basalmembran und des Stromas verhindert oder reguliert werden muss. Eine weitere bedeutungsvolle Eigenschaft von TIMP-3 ist die Möglichkeit der Apoptoseeinleitung, die über die N-terminale Domäne vermittelt wird (Bond et al. 2000).

### 1.2.5 Östrogenrezeptor

Östrogene gehören zu den Steroidhormonen und werden sowohl von der Frau als auch vom Mann synthetisiert. Bei beiden Geschlechtern sind sie gemeinsam mit Testosteron für das Skelettwachstum verantwortlich. Die Beeinflussung der Bildung und Entwicklung der Geschlechtsorgane und der sekundären Geschlechtsmerkmale ist eine wichtige Funktion bei der Frau. Die Hormonbildung findet im Ovar, in der Plazenta, sowie in der Nebennierenrinde und in den Hoden statt. In Organen mit Aromatasefunktion (Muskel und Fettgewebe) kommt es in geringem Umfang zur Umbildung von Hormonen. Die Wirkung erfolgt über die Östrogenrezeptoren, die zur Gruppe der Steroidhormonrezeptoren mit Zinkfingermotiven zählen und als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren wirken. Die Biosynthese der Östrogene erfolgt mittels der Aromatase-Reaktion aus Androgenen (Rassow et al. 2006).

Generell werden zwei Subtypen von Östrogenrezeptoren unterschieden.

Der ER $\alpha$  (*estrogen-receptor-alpha*) ist in der Prostata in den Stromazellen und der androgenunabhängigen basalen Zellschicht lokalisiert, in der die Stammzellen und die proliferativen Kompartimente der prostatichen Epithelzellen zu finden sind. Abnorme Proliferation, inflammatorische Prozesse und die Entstehung von Malignomen sind mit dem ER $\alpha$  assoziiert (Ellem und Risbridger 2007).

Der ER $\beta$  (*estrogen-receptor-beta*) ist vor allem in der luminalen Zellschicht vertreten. Diese wird auch als Differenzierungskompartiment bezeichnet, ist androgenabhängig und verfügt nur über eine begrenzte Proliferationsfähigkeit. Anti-Proliferation, Differenzierung und Apoptose sind mit dem ER $\beta$  assoziiert (Bonkhoff und Remberger 1996; Bonkhoff et al. 1999; Ellem und Risbridger 2007; Fixemer et al. 2003). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse ist es nicht verwunderlich, dass an verschiedenen Tiermodellen ein karzinogener Effekt von Östrogenen auf das prostatiche Epithel gezeigt werden konnte. Wurde Ratten regelmäßig Testosteron in niedrigen Dosen verabreicht, entwickelte sich bei 35-40% ein Prostatakarzinom in Form einer HGPIN (*high-grade PIN*). Wurde zusätzlich noch Östradiol verabreicht, stieg die Inzidenz auf nahezu 100% an. Im Rattenmodell waren somit für die maximale Karzinogenese neben Androgenen auch die Östrogene erforderlich. In einem neueren Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ER $\alpha$  für die Karzinogenese unerlässlich ist, indem ebenfalls Testosteron und Östrogene verabreicht wurden, jedoch unter Knockout des ER $\alpha$ . Bei diesen Mäusen kam es nicht zur Bildung einer HGPIN. Die Entstehung von

chronischen Entzündungen durch Östrogene mittels des ER $\alpha$ , als Vorstufe des Prostatakarzinoms, konnte ebenfalls im Mausmodell gezeigt werden (Bosland 2005; Ricke et al. 2008; Risbridger et al. 2007). In der humanen Prostata wurde eine Ausbreitung des ER $\alpha$  aus dem basalen- in das Differenzierungskompartiment der luminalen Zellschichten, in dem die dysplastische Umwandlung geschieht, beobachtet. Die Funktion des ER $\alpha$  als Onkogen, dessen Überexpression zur malignen Transformation in der Prostata führt, ist naheliegend (Bonkhoff et al. 1999; Bonkhoff und Berges 2009). Der ER $\beta$  wird mit genau gegensätzlichen Funktionen assoziiert, er konnte 1997 erstmals von Gustafsson geklont werden. Er gilt als Tumorsuppressor und sein Verlust während der Karzinomentstehung ist nicht verwunderlich. In HGPIN ist seine Expression in 40% der Fälle deutlich reduziert oder sogar nicht vorhanden. Im hormonrefraktären Prostatakarzinom fand sich ebenfalls in 40% der Fälle eine deutliche Reduktion des ER $\beta$ -Niveaus, in 10% der Fälle konnte er gar nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wird beim hormonsensitiven Prostatakarzinom der ER $\beta$  gemäß des zuvor bestandenen Niveaus wieder exprimiert, selbst in Lymphknoten und Knochenmetastasen. Diese Patienten könnten von einer ER $\beta$  agonistischen Wirkung profitieren (Fixemer et al. 2003). Ein präventiver Effekt über eine agonistische Wirkung wird auch den Phytoöstrogenen zugesprochen, zu denen der ER $\beta$  eine hohe Affinität hat. Diese Vermutung ergab sich aus epidemiologischen Beobachtungen, die zeigten, dass in asiatischen Ländern, in denen die Nahrung bereits einen hohen Anteil an Phytoöstrogenen beinhaltet, das Prostatakarzinom erheblich seltener vorkommt. Die Wirkung von Phytoöstrogenen, die sich in der Hemmung von Zellproliferation und Angiogenese, einem PSA-Abfall und einem AR-Abfall sowie einem AR-*silencing* zeigt, kann nicht zuverlässig auf die Wirkung über den ER $\beta$  zurückgeführt werden. Nur bei Prostatakarzinom-Formen mit polymorphen Variationen in der Promotorregion des ER $\beta$  konnte eine Senkung des Prostatakrebsrisikos unter der Einnahme von Phytoöstrogenen gezeigt werden. Beim Wildtyp Allel des ER $\beta$  konnte dieser Effekt nicht belegt werden (Hedelin et al. 2006; Klein 2002). Stettner et al. konnten in ihrer Arbeit jedoch die Relevanz des ER $\beta$  bei der Karzinogenese zeigen. Ein Knock-Down des ER $\beta$  mittels siRNA führte u.a. bei PDEF, PSA und DD3 zu einem onkogenen Stimulus. Eine Hochregulation des ER $\beta$  hingegen führte zu antiproliferativen Effekten. Ebenso wurde die antagonistische Wirkung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  nachgewiesen (Stettner et al. 2007).

### 1.2.6 Haushaltsgene

Die Mitbestimmung der endogenen Referenzgene ARP (*aciolic ribosomal protein*) und PBGD (*Porphobilinogen Desaminase*) bei der rtPCR dient der Kontrolle. Bei diesen Genen handelt es sich um sog. „housekeeping-Gene“, die unabhängig von Zellstadium und exogenen Einflüssen exprimiert werden und typischerweise mit grundlegenden Stoffwechselprozessen

der Zelle zusammenhängen. Unter experimentellen Bedingungen sollte es nicht zu Veränderungen der Expression kommen, da diese auf eine letale Schädigung der Zelle hindeuten.

### 1.3 Die Zelllinie

Die für die Experimente verwendete Zelllinie VCaP (*Vertebral-Cancer of the Prostate*) wurde 1997 bei einem an hormonrefraktärem Prostatakarzinom erkrankten Patienten aus einer Knochenmetastase der Wirbelsäule gewonnen.

Die Zelle ist sowohl in vivo als auch in vitro Androgen-sensibel (Korenchuk et al. 2001). Sie ist durch eine Fusion des prostataspezifischen, androgenregulierten Gens TMPRSS2 (21q22.3) mit einem der Gene der ETS-Familie gekennzeichnet. Laut Tomlins et al. ist die TMPRSS2-ERG-Genfusion die häufigste Fusion. Bei etwa 50% der Patienten mit auffälligen PSA-Werten und daraus resultierender chirurgischer Intervention wurde diese Genfusion im Biopsat nachgewiesen. Es zeigte sich ebenfalls, dass nahezu 90% der Prostatakarzinome mit einer ERG-Überexpression die TMPRSS2-ERG-Fusion aufweisen (Tomlins et al. 2005).

Die VCaP bietet viele Charakteristika des klinischen Prostatakarzinoms, die Expression von PSA und dem AR inbegriffen. Diese Zelllinie stellt eine nützliche Ergänzung zu den bereits existierenden Modellen des Prostatakarzinoms dar und ermöglicht erweiterte Untersuchungen zu den Abläufen von Progress und Metastasierung beim Prostatakarzinom (Korenchuk et al. 2001).

### 1.4 Histone, Histondeacetylasen und Histondeacetylaseinhibitoren

#### 1.4.1 Histone

Histone sind unter anderem für die Unterbringung der DNA im Zellkern erforderlich, die in der eukaryonten, diploiden Zelle eine Länge von ca. 2 Metern einnimmt. Das Nukleosom - die kleinste Organisationseinheit des Chromatingerüsts - umfasst neben 146 Basenpaaren der DNA auch acht Histone. Es bildet die Grundstruktur für die Chromosomen. Die sogenannte core-DNA windet sich um das aus acht Histonen gebildete Histonoktamer. Es besteht aus je zwei Histonen der Typen H2A, H2B, H3 und H4. Das Histon H1 ist an der Verbindung der einzelnen Nukleosomen beteiligt und erleichtert die Faltung zu höheren Strukturordnungen. Die Histone zeichnen sich durch eine hohe Basizität aus. Diese ermöglicht eine enge Verknüpfung mit den sauren Anteilen der DNA. Neben der Komprimierung der DNA sind die Histone an der Modulation der Genexpression beteiligt. Dies geschieht über verschiedene Mechanismen wie Acetylierung/Deacetylierung im Bereich des N-terminalen Endes des Histonproteins (Löffler und Petrides 2003; Marks et al. 2001).

### 1.4.2 Histondeacetylasen (HDACs)

HDACs sind eine Familie von Enzymen, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse (inklusive Zellproliferation, Apoptose und Aufbau des Zytoskeletts) beteiligt sind (de Ruijter et al. 2003). Ein Zusammenhang zwischen der Acetylierung von Histonen und der Transkriptionsaktivität wurde bereits vor mehr als 35 Jahren vermutet (Allfrey 1966). Inzwischen konnten genauere Zusammenhänge geklärt werden. Die Histondeacetylasen entfernen hydrolytisch Acetylgruppen an acetylierten Lysinen der N-terminalen Enden der Histone. Die Deacetylierung führt zu einem Überwiegen der positiven Ladungen und somit zu einer engeren Bindung von negativ geladenen DNA-Anteilen und Histonen. Die DNA ist enger gepackt und ein Ablesen erschwert. Über diesen Mechanismus wird eine Herunterregulierung der transkriptionellen Aktivität induziert. HDACs sind zudem an der Regulierung der Acetylierung von Nicht-Histon-Proteinen wie alpha-Tubulin und dem Tumorsuppressor p53 involviert, über die sie Einfluss auf die Regulation von Zellzyklusablauf und Apoptose nehmen (Glaser et al. 2004; Marks et al. 2001; Matsuyama et al. 2002). Derzeit sind 18 Mitglieder der HDAC-Familie identifiziert. Grundsätzlich findet eine Einteilung in drei Klassen statt. Klasse I und II sind Zink-abhängige Enzyme, Klasse III HDACs sind NAD<sup>+</sup>-abhängig (Gregoretto et al. 2004; Khan et al. 2008).

Histonacetyltransferasen (HATs) sind Enzyme, die die Übertragung von Acetylgruppen auf Lysinreste der Histone katalysieren und somit einen zu den HDACs konträren Effekt hervorrufen. Acetylierte Abschnitte verfügen über eine erhöhte transkriptionelle Aktivität (Göttlicher et al. 2001; Marks et al. 2001). Ein Ungleichgewicht zwischen HDAC- und HAT-Aktivität kann über die Regulierung der Chromatinstruktur und der damit verbundenen Transkriptionsaktivität zu einer Dysregulation der Transkription von Genen führen, die in Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Apoptose involviert sind. Langfristig kann dies zu einer malignen Entartung von Zellen führen (Marks et al. 2001).

### 1.4.3 HDAC-Inhibitoren

Das Wissen um die physiologischen Effekte der HDACs und deren mögliche Hemmung eröffnet einen neuen Behandlungsansatz in der Therapie von malignen Zellen. In der Zellkultur resultierte die Hemmung der HDACs bei entarteten Zellen in einem Zellzyklusarrest in der G1- und/oder der G2-Phase, in Apoptose und/oder Differenzierung. Ein wachstumshemmender Effekt konnte sowohl in hämatogenen als auch in epithelialen Tumoren (wie dem Prostatakarzinom) registriert werden. Diese apoptosefördernden und wachstumshemmenden Effekte konnten interessanterweise trotz nachweisbarer Acetylierung der Histone H2A, H2b, H3 und H4 nicht in gesunden Zellen nachgewiesen werden und scheinen somit auf transformierte Zellen beschränkt zu sein (Marks et al. 2001). In Bezug auf das Prostatakarzinom zeigt sich eine durch HDAC-Inhibitoren induzierte Blockade der AR-

vermittelten Transkriptionsaktivität vieler Gene, unter anderem des TMPRSS2-Gens, das in die Fusion mit den Genen der ETS-Familie verwickelt ist (Welsbie et al. 2009).

Für diese Arbeit wurde mit dem HDAC-Inhibitor Valproat gearbeitet, auf den im Folgenden näher eingegangen wird.

### 1.5 Valproinsäure (VPA)

Valproinsäure - auch 2-n-Propyl-Pentansäure genannt - ist eine verzweigtkettige Fettsäure, die aus acht Kohlenstoffatomen besteht. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften kann sie gut enteral resorbiert werden, die Blut-Hirnschranke kann passiert werden. In der Leber findet eine Glukuronidierung oder Oxidation von VPA statt und die Eliminationshalbwertszeit beträgt 8 bis 15 Stunden. Die verhältnismäßig schwach ausgeprägten Nebenwirkungen umfassen Tremor, zentralnervöse Störungen (Verwirrtheit, Unruhe) und gastrointestinale Beschwerden, der sedierende Effekt ist gering. Eine zwar seltene, aber schwerwiegende Nebenwirkung ist die Leberschädigung. Teratogenität zeigt sich hauptsächlich in Form von Neuralrohrdefekten. Valproat wird seit knapp 40 Jahren in der Behandlung von Epilepsien eingesetzt, findet aber auch Anwendung bei der Therapie von bipolaren affektiven Störungen und Panikattacken. Die Tagesdosis bei Erwachsenen umfasst 1,2 - 1,8 g (Lüllmann et al. 2006; Mutschler et al. 2001).

In den letzten Jahren konnten zahlreiche weitere Wirkungen von Valproat gezeigt werden. Es ist ein spezifischer Klasse I HDAC-Inhibitor (Khan et al. 2008). Göttlicher et al. zeigten 2001 die Wirkung von VPA als HDAC-Inhibitor und schlugen den Einsatz von VPA in der Krebstherapie vor (Göttlicher et al. 2001). VPA moduliert den Zellzyklus, induziert Apoptose von malignen Zellen und hemmt die Angiogenese in verschiedenen Tumormodellen. Der exakte Wirkmechanismus blieb bisher unklar, doch die Hyperacetylierung via HDAC-Inhibition scheint der bedeutendste Mechanismus für den Antitumor-Effekt zu sein (Hrebackova et al. 2010).

### 1.6 Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung des Einflusses von VPA als HDAC-Inhibitor auf die VCaP-Zelllinie des Prostatakarzinoms.

Eine Besonderheit der VCaP liegt in der Expression der TMPRSS2-ERG-Fusion. Diese Zelllinie repräsentiert als Derivat einer Knochenmetastase ein Modell des besonders aggressiven und letalen Prostatakarzinoms und ist sensibel gegenüber Androgenen. Ein Einfluss des HDAC-Inhibitors VPA konnte bereits bei verschiedenen Zelllinien des Prostatakarzinoms, wie beispielsweise der LNCaP, gezeigt werden. Wie genau VPA auf die VCaP wirkt und welchen Einfluss es auf die TMPRSS2-ERG-Fusion hat, ist noch nicht bekannt und soll in dieser Arbeit untersucht werden. Ziel ist es, mittels VPA induzierte

Veränderungen der Expression von Genen zu untersuchen. Als Methode wird hauptsächlich mit der rtPCR gearbeitet. Der Einsatz von VPA als HDAC-Inhibitor ist aufgrund der langjährigen Erfahrung in der klinischen Anwendung besonders interessant, da das Nebenwirkungsspektrum weitestgehend bekannt ist und Erfahrungen bezüglich der Langzeitanwendung vorliegen.

Untersucht werden v.a. Gene, deren Einfluss auf Apoptose, Differenzierung und Proliferation bekannt ist und die bereits bei anderen Zelllinien Veränderungen der Expression gezeigt haben.

Die Untersuchungen sollen auch neue Erkenntnisse über die Eigenschaften der VCaP-Zelllinie bezüglich des Expressionsmusters der untersuchten Gene und deren mögliche Funktionen bringen. Zusätzlich sollen mögliche therapeutische Ansätze für diese besonders maligne Form des Prostatakarzinoms gezeigt werden. Die Erkenntnisse über die Wirkung von VPA auf diese Zelllinie sollen den Schritt in Richtung klinischer Studien sondieren und mögliche Perspektiven in der Behandlung des Prostatakarzinoms aufzeigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Zellen, Primer

Material	Hersteller	Firmensitz
RPMI 1640	PAN-Systems GmbH	Nürnberg, Deutschland
10% fetales Kälberserum	PAA	Cölbe, Deutschland
2% Aminosäurelösung	Sigma®	Taufkirchen, Deutschland
1% L-Glutamin	Sigma®	Taufkirchen, Deutschland
VPA	Sigma®	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin	Sigma®	Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (EtOH)	Merck	Darmstadt, Deutschland
VCaP	LGC Standards	Wesel, Deutschland
DHT	Sigma®	Taufkirchen, Deutschland
Cell Freezing Medium	Sigma®	Taufkirchen, Deutschland
Random Primer	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Mastermix Plus SYBR® Green I with fluorescein	Eurogentec	Köln, Deutschland
Spezifische sense Primer	IBA	Göttingen, Deutschland
Spezifische antisense Primer	IBA	Göttingen, Deutschland
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
TAE-Buffer	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
Loading Dye Solution	Fermentas	St.Leon-Rot, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma®	Taufkirchen, Deutschland

**Tabelle 1**      Verwendete Chemikalien, Zellen und Primer

## Material und Methoden

---

### 2.1.2 Kits

Kit	Hersteller	Firmensitz
Mini RNA Isolation II Kit™	Zymo Research	Freiburg, Deutschland
Omniscript® RT Kit	QIAGEN	Hilden, Deutschland
RNA 6000 Nano Labchip® Kit	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Elecsys System 2010	Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland

**Tabelle 2**      Verwendete Kits

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Firmensitz
Latexhandschuhe	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl – 1000µl	Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Gewebekulturflaschen (50ml)	Nunc	Wiesbaden, Deutschland
Quarzglas-Küvetten	Brand	Wertheim, Deutschland
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tube Stripes	BioRad	München, Deutschland
Optical Tape	BioRad	München, Deutschland
Reagenzgefäße (BD Falcon™)	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Kryogefäße 1,8ml	Nunc	Wiesbaden, Deutschland

**Tabelle 3**      Verwendete Materialien

### 2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Pipetten 2,5µl bis 1000µl	Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Brutschrank	Heraeus	Hanau, Deutschland
Sterile Werkbank und Abzug HA 2472 GS	Heraeus Lamin Air	Hanau, Deutschland
Laborfuge 400R / GI	Heraeus	Hanau, Deutschland

## Material und Methoden

Lichtmikroskop	Leitz	Bensheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht	Sondheim, Deutschland
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Nano-Chip-Priming-Station	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
IKA Vortexer	IKA	Staufen, Deutschland
iCycler iQ	BioRad	München, Deutschland
MS1 Minishaker	IKA	Staufen, Deutschland
Geldokumentationsanlage E.A.S.Y. RH-3	Herolab GmbH	Wiesbaden, Deutschland
Gelschlitten mit Taschenkamm	BioRad	München, Deutschland
Mikrowelle	Bauknecht	Stuttgart, Deutschland
Becherglas	Schott	Mainz, Deutschland
Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler	GenTech	New York, USA
Power Pac 2000 Labornetzgerät	BioRad	München, Deutschland

**Tabelle 4**      Verwendete Geräte

### 2.1.5 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
iCycler iQ <sup>®</sup> real time detection software	BioRad	München, Deutschland
Microsoft <sup>®</sup> Excel	Microsoft	Redmond, USA
Graph Pad Prism <sup>®</sup> 4.0	GraphPad Software	La Jolla, USA
Agilent expert-software	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland

**Tabelle 5**      Verwendete Software

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur und Zellhaltung

#### 2.2.1.1 Zellhaltung

Die Zelllinie VCaP wird in Zellkulturflaschen im Kulturmedium RPMI gehalten. Diesem Kulturmedium werden 10% fetales Kälberserum, 2% Aminosäurelösung und 1% L-Glutamin zugesetzt. Die Zellkulturflaschen werden im Brutschrank bei 37°C Temperatur und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 10% gelagert. Alle Arbeiten mit Zellkulturen werden mit Handschuhen, unter sterilen Bedingungen und unter dem Abzug durchgeführt, um eine Kontamination zu vermeiden.

#### 2.2.1.2 Mediumwechsel und Passagieren der Zellkulturen

Die Zellen werden in 3ml des Kulturmediums RPMI in Kulturflaschen angezchtet. Da bei der VCaP eine verhältnismäßig langsame Zellvermehrung stattfindet, ist ein wöchentlicher Mediumwechsel ausreichend. Für den Mediumwechsel wird das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt, damit möglichst wenig Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst werden. Anschließend werden 3ml des zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmten RPMIs auf die Zellen gegeben. Ein Ablösen der Zellen vom Boden kann durch behutsames Vorgehen vermieden werden.

