

Aus der Klinik für Urologie

(Prof. Dr. med. L. Trojan)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Zellexperimentell vergleichende Untersuchung zum Androgenrezeptor beim
kastrationsresistenten Prostatakarzinom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kerstin Meyer-Wilmes, geb. Mösinger

aus

Coburg

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in:

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Zellexperimentell vergleichende Untersuchung zum Androgenrezeptor beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hannover, den 31.01.2019

.....

(Kerstin Meyer-Wilmes, geb. Möisinger)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Prostatakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Früherkennung.....	2
1.1.3 Diagnostik.....	3
1.1.4 Klinik des Prostatakarzinoms	3
1.1.5 Klinische Pathologie des Prostatakarzinoms	4
1.1.6 Stadieneinteilung	4
1.1.7 Therapie	5
1.1.8 Nachsorge	8
1.1.9 Pathologische und molekularbiologische Grundlagen der Kanzerogenese.....	9
1.1.10 Molekularbiologische Entstehung des <i>CRPC</i>	10
1.2 Markergene.....	12
1.2.1 Androgenrezeptor (AR)	12
1.2.2 Östrogenrezeptor β (ER β)	13
1.2.3 PSA.....	15
1.2.4 <i>CYP17A1</i> und <i>AKR1C3</i>	16
1.2.5 <i>IGF</i> -Achse	17
1.2.6 <i>TMPRSS2-ERG</i>	18
1.2.7 <i>ARP</i> und <i>RPL</i>	19
1.3 Valproat / Valproinsäure (VPA).....	19
1.4 BCA	20
1.5 Fragestellung	20
2. Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Geräte.....	23
2.1.2 Chemikalien und Kits	24
2.1.3 Zelllinie.....	25
2.1.4 Nukleinsäure siRNA	25
2.1.5 Medien	26
2.1.6 Zellkulturartikel, Platten, Gefäße	26
2.1.7 Software	27
2.1.8 Die Zelllinie <i>VCaP</i>	27

2.2 Methoden.....	28
2.2.1 Zellkultur	28
2.2.2 Stimulationsversuch.....	29
2.2.3 RNA-Interferenz mit <i>siRNA</i>	29
2.2.4 RNA-Extraktion.....	30
2.2.5 RNA-Messung	31
2.2.6 <i>cDNA</i> -Synthese.....	32
2.2.7 <i>PCR</i>	33
2.3 Statistische Auswertung	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Humaner Androgenrezeptor (hAR).....	36
3.2 PSA.....	37
3.3 <i>ERβ</i>	39
3.4 <i>CYP17A1</i> und <i>AKR1C3</i>	40
3.5 <i>TMPRSS2-ERG</i>	42
3.6 ARV7 und ARV1	43
3.7 <i>IGF</i> -Achse	45
3.8 <i>RPL</i> und <i>ARP</i>	48
4. Diskussion.....	50
5. Zusammenfassung und Ausblick	59
6. Literaturverzeichnis	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Einzelne Schritte der Testosteronbiosynthese	16
Abbildung 2 Pipettieransatz für die Stimulationsversuche	29
Abbildung 3 Pipettieransatz für die <i>siRNA</i> -Versuche.....	30
Abbildung 4 Pipettieransatz für die <i>PCR</i>	35
Abbildung 5 Expressionsprofil des humanen Androgenrezeptors unter Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen Medium bzw. DMSO.....	36
Abbildung 6 Expressionsprofil des humanen Androgenrezeptors nach Behandlung mit <i>siRNA</i> gegen den Androgenrezeptor (<i>Arex 2/3</i>) im Vergleich zur Kontrollgruppe <i>siRNA</i> gegen die Luciferase (<i>siLuc</i>)	37
Abbildung 7 Expressionsprofil von PSA unter Stimulationsversuchen mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	38
Abbildung 8 Expressionsprofil von PSA nach Transfektion der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen Luciferase .	38
Abbildung 9 Expressionsprofil des <i>ERβ</i> nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	39
Abbildung 10 Expressionsprofil von <i>ERβ</i> nach Transfektion der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen Luciferase .	40
Abbildung 11 Expressionsprofil von CYP17A1 nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	41
Abbildung 12 Expressionsprofil von AKR1C3 nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	41
Abbildung 13 Expressionsprofil von <i>TMPRSS2-ERG</i> nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	42