Bei sehr starker Zellzahlvermehrung mit dichtem Zellrasen müssen die Zellen zum Erhalt optimaler Wachstumsbedingungen passagiert werden.

Zum Passagieren wird zunächst das Kulturmedium abgesaugt. Anschließend werden 2ml Trypsin in die Kulturflaschen gegeben, so dass der Zellrasen bedeckt ist. Nach einer Inkubationszeit von etwa fünf Minuten sollten sich die Zellen vom Boden der Flaschen gelöst haben. Das Trypsin-Zellgemisch wird nun in ein Reagenzröhrchen gegeben. Die zelllytische Wirkung des Trypsin, wird durch Zugabe von 3ml RPMI minimiert. Die Lösung wird bei 10000U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Am Boden des Reagenzröhrchens bildet sich ein Zellpellet. Unter dem Abzug wird der Flüssigkeitsüberschuss abgesaugt. Den Zellen werden 2ml RPMI zugeführt und jeweils 1ml dieser Lösung wird in eine frische Kulturflasche gefüllt. Anschließend werden jeweils 2ml RPMI in die Flaschen gegeben, so dass sich am Ende 3ml in jeder Flasche befinden. Die Zellen werden wieder unter den oben genannten Bedingungen im Brutschrank gelagert.

#### 2.2.1.3 Konservierung von Zellen

Für spätere Versuche werden überschüssige Zellen eingefroren. Die Zellen werden wie unter 2.2.1.2 beschrieben aus den Kulturflaschen gelöst. Das nach der Zentrifugation entstandene Zellpellet wird im *Cell Freezing Medium* (Sigma<sup>®</sup>) resuspendiert und in Kryogegefäße (1,8ml)

überführt. Die Herunterkühlung von  $-20^{\circ}\text{C}$  auf  $-160^{\circ}\text{C}$  erfolgt innerhalb von drei Tagen. Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen werden die Kryogefäße in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad erwärmt. Die Zellen werden unmittelbar in Kulturflaschen entsprechend Abschnitt 2.2.1.1 und 2.2.1.2 kultiviert.

### 2.2.2 Stimulation und Behandlung der Zellkultur

Die Stimulationsversuche erfolgen in Kulturflaschen mit einer definierten Zellzahl. Dafür wird mittels der Neubauerzählkammer die Zellzahl pro Milliliter-Zellsuspension bestimmt. Anschließend werden  $10^6$  Zellen in 3ml Nährmedium in eine Kulturflasche gegeben. Für den Versuch werden insgesamt fünf Kulturflaschen benötigt, sie sind in folgender Tabelle dargestellt:

Je Kulturflasche $10^6$ Zellen in 3ml Medium	Tag 1-3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
Mediumkontrolle	Aussaat und Anwachsen der Zellen in den Kulturflaschen	Vorstimulation mit:	Behandlung mit:	Isolation der RNA
Ethanolkontrolle		EtOH		
DHT		DHT		
Valproat			VPA	
DHT und Valproat		DHT	VPA	

**Tabelle 6** Versuchsreihe

Die Stimulation wird 3 Tage nach Aussaat der Zellen durchgeführt. Wie in Tabelle 6 gezeigt, erfolgt zunächst eine Vorstimulation mit DHT in  $10^{-8}$  molarer Konzentration ( $3\mu\text{l}$  einer  $10^{-5}$  molaren Verdünnung / pro 3ml Kulturflaschenmedium), gleichzeitig wird eine Kontrollflasche mit EtOH stimuliert. Am fünften Tag beginnt die Behandlung mit Valproat in 5millimolarer Konzentration. Da sich für diese Konzentration ein Volumen von  $150\mu\text{l}$  einer 100millimolaren VPA-Lösung für 3ml Kulturmedium ergibt, werden zunächst vorsichtig  $150\mu\text{l}$  Medium aus der Zellkulturflasche entnommen, um weiterhin ein Gesamtvolumen von 3ml zu erhalten. Weitere 24 Stunden später wird die RNA aus den stimulierten Zellen gewonnen.

### 2.2.3 RNA

#### 2.2.3.1 RNA-Isolation

Die Isolation der zellulären RNA wird mit dem *Mini RNA Isolation II Kit<sup>TM</sup>* der Firma Zymo Research durchgeführt. Dieses Kit ermöglicht die RNA-Extraktion von Zellen aus Zellkulturen

mit einer Zellzahl von  $2 \cdot 10^2$  -  $5 \cdot 10^6$  Zellen oder Geweben bis 20mg. Das Prinzip beruht auf der *Fast-Spin column technology*. In den Säulen befinden sich Silica-basierte Membranpartikel mit einer hohen Affinität für RNA. Verunreinigungen kleinerer Größe können die Säule passieren. Auf diese Weise bleibt ausschließlich die RNA in der Säule haften und kann anschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert werden.

Vor Beginn der Isolation muss den 24ml RNA Wash-Buffer einmalig 96ml 100%iger Ethanol zur Fertigstellung zugegeben werden. Die Arbeiten finden in einem RNase-freien Bereich statt.

Ablauf der RNA-Isolation:

Zunächst werden die Zellen (wie unter 2.2.1.2 beschrieben) vom Boden der Kulturflasche gelöst, um anschließend zentrifugiert zu werden. Daraufhin wird der Flüssigkeitsüberstand abgesaugt, so dass mit dem Zellpellet weiter gearbeitet werden kann.

1. Zum Zellpellet werden 600µl des ZR RNA-Buffer™ gegeben und das Gemisch wird für kurze Zeit gevortext.
2. Das Flüssigkeitsgemisch wird in den Filter der Zymo-Spin™ Säule pipettiert, die sich in einem Tube befindet. Es wird für 1 Minute bei 10000U/min zentrifugiert und die Flüssigkeit im Tube wird verworfen.
3. Folgender Schritt wird zweimalig durchgeführt: Es werden 350µl des RNA-Wash-Buffers auf die Säule gegeben und nach einer Inkubationszeit von 1 Minute, für 1 Minute (wie in Schritt 2) zentrifugiert; das Zentrifugat wird verworfen.
4. Die Säule wird nun in ein 2ml Eppendorf Cup gegeben und es wird 30µl RNase-freies Wasser direkt auf den Filter gegeben. Nach 2-minütiger Inkubation erfolgt die 1-minütige Zentrifugation. Der Filter wird verworfen. Im Eppendorf-Cup befindet sich jetzt die isolierte RNA, die unverzüglich zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gelagert werden muss, oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank aufbewahrt wird.

### 2.2.3.2 Umgang mit RNA

RNA ist sehr empfindlich gegenüber Ribonukleasen (RNasen). Dies sind sehr stabile und aktive Enzyme, die keine Kofaktoren zur Aktivierung benötigen. Sie sind nur schwer zu inaktivieren und können innerhalb kurzer Zeit zur Denaturierung der RNA führen. Es ist demnach erforderlich, alle Arbeiten in einem RNase-freien Bereich durchzuführen und nach Möglichkeit sterile, RNase-freie Verbrauchsmaterialien zu nutzen. Das Tragen von Handschuhen ist unerlässlich, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Lagerung der RNA erfolgt im Gefrierschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Zur Verarbeitung wird sie auf Eis lagernd aufgetaut.

### 2.2.3.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Der Bioanalyser der Firma Agilent ermöglicht es Integrität und Quantität von RNA zu bestimmen. Bei der dabei genutzten *lab-on-a-chip* Technologie befinden sich alle benötigten Reagenzien und Proben auf einem Chip. Die einzelnen Proben werden in Mikrokanälen auf dem Chip bewegt und der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Der Bioanalyser erfasst das ausgesandte Fluoreszenzsignal der einzelnen Komponenten. Zur späteren Auswertung der Konzentration dient die mitgeführte Leiter. Die gemessenen Werte erscheinen mittels der Agilent expert-Software als Gel-ähnliche Banden und als Elektropherogramm (siehe Abbildung 1 und 2). Zudem wird die genaue Konzentration der RNA angegeben.

#### 2.2.3.3.1 Protokoll

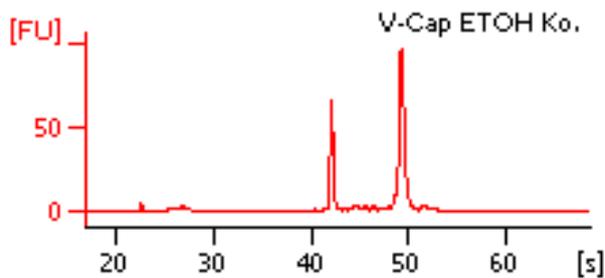
Zur Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA wird das Agilent RNA 6000 Nano Kit genutzt. Zunächst muss die für die Messung erforderliche *RNA 6000 Nano gel matrix* nach Angaben des Herstellers zentrifugiert und aliquotiert werden. Zur Anfertigung des Gel-Farbstoffmixes wird 1µl des auf Raumtemperatur gebrachten und für 10 Sekunden gevortexten *RNA 6000 Nano dye concentrate* in 65µl des aliquotierten und gefilterten Gels gegeben. Dieser Mix wird erneut gevortext und anschließend für 10 Minuten bei 13000g zentrifugiert.

In die mit Hilfe der Primingstation beladenen und nach Vorschrift des Herstellers mit dem Gelfarbstoffmix beladenen Wells des Chips, wird nun in jedes Well 5µl des *RNA Nano Markers* pipettiert. Zudem wird je 1µl der zu messenden Proben in ein Well gegeben. Von der zuvor aufgetauten Leiter wird 1µl in das dafür auf dem Chip vorgesehene Well pipettiert. Sind weniger Proben als Wells vorhanden, werden die freien Wells mit 1µl des *RNA Nano Markers* befüllt. Nachdem der Chip für 1 Minute im *IKA-Vortexer* gevortext wurde, wird er im *Agilent 2100 bioanalyser* platziert. Im Analyzer findet mittels der Agilent 2100 expert-Software die quantitative und qualitative Auswertung der in den Proben enthaltenen RNA statt. Nach Ablauf der Messung werden die Elektroden mit dem Elektrodenreinigungschip, in den 350µl RNase-freies Wasser gefüllt wird, gereinigt. Der Chip wird zweimal für 2 Minuten im Gerät platziert.

#### 2.2.3.3.2 Auswertung der Ergebnisse

Das in der unten stehenden Abbildung dargestellte Elektropherogramm zeigt eine Auswertung des Bioanalyzers. Der erste Peak stellt einen 50bp großen Marker dar, der bei allen Proben mitgeführt wird und eine Eichung der einzelnen Proben ermöglicht. Im zweiten Peak zeigt sich die 18S rRNA, im dritten Peak die 28S rRNA eukaryonter Zellen. Diese drei Peaks sollten bei einer erfolgreichen Messung dargestellt sein und zwischen dem 2. und dem 3. Peak sollte nur eine geringe Hintergrundfluoreszenz erscheinen. Zur qualitativen Beurteilung kann die rRNA-Ratio (28S/18S) herangezogen werden. Werte über 1,7 sprechen für eine qualitativ hochwertige rRNA. Im Gelformat der Bioanalyser-Messung sprechen zwei

scharf getrennte Banden von 18S rRNA und 28S rRNA für die Integrität der RNA. Dabei sollte die 28S-Bande mit etwa der doppelten Intensität der 18S-Bande vertreten sein. Sind die Banden unscharf, verschmiert oder in Richtung anderer RNA Größen verschoben, spricht dies für die Degradation der RNA.



**Abbildung 1** Elektropherogramm mit 18S- und 28S Bande



**Abbildung 2** Gel-Darstellung der Bioanalyzermessung

### 2.2.4 Reverse Transkription der RNA

#### 2.2.4.1 Allgemeines zur Reversen Transkription

Als Basis für die spätere rtPCR ist die Synthese von cDNA aus der gewonnenen RNA erforderlich. Voraussetzung für eine verhältnismäßige Transkription ist eine intakte RNA. Bereits kleine Mengen von RNasen können zu einer RNA-Spaltung führen, die verkürzte cDNA-Produkte zur Folge hätte. Somit ist auch hier ein steriles und RNase-freies Arbeiten erforderlich (siehe Handling der RNA 2.2.3.2)

Das *Omniscript<sup>®</sup> RT Kit* der Firma Qiagen beinhaltet die Omniscript Reverse-Transkriptase, ein rekombinantes, heterodimeres Enzym, das aus *E. coli* isoliert wurde. In vivo hat es drei wesentliche Funktionen, nämlich eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine Hybrid-abhängige Exonuclease (RNase H) und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. Diese drei Funktionen erlauben in vivo eine Transkription der einsträngigen RNA in doppelsträngige cDNA für die retrovirale Transfektion. In vitro werden die ersten beiden Aktivitäten für die Reverse Transkription genutzt.

Die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität sorgt für die Synthese der einzelsträngigen cDNA von einem vorhandenen RNA-Template. Die Ribonuklease-Aktivität zerstört in einem zweiten Schritt spezifisch die RNA des vorliegenden DNA-RNA-Hybrids. Die Omniscript RNase ist nur an hybridisierter RNA aktiv. Zu reiner, ungebundener RNA hat sie keine Affinität.

Die im Kit enthaltenen Random Primer sind 6-8 Nukleotide lang und können sich an jeder Stelle der RNA-Matrize anlagern, da sie mit zahlreichen möglichen Basenkombinationen übereinstimmen. Nach der Anlagerung des Primers an die Matrize kann die Reverse-Transkriptase vom 3'-Ende des Primers ausgehend, die RNA nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung in cDNA umschreiben. Alle erforderlichen dNTPs sind im Reaktionsansatz enthalten. Liegt das RNA-DNA-Hybrid vor, sorgt die oben beschriebene Ribonuklease-Aktivität für eine Abspaltung der RNA von der DNA.

### 2.2.4.2 Protokoll zur Reversen Transkription

Das von der Firma Qiagen verwendete *Omniscript<sup>®</sup> RT Kit* beinhaltet folgende Reagenzien, die in folgendem Verhältnis als Mastermix pipettiert werden:

Mastermix Einfachansatz mit einem Gesamtvolumen von 5,8µl:	
RT-Buffer	2µl
dNTPs	2µl
RT	1µl
Random Primer	0,5µl
Inhibitor	0,3µl

**Tabelle 7** Pipettierschema Mastermix für Reverse Transkription

Der Mastermix wird zu einem 500ng RNA enthaltenden Wasser-RNA-Gemisch mit einem Volumen von 14,2µl gegeben. Zuvor wurde errechnet, wie viel µl der vorhandenen RNA benötigt werden. Umgeschrieben werden sollen 500ng der RNA. Im Folgenden findet sich ein Rechenbeispiel für eine RNA Konzentration von 760ng/µl.

$$\frac{500\text{ng}}{X} = \frac{760\text{ng}}{1\mu\text{l}} \quad X = 0,66\mu\text{l RNA}$$

Das Zielvolumen des gesamten Reaktionsansatzes soll 20µl betragen. Da der Mastermix ein Volumen von 5,8µl ausmacht, müssen RNA und Wasser ein Gesamtvolumen von 14,2µl ergeben. Daraus ergibt sich für oben stehendes Beispiel ein Wasservolumen von: 14,2µl - 0,66µl RNA = 13,54µl Wasser.

Nach Eluation der RNA mit dem Wasser, wird das Gemisch zunächst für 5 Min bei 65°C inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen zu beseitigen. Vom gleichzeitig pipettierten Mastermix (siehe Tabelle) werden nun jeweils 5,8µl pro Probe hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgt im Thermocycler der Firma Gen Tech nach folgendem Ablauf:

Temperatur	Dauer
25°C	10 Min
37°C	60 Min
93°C	5 Min
4°C	Haltetemperatur

**Tabelle 8** Temperaturverlauf der cDNA-Synthese im Thermocycler

Zur weiteren Verarbeitung für die rtPCR wird das Transkriptionsprodukt im Verhältnis 1:4 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

### 2.2.5 PSA-Messung

Im Überstand der stimulierten Zellen wird die PSA-Sekretion gemessen. Diese erfolgte mit dem Elecsys® System 2010 der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland). Die auch im klinischen Alltag angewandte Untersuchungsmethode basiert auf einer Elektrochemilumineszenz-Immunoassay-Technik, bei der mittels einer Sandwichmethode freies und gebundenes PSA gemessen werden (Haese et al. 2002). Da die ermittelten PSA-Konzentrationen von der zuvor vorhandenen Zellmenge abhängig sind, wurden die Konzentrationen in ein Verhältnis mit den entsprechenden mRNA-Konzentrationen gesetzt, welche die Zellmenge widerspiegeln. Die mRNA-Konzentration der Kontrolle wurde als 1 definiert. Alle weiteren PSA-Konzentrationen wurden dann mit dem Faktor entsprechend des Verhältnisses der mRNA-Konzentrationen zur Kontrolle multipliziert. Diese Methode ermöglicht den direkten Vergleich der PSA-Konzentrationen der unterschiedlichen Überstände. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

### 2.2.6 PCR

#### 2.2.6.1 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der PCR können mittels ausgewählter Primer und einer DNA-Polymerase gezielt bestimmte Sequenzen der DNA vervielfältigt werden. Voraussetzung dafür ist, dass die zu amplifizierenden Abschnitte der DNA bekannt sind. Die DNA-Polymerase kommt natürlicherweise in allen lebenden Organismen vor und hat im Zellzyklus die Aufgabe der Replikation vor der Zellteilung. In vivo wird die doppelsträngige DNA mittels einer ATP-

abhängigen Helikase aufgespalten und für die DNA-Polymerase zugänglich gemacht. In vitro erfolgt die Auftrennung des Doppelstranges durch Erhitzen.

Die Polymerasekettenreaktion umfasst drei aufeinanderfolgende Schritte, die in 20-60 Zyklen wiederholt werden.

Im ersten Schritt (Denaturierung) wird der Ansatz auf 95°C erhitzt und die entstandenen Einzelstränge für weitere Schritte zugänglich gemacht.

Der zweite Schritt (*Annealing*) erfolgt bei einer für die Primer optimalen Temperatur und führt zur Anlagerung der Primer an die komplementären Stränge der Matrizen-DNA. Einer der Primer ist komplementär mit dem 5`-Ende der Matrize. Der zweite Primer ist komplementär zum 3`-Ende, so dass dazwischen ein definierter DNA-Abschnitt vorliegt. Je nach Primerlänge und Basenzusammensetzung (je höher der CG-Gehalt und somit die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen, desto höher auch die Annealing-Temperatur), variiert die optimale Temperatur zwischen 40°C und 70°C.

Beim dritten Schritt der PCR (DNA-Synthese) wird der gewünschte DNA-Abschnitt synthetisiert (Elongation). Die dafür genutzte Taq-Polymerase wurde aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und bleibt auch während der Phase höchster Temperatur (95°C) stabil. Die Polymerase beginnt am freien 3`-OH-Ende des angelagerten Primers mit der Synthese in 5`-3`-Richtung. Die für diesen Schritt erforderlichen dNTPs werden dem Reaktionsansatz zu Beginn beigelegt. Nach 20-40 Sekunden erfolgt wieder eine Erhitzung des Ansatzes auf 95°C. Die während der Synthese entstandenen Doppelstränge werden getrennt und stehen als weitere Matrize für den nächsten Zyklus zur Verfügung. Bereits im zweiten Zyklus entstehen die ersten DNA-Abschnitte mit der durch die Primer definierten Länge. Bei diesen Abschnitten kommt es während der Zyklen zu einem exponentiellen Anstieg der Produkte (Löffler und Petrides 2003; Rassow et al. 2006). Das entstandene Produkt kann mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden (siehe auch 2.2.7).

### 2.2.6.2 Die Real-Time PCR (rtPCR)

Die Real-Time PCR ist ein auf der konventionellen PCR basierendes Verfahren, bei dem in Echtzeit die Amplifikation der DNA-Abschnitte gemessen werden kann. Es ist möglich eine direkte, quantitative Bestimmung der DNA durchzuführen. Der verwendete Farbstoff SYBR® Green wird dem Versuchsansatz zu Beginn zugegeben. Die Bindung des Farbstoffs erfolgt vorrangig an doppelsträngige DNA und resultiert in einer Aussendung eines Fluoreszenzsignals, das vom *iCycler* automatisch erfasst wird und proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA ist. Die fluorimetrische Messung findet in jedem Zyklus direkt nach der Elongation statt. Hier liegen die neu amplifizierten DNA-Abschnitte noch als Doppelstrang vor, wodurch ein starkes Signal vom Farbstoff ausgeht. So ist es möglich, in Echtzeit die quantitative Zunahme der DNA im Verlauf der Zyklen zu erfassen. Da der

Farbstoff unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, ist nicht zwischen einer Amplifikation des Targets oder anderer ungewünschter Sequenzen zu unterscheiden. Eine qualitative Kontrolle ist erforderlich und kann mittels Agarosegel (siehe 2.2.7) oder eine direkt im Anschluss an die rtPCR durchgeführte Schmelzpunktanalyse durchgeführt werden.

### 2.2.6.3 Qualitative Bewertung der PCR

Zur Feststellung der korrekten Amplifikation der cDNA wird bei der konventionellen PCR die Gelelektrophorese genutzt. Anhand der Banden kann beurteilt werden, ob das gewünschte Amplifikat entstanden ist und ob eventuell unerwünschte Produkte vorliegen (siehe 2.2.7).

Bei der rtPCR besteht die Möglichkeit der Schmelzpunktanalyse, bei der der verwendete Farbstoff *SYBR® green* genutzt wird. Nach Abschluss der erforderlichen Zyklen findet eine kontinuierliche Temperaturerhöhung um jeweils 0,5°C von 50°C bis auf 95°C statt. Die vorliegende doppelsträngige DNA wird denaturiert, der gebundene Farbstoff dissoziiert von der DNA und es kommt zu einem Abfall des Fluoreszenzsignals. Bei den spezifischen DNA-Amplifikaten der jeweiligen Primer kommt es bei einer definierten Temperatur zum Abfall des Fluoreszenzsignals (diese Temperatur gibt den Schmelzpunkt an). Die Schmelzpunkte der unspezifischen Produkte liegen unter denen der gewünschten Produkte und können somit differenziert werden. Im optimalen Fall findet sich bei der für das Genprodukt spezifischen Schmelztemperatur ein starker Signalabfall, der im Diagramm als Peak zu erkennen ist und ein ungefähres Bild der Menge des cDNA-Amplifikates widerspiegelt.

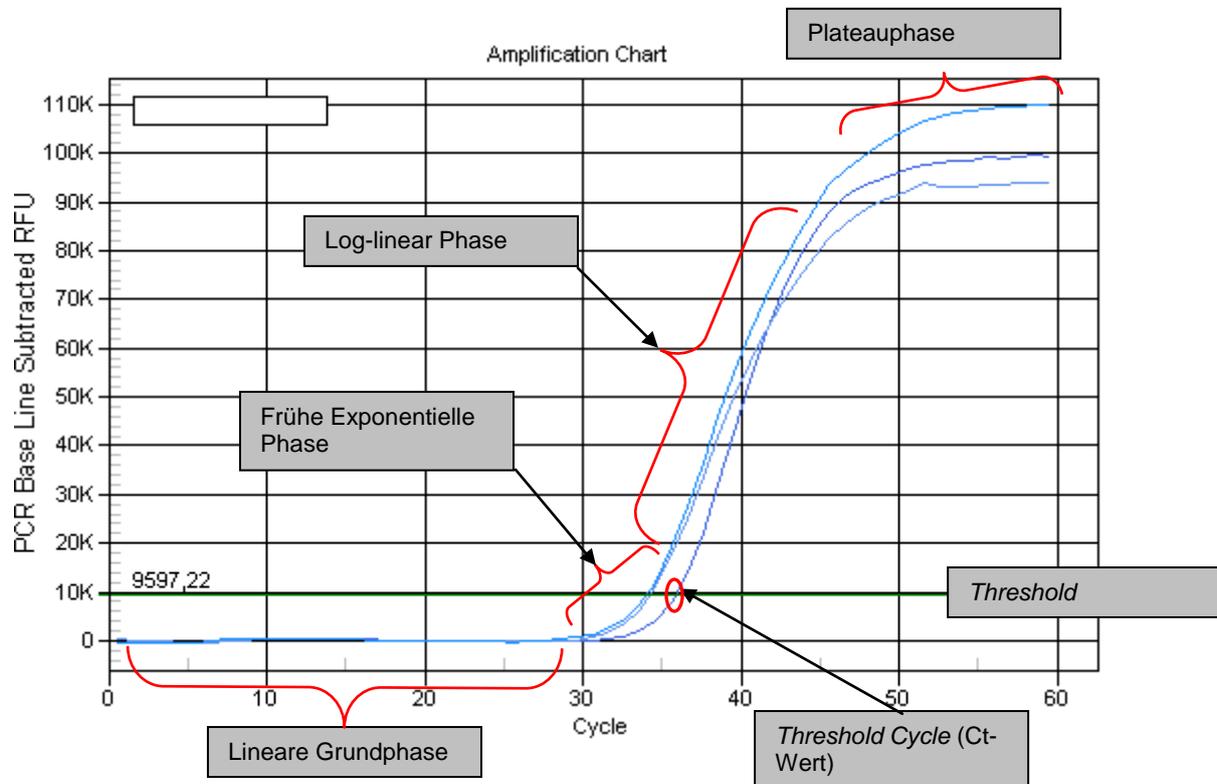
### 2.2.6.4 Das Amplifikationsdiagramm

Die während der rtPCR gesammelten Daten werden in einem Amplifikationsdiagramm zusammengefasst, in dem die Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen wird. Der sigmoide Kurvenverlauf kann in vier Phasen gegliedert werden.

Die erste Phase (lineare Grundphase) findet während der ersten Zyklen, zu Beginn der PCR statt. Hier steigt die Fluoreszenz noch nicht über die Hintergrundfluoreszenz (unspezifische Fluoreszenzsignale), die während der ersten Zyklen der PCR bestimmt wurde. Dies wird als *Baseline* bezeichnet. Bis zu diesem Zeitpunkt hat noch kein messbarer Anstieg von PCR-Produkten stattgefunden. In der sich anschließenden exponentiellen Phase steigt die Fluoreszenzintensität signifikant über den Hintergrund an. Die Festlegung des *Threshold* (Schwellenwert) erfolgt anhand der zehnfachen Schwankung der *Baseline*. Der Zyklus bei dem die Amplifikationskurve den *Threshold* schneidet, wird als *Threshold Cycle* (oder Ct-Wert) bezeichnet und ist für die spätere Auswertung der Daten erforderlich. Dieser Punkt entspricht dem Anfangswert der Templatemenge.

In der dritten Phase, der log-linear-Phase (Exponentielle Phase) kommt es unter idealen Reaktionsbedingungen in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der PCR-Produkte. Die folgende, vierte Phase (Plateauphase) ist zum einen durch einen Verbrauch der

Reaktionskomponenten, zum anderen durch ein nicht mehr weiter für die Auswertung verwertbares Fluoreszenzniveau gekennzeichnet. Die PCR endet in dieser Phase (Holzapfel und Wickert 2007; Wong und Medrano 2005) .



**Abbildung 3** Beispiel eines Amplifikationsdiagramms

### 2.2.6.5 Primerauswahl

Für die erfolgreiche Durchführung einer aussagekräftigen rtPCR sind die genspezifischen Primer von entscheidender Bedeutung. Die Primer sollten sich bei der rtPCR sequenzspezifisch an die Matritze anlagern. Um bei einer sehr hohen Ausgangskonzentration zu vermeiden, dass sich Primer-Dimere bilden oder Primer an nicht komplementäre Sequenzen binden, ist entsprechend den Empfehlungen des Herstellers folgendes zu beachten:

- 1.) Beim Design der Primer sollte bedacht werden, dass die ideale Amplikongröße unter 150bp liegt.
- 2.) Die Primerlänge sollte 15-30 Nukleotide betragen, idealerweise liegt der Guanin-Cytosin-Gehalt bei 40-60%.
- 3.) Die Bildung von Primer-Dimeren kann durch Vermeidung komplementärer Sequenzen zwischen s- und as-Primern erreicht werden.

## Material & Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden Primer der Firma IBA verwendet. Die Primer wurden mithilfe des *primer3 on-line primer design* Programms entworfen. Zur Darstellung von zu vermeidenden Sekundärstrukturen der PCR-Produkte wurde das *Mfold Web-Server* Programm eingesetzt.

Gen	Sequenz (s)	Sequenz (as)	AT (°C)	MT (°C)
PDEF	5'-GTA AGG AGA GCT CCG-3'	5'-TTG AGG AAC TGC CAC AGG TG-3'	55	92
TIMP-3	5'-GGG GAA GAA GCT GCT AAA G-3'	5'-GTC GGT CCA GAG ACA CTC GT -3'	57	77
ARP	5'-CGA CCT GGA AGT CCA ACT AC-3'	5'-ATC TGC TGC ATC TGC TTG-3'	60	77
TMPRSS2- ERG	5'-CAG GAG GCG GAG GCG GA-3'	5'-CCG TAG GCA CAC TCA AAC AAC GA-3'	60	83
IGF-I	5'-TGG ATG CTG TTC AGT TCG TG-3'	5'-AGG GGT GCG CAA TAC ATC T-3'	60	83
DD3	5'-GGT GGG AAG GAC CTG ATG ATA C-3'	5'-GGG CGA GGC TCA TCG AT-3'	60	86
IGF-II	5'-CGT TGA GGA GTG CTG TTT CC-3'	5'-GGA CTG CTT CCA GGT GTC AT-3'	61	84
PSA	5'-TGA ACC AGA GGA GTT CTT GAC-3'	5'-CCC CAG AAT CAC CCG AGC AG-3'	61	87
IGF-IR	5'-CCG AAG GTC TGT GAG GAA GA-3'	5'-AAT GGC GGA TCT TCA CGT AG-3'	61	86
IGFBP-3	5'-GAA CTT CTC CTC CGA GTC CAA-3'	5'-GAG TTA CAC GAC TCA GGG TC-3'	61	83
PBGD	5'-CTT TCC AAG CGG ACG CAT GTC TGG T-3'	5'-TTG TCC CCT GTG GTG CAG ATA GCA A-3'	72	83

**Tabelle 9** Untersuchte Gene mit Sequenz, Annealing-Temperatur (AT) und Schmelztemperatur (MT)

### 2.2.6.6 Praktische Durchführung der rtPCR

Zur Verringerung des Verunreinigungsrisikos wird der Reaktionsansatz für die rtPCR in einem separaten Raum pipettiert, in dem keine Arbeiten mit PCR-Produkten oder DNA-Präparationen stattfinden. Alle Arbeiten werden mit Handschuhen durchgeführt.

Die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte und auf ein Verhältnis von  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  aliquotierte cDNA wird ebenso wie der Mastermix *Plus SYBR® Green I with fluorescin* und die genspezifischen sense- und antisense-Primer aufgetaut.

Pipettieren des Mastermixes und des Reaktionsansatzes:

Die Menge des Mastermixes ergibt sich aus der Anzahl der cDNA-Proben. Hinzu kommt die Mastermixkontrolle (hiermit sollen eventuelle Verunreinigungen des Mastermixes ausgeschlossen werden) sowie ein Überschuss von 1-2 Ansätzen. Bei fünf cDNA-Proben wird der unten stehende Ansatz siebenfach angesetzt. Vor dem Pipettieren sollten alle Reagenzien für kurze Zeit gevortext werden. Der Mastermix setzt sich für einen Ansatz wie folgt zusammen:

<b>Einfachansatz</b>	<b>siebenfacher Ansatz (5 cDNA-Proben, 1 Negativkontrolle, 1 Überschuss)</b>
10 $\mu\text{l}$ iQ TM SYBR® - Supermix	70 $\mu\text{l}$ iQ TM SYBR® - Supermix
0,2 $\mu\text{l}$ sense-Primer	1,4 $\mu\text{l}$ sense-Primer
0,2 $\mu\text{l}$ antisense-Primer	1,4 $\mu\text{l}$ antisense-Primer
4,6 $\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser	32,2 $\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser

**Tabelle 10** Pipettierschema Mastermix

Es werden in jedes Tube 15 $\mu\text{l}$  des gevortexten Mastermixes gegeben. Hinzu kommen jeweils noch 5 $\mu\text{l}$  der zuvor ebenfalls gevortexten, aus  $100\text{ng}/\mu\text{l}$  verdünnten, cDNA. Der Mastermixkontrolle wird statt der cDNA 5 $\mu\text{l}$  des RNase-freien Wassers zugesetzt. Die „Tubestrips“ werden mit dem thermosensiblen *optical tape* der Firma BioRad versiegelt, in der Zentrifuge bei  $13000\text{U}/\text{min}$  für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend direkt im *iCycler* positioniert.

Programmierung des iCyclers:

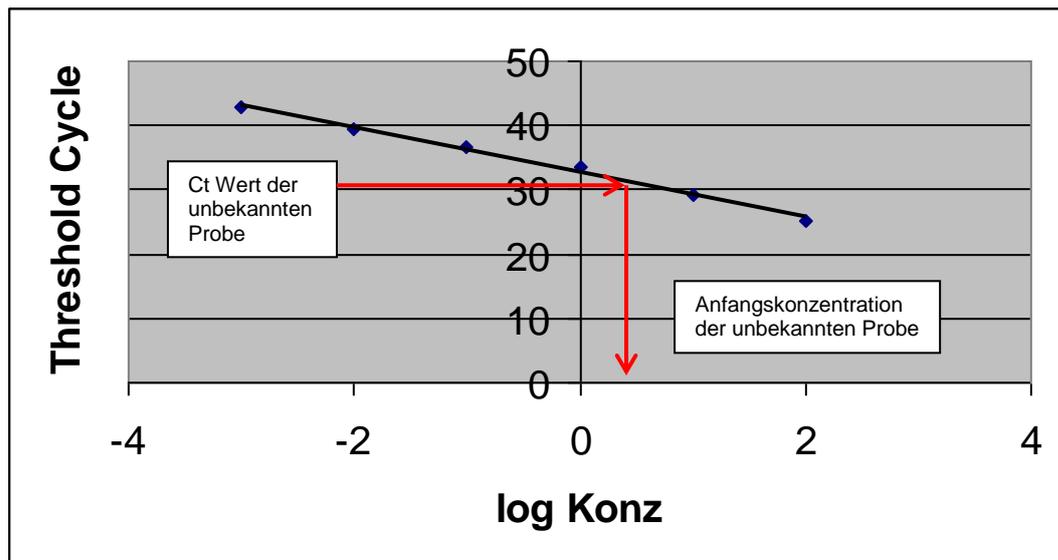
Zyklus	Wiederholungen	Temperatur	Funktion
1	1x	95°C für 10min	Aktivierung der Polymerase Initiale Denaturierung der DNA
2	Step1 60x	95°C für 30sek	Denaturierung
	Step2 60x	58°C-72°C für 1min	Annealing der Primer, Extension, Datenerfassung
3	81x	55°C – 95°C; Erhöhung um 0,5°C für 15sek je Wiederholung	Schmelzpunktanalyse
4	endlos	20°C	Haltetemperatur

**Tabelle 11** Programmierung des *iCyclers*

Die Annealing-Temperatur (AT) im zweiten Schritt des zweiten Zyklus variiert je nach Primer. Die für die jeweiligen Primer spezifischen Annealing-Temperaturen sind der Tabelle 9 zu entnehmen. Nach Beendigung der rtPCR kann der Reaktionsansatz für die Gelelektrophorese genutzt werden.

### 2.2.6.7 Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration

Für die genaue Berechnung der Nukleinsäurekonzentrationen der Versuchsproben ist zunächst die Erstellung einer Standardkurve erforderlich. Die Ct-Werte (siehe 2.2.6.4) von fünf Standardproben unterschiedlicher Konzentrationen und bekannter Fragmentkonzentration werden gegen den Logarithmus der Templatemenge aufgetragen und in einer Geraden zusammengefasst. Die Ct-Werte dieser Proben, sowie die entstandene Standardkurve, werden dann zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen der Proben mit unbekannter Templatemenge herangezogen (Heid et al. 1996; Wong und Medrano 2005). Der *Threshold Cycle* der Probe unbekannter Nukleinsäurekonzentration wird auf der Standardkurve aufgetragen, und mittels der Gleichung  $\text{Ct-Wert} / \text{Steigung}$  kann der Logarithmus der Amplifikate bestimmt werden. Mit der Formel  $10^{\log \text{Konz}}$  kann dann die Ausgangskonzentration der Probe errechnet werden.



**Abbildung 4** Quantifizierung einer unbekannt Probe anhand einer Eichgeraden. Die Eichgerade wurde anhand von Standardproben konstruiert.

### 2.2.6.8 Datenauswertung der rtPCR

Mittels der *iCycler iQ® real time detection software* der Firma Biorad wird die Datenanalyse durchgeführt. Die Konzentrationsberechnung der Nukleinsäurekonzentration sowie die Erstellung der Standardkurven erfolgt mit Microsoft® Excel. Die in Kapitel 3 gezeigten Graphen wurden ebenso wie die statistische Auswertung mit dem Programm GraphPad Prism® 4.0 gestaltet.

### 2.2.7 Gelelektrophorese

Zur Verifikation des Genproduktes einer rtPCR kann die Gelelektrophorese genutzt werden. Hierbei wird die Größe des Amplifikates durch Auftrennung im elektrischen Feld bestimmt. Für die Herstellung des 1,5%-Agarosegels werden 1,5g Agarose in 100ml TAE-Buffer durch Erhitzen in der Mikrowelle bis zum Siedepunkt aufgelöst und anschließend - nach einer Abkühlphase - blasenfrei in einen Gelschlitten mit Taschenkammern gefüllt. Nachdem das Gel ausgehärtet ist, werden die PCR-Proben nach Anleitung des Herstellers mit dem 6fach Loade-Puffer vermischt und ebenso wie die Leiter in je eine Tasche des Gels gefüllt. Bei 100 Volt läuft das Gel etwa 80 Minuten. Zur anschließenden Beurteilung wird das Gel für eine vorgegebene Zeit in Ethidiumbromid-Lösung getaucht und anschließend mithilfe der Geldokumentationsanlage E.A.S.Y RH-3 abfotografiert. Anhand der Banden der Leiter kann die Größe des PCR-Produktes abgelesen und mit der zu erwartenden Produktgröße verglichen werden. Sollten ungewünschte und unspezifische Genprodukte entstanden sein, sind diese ebenfalls als Bande bei der entsprechenden Probe zu sehen. Sie entsprechen

nicht der Größe des gewünschten Genproduktes und sind häufig durch eine unscharfe Begrenzung der Bande gekennzeichnet. Mit dieser Methode kann eine Aussage über die Menge des entstandenen Amplifikates, jedoch nicht über die Expressionsstärke des untersuchten Gens getroffen werden.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die im folgenden Kapitel dargestellten Daten resultieren aus einer Vielzahl von Experimenten und Dreifachbestimmungen. Mit dem Analyseprogramm GraphPad Prism® Version 4.0 erfolgte die statistische Auswertung und die graphische Darstellung. Es wurde der ungepaarte t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95% angewandt. Somit ergibt sich eine statistische Signifikanz bei  $p < 0,05$ . Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Daten im Balkendiagramm als Mittelwerte mit einer Standardabweichung gezeigt.

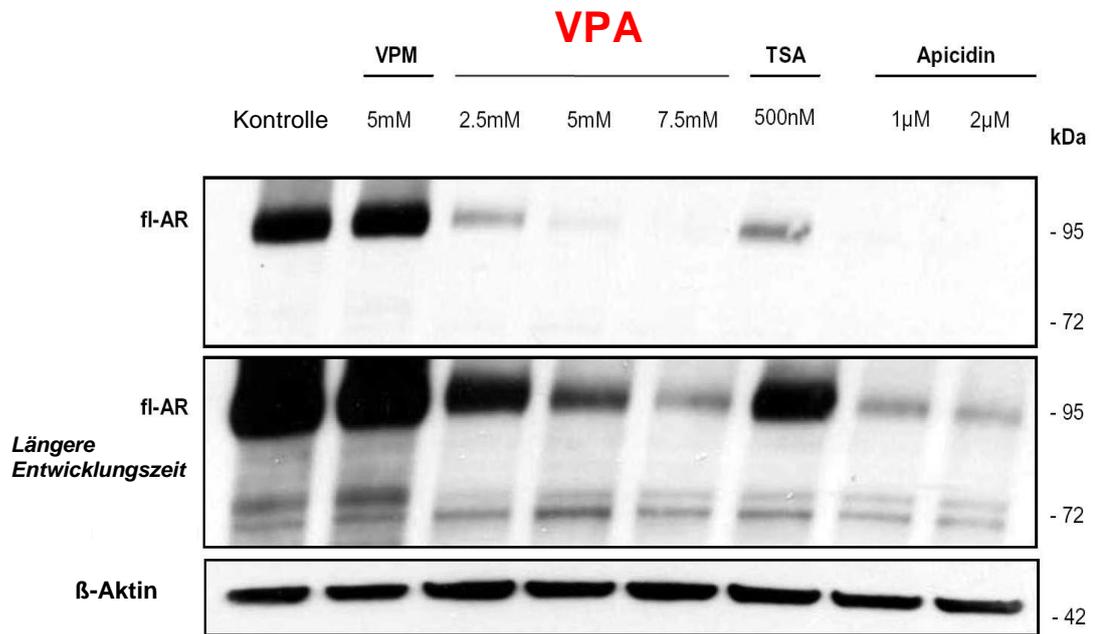
### 3 Ergebnisse

Die VCaP-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit - sowohl nach 24 stündiger Vorstimulation mit  $10^{-8}$  molarer Konzentration von DHT, als auch in unbehandeltem Zustand (EtOH-Kontrolle) - für 24 Stunden mit VPA in 5 millimolarer Konzentration behandelt. Mit der Vorstimulation durch DHT sollten die Hormonverhältnisse beim erkrankten Mann simuliert werden, bei dem es in aller Regel zu einer ständigen Stimulation der Prostatakarzinomzellen durch Androgene kommt. Die Zellen wurden anschließend gemäß der Methoden des vorangegangenen Kapitels behandelt. Die Ergebnisse der Experimente werden im Folgenden gezeigt.