Abbildung 14 Expressionsprofil von <i>TMPRSS2-ERG</i> nach Transfektion der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen Luciferase	43
Abbildung 15 Expressionsprofil von <i>ARV7</i> nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	44
Abbildung 16 Expressionsprofil von <i>ARV1</i> nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	44
Abbildung 17 Expressionsprofil von <i>ARV1</i> nach Transfektion der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen Luciferase .	45
Abbildung 18 Expressionsprofil von <i>IGFBP-3</i> nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	46
Abbildung 19 Expressionsprofil von <i>IGFBP-3</i> nach Transfektion der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen Luciferase	46
Abbildung 20 Expressionsprofil von <i>IGF-1R</i> nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	47
Abbildung 21 Expressionsprofil von <i>IGF-1R</i> nach Transfektion der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen Luciferase	47
Abbildung 22 Expressionsprofil des <i>Housekeeping</i> -Gens <i>RPL</i> nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO	48
Abbildung 23 Expressionsprofil des <i>Housekeeping</i> -Gens <i>ARP</i> nach Transfektion der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der <i>VCaP</i> mit <i>siRNA</i> gegen Luciferase	49

Abkürzungsverzeichnis

AA	Abirateronacetat
AAS	<i>Amino Acid Score</i>
<i>AKR1C1</i>	<i>Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C1</i>
AR	Androgenrezeptor
<i>ARP</i>	<i>Acidic Ribosomal Protein</i>
ARV	Androgenrezeptorvariante (Spleißvariante)
<i>ATCC</i>	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Bicalutamid
<i>BPH1</i>	<i>Benign prostatic hyperplasia (BPH) epithelial cell line 1</i>
<i>cDNA</i>	<i>Complementary DNA</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>CRPC</i>	<i>Castration-resistant prostate cancer</i>
<i>Ct</i>	<i>Cycle threshold</i>
CT	Computertomographie
<i>CYP7B1</i>	<i>Cytochrome P450 Family 7 Subfamily B Member 1</i>
<i>CYP17A1</i>	<i>Cytochrome P450 Family Steroid-17α-Hydroxylase</i>
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid

<i>DNA</i>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ERα</i>	<i>Estrogen receptor alpha</i>
<i>ERβ</i>	<i>Estrogen receptor beta</i>
<i>ERG</i>	<i>ETS-related gene</i>
ETS	E26 transformations-spezifisch
<i>FCS</i>	<i>Fetal calf serum</i>
<i>flAR/ ARFL</i>	<i>Full-length AR, ohne Mutationen (= Wildtyp AR)</i>
<i>FOXO3a</i>	<i>Forkhead box O3</i>
G1-Phase	Gap-Phase 1 im Zellzyklus
<i>GnRH</i>	<i>Gonadotropin-releasing-hormone</i>
H ₂ O	Wasser
hAR	Humaner Androgenrezeptor
<i>HDR</i>	<i>High dose rate</i>
<i>HSD3B1, 2</i>	<i>Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3beta-steroid delta-isomerase</i>
<i>IGF</i>	<i>Insulin-like growth factor</i>
<i>IGF-BP</i>	<i>IGF-Bindeprotein</i>
<i>IGF-R</i>	<i>IGF-Rezeptor</i>
<i>LDR</i>	<i>Low dose rate</i>
L-Glu	L-Glutamin

<i>LNCaP</i>	Zelllinie (<i>Lymph node cancer of prostate</i>)
Luc	Luciferase
<i>mRNA</i>	<i>Messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
pAR(S210)	Serin210-phosphorlierter Androgenrezeptor
<i>PCA</i>	<i>Prostate Cancer</i>
<i>PC-3</i>	<i>human prostate cancer cell line 3</i>
<i>PCA3</i>	<i>mRNA Prostate cancer biomarker</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PDEF</i>	<i>Prostate-derived ETS factor</i>
PIA	Proliferativ inflammatorische Atrophie
PIN	Prostatisch intraepitheliale Neoplasie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
<i>PUMA</i>	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
RALP	Roboter-assistierte laparoskopische radikale Prostatektomie
<i>RANKL</i>	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<i>RPL</i>	<i>Ribosomal protein</i>
<i>RPMI-Medium</i>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Reverse Transkription
<i>SCID</i>	<i>Severe combined immunodeficiency</i>