#### 3.1 Veränderungen der Genexpression nach Stimulation mit DHT und VPA

##### 3.1.1 Androgenrezeptor

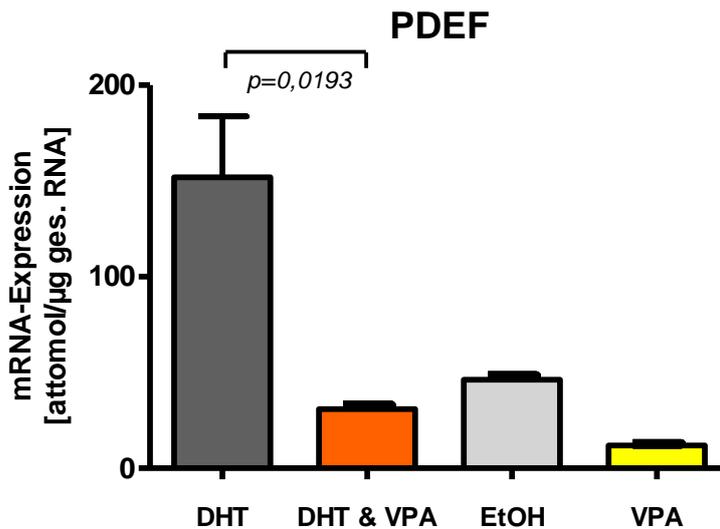
Zur Untersuchung des Einflusses von VPA auf die Expression des ARs bei der VCaP wurde zunächst die rtPCR eingesetzt, die keine signifikanten Ergebnisse über die Wirkung auf mRNA-Ebene erbrachte (Daten nicht gezeigt). Der Sachverhalt konnte dennoch auf Proteinebene von der Arbeitsgruppe um V. Venkataramani, auf Grundlage des Western Blots, geklärt werden. Zudem wurde in diesem Blot auch die Hyperacetylierung des Histon H4 untersucht. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt und sind in Abbildung 5 und Abbildung 20 dargestellt. Die an derselben Zelllinie durchgeführten Experimente zeigen, dass die Abnahme des ARs auf Proteinebene mit steigender VPA-Konzentration korreliert. Als Kontrolle wurde Valpromide (VPM) mitgeführt, bei dem im Vergleich zum VPA lediglich die Carboxylgruppe durch ein Amid ersetzt ist und dadurch die HDAC-inhibitorische Wirkung nicht existiert. Die Abbildung zeigt, dass unter VPM, im Gegensatz zu VPA, ein ähnlich zur Kontrolle ausgeprägtes AR-Niveau existiert. Zudem wurden die Zellen mit weiteren experimentellen HDAC-Inhibitoren (Trichostatin A (TSA) und Apicidin) stimuliert. Nach der Stimulation mit TSA zeigte sich eine leicht herabgesetzte Expression des AR im Vergleich zur Kontrolle. Die Stimulation der Zellen mit Apicidin führte zu einer stark verringerten Expression des ARs, vergleichbar mit dem Effekt von VPA in 5 - 7,5mM Konzentration. Als Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin eingesetzt.



**Abbildung 5** Expression des ARs bei der VCaP im Western Blot, nach Behandlung mit VPM, VPA, Trichostatin A und Apicidin

### 3.1.2 PDEF

Die in der folgenden Abbildung dargestellten Ergebnisse der rtPCR zeigen die veränderten Genexpressionen von PDEF bei den untersuchten Zellen der VCaP-Zelllinie. Zunächst kam es unter Vorstimulation mit DHT zu einer deutlichen Hochregulation der PDEF-Expression im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle. Eine anschließende Behandlung mit VPA resultierte in einer signifikant verminderten PDEF-Genexpression der VCaP-Zellen. Eine Herunterregulation unter VPA-Einfluss fand sich ebenfalls bei den nicht vorstimulierten Zellen.



**Abbildung 6** Veränderungen der PDEF-Genexpression mit und ohne Einfluss von DHT und VPA

### 3.1.3 PSA-Expression

In der rtPCR zeigte sich zunächst eine sehr geringe PSA-Expression der Kontrollzellen (EtOH). Eine Stimulation der Zellen mit DHT resultierte in einer deutlichen Expressionssteigerung von PSA. Eine anschließende Behandlung dieser Zellen mit VPA führte dagegen zu einer signifikanten ( $p=0,0117$ ) Herunterregulation der PSA mRNA-Expression. Dieser Effekt von VPA zeigte sich ebenfalls bei der nicht vorstimulierten Zelle, im Vergleich zur EtOH-Kontrolle, jedoch auf einem deutlich niedrigerem Expressionsniveau (siehe Abbildung 7).

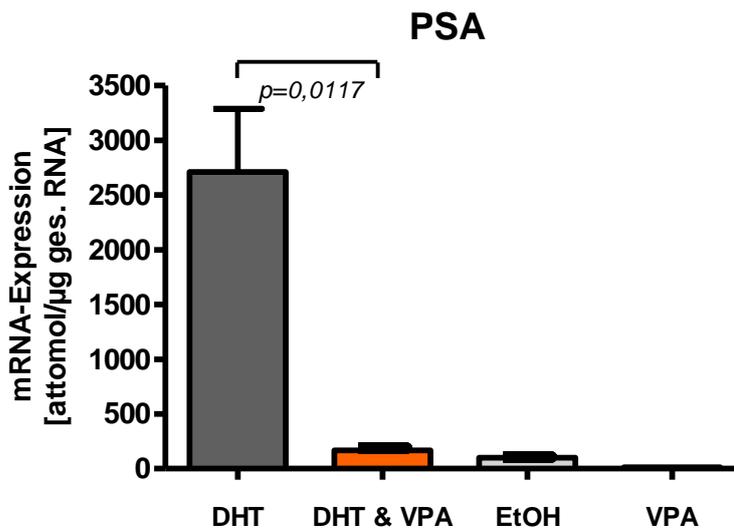
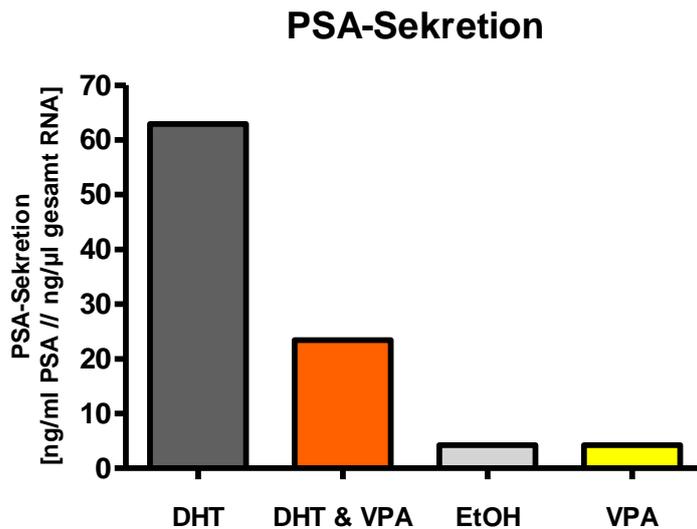


Abbildung 7 mRNA-Expression von PSA unter Einfluss von DHT und VPA

### 3.1.4 PSA-Sekretion

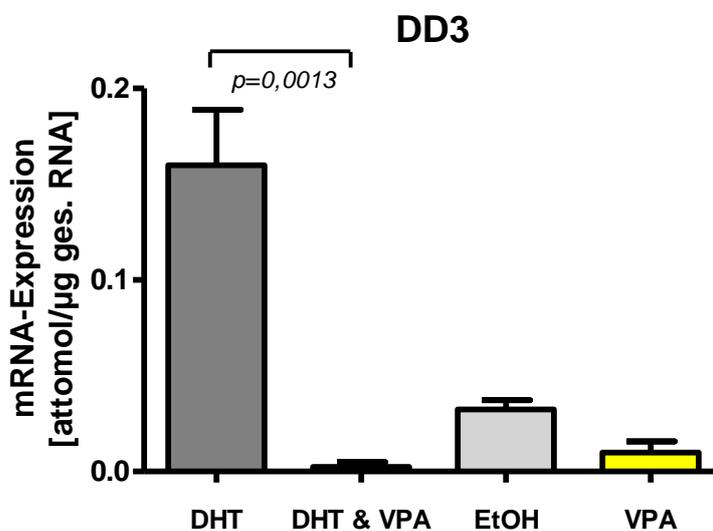
Die aus den Zellüberständen bestimmten PSA-Konzentrationen wurden mit den unterschiedlichen Zellzahlen der jeweiligen Ansätze ins Verhältnis gesetzt (siehe 2.2.5). Es zeigte sich eine starke PSA-Sekretion unter Einfluss von DHT, die unter anschließender VPA-Behandlung signifikant zurückging. Bei den nicht mittels DHT vorstimulierten Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied nach VPA-Behandlung. Abbildung 8 zeigt dieses Ergebnis.



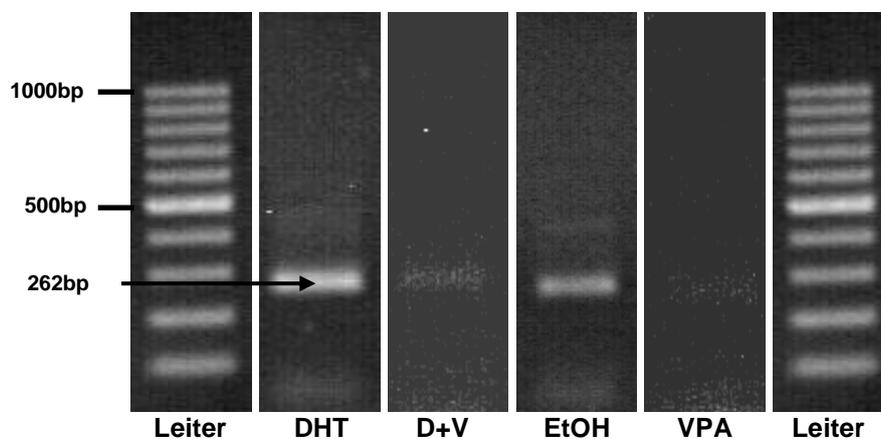
**Abbildung 8** PSA-Sekretion unter Einfluss von DHT und VPA

### 3.1.5 DD3 (PCA3)

In der rtPCR fand sich eine deutliche Expression von DD3 nach Vorstimulation der VCaP-Zellen mit DHT. Bei den nicht vorstimulierten Zellen wurde DD3 ebenfalls exprimiert, jedoch in einer deutlich geringeren Konzentration. Die Behandlung der VCaP-Zellen mit VPA führte zu einer kaum mehr messbaren Expression der DD3-mRNA. Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass VPA die DD3-Expression nahezu vollständig unterdrückt. Zur Untermauerung dieser Vermutung wurden die Produkte der rtPCR mit der Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Abbildung 10 zeigt, dass die PCR-Produkte der mit VPA behandelten Zellen nur andeutungsweise eine Bande bei der dem PCR-Produkt entsprechenden Größe von 262 bp aufweisen.



**Abbildung 9** Ergebnisse der rtPCR der VCaP nach DHT- und VPA-Behandlung



**Abbildung 10** Agarose-Gelelektrophorese der rtPCR-Produkte für DD3 (Ausschnitt aus Abbildung 22, siehe Bilderanhang)

### 3.1.6 TMPRSS2-ERG

In der rtPCR zeigte sich zunächst eine Hochregulation der TMPRSS2-ERG-Genfusion unter der Vorstimulation mit DHT im Verhältnis zur EtOH-Kontrolle. Wurden diese Zellen zusätzlich mit VPA behandelt, fand sich eine signifikant reduzierte Expression der TMPRSS2-ERG-Genfusion in der rtPCR, die der graphischen Darstellung in Abbildung 11 zu entnehmen ist. Ein ähnlicher Effekt von VPA zeigte sich auch bei den nicht mit DHT vorstimulierten Zellen, jedoch von einem geringeren Expressionsniveau ausgehend. Nach der Behandlung mit VPA zeigte sich die TMPRSS2-ERG-Fusion bei beiden Zellen etwa gleich stark exprimiert. Zum Nachweis des den Primern entsprechenden PCR-Produktes wurde ergänzend eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. In allen Proben zeigt sich, wie in Abbildung 12 dargestellt, die erwartete Produktgröße von 119 kb.

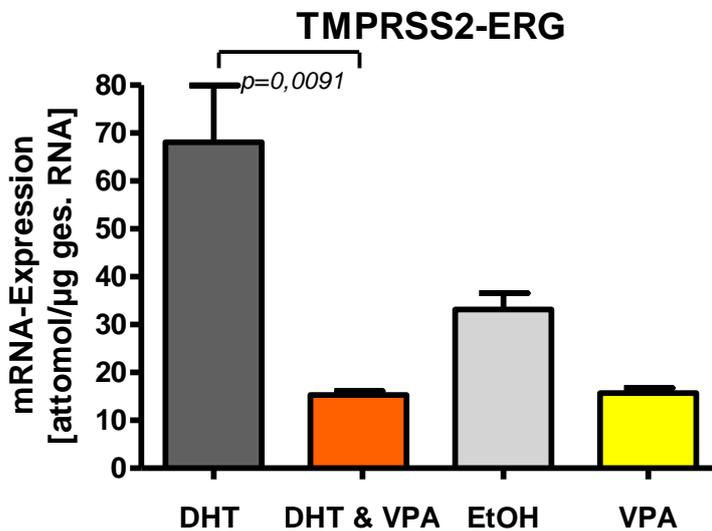


Abbildung 11 Expression der TMPRSS2-ERG-Genfusion unter DHT- und VPA-Stimulation in der rtPCR

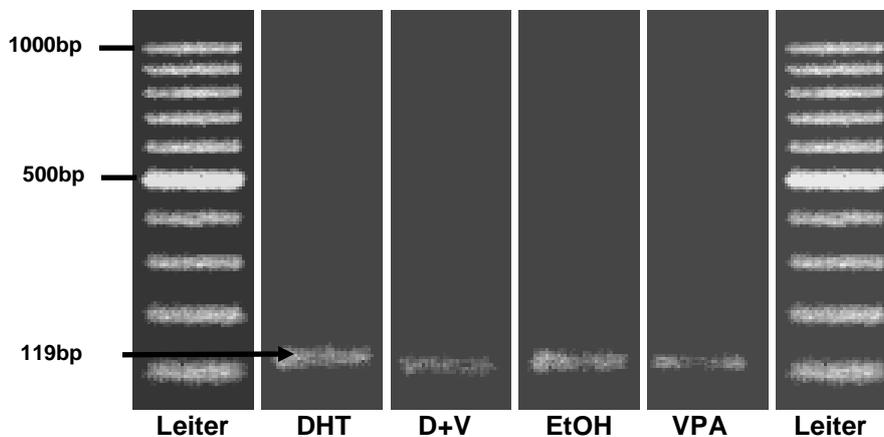
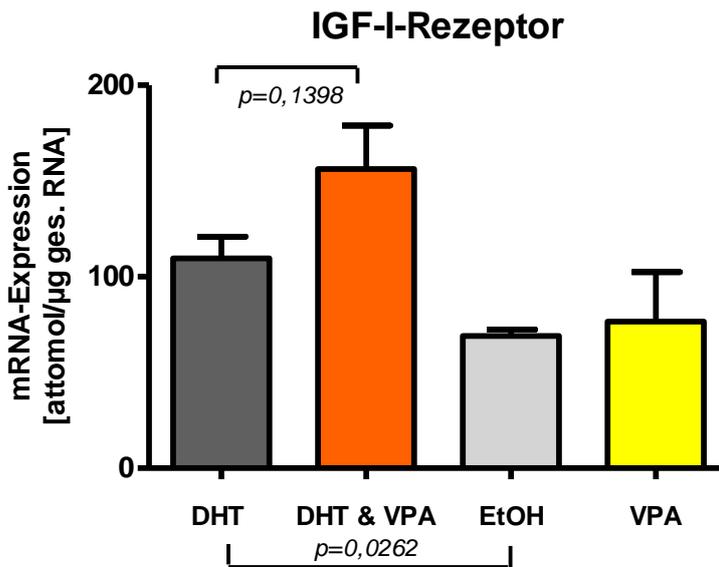


Abbildung 12 Gelelektrophorese der TMPRSS2-ERG PCR-Produkte

### 3.1.7 IGF-I-Rezeptor

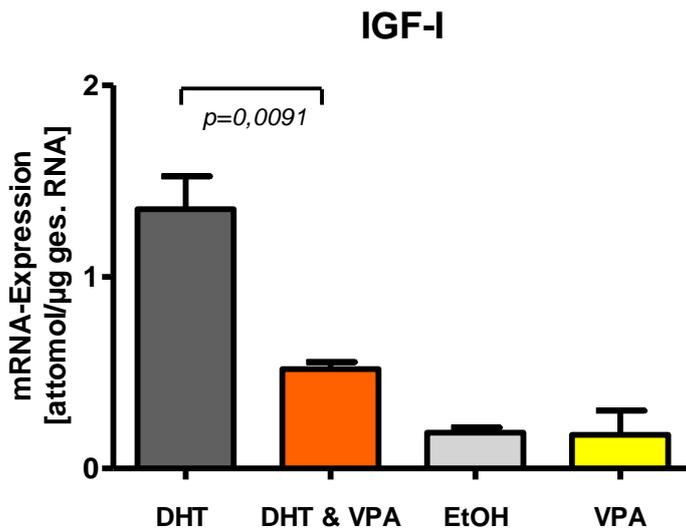
Die Genexpression des IGF-I-Rezeptors, der ebenfalls eine wichtige Komponente des IGF-Systems ist, zeigte zunächst eine unter DHT signifikant gesteigerte Expression des IGF-I-Rezeptors im Vergleich zur EtOH-Kontrolle. Des Weiteren fand sich eine Hochregulation unter VPA-Behandlung bei der zuvor mit DHT stimulierten Zelle, die jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus blieb. Dieser Effekt ist auch bei der nicht vorstimulierten Zelle angedeutet, jedoch auf einem niedrigeren Niveau. In Abbildung 13 ist der beschriebene Effekt dargestellt.



**Abbildung 13** mRNA-Expression des IGF-I-Rezeptors bei der VCaP vor und nach Stimulation mit DHT und VPA

### 3.1.8 IGF-I

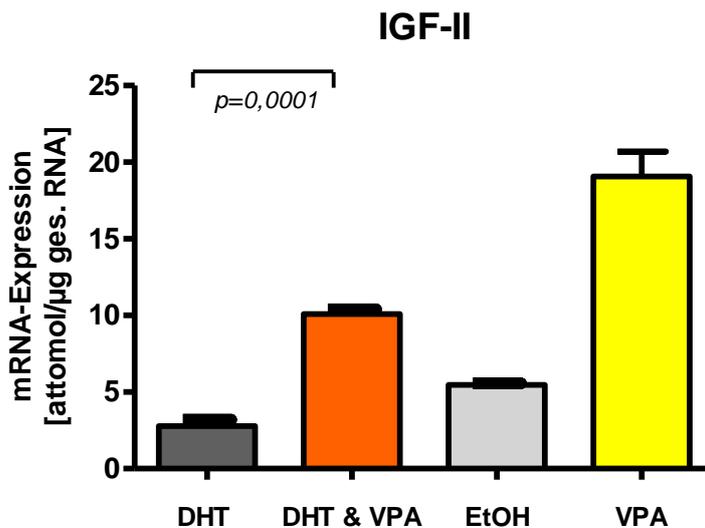
Als eine wichtige Komponente der IGF-Achse wurde die Wirkung von DHT und VPA auf IGF-I in der VCaP-Zelle untersucht. Eine Vorstimulation der VCaP-Zellen mit DHT führte zunächst zu einer Hochregulation des IGF-I. Die Wirkung von VPA auf diese Zellen zeigte sich in einer signifikant reduzierten mRNA-Expression von IGF-I. Eine Behandlung der EtOH-Kontrollzellen mit VPA zeigte keine Veränderungen der mRNA-Expression, sie blieb nahezu gleich. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 gezeigt.



**Abbildung 14** Einfluss von DHT und VPA auf die IGF-I-Expression bei der VCaP

### 3.1.9 IGF-II

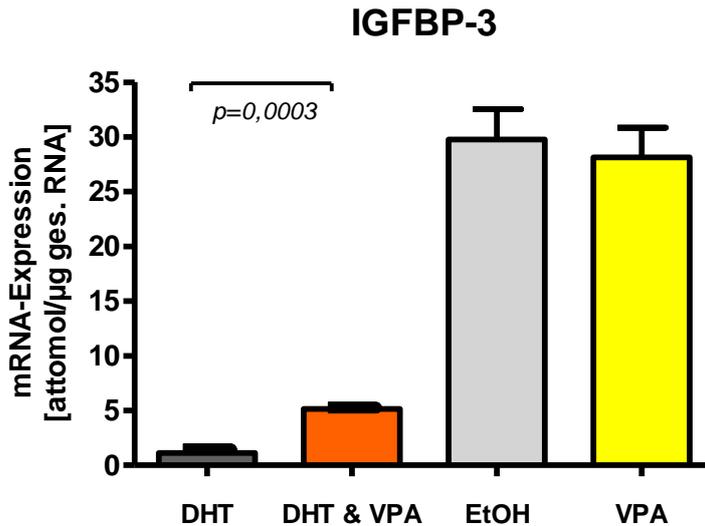
Die Experimente zur Wirkung von DHT und VPA auf die Genexpression von IGF-II zeigten, dass unter Einfluss von DHT IGF-II im Verhältnis zur EtOH-Kontrolle reduziert exprimiert wurde. Die Behandlung mit VPA führte dann zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression. Diese Expressionszunahme unter VPA zeigte sich in noch stärkerem Ausmaß bei den nicht mit DHT vorstimulierten Zellen. Zusammenfassend fand sich eine Hochregulation der IGF-II-Expression unter VPA und eine reduzierte Expression unter DHT Einfluss, die der Abbildung 15 zu entnehmen ist.



**Abbildung 15** IGF-II mRNA-Expression der VCaP nach DHT- und VPA-Stimulation

### 3.1.10 IGFBP-3

Beim IGFBP-3 zeigte sich eine deutlich reduzierte Genexpression der mit DHT vorstimulierten VCaP-Zellen im Vergleich zur EtOH-Kontrolle. In Abbildung 16 ist zu sehen, dass die anschließende Behandlung mit VPA zu einer leicht erhöhten Expression führte, die jedoch weitaus geringer war als die der Zellen ohne vorherigen DHT-Einfluss. Eine Behandlung der EtOH-Kontrolle mit VPA resultierte nicht in einer gesteigerten mRNA-Expression, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression.