<i>siRNA</i>	<i>Small interfering RNA</i>
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus
<i>STR</i>	<i>Short tandem repeats</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>TMPRSS2</i>	<i>Transmembrane protease, serine 2</i>
TRUS	Transrektaler Ultraschall
<i>UICC</i>	<i>Union Internationale contre le cancer</i>
<i>VCaP</i>	<i>Zelllinie (Vertebrate cancer of prostate)</i>
VPA	Valproat
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
ZR	<i>Zymo research</i>

1. Einleitung

1.1 Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Prostatakrebs (*PCA*) ist die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern in Deutschland. Die Zahl der Neuerkrankungen ist über lange Zeit stetig gestiegen, nimmt seit 2010 (ca. 67.300 Erkrankte) jedoch leicht ab und lag im Jahr 2012 bei rund 63.700 Fällen. Im Gegensatz zur Erkrankungsrate ist die altersstandardisierte Sterberate seit etwa Mitte der 1990er Jahre rückläufig. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Prostatakrebs liegt zurzeit bei 93 %, allerdings treten Sterbefälle auch nach längerem Verlauf, etwa bedingt durch Rezidive, noch auf (Krebs in Deutschland 2011/2012 2015). Mit einer Mortalität von 12.676 Männern im Jahr 2010 (laut RKI) steht dieses Malignom trotzdem in der Statistik der Krebstodesfälle an dritter Stelle. Seit 1999 ist die Zahl jährlich neu auftretender Prostatatumoren um rund 50 % angestiegen (Krebs in Deutschland 2009/2010 2013). Diese Zahl lässt sich nicht zuletzt durch vermehrte Vorsorgeuntersuchungen und prostataspezifisches Antigen (*PSA*)-*Screenings* sowie eine durchschnittlich längere Lebenserwartung erklären. Dabei liegt das Erkrankungsalter im Mittel bei gut 70 Jahren (Krebs in Deutschland 2009/2010 2013). Bei 50 % aller über 80 Jahre alten Männer sind die klinisch symptomlosen, im Rahmen einer Autopsie entdeckten, so genannten latenten Prostatakarzinome nachweisbar. In etwa 15 % der Fälle zeigt sich bei einer transurethralen Resektion der Prostata bei adenomyomatöser Prostatahyperplasie ein inzidentes Prostatakarzinom (Fischer 2010). Das Prostatakarzinom entwickelt sich über viele Jahre hinweg. Als Präkanzerosen gelten Dysplasien, die mit einer proliferativen inflammatorischen Atrophie (*PIA*) einhergehen und zur prostatic intraepithelialen Neoplasie (*PIN*) fortschreiten können (Taichman et al. 2007). Die *PIN* ist Ursprung einer Prostatakarzinomzelle.

Der bedeutendste Risikofaktor ist das Alter. Aber auch Umwelteinflüsse und Ernährung spielen eine große Rolle. In Asien ist die Inzidenz des Prostatakarzinoms viel geringer als in der westlichen Welt. Dies wird heutigen Erkenntnissen nach auf die sojareiche asiatische Ernährungsweise zurückgeführt. Den im Soja enthaltenen Phytoöstrogenen (z. B. Genistein

als schwaches Östrogen mit *estrogen receptor beta* (*ERβ*)-Selektivität wird eine protektive Wirkung zugeschrieben (Schulz et al. 2003).

1.1.2 Früherkennung

Die Früherkennungsmaßnahmen richten sich an Männer ab dem 45. bzw. 40. Lebensjahr, insbesondere bei positiver Familienanamnese. Sowohl die digital rektale Untersuchung zur Diskriminierung suspekter Tastbefunde als auch die Bestimmung des PSA-Wertes im Blutserum sind Bestandteil dieser Untersuchung. Das PSA ist ein Glykoprotein, das von der Prostata gebildet und dem Ejakulat beigemischt wird. Dieses Protein fungiert als Enzym (Serinprotease) und verflüssigt das Ejakulat. Ein PSA-Wert von < 2 ng/ml sollte in einer Zeitspanne von zwei Jahren, ein PSA-Wert von < 1 ng/ml in einem Intervall von vier Jahren kontrolliert werden. Bei Werten > 2 ng/ml sollte ein Untersuchungsintervall von einem Jahr oder individuell auch kürzer eingehalten werden (Lilja et al. 2011). So gibt es aber auch altersadaptierte Grenzwerte nach Oesterling zu beachten, da die tolerablen Werte wegen der gutartigen Prostatavergrößerung im Alter höher sind (Kleer und Oesterling 1993). Wichtig ist auch die Beobachtung der Entwicklung des PSA-Wertes im Langzeitverlauf. Eine *PSA-velocity*, also ein Anstieg des Wertes von über 0,75 ng/ml pro Jahr ist als suspekt einzustufen (Carter et al. 1992). Das Verhältnis von Nutzen und Schaden für das *PSA-Screening* wird in den letzten Jahren vermehrt diskutiert. Ein erhöhter PSA-Wert ist keinesfalls spezifisch nur einem Prostatakarzinom zuzuschreiben. So kann er zum Beispiel auch Ausdruck einer Prostatitis oder einer benignen Prostatahyperplasie sein sowie durch eine digital rektale Untersuchung verursacht werden (Ornstein et al. 1997). Kritiker bemängeln also vielfach resultierende unnötige Stanzbiopsien bzw. eine Übertherapie von dadurch zufällig entdeckten Prostatakarzinomen, die klinisch nie symptomatisch geworden wären und auch die Lebenserwartung nicht beeinflusst hätten. Der PSA-Wert als Verlaufsparemeter in der Therapie des *PCA* hat jedoch einen unumstrittenen Stellenwert. Als neuer Tumormarker für das *PCA* hat sich in der Praxis in den letzten Jahren das *PCA3* (ProgensisTM-Test) etabliert. Dieser weitaus spezifischere Biomarker für ein Karzinom wird in der Klinik aus ökonomischen Gründen meist erst bei Patienten mit erhöhtem PSA-Wert angewendet. *PCA3* kann nichtinvasiv im Urin nachgewiesen werden und hat sowohl einen diagnostischen als auch einen prognostischen Stellenwert. So kann der Wert bei der Entscheidung helfen, eine Biopsie zu indizieren bzw. deren Ergebnis auch prognostizieren (Fernandez-Serra et al. 2015).

1.1.3 Diagnostik

Die Darstellungen zur Diagnostik und Therapie sowie die Nachsorgeempfehlungen richten sich nach der interdisziplinären S3-Leitlinie zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms (Leitlinienprogramm Onkologie 2016).

Um die Ätiologie eines suspekten Befundes im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen eindeutig zu klären, eignet sich am besten eine Stanzbiopsie der Prostata mittels eines transrektalen Ultraschalls (TRUS). Bei der Stanzbiopsie sollten in der Regel 10-12 Gewebezylinder entnommen werden (Eichler et al. 2006).

Bei folgenden Befundkonstellationen soll eine erneute Biopsie innerhalb von sechs Monaten empfohlen werden:

- ausgedehnte *High-Grade-PIN* (Nachweis in mindestens 4 Gewebeprobe(n));
- *atypical small acinar proliferation (ASAP)*;
- suspekter PSA-Wert bzw. PSA-Verlauf (Davidson et al. 1995; Iczkowski et al. 1998; Borboroglu et al. 2001).

Der TRUS kann auch als bildgebendes Verfahren eingesetzt werden. Hier können malignitätsverdächtige Areale direkt punktiert werden oder infiltratives Wachstum lokal fortgeschrittener Tumoren beurteilt werden.

Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren sollten im Rahmen der *Staging*-Untersuchung ein CT oder ein MRT der Beckenorgane bekommen, um die lokale Infiltration in Nachbarorgane und umliegende Gewebe besser beurteilen zu können. Prostatakarzinompatienten mit Knochenschmerzen oder weit fortgeschrittenem Tumorleiden sollten eine Knochenszintigraphie zum Ausschluss von Knochenmetastasen erhalten.