**Abbildung 16** IGFBP-3-Expression in VCaP-Zellen mit und ohne Einfluss von DHT und VPA

### 3.1.11 TIMP-3

In der rtPCR zeigte sich, dass der spezifische Inhibitor der Matrix-Metalloproteasen (TIMP-3) unter Behandlung mit VPA exprimiert wird. In den unbehandelten und den mit DHT vorstimulierten VCaP-Zellen war die Expression auf ein Minimum supprimiert. Die Wirkung der Behandlung mit VPA liegt somit in der Hochregulation dieses sowohl MMP-inhibitorischen als auch proapoptotisch wirkenden Faktors. Abbildung 17 zeigt dieses Ergebnis in graphischer Darstellung. Die Agarose-Gelelektrophorese der Produkte der rtPCR bestätigt die nur unter VPA gegebene Genexpression. Wie Abbildung 18 zu entnehmen, liegt die Größe der PCR-Produkte bei 300bp und zeigte sich nur nach Behandlung der Zellen mit VPA.

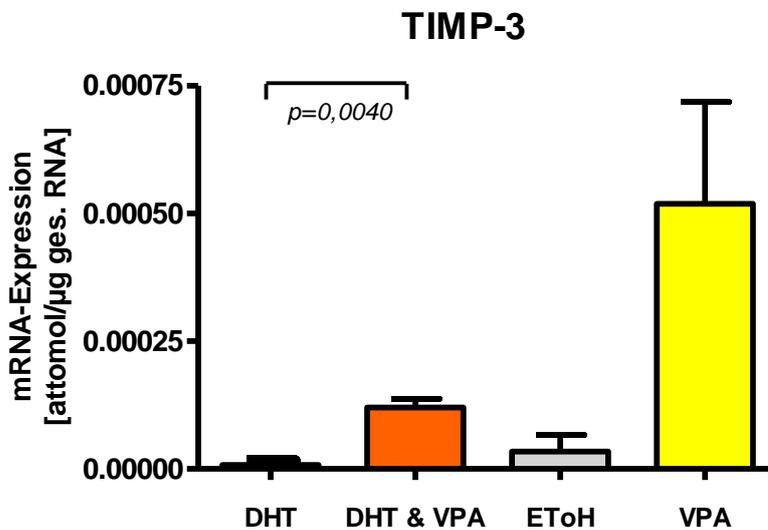


Abbildung 17 Wirkung von VPA auf die VCaP vor und nach Vorstimulation mit DHT

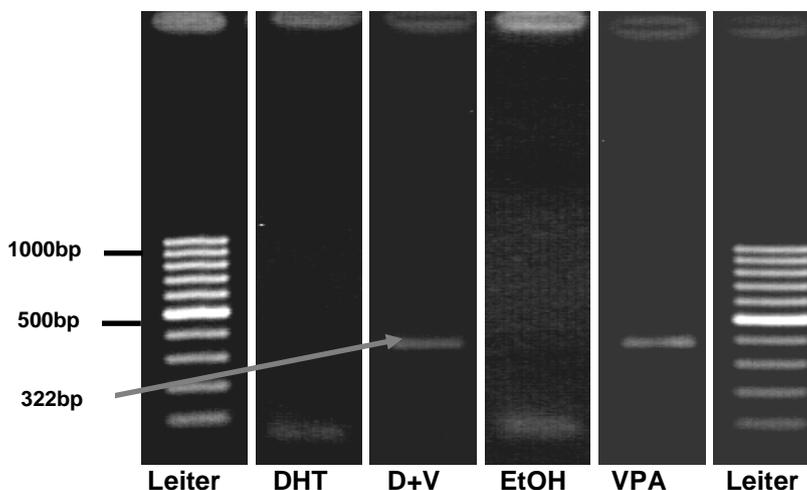


Abbildung 18 Gelelektrophorese der rtPCR-Produkte von TIMP-3

### 3.1.12 Östrogenrezeptor

Die cDNA der mit DHT stimulierten Zellen wurde mittels rtPCR bezüglich des Einflusses von VPA auf den ER $\beta$  untersucht. Die in Abbildung 19 dargestellten Ergebnisse deuten auf eine Expression des ER $\beta$  auf Genebene nur nach VPA-Behandlung hin. Die mit DHT vorstimulierten Zellen zeigen nach Behandlung mit VPA eine weniger stark ausgeprägte ER $\beta$ -mRNA-Expression als die EtOH-Kontrolle nach VPA-Behandlung. In der EtOH-Kontrolle und unter DHT scheint der ER $\beta$  nicht oder nur minimal exprimiert. VPA würde demnach zu einer Hochregulation des ER $\beta$  führen. Das Ergebnis ist in folgender Abbildung gezeigt. An einem eindeutigen, signifikanten Nachweis dieses Zusammenhangs bei der VCaP-Zelle wird weiterhin gearbeitet.

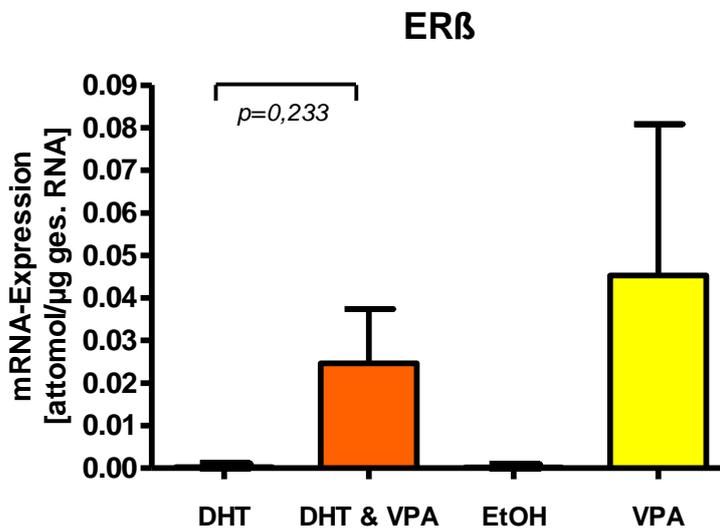
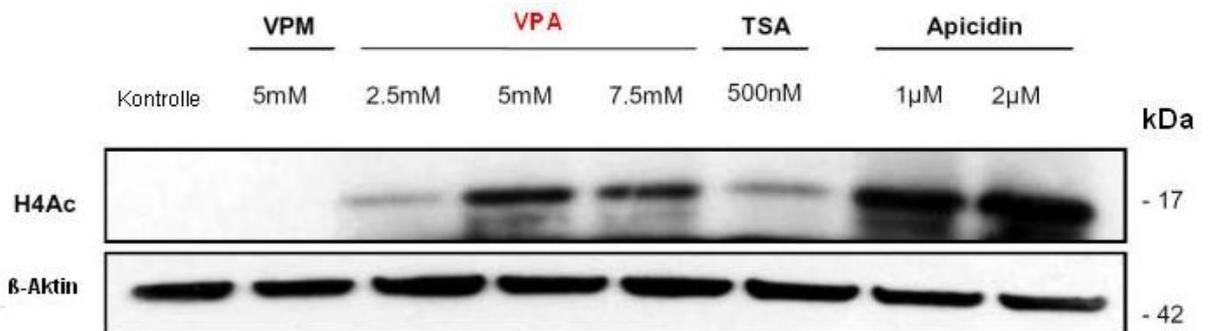


Abbildung 19 ER $\beta$ -mRNA-Expression nach Behandlung mit VPA

### 3.1.13 Acetylierung

Die Effekte von VPA basieren wahrscheinlich auf einer Hyperacetylierung von Histonen (siehe 1.4). Zum Nachweis der Hyperacetylierung wurde ein Western Blot durchgeführt, der eine deutliche Zunahme der Acetylierung des Histons H4 unter steigenden VPA Konzentrationen bei der VCaP zeigte (Abbildung 20). Nach Behandlung der Zellen mit VPM fand sich keine Hyperacetylierung. Die Abbildung zeigt weiterhin eine Hyperacetylierung des Histons H4 nach Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren TSA und Apicidin. Als Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt.



**Abbildung 20** Acetylierung des Histon H4 (Western Blot)

### 3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammenfassend dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die untersuchten Gene nach ihrer Eigenschaft im Bezug auf Apoptose und Proliferation unterschieden. Es wird deutlich, dass die Stimulation mit DHT zu einer Hochregulation vor allem der mit Proliferation und Antiapoptose assoziierten Gene führte. Gene, die Apoptose induzieren und unkontrollierte Proliferation hemmen, waren unter Einfluss von DHT herunterreguliert. VPA führte zu einem gegenteiligen Effekt. Jene Gene, die unter DHT weniger stark exprimiert waren, wurden nach Stimulation mit VPA verstärkt exprimiert. Antiapoptotisch wirkende Gene wurden hingegen herunterreguliert.

Proliferation / Antiapoptose	Einfluss von DHT auf die Genexpression	Assoziiert mit Proliferation Antiapoptose	Assoziiert mit Apoptose	Einfluss von VPA auf die Genexpression	APOPTOSE / Antiproliferation
	↑	AR		↓	
	↑	PDEF		↓	
	↑	PSA		↓	
	↑	DD3 (PC3)		↓	
	↑	TMPRSS2-ERG		↓	
	↑	IGF-I-R		↓	
	↑	IGF-I		↓	
	↑	IGF-II		↓	
	↓		IGFBP-3	↑	
	↓		TIMP-3	↑	
	↓		ERβ	↑	

**Tabelle 12** Tabellarisch zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse

Die Pfeile in der Tabelle stellen den Einfluss der jeweiligen Stimulanz auf die mRNA-Expression der einzelnen Gene dar.

↑ Hochregulation unter DHT; ↓ Herunterregulation unter DHT

↑ Hochregulation unter VPA; ↓ Herunterregulation unter VPA

### 4 Diskussion

Die Zielsetzung dieser Arbeit lag in der Untersuchung von HDAC-Inhibitoren als Therapieoption beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom. In der vorliegenden Arbeit wurde der seit vielen Jahren im klinischen Alltag als Antikonvulsivum genutzte HDAC-Inhibitor Valproat verwendet und zur Behandlung der noch wenig untersuchten VCaP-Zelllinie eingesetzt, die als Derivat einer Knochenmetastase das derzeit repräsentativste Modell für das kastrationsresistente Prostatakarzinom darstellt. Besonderes Interesse galt der Analyse von Veränderungen der mRNA-Expression bei Genen, die Einfluss auf Proliferation, Invasion und Apoptose von Karzinomzellen nehmen.

#### 4.1 VPA und Karzinogenese

Maligne Erkrankungen werden häufig über den Mechanismus der aberranten Regulation der Transkription erklärt, die möglicherweise durch eine Änderung der Rekrutierung von HDACs hervorgerufen wird (Grignani et al. 1998). Der Einsatz des HDAC-Inhibitors VPA in der Behandlung von Karzinomen ist gegenwärtig von großem Interesse. Bei verschiedenen Prostatakarzinom-Zelllinien (z. B. PC3 und LNCaP) wurde ein pro-apoptotischer Effekt von VPA gezeigt, der aus einer Bcl-2-Heruntermodulation, sowie Fas- und Fas-Ligand-Überexpression resultiert (Angelucci et al. 2006). Bei der VCaP konnten Björkman et al. bereits eine hohe Sensitivität der Zelle gegenüber HDAC-Inhibitoren wie beispielsweise TSA zeigen, die unter anderem in einer Herunterregulation der TMPRSS2-ERG-Fusion resultierten (Björkman et al. 2008). Die im Folgenden ausführlich erörterten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei der VCaP-Zelllinie eine Sensibilität für das in der Klinik seit langem etablierte Antikonvulsivum Valproat vorliegt, welches wegen seiner guten Verträglichkeit und der langjährigen Erfahrung bei der Anwendung von besonders großem Interesse ist. Die VCaP-Zelle ist *in vivo* und *in vitro* durch Androgen-Sensibilität gekennzeichnet (Korenchuk et al. 2001). Diese Situation wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Vorstimulation der Zellen mit DHT simuliert.

##### 4.1.1 Hyperacetylierung durch VPA

Die Hyperacetylierung von Histonen durch HDAC-Inhibitoren scheint einer der initialen Mechanismen der Antitumor-Wirkungen von VPA zu sein. VPA führt *in vitro* und *in vivo* zur Hyperacetylierung des N-terminalen Endes der Histone H3 und H4 (Göttlicher et al. 2001), die DNA liegt weniger stark komprimiert vor, Transkription wird ermöglicht. Die Hyperacetylierung des Histon H4 nach Behandlung mit VPA konnte bereits für verschiedene Zelllinien gezeigt werden (Venkataramani et al. 2010). In vorliegender Arbeit gelang es, diese auch bei der VCaP-Zelllinie nachzuweisen (Abbildung 20). Die Tatsache, dass VPM (dem die funktionelle Carboxylgruppe für die HDAC-Inhibition fehlt) im Gegensatz zu den

verschiedenen HDAC-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Expression von Proteinen zeigte, verstärkt die Vermutung, dass die Wirkung von VPA tatsächlich auf die Hyperacetylierung der Histone zurückzuführen ist (siehe Abbildung 5).

Obwohl davon ausgegangen wird, dass die Acetylierung von Histonen für die Genexpression erforderlich ist, resultiert eine Hemmung der HDACs nicht in einer generell gesteigerten Genexpression. Vielmehr findet sich bei der Hälfte der Gene die eine veränderte Expression unter VPA zeigen eine Herunterregulation (Kortenhorst et al. 2008). Dieses Phänomen zeigt sich auch in dieser Arbeit. Von den insgesamt 11 untersuchten Genen kommt es bei nur etwa einem Viertel zur Hochregulation der mRNA-Expression. Bei der Mehrzahl der Gene resultiert die VPA-Behandlung in einer Herunterregulation der mRNA-Expression (siehe Tabelle 12). Die Hochregulation der Genexpression kann über die - nach Hemmung der HDACs - in stärker acetyliertem Zustand vorliegende DNA erklärt werden. Einige Gene verfügen vermutlich zusätzlich über Bindungsdomänen in ihrer Promotorregion, an die HDAC-rekrutierte Transkriptionskomplexe binden und so transkriptionelle Aktivität unterdrücken. Die HDAC-Inhibition könnte zur Aufhebung dieses „*gene silencing*“ beitragen (Marks et al. 2001). Über diese Mechanismen kann die Hochregulation der Gene erklärt werden, von der vor allem Gene mit Tumorsuppressor-Eigenschaften wie ER $\beta$ , TIMP-3 und IGFBP-3 betroffen sind.

Die in dieser Arbeit doch weitaus häufigere Herunterregulation von Genen könnte in folgendem Mechanismus begründet sein: HDAC-Inhibitoren induzieren die Expression von Genen, die für einen Cyclin abhängigen Kinaseinhibitor (p21) kodieren. Der Kinaseinhibitor p21 wiederum hemmt die Zellzyklusprogression und führt letztlich zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Marks et al. 2001).

Zusätzlich können Transkriptionsfaktoren, die durch die Rekrutierung von HDACs gehemmt sind, mittels VPA reaktiviert werden (Göttlicher et al. 2001). Bei der VCaP fand sich in dieser Arbeit ein deutlicher Einfluss von VPA auf den Transkriptionsfaktor ER $\beta$ , der nach VPA-Behandlung wieder verstärkt exprimiert wurde und in der Folge anti-Androgene Effekte mit sich brachte. Der ER $\beta$  führt über eine Herunterregulation des ARs auch zur reduzierten Expression weiterer Gene, insbesondere auch der Markergene PDEF, PSA, DD3 und TMPRSS2-ERG (Setlur et al. 2008; Stettner et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass der ER $\beta$  in der VCaP natürlicherweise nur minimal bzw. gar nicht exprimiert zu sein scheint. Eine Behandlung der Zellen mit VPA induziert möglicherweise die Expression des ER $\beta$ . Dies steht im Einklang mit Untersuchungen an der LNCaP, bei der eine VPA-Behandlung zu einer deutlichen Hochregulation des ER $\beta$  führte (Stettner et al. 2007). Es ist bekannt, dass der Promotor des ER $\beta$  im Karzinom häufig in methylierter Form vorliegt und darüber zu einem Expressionsverlust des ER $\beta$  führt (Suzuki et al. 2008). Beim Prostatakarzinom zeigte sich, dass die meisten Karzinome mit einem Gleason-Score größer

drei keinen ER $\beta$  exprimieren. Patienten mit einem Gleason-Score unter drei, die sich einer *watchful waiting* Therapie unterziehen, können möglicherweise bei ER $\beta$ -positivem Prostatakarzinom von einer Behandlung mit ER $\beta$ -Agonisten profitieren (Warner und Gustafsson 2010). Die Hochregulation des ER $\beta$  beim Prostatakarzinom führt zu einem Übergang der Zellen in einen weniger malignen Phänotyp (Stettner et al. 2007). VPA zeigt in dieser Arbeit das Potenzial, positiven Einfluss auf die Expression des ER $\beta$  in der VCaP nehmen zu können. Der Einsatz von VPA als ER $\beta$ -Agonist, der über die Herunterregulation des ARs Einfluss auf die TMPRSS2-ERG-Fusion nehmen kann, stellt eine vielversprechende Therapieoption dar. Vor allem der Eingriff in die Expression des ARs, der beim Prostatakarzinom eine entscheidende Rolle spielt und Fokus neuer Therapien darstellt, zeigt die Möglichkeiten von VPA.

Die transkriptionelle Aktivität des ARs ist gerade bei der Resistenzentwicklung gegenüber der Androgenablationstherapie und der antiandrogenen Therapie entscheidend für Wachstum und Überleben des Prostatakarzinoms (Welsbie et al. 2009). Es gibt Anzeichen dafür, dass das kastrationsresistente Prostatakarzinom abhängig von der Funktion des ARs ist und dass die Entwicklung vom kastrationssensiblen zum kastrationsresistenten Stadium auf der Reaktivierung des ARs in niedrigem Androgenmilieu beruht (Knudsen und Penning 2010).

Derzeit vorhandene AR-Target-Therapien, inklusive GnRH-Analoga und Antiandrogenen, vermögen nicht Signalwege über den AR gänzlich auszuschalten (Chen Y et al. 2008). Mehrere den AR betreffende Mechanismen, wie AR-Überexpression oder erhöhte intrakrine Synthese von Androgenen, fördern den AR-Signalweg. Diese Erkenntnisse gaben Anlass zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten, die den AR-Signalweg unterbrechen. Die Inhibition der HDACs, die für eine optimale AR vermittelte Transkription erforderlich sind, ist Bestandteil aktueller Untersuchungen (Chen Y et al. 2008).

In vorliegender Arbeit konnte eine Reduktion des AR-Proteinniveaus der VCaP nach Behandlung mit VPA nachgewiesen werden. Es zeigt sich dabei eine deutliche Korrelation zwischen steigender VPA-Konzentration und sinkender AR-Expression. Ähnliche Effekte konnten auch für die beiden HDAC-Inhibitoren TSA und Apicidin bei der VCaP gezeigt werden. Das dem VPA strukturell sehr ähnliche, aber ohne HDAC-inhibitorische Funktion ausgestattete VPM, verursachte keine Änderungen im Hinblick auf die Expression des ARs. Somit erfolgt die Wirkung von VPA tatsächlich über seine HDAC-inhibitorische Komponente und nicht etwa durch Anwesenheit einer verzweigten Fettsäure. Entscheidende Bedeutung ist vermutlich auch bei der VCaP-Zelle dem ER $\beta$  beizumessen, der ein wesentliches Regulativ der Androgenachse darstellt (Stettner et al. 2007) und in vorliegender Arbeit tendenziell hochreguliert werden konnte.

Ein weiterer möglicher Mechanismus der AR-Herunterregulation durch VPA könnte die durch HDAC-Inhibitoren (wie z. B. LAQ824) vermittelte Acetylierung des HSP90 sein, die bei der LNCaP vorliegt. Die Acetylierung führt zu einer Inhibition der HSP90-ATP-Bindungsstelle und resultiert in einer Dissoziation des HSP90-AR-Komplexes. Der AR wird über Proteasomen abgebaut (Chen L et al. 2005) und liegt folglich in reduzierter Konzentration vor. Zudem können HDAC-Inhibitoren die AR-Transkription direkt supprimieren (Marrocco et al. 2007; Rokhlin et al. 2006).

Der AR wiederum reguliert PSA, welches im klinischen Alltag als Verlaufsmarker dient und als Spiegel der AR-Aktivität gilt. Mit diesem Sachverhalt einhergehend resultierte die VPA-Behandlung der VCaP-Zellen in einer supprimierten PSA mRNA-Expression und -Sekretion (siehe Kapitel 3.1). Das ebenfalls unter Kontrolle des ARs stehende TMPRSS2, das mit ERG fusioniert vorliegt, wurde – genau wie PSA nach VPA-Einfluss – herunterreguliert (siehe auch Kapitel 4.1.2).

Das aus der VPA-Behandlung resultierende verminderte AR-Proteinniveau sowie die Herunterregulation der AR-abhängigen Gene PSA, PCA3 und TMPRSS2-ERG zeigen das vielversprechende Potenzial von VPA. Mit dem Eingriff in den AR-Signalweg agiert VPA bei diesem aktuellen Zellmodell für das kastrationsresistente Prostatakarzinom an einem für die Pathogenese des Prostatakarzinoms entscheidenden Punkt.