1.1.4 Klinik des Prostatakarzinoms

Das *PCA* verursacht in den frühen Stadien nur sehr selten Symptome. Erst in späteren Stadien werden manchmal Pollakisurie, Nykturie oder Hämaturie bemerkt. Bei Diagnosestellung sind die Tumoren oft schon metastasiert. Typischerweise streuen sie erst lymphogen in umliegende Abflussgebiete (obturatorisch, iliakal oder retroperitoneal) und breiten sich dann hämatogen in Form von Knochenmetastasen (besonders vertebral, costal) aus. Ist der Tumor bereits

vertebral metastasiert, sind Rücken- bzw. Knochenschmerzen die ersten Symptome, die häufig zur Diagnose führen. Aber auch eine unspezifische Klinik mit Nachtschweiß, Gewichtsverlust, unklarem Fieber, Anämie und Abgeschlagenheit können Anzeichen für ein *PCA* sein.

1.1.5 Klinische Pathologie des Prostatakarzinoms

Makroskopisch gesehen entwickelt sich das Karzinom meist in den Drüsenepithelien der peripheren Zone der Prostata. Als präkanzeröse, nichtinvasive Läsion, bei der die Basalmembran definitionsgemäß noch erhalten ist, wird die prostatistische intraepitheliale Neoplasie bezeichnet. Beim typischen *PCA* handelt es sich um ein multizentrisches Adenokarzinom. Histologisch erkennt man dicht aneinanderliegende Tubuli mit hellen Tumorzellen mit unterschiedlichem Wachstumsmuster (kribriform, glandulär oder anaplastisch). Gerade durch die Heterogenität des Wachstumsmusters hat sich der *Gleason-Score* (s. u.) in der Prognoseeinschätzung bewährt (Fischer 2010).

1.1.6 Stadieneinteilung

Auch das Prostatakarzinom wird nach den *Union Internationale contre le cancer (UICC)*-Kriterien in unterschiedliche Stadien eingeteilt. T beschreibt die Eindringtiefe des Tumors in das umliegende Gewebe. N beschreibt die Anzahl befallener Lymphknoten und M zeigt, ob bereits Fernmetastasen vorliegen.

Unter Stadium I versteht man ein lokal begrenztes Karzinom, Stadium II wird als lokal fortgeschritten bezeichnet, und ab Stadium III spricht man von einer fortgeschrittenen bzw. metastasierten Erkrankung.

Eine weitere Klassifikationsmöglichkeit zur Aggressivitätsbeurteilung des Tumors ist der speziell für das *PCA* entwickelte *Gleason-Score*. Dieser *Score* wird unter rein histopathologischen Gesichtspunkten gebildet. Die Zellpopulation, die am häufigsten vorkommt, wird hinsichtlich ihres Entdifferenzierungsgrads mit einem Zahlenwert von 1-5 beurteilt und mit dem Zahlenwert der entdifferenziertesten Zellpopulation addiert. Ein *Gleason-Score* von 2 beschreibt ein bisher wenig entartetes Gewebe eines Karzinoms, das dem der Prostata noch recht ähnlich ist. Mit dem Höchstwert 10 werden Gewebeproben beschrieben, deren Zellbild

völlig entdifferenziert ist. Mit dem so gebildeten *Gleason-Score* kann schließlich auch eine Aussage bezüglich des *Gradings* nach *World Health Organization (WHO)* gemacht werden. Der *Gleason-Score* ist als prognostischer Faktor beim *PCA* jedoch aussagekräftiger.

Für den Prognosefaktor entscheidend sind TNM-Stadium, *Gleason-Score* und PSA-Wert. Um eine genaue Prognoseeinschätzung abgeben zu können, z. B. bezüglich der 5-Jahres-Überlebensrate oder des Risikos des Lymphknotenbefalls gibt es verschiedene Nomogramme, in denen noch weitere Daten verarbeitet werden (Damm 2006).

1.1.7 Therapie

Das Therapieregime beim Prostatakarzinom reicht von OP, Bestrahlung, Chemotherapie über Medikamente zur Unterdrückung des Testosteronspiegels bzw. zur Androgenrezeptorblockade und wird individuell nach Stadium und Patient angewandt. Auch die Möglichkeit des *watchful waiting*, also einem reinen Beobachten des Tumors ohne den Einsatz medizinischer Therapien besteht. Diese Option bietet sich besonders für Patienten an, die sich in einem frühen, symptomlosen Stadium befinden und eine Lebenserwartung haben, die aufgrund hohen Alters oder anderer Grunderkrankungen unter 10 Jahren liegt. In diesen Fällen würde eine Therapie die Lebenserwartung nicht steigern.

Grundsätzlich sind zwei Behandlungskonzepte zu unterscheiden. Beim nichtmetastasierten Stadium ist der Behandlungsansatz ein kurativer, während das metastasierte *PCA* palliativ therapiert wird. Natürlich gibt es auch die Möglichkeit, ein nichtmetastasiertes *PCA* palliativ zu behandeln, wenn der Patient dies wünscht oder andere Faktoren wie Alter oder weitere Grunderkrankungen eine kurative Therapie nicht zulassen.

Therapie der Wahl beim nichtmetastasierten Karzinom ist häufig die radikale Prostatovesikulektomie. Bei dieser Operation wird die Prostata samt Kapsel und anliegender Samenbläschen komplett entfernt. Um das N-Stadium und damit das weitere Therapievorgehen bestimmen zu können, wird in der Regel zusätzlich eine pelvine Lymphadenektomie vorgenommen. Bei einem *PCA* mit niedrigem Risiko kann unter Umständen auf die Lymphadenektomie verzichtet werden. Handelt es sich um einen lokal begrenzten Tumor, kann nervenerhaltend bzw. nervenschonend operiert werden. Dies begünstigt eine postoperative Kontinenz- und Erektionserhaltung. Bei lokal fortgeschrittenen Befunden muss das Gefäß-Nervenbündel um die Prostata herum mit entfernt werden, was Inkontinenz und Impotenz zur Folge hat. Diese

Operation kann offen oder minimal-invasiv durchgeführt werden. In vielen Kliniken steht mittlerweile auch die Möglichkeit einer roboterassistierten laparoskopischen radikalen Prostatektomie (RALP) zur Verfügung. Vorteil des Operationsroboters für den Operateur ist hier die freie Beweglichkeit der Arbeitsinstrumente in allen drei Ebenen des Raumes, was insbesondere in den engen anatomischen Gegebenheiten des kleinen Beckens von Vorteil ist.

Anschließend wird, je nach Stadium und verbliebener Tumormasse, noch eine adjuvante Strahlentherapie empfohlen. Bei lymphknotenpositiven Karzinomen wird eine zusätzliche postoperative hormonablativ Therapie empfohlen. Die perkutane Strahlentherapie ist auch eine primäre Therapieoption beim nicht metastasierten *PCA*.

Aus strahlentherapeutischer Sicht gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten zur Behandlung. Bei der externen perkutanen Bestrahlung wird der Tumor fraktioniert nach einer 3-D-Planung des Tumors bestrahlt. Bei Patienten mit einem erhöhten Risikoprofil wird z. T. noch zusätzlich eine hormonablativ Therapie durchgeführt. Die weiteren Möglichkeiten sind *low dose rate (LDR)*- und *high dose rate (HDR)*-Brachytherapien. Bei einer Brachytherapie wird eine Strahlenquelle direkt in die Nähe des Tumors gebracht. Bei der *low-dose-rate*-Brachytherapie werden so genannte *seeds* (kleine, radioaktive Jodstifte) in die Prostata eingebracht, die dort verbleiben. Hier geben sie für ca. ein Jahr lokal eine niedrige Strahlendosis ab. Bei der *HDR*-Brachytherapie wird über eine anal eingeführt Strahlenquelle mit hoher Dosis fraktioniert bestrahlt. Diese Methode kann auch zusätzlich zur perkutanen Strahlentherapie angewendet werden, um deren Wirkung zu unterstützen.