Die Induktion von Wachstumshemmung und Apoptose durch HDAC-Inhibitoren geht vermutlich nicht ausschließlich auf ihren Einfluss auf den Acetylierungsstatus der DNA zurück. Auch viele Nicht-Histon-Proteine, die Einfluss auf die Kontrolle von Apoptose nehmen, wie beispielsweise p53 und HSP90, interagieren mit HDACs. Das Vorliegen in einer acetylierten Form, nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren, führt zu einer Stabilisierung der Substrate (Lin et al. 2006).

HDAC-Inhibitoren führen sowohl in gesunden als auch in Tumorzellen zu einer Acetylierung der für die Nukleosombildung verantwortlichen Histone. Der wachstumshemmende und Apoptose-induzierende Einfluss scheint jedoch auf transformierte Zellen begrenzt zu sein (Marks et al. 2001; Pathil et al. 2006). Dies ist für den klinischen Einsatz von großer Relevanz, da gesunde Zellen von Apoptose verschont blieben.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich deutlich der proapoptotische Effekt durch VPA. Es liegt nach der Behandlung mit VPA eine Hochregulation der mit Apoptose assoziierten Gene sowie eine reduzierte mRNA-Expression der für Invasion und unkontrolliertes Wachstum stehenden Gene vor. Sowohl die etablierten als auch die potenziellen Markergene spiegeln dieses Ergebnis wider.

### 4.1.2 Einfluss von VPA auf für das Prostatakarzinom relevante Markergene

Interessanterweise zeigte sich in dieser Arbeit bei allen im Folgenden beschriebenen Markergenen ein deutlicher Zusammenhang der mRNA-Expressionsstärke der jeweiligen Gene mit der DHT-Vorstimulation. Die Expression der mRNA stieg nach der Stimulation mit DHT im Vergleich zur EtOH-Kontrolle deutlich an. Dies zeigt, wie wichtig die Androgen-Achse für den Fortbestand des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms ist. Eine völlige Blockade der Androgen-Achse würde nach den Ergebnissen dieser Arbeit in einer deutlichen Expressionsreduktion münden, was noch einmal die Bedeutung der Markergene als Indikatoren bzw. Verlaufsmarker unterstreicht. Die VPA-Behandlung resultierte bei diesen Genen jeweils in einer Expressionsminderung unter das Niveau der EtOH-Kontrolle. Dieses spricht zum einen für den Einsatz von VPA, zum anderen unterstreicht es die Kastrationsresistenz der VCaP-Zelle, die bereits über Mechanismen verfügt, die es in völliger Abwesenheit von Androgenen ermöglichen, das Karzinom zu unterhalten. Da es mittels VPA gelingt, die Expression noch unterhalb des Expressionsniveaus der EtOH-Kontrolle zu senken, müssen neben dem Eingriff von VPA in die Androgen-Achse weitere Mechanismen wie der direkte Eingriff in Zellzyklus und Apoptose vorliegen. Auf die Bedeutung der einzelnen Markergene wird im Folgenden eingegangen.

#### 4.1.2.1 Suppression der PDEF-Genexpression durch VPA

PDEF wird als ein androgenabhängiger Transkriptionsaktivator des PSA-Promotors beschrieben und zählt wie ERG zur Gruppe der ETS-Transkriptionsfaktoren (Oettgen et al. 2000). PDEF zeigt eine deutlichere Tumorassoziation als die Mehrzahl der anderen bekannten Tumor-assoziierten Gene (Ghadersohi et al. 2004). Bei der VCaP findet sich in der mit DHT vorstimulierten Zelle eine ausgeprägte Expression von PDEF. Nach 24-stündiger Behandlung der Zelle mit VPA wurde eine signifikante Herunterregulation der PDEF mRNA-Expression erzielt. Als ein Indikator der Malignität eines Tumors geltend (Sood et al. 2007), könnte die in dieser Arbeit (Kapitel 3.1.2) durch VPA induzierte Herunterregulation von PDEF ein Indiz für einen niedrigeren Malignitätsgrad sein.

Die Herunterregulation von PDEF könnte ebenfalls an der supprimierten PSA-Sekretion und Expression beteiligt sein (Thelen et al. 2004), da der PSA-Promotor möglicherweise mangels Aktivierung durch PDEF gehemmt ist.

#### 4.1.2.2 Suppression von PSA durch VPA

Mittels VPA-Behandlung konnte bei der VCaP sowohl eine verminderte mRNA-Expression von PSA als auch eine reduzierte PSA-Sekretion erzielt werden (siehe Kapitel 3.1). Die PSA-Sekretion unterliegt auf Genebene dem AR, als Transkriptionsfaktor (Knudsen und Penning 2010). Die Möglichkeit, PSA als einen Marker der AR-Aktivität zu beobachten, hat große

Bedeutung in der Diagnose und der Behandlung des Prostatakarzinoms (Ryan et al. 2006). Bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit, lässt sich aus der verminderten PSA-Sekretion und mRNA-Expression folglich auch auf eine herabgesetzte AR-Aktivität, als Resultat der VPA-Behandlung, schließen. Die Herunterregulation des ARs konnte ebenfalls nachgewiesen werden und bestätigt somit diesen Sachverhalt.

PSA selbst reguliert das pro-apoptotische, anti-proliferative IGFBP-3, welches es spaltet und inaktiviert (Thelen et al. 2004). Demnach sollte eine verminderte PSA-Expression zur Erhaltung des IGFBP-3 führen. VPA induziert folglich bei der VCaP-Zelllinie eine - vermutlich über die Herunterregulation des ARs und des PDEFs vermittelte - verringerte PSA-Expression, die wiederum an einer Erhaltung des IGFBP-3 beteiligt sein könnte und zu einer Wiederherstellung des Gleichgewichts innerhalb der IGF-Achse beiträgt. Insgesamt lässt sich eine Verschiebung der Zellabläufe in Richtung Apoptose und reduzierter Proliferation mittels VPA festhalten.

### **4.1.2.3 DD3 - ein vielversprechendes Markergen -**

DD3 (in klinischen Test inzwischen als PCA3 bezeichnet) ist ein prostataspezifisches Gen, das in mehr als 95% der Prostatakarzinome überexprimiert vorliegt und als ein Marker für das Prostatakarzinom bereits im klinischen Alltag eingesetzt wird (Schalken et al. 2003). Die Expression der DD3-mRNA korreliert sehr eng mit dem Vorliegen eines Prostatakarzinoms (Popa et al. 2007). Vorliegende Arbeit zeigt in Kapitel 3.1.5, dass eine DD3 mRNA-Expression vor allem in der mit DHT vorstimulierten VCaP (aber auch in der unbehandelten VCaP) vorliegt. Die beobachtete mRNA-Expressionsminderung von DD3 nach VPA-Behandlung könnte für eine verminderte Malignität der Zelle sprechen. Dieses Ergebnis fügt sich gut in das bisher durch VPA induzierte pro-apoptotische, anti-proliferative Wirkungsspektrum ein.

### **4.1.2.4 Reduktion der TMPRSS2-ERG-Fusion nach VPA-Behandlung**

In etwa 50% aller in einer Studie aus den USA via PSA-Wert-Screening entdeckten Prostatakarzinome fand sich die TMPRSS2-ERG-Fusion als häufigste Fusion. Die Konsequenz der Fusion liegt in einer Überexpression der Onkogene aus der ETS-Familie. Die initial noch unter Einfluss von Androgenen und dem AR stehende Expression kann im Krankheitsverlauf durch Entwicklung einer Androgenunabhängigkeit verloren gehen (Narod et al. 2008). Iljin et al. fanden heraus, dass mit der ERG-Expression am häufigsten eine Koexpression von HDAC1 einherging (Iljin et al. 2006). Auch hieraus ließ sich das therapeutische Potenzial von HDAC-Inhibitoren ableiten.

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst die TMPRSS2-ERG-Fusion in der VCaP mittels rtPCR nachgewiesen werden. Aus Abbildung 11 geht hervor, dass die Stimulation der Zellen mit DHT zu einer deutlich ausgeprägteren mRNA-Expression führt. Der durch die Fusion

unter Kontrolle des ARs geratene Transkriptionsfaktor ERG (Tomlins et al. 2005) könnte eine Erklärung für die DHT-vermittelte Hochregulation des TMPRSS2-ERG-Genproduktes sein. Die Behandlung der VCaP mit dem HDAC-1-Inhibitor VPA führte dagegen in diesem Projekt zu einer signifikanten Herunterregulation der TMPRSS2-ERG-Fusion.

TMPRSS2-ERG-Fusion tragende Tumore sind mit aggressivem Wachstum und letalem Phänotyp assoziiert (Kumar-Sinha et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten das Potenzial des HDAC-Inhibitors VPA an. Besonders Patienten mit einem ERG-positiven Prostatakarzinom könnten von der Therapie profitieren. Aufgrund seines geringen Nebenwirkungsspektrums könnte er Tumorregress herbeiführen, ohne große Lebensqualität-reduzierende Nebenwirkungen zu verursachen.

Neben der Therapie mit HDAC-Inhibitoren liegen große Erwartungen in der Entwicklung von Screening-Tests, mit denen verschiedene Risikogruppen, je nach Vorliegen einer ETS-Fusion, unterschieden werden können. Da die TMPRSS2-ERG-Fusion als ein frühes Ereignis in der Entstehung des Prostatakarzinoms gesehen wird und sich bereits bei 15% der HGPIN, jedoch nicht in der BPH findet (Carver et al. 2009; Han et al. 2009; Perner et al. 2007), stellt es für das Prostatakarzinom einen spezifischeren Marker als das PSA dar. Zusätzlich wird beim Nachweis dieser Fusion die zu erwartende Malignität des Karzinoms deutlich, was hinsichtlich der Therapiestrategie von großer Bedeutung ist.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass neuere Untersuchungen TMPRSS2-ERG eine noch größere Bedeutung beim Progress des Prostatakarzinoms einräumen. Es wird vermutet, dass TMPRSS2-ERG zu einer Störung des ursprünglichen Differenzierungsprogramms des ARs führt und stattdessen eine zelluläre Dedifferenzierung induziert (Yu J et al. 2010). TMPRSS2-ERG könnte somit entscheidend am Progress des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms beteiligt sein. Eine Therapie mit dem alleinigen Angriff an der Androgenachse scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit insuffizient, da die Zelle auch unter Androgenablation (EtOH-Kontrolle) noch eine deutliche mRNA-Expression von TMPRSS2-ERG zeigt. Es sind daher Therapeutika wie die HDAC-Inhibitoren gefragt, die über verschiedene Mechanismen angreifen und das Expressionsniveau, wie in vorliegender Arbeit gezeigt, noch unterhalb des Niveaus der Androgenablation bringen können.

Hoffnung liegt ebenfalls in der Nutzung der ETS-Familie als mögliche Targets in neuen Therapien zur Behandlung des Prostatakarzinoms (Narod et al. 2008).

### **4.1.3 Der Einfluss von VPA auf die IGF-Achse**

Es existieren deutliche Hinweise für die Relevanz der IGF-Achse auf das Prostatakarzinom sowie die Progression des Prostatakarzinoms zur Androgenunabhängigkeit (Grzmil et al. 2004).

IGF-I kann auch in der Abwesenheit von Androgenen zu einer direkten Aktivierung des ARs führen (Culig et al. 1994). Der aktivierte AR wiederum führt zu einer erhöhten Expression

zahlreicher Gene, jedoch nicht der des IGF-I-Rezeptors (Iwamura et al. 1993). Bei der LNCaP – einem weiteren Zellmodell des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms – zeigt sich *in vivo*, dass der Übergang zur Androgenunabhängigkeit mit steigender Expression von IGF-I und IGF-I-Rezeptor-mRNA einhergeht (Nickerson et al. 2001).

Ein erhöhtes IGF-I-Niveau ist mit einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen assoziiert. Die durch IGF-I gesteigerte Proliferationsrate bringt ein gesteigertes Risiko für genetische Defekte mit sich. Aufgrund des antiapoptotischen Effekts von IGF-I können Zellen mit solchen Defekten möglicherweise besser überleben. Möglicherweise führt eine gesteigerte IGF-I-Expression auch zu einer Verkürzung des Zeitintervalls zwischen der auf zellulärer Ebene entstanden transformierten Zellpopulation und dem klinisch signifikanten Karzinom (Pollak et al. 2004). Dieser Aspekt ist besonders beim Prostatakarzinom von großer Bedeutung, da die Karzinogenese häufig schon wesentlich früher beginnt und über viele Jahre abläuft. Therapeutika, die Einfluss auf den IGF-I-Signalweg nehmen, könnten schon früh in den Prozess der Karzinogenese eingreifen.

Die in vorliegender Arbeit unter VPA-Behandlung reduzierte IGF-I mRNA-Expression (Kapitel 3.1.8) zeigt den Einfluss von VPA auf die Karzinogenese in der VCaP-Zelle. VPA könnte über die Herunterregulation von IGF-I sowohl die Proliferationsrate der Zellen verringern, als auch den antiapoptotischen Einfluss von IGF-I mindern. Zellen mit Defekten können wieder dem für sie natürlicherweise vorgesehenen Weg in die Apoptose folgen.

Zusätzlich könnte durch die reduzierte IGF-I-Expression die IGF-vermittelte Stimulation des ARs verringert werden. Ebenso könnte der Übergang in ein androgenunabhängiges Prostatakarzinom verzögert oder sogar unterbunden werden, denn IGF-I unterstützt die AR-Aktivität in einem Milieu mit niedrigem Androgen-Niveau, sichert somit die AR-Aktivität und bahnt im Prostatakarzinom den Weg in eine Androgenunabhängigkeit (Knudsen und Penning 2010).

Interessanterweise zeigen tierexperimentelle Versuche zur Untersuchung des Einflusses von langfristiger VPA-Behandlung auf die Ovarien von Ratten ebenfalls ein reduziertes IGF-I-Vorkommen durch VPA (Cansu et al. 2008). Dieses für die Behandlung von Frauen mit Epilepsie bedenkliche Ergebnis unterstreicht jedoch das mögliche Potenzial von VPA bei der Behandlung des Prostatakarzinoms.

Der IGF-I-Rezeptor wird durch seine Liganden IGF-I und IGF-II aktiviert. Die Dichte der IGF-I-R bestimmt die Antwort auf IGF-I (Butler et al. 1998). Der IGF-I-Rezeptor spielt zusammen mit den IGFs bei der Zellproliferation eine ebenso kritische Rolle wie bei der Hemmung von Apoptose (Moschos und Mantzoros 2002). Bei der LNCaP-Zelle fand sich eine Assoziation zwischen erhöhter IGF-I-Rezeptor-Expression sowie erhöhtem IGF-I-Niveau und dem Progress in eine Androgenunabhängigkeit (Nickerson et al. 2001). Im Prostatakarzinom wurde eine Überexpression des IGF-I-R beobachtet, bei der PC3-Zelle resultierte eine

Hemmung des IGF-I-R in einer Suppression von Proliferation und Invasion (Grzmil et al. 2004).

Im Bezug auf die Expression des Rezeptors von IGF-I zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Änderungen der IGF-I-R mRNA-Expression unter der Behandlung mit VPA (Kapitel 3.1.7). Möglicherweise führt die erniedrigte Expression des Liganden IGF-I nach VPA-Behandlung, im Sinne einer negativen Rückkopplung, zu einer unveränderten bzw. tendenziell erhöhten Expression seines Rezeptors. Denn die IGF-I-Rezeptor-Genexpression wird von vielen Tumorsuppressorgenen wie z. B. p53, aber auch vom IGF-I selbst herabgesetzt (Yu H und Rohan 2000), welches in vorliegender Arbeit tatsächlich herunterreguliert werden konnte. Auch wenn VPA keinen direkten Einfluss auf die IGF-I-R mRNA-Expression zu haben scheint, nimmt es doch indirekt - über das IGFBP-3 und das IGF-I - Einfluss auf die Wiederherstellung des Gleichgewichts innerhalb der IGF-Achse in Richtung Apoptose und Differenzierung. Zudem wurde in dieser Arbeit nicht überprüft, ob die IGF-I mRNA-Expression - wie sonst untersucht - mit der Proteinmenge übereinstimmt (Thelen et al. 2005).

Ähnlich dem IGF-I verfügt auch das IGF-II über proliferative und antiapoptotische Effekte, die über den IGF-I-Rezeptor vermittelt werden (O'Dell und Day 1998). Die mRNA-Expression des IGF-II (Kapitel 3.1.9) zeigt sich in vorliegender Arbeit - im Kontrast zur IGF-I-Suppression - nach Behandlung mit VPA erhöht. Diese zum IGF-I gegensätzlich verlaufende Expression erscheint zunächst überraschend. Eine mögliche Erklärung könnten die Erkenntnisse von Cardillo et al. sein. Demnach produzieren in serumfreiem Medium kultivierte Prostatakarzinom-Zellen über eine autokrine Stimulation vermehrt IGF-II. Dadurch wird das Wachstum der Prostatakarzinom-Zelle auch in ungünstigem Milieu stimuliert (Cardillo et al. 2003). Die IGF-II-Erhöhung (nach VPA-Behandlung) könnte somit eine kompensatorische Reaktion der Zelle auf die verminderte IGF-I-Expression sein, durch die bereits ein wesentlicher Proliferationsstimulus reduziert wurde. Weitere mögliche Ursachen einer Überexpression von IGF-II können ein Verlust von genomischem Imprinting, ein Funktionsverlust von Transkriptionsrepressoren oder veränderte Transkriptions-Promotorstellen sein (Yu H und Rohan 2000).

Da das IGF-II einen wesentlich geringeren Stimulus auf den IGF-I-R ausübt, ist nicht zu erwarten, dass vermehrt auftretendes IGF-II die Reduktion von IGF-I kompensiert. Zudem verfügt das IGF-II über eine höhere Affinität zum IGFBP-3 (Moschos und Mantzoros 2002), als das ohnehin reduzierte IGF-I, wodurch der Einfluss des IGF-II möglicherweise über die VPA induzierte IGFBP-3-Expressionsteigerung gemindert werden kann.

Die Interaktion zwischen den IGFs und ihren Rezeptoren wird in großem Maße vom IGFBP-3 moduliert. Erhöhte IGF-I-Level im Plasma sowie reduzierte Konzentrationen des IGFBP-3

sind mit einem erhöhten Risiko für das Prostatakarzinom assoziiert (Chan et al. 1998; Wolk et al. 1998).

IGFBP-3 ist zusätzlich zur Regulation der mitogenen Aktivität der IGFs für die Inhibition ihrer antiapoptotischen Effekte verantwortlich (Moschos und Mantzoros 2002). Weiterhin verfügt das IGFBP-3 auch über IGF-unabhängige Funktionen, die proapoptotische und antiproliferative Effekte sowie Suppression der Angiogenese umfassen (Massoner et al. 2009). Neoplastische Zellen sind in der Lage eine Resistenz gegenüber diesen Funktionen zu entwickeln (Firth und Baxter 2002).

Ingermann et al. klonierten einen IGFBP-3-Rezeptor und sprechen von einer IGFBP-3/IGBBP-3-Rezeptor-Achse als einen neuen Kaspase-8-abhängigen Signalweg für die Apoptose in Karzinomen. Zudem zeigt sich eine supprimierte Expression von IGFBP-3 und seinem Rezeptor beim Brust- und Prostatakarzinom (Ingermann et al. 2010).

Die in vorliegender Arbeit (Kapitel 3.1.10) mittels VPA induzierte Hochregulation des IGFBP-3 spiegelt das proapoptotische Potenzial des HDAC-Inhibitors wider. Mit gesteigerter IGFBP-3-Expression geht eine verminderte Verfügbarkeit des IGF-I einher, die in einer Suppression der antiapoptotischen Effekte münden könnte. Zusätzlich könnte über VPA die IGF-unabhängige Funktion des IGFBP-3 gesteigert und somit Apoptose induziert, sowie Proliferation und Angiogenese gehemmt werden. Wenn demnach IGFBP-3 auch auf Proteinebene erhöht vorliegt, ist sein nachhaltiger Bestand wegen des verminderten Abbaus durch PSA, welches nach der VPA-Behandlung vermindert sezerniert wird, wahrscheinlich.

Zusammenfassend zeigt die VPA-Behandlung bei der VCaP-Zelle einen umfassenden Einfluss auf die IGF-Achse. Das bedeutende, antiapoptotische und proliferative IGF-I kann durch VPA herunterreguliert werden. Ergänzend dazu wird das IGFBP-3 erhöht exprimiert und kann verstärkt proapoptotisch wirken. Der IGF-I-R zeigt keine signifikanten mRNA-Expressionsveränderungen durch VPA. Möglicherweise überwiegt trotzdem das Gewicht in Richtung Apoptose und Differenzierung, da weniger IGF-I bei nahezu gleichbleibender IGF-I mRNA-Expression vorliegt. Die Hochregulation des IGF-II kann möglicherweise mittels der erhöhten IGFBP-3 Konzentrationen und der insgesamt geringeren Affinität zum IGF-I-R kompensiert werden. Festzuhalten bleibt, dass VPA proapoptotischen Einfluss auf die für den Progress des Prostatakarzinoms so relevante IGF-Achse nimmt.

#### **4.1.4 Hochregulation von TIMP-3 nach VPA-Behandlung**

Neben der HDAC-Inhibition verfügt VPA über verschiedene weitere Funktionen, zu denen auch die Induktion der Apoptose gezählt wird (Kawagoe et al. 2002). Bei vielen Prostatakarzinom-Zelllinien wurde (unabhängig vom Grad der Malignität) die Expression von Fas und seinem Liganden (FasL) nachgewiesen. Diese Aktivität resultierte jedoch gar nicht oder nur in einem geringem Maß in Apoptoseinitiation (Liu et al. 1998; Rokhlin et al. 1997) .

Diese Resistenz gegenüber der Fas-vermittelten Apoptose wird u.a. auf die Präsenz spezifischer Caspase-8-Inhibitoren zurückgeführt (Hedlund et al. 1998). TIMP-3 zeigt Eigenschaften eines Vermittlers der Todesrezeptor-abhängigen Apoptose, die beispielsweise über eine Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -9 via FADD-sensitiven Todesrezeptor erfolgt (Bond et al. 2002).

Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine Hochregulation der TIMP-3 mRNA-Expression nach Behandlung der Zellen mit VPA. TIMP-3 scheint in der unbehandelten VCaP und nach Vorstimulation mit DHT nahezu nicht exprimiert. Erst nach der VPA-Behandlung sind messbare mRNA-Konzentrationen zu detektieren. Diese Hochregulation von TIMP-3 könnte die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose induzieren. VPA sorgt somit möglicherweise über HDAC-Inhibition für eine Transkriptionssteigerung von Genen, die über den Todesrezeptor Apoptose induzieren und zuvor in ihrer Transkription unterdrückt waren (Igney und Krammer 2002). Die Tatsache, dass das als proapoptotischer Faktor deklarierte TIMP-3 nach DHT-Stimulation noch geringer exprimiert ist als in der unbehandelten Zelle (Abbildung 17), unterstreicht die Annahme, dass durch DHT zusätzlich Apoptose verhindert wird. An dieser Stelle sei auf die Problematik des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms hingewiesen, in dem es über Expressionsreduktion des TIMP-3 zu einer fatalen Androgen-vermittelten Apoptosehemmung kommen könnte.

Die durch hohe Malignität und invasives Wachstum gekennzeichnete VCaP-Zelllinie zeigt in vorliegender Arbeit in der Kontrolle und unter DHT eine nur minimale mRNA-Expression von TIMP-3. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis für ein Ungleichgewicht innerhalb der EZM sein, wodurch es zum invasiven Wachstum kommt. Denn eine wichtige Eigenschaft von TIMP-3 ist die Inhibition der Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Es ist dort lokalisiert, wo es die Durchwanderung von Basalmembran und Stroma kontrollieren kann. Bei einem Ungleichgewicht zwischen TIMPs und MMPs zugunsten der MMPs kommt es zu Gewebedestruktion (Woessner 2001). Der Anstieg der TIMP-3 mRNA-Expression nach VPA-Behandlung sorgt möglicherweise für ein Wiedererlangen eines Gleichgewichts zwischen MMPs und TIMPs, wodurch ein aggressives, invasives Wachstum verringert werden könnte.

### 4.2 Ausblick

VPA zeigt in präklinischen Studien (in vivo und in vitro) bei verschiedenen Karzinomen ein hohes Potenzial an Antitumor-Effekten. Es moduliert verschiedene Signalwege, die Zellzyklusarrest, Angiogenese, Apoptose und Differenzierung betreffen. Diese Effekte scheinen Zelltyp-spezifisch zu sein und sind vermutlich abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen und dem Grad der Alteration bei Karzinomen. Für solide Tumoren fanden sich bis 2008 in präklinischen Studien 19 verschiedene Typen von soliden Tumoren, die positive

Effekte auf VPA zeigten (Duenas-Gonzalez et al. 2008). Im Prostatakarzinom induziert VPA sowohl in Androgen-unabhängigen als auch Androgen-abhängigen Zelllinien Apoptose (Thelen et al. 2004) und es zeigt wachstumshemmende Effekte in *Xenograft*-Modellen (Xia et al. 2006). Die in vorliegender Arbeit gezeigten Veränderungen der mRNA-Expression der verschiedenen Gene zeigen auch bei den VCaP-Zellen - dem aktuellsten Zellmodell für das kastrationsresistente Prostatakarzinom - das Potenzial von VPA.

Bisherige Ergebnisse klinischer Studien deuten auf eine vielversprechende Wirkung von Valproat sowohl auf solide Tumoren, als auch auf hämatopoetische Erkrankungen hin (Atmaca et al. 2007; Blaheta et al. 2005). In einer klinischen Studie zur Untersuchung des Einflusses von VPA auf solide Tumoren wurden Patienten mit fortgeschrittenen, progressiven Karzinomen mit VPA in intravenöser Form behandelt. In Untersuchungen der peripheren Zellen des Blutes konnte die Induktion der Hyperacetylierung bei den meisten Patienten gezeigt werden (Atmaca et al. 2007). Um langfristig den möglichen Einsatz von VPA in der Behandlung von Prostatakarzinom-Patienten zu untersuchen, sind sicher weitere klinische Studien erforderlich.

Im Hinblick auf die Therapie des Prostatakarzinoms sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für einen Einsatz von VPA. Selbst bei der VCaP-Zelllinie, die mit hoher Malignität und Kastrationsresistenz assoziiert ist, konnte mit VPA Einfluss auf entscheidende Komponenten – wie den AR, den ER $\beta$  und die IGF-Achse – des Prostatakarzinoms genommen werden. Das gut bekannte und im Vergleich zu anderen Therapien geringe Nebenwirkungsspektrum von VPA spricht ebenfalls für seinen Einsatz. Die oft in der Epilepsiebehandlung gefürchtete Teratogenität kann in der Prostatakarzinomtherapie bei einer Vielzahl der Patienten vernachlässigt werden, da der Großteil sich bereits in fortgeschrittenem Alter befindet. Im Vergleich zur operativen Therapie oder der Strahlentherapie, bei denen es häufig zu Störungen der Kontinenz und/oder erektiler Dysfunktion kommt, würde die Behandlung mit VPA den Patienten eine wesentlich höhere Lebensqualität bieten.

### 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des therapeutischen Potenzials des HDAC-Inhibitors VPA am Modell der VCaP-Zelllinie. Die Besonderheit der VCaP-Zelllinie liegt darin, dass sie über die TMPRSS2-ERG-Fusion verfügt. Diese Eigenschaft ist mit hoher Malignität und letalem Verlauf assoziiert. Die VCaP ist somit auch ein Modell für eine Form des Prostatakarzinoms, für deren Patienten häufig kaum schonende Therapieoptionen zur Verfügung stehen. Für diese Patienten gilt es, neue nebenwirkungsärmere Therapien zu entwickeln. Insgesamt führte die Behandlung der VCaP mit VPA zu Veränderungen der Genexpression, die in Richtung Zellzyklusarrest, Apoptose, Proliferationshemmung und Differenzierung weisen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen sowohl erhöhte als auch supprimierte Expressionen von Genen, die wichtigen Einfluss auf Wachstum und Differenzierung nehmen.

Eine Hochregulation fand sich bei den Genen ER $\beta$ , TIMP-3, sowie dem IGFBP-3. Diese Gene sind wichtig für die Induktion von Apoptose und die Hemmung unkontrollierten Wachstums. Sie verfügen über Eigenschaften eines Tumorsuppressors und zeigen sich zum Teil in der VCaP vermindert oder sogar gar nicht exprimiert. Die VPA-Behandlung kann somit im Sinne einer Aufhebung des *gene-silencing* gewirkt haben.

Die Mehrzahl der untersuchten Gene wurde nach der Behandlung mit VPA jedoch herunterreguliert. Als einer der für die Pathogenese des Prostatakarzinoms entscheidendsten Faktoren konnte der AR (Knudsen und Penning 2010) herunterreguliert werden. Auch auf das mit hoher Malignität assoziierte PDEF (Sood et al. 2007) konnte im Sinne einer Suppression Einfluss genommen werden. Die TMPRSS2-ERG-Fusion, die bezeichnend für die VCaP ist und mit einem besonders malignen und letalen Prostatakarzinom-Phänotyp assoziiert wird, zeigte sich nach VPA-Behandlung supprimiert. Dies könnte ein Indiz für den Weg zu einem weniger malignen Prostatakarzinom durch die Behandlung mit VPA sein.

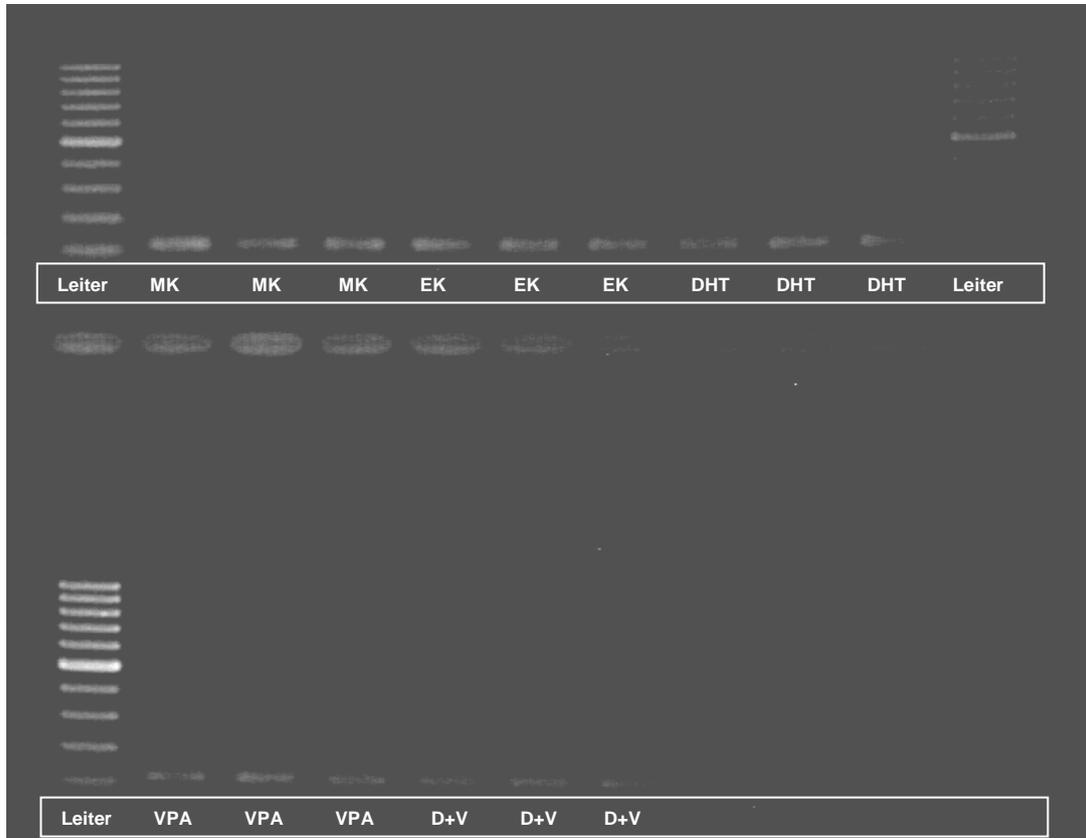
Auf die IGF-Achse nahm VPA vielschichtigen Einfluss. IGF-I konnte herunterreguliert werden. Damit schlüssig, im Sinne einer Normalisierung, wurde IGFBP-3 hochreguliert. Signifikante Expressionsveränderungen des IGF-I-R konnten in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. IGF-II lag nach VPA-Behandlung dagegen verstärkt exprimiert vor.

Die beiden relevanten Markergene PSA und DD3, die in der VCaP stark exprimiert sind, zeigten nach der Behandlung mit VPA eine reduzierte Expression. Sie könnten möglicherweise auch in klinischen Studien einen Indikator für die Wirkung von VPA repräsentieren.

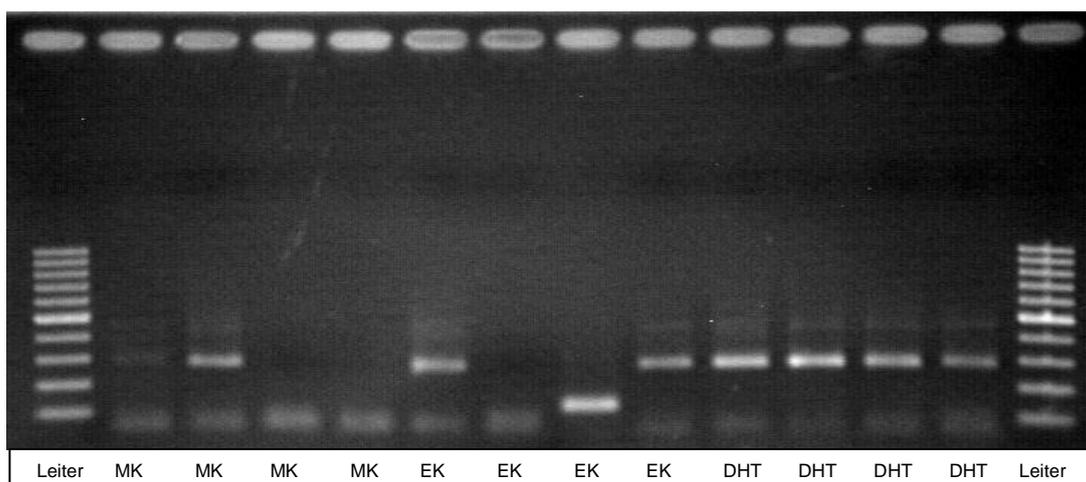
Ob sich der in dieser Arbeit gezeigte, antiproliferative und proapoptotische Einfluss von VPA auch klinisch bei Patienten mit Prostatakarzinom reproduzieren lässt, sollte in prospektiven, randomisierten Studien untersucht werden.

## 6 Anhang

### 6.1 Originalabbildungen



**Abbildung 21** Originalbild: Gelelektrophorese der TMPRSS2-ERG-Genprodukte



**Abbildung 22** Originalbild: Gelelektrophorese der DD3-rtPCR-Produkte

## 6.2 Verzeichnis der Abbildungen

<b>Abbildung 1</b>	Elektropherogramm mit 18S- und 28S Bande.....	33
<b>Abbildung 2</b>	Gel-Darstellung der Bioanalyser-Messung.....	33
<b>Abbildung 3</b>	Beispiel eines Amplifikationsdiagramms .....	38
<b>Abbildung 4</b>	Quantifizierung einer unbekannt Probe anhand einer Eichgeraden.....	42
<b>Abbildung 5</b>	Expression des ARs bei der VCaP im Western Blot, nach Behandlung mit VPM, VPA, Trichostatin A und Apicidin .....	45
<b>Abbildung 6</b>	Veränderungen der PDEF-Genexpression mit und ohne Einfluss von DHT und VPA .....	46
<b>Abbildung 7</b>	mRNA-Expression von PSA unter Einfluss von DHT und VPA .....	47
<b>Abbildung 8</b>	PSA-Sekretion unter Einfluss von DHT und VPA .....	48
<b>Abbildung 9</b>	Ergebnisse der rtPCR der VCaP nach DHT- und VPA-Behandlung.....	49
<b>Abbildung 10</b>	Agarose-Gelelektrophorese der rtPCR-Produkte für DD3 .....	49
<b>Abbildung 11</b>	Expression der TMPRSS2-ERG-Genfusion unter DHT- und VPA-Stimulation in der rtPCR .....	50
<b>Abbildung 12</b>	Gelelektrophorese der TMPRSS2-ERG PCR-Produkte .....	50
<b>Abbildung 13</b>	mRNA-Expression des IGF-I-Rezeptors bei der VCaP vor und nach Stimulation mit DHT und VPA .....	51
<b>Abbildung 14</b>	Einfluss von DHT und VPA auf die IGF-I-Expression bei der VCaP .....	52
<b>Abbildung 15</b>	IGF-II mRNA-Expression der VCaP nach DHT- und VPA-Stimulation .....	53
<b>Abbildung 16</b>	IGFBP-3-Expression in VCaP-Zellen mit und ohne Einfluss von DHT und VP.....	54
<b>Abbildung 17</b>	Wirkung von VPA auf die VCaP vor und nach Vorstimulation mit DHT .....	55
<b>Abbildung 18</b>	Gelelektrophorese der rtPCR-Produkte von TIMP-3 .....	55
<b>Abbildung 19</b>	ER $\beta$ -mRNA-Expression nach Behandlung mit VPA .....	56
<b>Abbildung 20</b>	Acetylierung des Histon H4 (Western Blot) .....	57
<b>Abbildung 21</b>	Originalbild: Gelelektrophorese der TMPRSS2-ERG-Genprodukte.....	72
<b>Abbildung 22</b>	Originalbild: Gelelektrophorese der DD3-rtPCR-Produkte.....	72

### 6.3 Verzeichnis der Tabellen

<b>Tabelle 1</b>	Verwendete Chemikalien, Zellen und Primer .....	26
<b>Tabelle 2</b>	Verwendete Kits .....	27
<b>Tabelle 3</b>	Verwendete Materialien .....	27
<b>Tabelle 4</b>	Verwendete Geräte.....	28
<b>Tabelle 5</b>	Verwendete Software .....	28
<b>Tabelle 6</b>	Versuchsreihe.....	30
<b>Tabelle 7</b>	Pipettierschema Mastermix für Reverse Transkription .....	34
<b>Tabelle 8</b>	Temperaturverlauf der cDNA-Synthese im Thermocycler .....	35
<b>Tabelle 9</b>	Untersuchte Gene mit Sequenz, Annealing-Temperatur (AT) und Schmelztemperatur (MT) .....	39
<b>Tabelle 10</b>	Pipettierschema Mastermix.....	40
<b>Tabelle 11</b>	Programmierung des <i>iCyclers</i> .....	41
<b>Tabelle 12</b>	Tabellarisch zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse .....	58

### 7 Literaturverzeichnis

Abate-Shen C, Shen MM (2000):  
Molecular genetics of prostate cancer.  
Genes Dev; 14(19), 2410-2434

Allfrey VG (1966):  
Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis.  
Proc Can Cancer Conf; 6, 313-335

Angelucci A, Valentini A, Millimaggi D, Gravina GL, Miano R, Dolo V, Vicentini C, Bologna M, Federici G, Bernardini S (2006):  
Valproic acid induces apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple death pathways.  
Anticancer Drugs; 17(10), 1141-1150

Atmaca A, Al-Batran SE, Maurer A, Neumann A, Heinzl T, Hentsch B, Schwarz SE, Hovelmann S, Gottlicher M, Knuth A, et al. (2007):  
Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial.  
Br J Cancer; 97(2), 177-182

Attard G, Cooper CS, de Bono JS (2009):  
Steroid hormone receptors in prostate cancer: a hard habit to break?  
Cancer Cell; 16(6), 458-462

Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Bärbel-Maria Kurth B-M, Wolf U:  
Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland, Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010, Eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI. ;  
Robert Koch-Institut, Berlin 2010

Beske F, Becker E, Katalinic A, Krauss C, Pritzkeleit R:  
Gesundheitsversorgung 2050 - Prognose für Deutschland und Schleswig-Holstein. ;  
Institut für Gesundheits-System-Forschung, Kiel 2007

Björkman M, Iljin K, Halonen P, Sara H, Kaivanto E, Nees M, Kallioniemi OP (2008):  
Defining the molecular action of HDAC inhibitors and synergism with androgen deprivation in ERG-positive prostate cancer.  
Int J Cancer; 123(12), 2774-2781

Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J, Jr. (2005):  
Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies.  
Med Res Rev; 25(4), 383-397

Bond M, Murphy G, Bennett MR, Amour A, Knauper V, Newby AC, Baker AH (2000):  
Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. Metalloproteinase inhibition is associated with proapoptotic activity.  
J Biol Chem; 275(52), 41358-41363

Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH (2002):  
Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway.  
J Biol Chem; 277(16), 13787-13795

- Bonkhoff H, Remberger K (1996):  
Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model.  
Prostate; 28(2), 98-106
- Bonkhoff H, Berges R (2009):  
The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer.  
Eur Urol; 55(3), 533-542
- Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K (1999):  
Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions.  
Am J Pathol; 155(2), 641-647
- Börgermann C, Sieverding M, Fornara P, Graefen M, Hammerer P, Semjonow A, Schröder F, Rübber H (2006):  
[PSA 2010--the beginning of a new era in early detection of prostate cancer].  
Urologe A; 45 Suppl 4, 127-133
- Börgermann C, Loertzer H, Hammerer P, Fornara P, Graefen M, Rübber H (2010):  
[Problems, objective, and substance of early detection of prostate cancer].  
Urologe A; 49(2), 181-189
- Bosland MC (2005):  
The role of estrogens in prostate carcinogenesis: a rationale for chemoprevention.  
Rev Urol; 7 Suppl 3, S4-S10
- Brooke GN, Bevan CL (2009):  
The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression.  
Curr Genomics; 10(1), 18-25
- Bruchofsky N, Wilson JD (1968):  
The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro.  
J Biol Chem; 243(8), 2012-2021
- Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB (1999):  
DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer.  
Cancer Res; 59(23), 5975-5979
- Butler AA, Blakesley VA, Poulaki V, Tsokos M, Wood TL, LeRoith D (1998):  
Stimulation of tumor growth by recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) is dependent on the dose and the level of IGF-I receptor expression.  
Cancer Res; 58(14), 3021-3027
- Cansu A, Giray SG, Serdaroglu A, Erdogan D, Coskun ZK, Korucuoglu U, Biri AA (2008):  
Effects of chronic treatment with valproate and oxcarbazepine on ovarian folliculogenesis in rats.  
Epilepsia; 49(7), 1192-1201
- Cardillo MR, Monti S, Di Silverio F, Gentile V, Sciarra F, Toscano V (2003):  
Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF type I receptor (IGFR-I) expression in prostatic cancer.  
Anticancer Res; 23(5A), 3825-3835

Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, Alimonti A, Nardella C, Varmeh S, Scardino PT, et al. (2009):  
Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate.

Nat Genet; 41(5), 619-624

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW (1993):

Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening.

JAMA; 270(8), 948-954

Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, Hennekens CH, Pollak M (1998):

Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study.

Science; 279(5350), 563-566

Chen L, Meng S, Wang H, Bali P, Bai W, Li B, Atadja P, Bhalla KN, Wu J (2005):

Chemical ablation of androgen receptor in prostate cancer cells by the histone deacetylase inhibitor LAQ824.

Mol Cancer Ther; 4(9), 1311-1319

Chen Y, Sawyers CL, Scher HI (2008):

Targeting the androgen receptor pathway in prostate cancer.

Curr Opin Pharmacol; 8(4), 440-448

Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM (2008):

The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway.

Clin Cancer Res; 14(20), 6364-6370

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, Bartsch G, Klocker H (1994):

Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor.

Cancer Res; 54(20), 5474-5478

de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003):

Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.

Biochem J; 370(Pt 3), 737-749

Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ (2008):

Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance.

Cancer Res; 68(13), 5469-5477

DGU:

Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms

Autoren-Steuergruppe: Wirth MP, Weißbach L, Ackermann R, Winfried A, Albrecht C, Göckel-Beining B, Fröhner B, Hinkelbein W, Miller K, Rübber H, Wiegel T, Wolff J, Wörmann B. Version 1.0;

Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., Düsseldorf 2009

Dhom G (1983):

Epidemiologic aspects of latent and clinically manifest carcinoma of the prostate.

J Cancer Res Clin Oncol; 106(3), 210-218

Draisma G, Boer R, Otto SJ, van der Crujisen IW, Damhuis RA, Schroder FH, de Koning HJ (2003):

Lead times and overdetection due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer.

J Natl Cancer Inst; 95(12), 868-878

Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA (2008):

Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors.

Cancer Treat Rev; 34(3), 206-222

Edwards J, Bartlett JM (2005):

The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways.

BJU Int; 95(9), 1327-1335

Ellem SJ, Risbridger GP (2007):

Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens.

Nat Rev Cancer; 7(8), 621-627

Evans RM (1988):

The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.

Science; 240(4854), 889-895

Firth SM, Baxter RC (2002):

Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins.

Endocr Rev; 23(6), 824-854

Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H (2003):

Differential expression of the estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma.

Prostate; 54(2), 79-87

Ganzer R, Wieland WF, Bach T, Rossler W, Blana A (2007):

[Hormonal treatment of cancer of the prostate: review and present status].

Dtsch Med Wochenschr; 132(4), 161-166

Ghadersohi A, Odunsi K, Lele S, Collins Y, Greco WR, Winston J, Liang P, Sood AK (2004):

Prostate derived Ets transcription factor shows better tumor-association than other cancer-associated molecules.

Oncol Rep; 11(2), 453-458

Ghadersohi A, Odunsi K, Zhang S, Azrak RG, Bundy BN, Manjili MH, Li F (2008):

Prostate-derived Ets transcription factor as a favorable prognostic marker in ovarian cancer patients.

Int J Cancer; 123(6), 1376-1384

Giovannucci E (1999):

Nutritional factors in human cancers.

Adv Exp Med Biol; 472, 29-42

Glaser KB, Li J, Pease LJ, Staver MJ, Marcotte PA, Guo J, Frey RR, Garland RB, Heyman HR, Wada CK, et al. (2004):

Differential protein acetylation induced by novel histone deacetylase inhibitors.

Biochem Biophys Res Commun; 325(3), 683-690

Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, et al. (2001):  
Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells.

EMBO J; 20(24), 6969-6978

Graefen M, Hammerer P, Haese A, Huland H (2000):  
[Therapeutic options in hormone refractory prostate carcinoma].  
Urologe A; 39(3), 267-273

Gregoretto IV, Lee YM, Goodson HV (2004):  
Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis.

J Mol Biol; 338(1), 17-31

Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, et al. (1998):

Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia.

Nature; 391(6669), 815-818

Grzmil M, Hemmerlein B, Thelen P, Schweyer S, Burfeind P (2004):  
Blockade of the type I IGF receptor expression in human prostate cancer cells inhibits proliferation and invasion, up-regulates IGF binding protein-3, and suppresses MMP-2 expression.

J Pathol; 202(1), 50-59

Gu X, Zerbini LF, Otu HH, Bhasin M, Yang Q, Joseph MG, Grall F, Onatunde T, Correa RG, Libermann TA (2007):

Reduced PDEF expression increases invasion and expression of mesenchymal genes in prostate cancer cells.

Cancer Res; 67(9), 4219-4226

Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G (2008):  
The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies.

Can J Urol; 15(1), 3866-3871

Haese A, Dworschack RT, Piccoli SP, Sokoll LJ, Partin AW, Chan DW (2002):  
Clinical evaluation of the Elecsys total prostate-specific antigen assay on the Elecsys 1010 and 2010 systems.

Clin Chem; 48(6 Pt 1), 944-947

Haese A, Graefen M, Palisaar J, Huland E, Huland H (2003):  
[Serum markers for early detection and staging of prostate cancer. Status report on current and future markers].

Urologe A; 42(9), 1172-1187

Haese A, de la Taille A, van Poppel H, Marberger M, Stenzl A, Mulders PF, Huland H, Abbou CC, Remzi M, Tinzi M, et al. (2008):

Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy.

Eur Urol; 54(5), 1081-1088

Han B, Mehra R, Lonigro RJ, Wang L, Suleman K, Menon A, Palanisamy N, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Shah RB (2009):

Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression.

Mod Pathol; 22(8), 1083-1093

Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T (1971):

[Some physico-chemical characteristics of " -seminoprotein", an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. VII].

Nihon Hoigaku Zasshi; 25(4), 322-324

Hedelin M, Balter KA, Chang ET, Bellocco R, Klint A, Johansson JE, Wiklund F, Thellenberg-Karlsson C, Adami HO, Gronberg H (2006):

Dietary intake of phytoestrogens, estrogen receptor-beta polymorphisms and the risk of prostate cancer.

Prostate; 66(14), 1512-1520

Hedlund TE, Duke RC, Schleicher MS, Miller GJ (1998):

Fas-mediated apoptosis in seven human prostate cancer cell lines: correlation with tumor stage.

Prostate; 36(2), 92-101

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996):

Real time quantitative PCR.

Genome Res; 6(10), 986-994

Heidenreich A, Ohlmann CH (2005):

[Treatment options for hormone-refractory prostate cancer].

Urologe A; 44(11), 1303-1304, 1306-1314

Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulosom R, Brewster SF, Macaulay VM (2002):

Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease.

Cancer Res; 62(10), 2942-2950

Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA (2003):

DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer.

Eur Urol; 44(1), 8-15; discussion 15-16

Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA (2007):

Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer.

Clin Cancer Res; 13(17), 5103-5108

Holzapfel B, Wickert L (2007):

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).

Biologie Unserer Zeit, 120-126

Hrebackova J, Hrabeta J, Eckschlager T (2010):

Valproic Acid in the complex therapy of malignant tumors.

Curr Drug Targets; 11(3), 361-379

Huggins C, Hodges CV (1972):

Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate.

CA Cancer J Clin; 22(4), 232-240

- Igney FH, Krammer PH (2002):  
Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.  
Nat Rev Cancer; 2(4), 277-288
- Iijin K, Wolf M, Edgren H, Gupta S, Kilpinen S, Skotheim RI, Peltola M, Smit F, Verhaegh G, Schalken J, et al. (2006):  
TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming.  
Cancer Res; 66(21), 10242-10246
- Ingermann AR, Yang YF, Paisley TE, Han J, Mikami A, Garza AE, Mohanraj L, Fan L, Idowu M, Ware JL, et al. (2010):  
Identification of a novel cell death receptor mediating IGFBP-3-induced antitumor effects in breast and prostate cancer.  
J Biol Chem
- Iwamura M, Sluss PM, Casamento JB, Cockett AT (1993):  
Insulin-like growth factor I: action and receptor characterization in human prostate cancer cell lines.  
Prostate; 22(3), 243-252
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009):  
Cancer statistics, 2009.  
CA Cancer J Clin; 59(4), 225-249
- Johns LE, Houlston RS (2003):  
A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk.  
BJU Int; 91(9), 789-794
- Kaklamani VG, Linos A, Kaklamani E, Markaki I, Mantzoros C (1999):  
Age, sex, and smoking are predictors of circulating insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor-binding protein 3.  
J Clin Oncol; 17(3), 813-817
- Kanety H, Madjar Y, Dagan Y, Levi J, Papa MZ, Pariente C, Goldwasser B, Karasik A (1993):  
Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: correlation with serum prostate-specific antigen.  
J Clin Endocrinol Metab; 77(1), 229-233
- Kawagoe R, Kawagoe H, Sano K (2002):  
Valproic acid induces apoptosis in human leukemia cells by stimulating both caspase-dependent and -independent apoptotic signaling pathways.  
Leuk Res; 26(5), 495-502
- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, et al. (2008):  
Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors.  
Biochem J; 409(2), 581-589
- Klein EA (2002):  
Opportunities for prevention of prostate cancer: genetics, chemoprevention, and dietary intervention.  
Rev Urol; 4 Suppl 5, S18-28

Knudsen KE, Penning TM (2010):

Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. Trends Endocrinol Metab; 21(5), 315-324

Korenchuk S, Lehr JE, L MC, Lee YG, Whitney S, Vessella R, Lin DL, Pienta KJ (2001): VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer.

In Vivo; 15(2), 163-168

Kortenhorst MS, Zahurak M, Shabbeer S, Kachhap S, Galloway N, Parmigiani G, Verheul HM, Carducci MA (2008):

A multiple-loop, double-cube microarray design applied to prostate cancer cell lines with variable sensitivity to histone deacetylase inhibitors.

Clin Cancer Res; 14(21), 6886-6894

Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM (2008):

Recurrent gene fusions in prostate cancer.

Nat Rev Cancer; 8(7), 497-511

LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. (1995):

Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.

Endocr Rev; 16(2), 143-163

Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS (2006):

Targeting histone deacetylase in cancer therapy.

Med Res Rev; 26(4), 397-413

Liu QY, Rubin MA, Omene C, Lederman S, Stein CA (1998):

Fas ligand is constitutively secreted by prostate cancer cells in vitro.

Clin Cancer Res; 4(7), 1803-1811

Löffler G, Petrides PE:

Biochemie und Pathobiochemie.7. völlig neu bearbeitete Auflage;

Springer Verlag Heidelberg, 2003

Lüllmann H, Mohr K, Hein L:

Pharmakologie und Toxikologie Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen.16., vollständig überarbeitete Auflage;

Georg Thieme Verlag Stuttgart 2006

Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK (2001):

Histone deacetylases and cancer: causes and therapies.

Nat Rev Cancer; 1(3), 194-202

Marrocco DL, Tilley WD, Bianco-Miotto T, Evdokiou A, Scher HI, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM, Butler LM (2007):

Suberoylanilide hydroxamic acid (vorinostat) represses androgen receptor expression and acts synergistically with an androgen receptor antagonist to inhibit prostate cancer cell proliferation.

Mol Cancer Ther; 6(1), 51-60

Massoner P, Colleselli D, Matscheski A, Pircher H, Geley S, Jansen Durr P, Klocker H (2009):

Novel mechanism of IGF-binding protein-3 action on prostate cancer cells: inhibition of proliferation, adhesion, and motility.

Endocr Relat Cancer; 16(3), 795-808

Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, et al. (2002):  
In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation.  
EMBO J; 21(24), 6820-6831

Moschos SJ, Mantzoros CS (2002):  
The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications.  
Oncology; 63(4), 317-332

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer K, Schäfer-Korting M:  
Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxykologie.8. völlig neu überarbeitete und erweiterte Auflage;  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2001

Narod SA, Seth A, Nam R (2008):  
Fusion in the ETS gene family and prostate cancer.  
Br J Cancer; 99(6), 847-851

Nickerson T, Chang F, Lorimer D, Smeekens SP, Sawyers CL, Pollak M (2001):  
In vivo progression of LAPC-9 and LNCaP prostate cancer models to androgen independence is associated with increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR).  
Cancer Res; 61(16), 6276-6280

O'Dell SD, Day IN (1998):  
Insulin-like growth factor II (IGF-II).  
Int J Biochem Cell Biol; 30(7), 767-771

Oates AJ, Schumaker LM, Jenkins SB, Pearce AA, DaCosta SA, Arun B, Ellis MJ (1998):  
The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene.  
Breast Cancer Res Treat; 47(3), 269-281

Oettgen P, Finger E, Sun Z, Akbarali Y, Thamrongsak U, Boltax J, Grall F, Dube A, Weiss A, Brown L, et al. (2000):  
PDEF, a novel prostate epithelium-specific ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression.  
J Biol Chem; 275(2), 1216-1225

Page ST, Lin DW, Mostaghel EA, Hess DL, True LD, Amory JK, Nelson PS, Matsumoto AM, Bremner WJ (2006):  
Persistent intraprostatic androgen concentrations after medical castration in healthy men.  
J Clin Endocrinol Metab; 91(10), 3850-3856

Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1980):  
A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients.  
Cancer Res; 40(7), 2428-2432

Pathil A, Armeanu S, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M (2006):  
HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL.  
Hepatology; 43(3), 425-434

Perner S, Schmidt FH, Hofer MD, Kuefer R, Rubin M (2007):  
[TMPRSS2-ETS gene fusion in prostate cancer].

Urologe A; 46(7), 754-760

Petley T, Graff K, Jiang W, Yang H, Florini J (1999):  
Variation among cell types in the signaling pathways by which IGF-I stimulates specific cellular responses.  
Horm Metab Res; 31(2-3), 70-76

Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE (2004):  
Insulin-like growth factors and neoplasia.  
Nat Rev Cancer; 4(7), 505-518

Popa I, Fradet Y, Beaudry G, Hovington H, Beaudry G, Tetu B (2007):  
Identification of PCA3 (DD3) in prostatic carcinoma by in situ hybridization.  
Mod Pathol; 20(11), 1121-1127

Rao AR, Motiwala HG, Karim OM (2008):  
The discovery of prostate-specific antigen.  
BJU Int; 101(1), 5-10

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R:  
Biochemie.1. Auflage;  
Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2006

Ricke WA, McPherson SJ, Bianco JJ, Cunha GR, Wang Y, Risbridger GP (2008):  
Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling.  
FASEB J; 22(5), 1512-1520

Risbridger GP, Ellem SJ, McPherson SJ (2007):  
Estrogen action on the prostate gland: a critical mix of endocrine and paracrine signaling.  
J Mol Endocrinol; 39(3), 183-188

Rokhlin OW, Bishop GA, Hostager BS, Waldschmidt TJ, Sidorenko SP, Pavloff N, Kiefer MC, Umansky SR, Glover RA, Cohen MB (1997):  
Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines.  
Cancer Res; 57(9), 1758-1768

Rokhlin OW, Glover RB, Guseva NV, Taghiyev AF, Kohlgraf KG, Cohen MB (2006):  
Mechanisms of cell death induced by histone deacetylase inhibitors in androgen receptor-positive prostate cancer cells.  
Mol Cancer Res; 4(2), 113-123

Ryan CJ, Smith A, Lal P, Satagopan J, Reuter V, Scardino P, Gerald W, Scher HI (2006):  
Persistent prostate-specific antigen expression after neoadjuvant androgen depletion: an early predictor of relapse or incomplete androgen suppression.  
Urology; 68(4), 834-839

Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G (2003):  
New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene.  
Urology; 62(5 Suppl 1), 34-43

Schmitz-Dräger BJ, Eichholzer M, Beiche B, Ebert T (2001):  
Nutrition and prostate cancer.  
Urol Int; 67(1), 1-11

Schmitz-Dräger BJ, Bismarck E, Lummen G (2010):

[Risks and prevention of prostate cancer. Commentary on the new S3 guideline].

Urologe A; 49(2), 233-237

Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, et al. (2009):

Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study.

N Engl J Med; 360(13), 1320-1328

Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003):

Molecular biology of prostate cancer.

Mol Hum Reprod; 9(8), 437-448

Setlur SR, Mertz KD, Hoshida Y, Demichelis F, Lupien M, Perner S, Sboner A, Pawitan Y, Andren O, Johnson LA, et al. (2008):

Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer.

J Natl Cancer Inst; 100(11), 815-825

Sood AK, Saxena R, Groth J, Desouki MM, Cheewakriangkrai C, Rodabaugh KJ, Kasyapa CS, Geradts J (2007):

Expression characteristics of prostate-derived Ets factor support a role in breast and prostate cancer progression.

Hum Pathol; 38(11), 1628-1638

Sood AK (2010):

PDEF and PDEF-induced proteins as candidate tumor antigens for T cell and antibody-mediated immunotherapy of breast cancer.

Immunol Res; 46(1-3), 206-215

Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E (1987):

Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate.

N Engl J Med; 317(15), 909-916

Stettner M, Kaulfuss S, Burfeind P, Schweyer S, Strauss A, Ringert RH, Thelen P (2007):

The relevance of estrogen receptor-beta expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment.

Mol Cancer Ther; 6(10), 2626-2633

Stewart CE, Rotwein P (1996):

Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors.

Physiol Rev; 76(4), 1005-1026

Suzuki F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S, Sasano H, Yaegashi N (2008):

Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma.

Cancer Sci; 99(12), 2365-2372

Taplin ME (2007):

Drug insight: role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer.

Nat Clin Pract Oncol; 4(4), 236-244

- Thelen P, Schweyer S, Hemmerlein B, Wuttke W, Seseke F, Ringert RH (2004):  
Expressional changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells.  
Int J Oncol; 24(1), 25-31
- Thelen P, Scharf JG, Burfeind P, Hemmerlein B, Wuttke W, Spengler B, Christoffel V, Ringert RH, Seidlova-Wuttke D (2005):  
Tectorigenin and other phytochemicals extracted from leopard lily *Belamcanda chinensis* affect new and established targets for therapies in prostate cancer.  
Carcinogenesis; 26(8), 1360-1367
- Thelen P, Strauß A, Stettner M, Kaulfuß S, Ringert RH, Loertzer H (2010):  
[Antiandrogen strategies in prostate cancer: reconstitution of oestrogen receptor beta].  
Urologe A; 49(9), 1124, 1126-1128, 1130
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE (1994):  
Nutritional regulation of the insulin-like growth factors.  
Endocr Rev; 15(1), 80-101
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, et al. (2005):  
Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.  
Science; 310(5748), 644-648
- Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, Wongvipat J, Smith-Jones PM, Yoo D, Kwon A, et al. (2009):  
Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer.  
Science; 324(5928), 787-790
- Venkataramani V, Rossner C, Iffland L, Schweyer S, Tamboli IY, Walter J, Wirths O, Bayer TA (2010):  
Histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits cancer cell proliferation via down-regulation of the alzheimer amyloid precursor protein.  
J Biol Chem; 285(14), 10678-10689
- Vis AN, Schröder FH (2009):  
Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 1: the androgen receptor and steroidogenic pathways.  
BJU Int; 104(4), 438-448
- Warner M, Gustafsson JA (2010):  
The role of estrogen receptor beta (ERbeta) in malignant diseases--a new potential target for antiproliferative drugs in prevention and treatment of cancer.  
Biochem Biophys Res Commun; 396(1), 63-66
- Weißbach L, Schaefer C, Heidenreich A (2010):  
[A paradigm shift. Defensive strategies for the treatment of localized prostate cancer in the new S3 guideline].  
Urologe A; 49(2), 199-205
- Welsbie DS, Xu J, Chen Y, Borsu L, Scher HI, Rosen N, Sawyers CL (2009):  
Histone deacetylases are required for androgen receptor function in hormone-sensitive and castrate-resistant prostate cancer.  
Cancer Res; 69(3), 958-966

Wirth MP, Hakenberg OW, Frohner M (2005):  
[Treatment of locally advanced prostate cancer].  
Urologe A; 44(11), 1295-1302

Woessner JF, Jr. (2001):  
That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3.  
J Clin Invest; 108(6), 799-800

Wolk A, Mantzoros CS, Andersson SO, Bergstrom R, Signorello LB, Laggiou P, Adami HO, Trichopoulos D (1998):  
Insulin-like growth factor 1 and prostate cancer risk: a population-based, case-control study.  
J Natl Cancer Inst; 90(12), 911-915

Wong ML, Medrano JF (2005):  
Real-time PCR for mRNA quantitation.  
Biotechniques; 39(1), 75-85

Xia Q, Sung J, Chowdhury W, Chen CL, Hoti N, Shabbeer S, Carducci M, Rodriguez R (2006):  
Chronic administration of valproic acid inhibits prostate cancer cell growth in vitro and in vivo.  
Cancer Res; 66(14), 7237-7244

Yu H, Rohan T (2000):  
Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression.  
J Natl Cancer Inst; 92(18), 1472-1489

Yu J, Yu J, Mani RS, Cao Q, Brenner CJ, Cao X, Wang X, Wu L, Li J, Hu M, et al. (2010):  
An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression.  
Cancer Cell; 17(5), 443-454

Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF, Jr. (2000):  
TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix.  
J Biol Chem; 275(40), 31226-31232

Yuan X, Balk SP (2009):  
Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration.  
Urol Oncol; 27(1), 36-41

## **Danksagung**

---

### **Danksagung:**

Herrn Prof. Dr. med. R.-H. Ringert möchte ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in seiner Abteilung ausführen zu können, danken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. rer. nat. P. Thelen, der die Durchführung der vorliegenden Arbeit ermöglichte und mich während der gesamten Zeit mit viel Engagement unterstützt hat. Vielen Dank für die stete Ansprechbarkeit und zahlreiche „AHA-Erlebnisse“. Du hast mein Interesse für experimentelle Laborarbeit geweckt und mir das wissenschaftliche Arbeiten nahe gebracht, Danke!

Vivek Venkataramani möchte ich herzlich für die Durchführung und Auswertung des Western Blots danken.

Danken möchte ich auch Marion Striepe und Nicole Putzer für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die Unterstützung mit vielen Tipps während der experimentellen Phase.

---