Bei sehr frühen Stadien kann auch über die Strategie des *active surveillance* nachgedacht werden. Bei dieser aktiven Überwachung des Krankheitsbildes gilt es, durch regelmäßige Befundkontrollen den Patienten zu beobachten und erst wenn sich die Tumorbiologie verändert und auf einen Progress hindeutet, therapeutisch einzuschreiten. Diese Strategie ist klar von der *watchful waiting* Strategie abzugrenzen. Beim *active surveillance* handelt es sich um einen kurativen Ansatz, während beim *watchful waiting* nur auftretende Symptome palliativ behandelt werden. Laut den S3-Leitlinien von 2016 kommen nur bestimmte Patienten für eine *active surveillance*-Strategie in Frage: PSA-Wert ≤ 10 ng/ml; *Gleason-Score* ≤ 6 ; cT1c und cT2a; Tumor in ≤ 2 Stanzen; ≤ 50 % Tumor pro Stanze. Ebenso gibt es Vorgaben, bei denen die Beobachtungen abgeschlossen werden und sofort therapeutisch interveniert werden sollte. Dies ist der Fall, wenn sich die PSA-Verdopplungszeit auf weniger als drei Jahre verkürzt, sich der Malignitätsgrad auf einen *Gleason-Score* über 6

verschlechtert, Tumormasse in mehr als 2 von 10 bis 12 Stanzen nachgewiesen wird oder mehr als 50 % Tumor in einer Stanze nachgewiesen werden (Klotz et al. 2010; Bastian et al. 2009; Klotz 2012).

Bei einer Lebenserwartung von weniger als 10 Jahren gilt es auch hier die oben beschriebene Methode des *watchful waiting* mit dem Patienten zu diskutieren.

Ein Rezidiv, erkennbar an einem Wiederanstieg des PSA-Wertes nach radikaler Prostatovesikulektomie bzw. alleiniger Bestrahlung, oder ein bereits metastasiertes Karzinom können bis heute nur palliativ behandelt werden. Somit ergeben sich völlig andere, dem aktuellen Kenntnisstand entsprechende Therapieoptionen.

Bei einem Lokalrezidiv nach Bestrahlung gibt es noch die Option der *Salvage*-Prostatektomie. Diese ist allerdings nur für Patienten mit einem noch eher gut differenzierten Lokalbefund vorgesehen. Die postoperativen Ergebnisse bezüglich Kontinenz- und Erektionserhalt sind durch die strahlenbedingten Schädigungen des Gewebes deutlich schlechter als nach einer primären radikalen Operation (Nguyen et al. 2007).

Vom kastrationsresistenten Prostatakarzinom spricht man, wenn es zum Tumorprogress kommt, trotz suffizienter antiandrogener Therapie. Das kastrationsresistente Prostatakarzinom entsteht aus lokal fortgeschrittenen bzw. metastasierten Karzinomen. Diese wachsen immer noch androgenabhängig und werden in diesem fortgeschrittenen Stadium mittels chemischer Kastration durch *gonadotropin-releasing-hormone (GnRH)*-Analoga oder Antiandrogene behandelt. Dadurch kommt es im Tumor zum Zellzyklusarrest und zum Zelltod. Initial schlägt die Therapie meist gut an. Es kommt zur Tumorregression und zum Abfall des Serum-PSA. Nach durchschnittlich 2-3 Jahren fallen viele Patienten jedoch mit einem Wiederanstieg des PSA-Wertes sowie Tumorprogress auf. Die verbleibenden Zellen müssen also Mechanismen entwickelt haben, sodass auch minimale Androgenlevel zum Tumorprogress ausreichen (Lamont und Tindall 2011). In diesem Stadium spricht man vom kastrationsresistenten Prostatakarzinom, weil der Androgenrezeptor (AR) trotz niedrigem Hormonlevel oder vielleicht sogar hormonunabhängig aktiv bleibt. Der Tumor erhält also wieder oder immer noch die Wachstums- und Entartungsstimulation durch den AR (Knudsen und Penning 2010).

Bei symptomatischen Patienten mit einem metastasierten Karzinom gibt es laut S3-Leitlinie die im Folgenden beschriebenen palliativen Therapieoptionen, die sowohl einzeln als auch untereinander kombiniert möglich sind. Der Patient sollte in jedem Fall vorher über seine

palliative Situation aufgeklärt und Nebenwirkungen sowie Perspektiven der einzelnen Therapien explizit aufgezeigt werden.

Zum einen die Therapie mit *GnRH*-Analoge bzw. die Therapie mit Antiandrogenen, um die androgenabhängige Wachstumsstimulation am Androgenrezeptor zu unterdrücken und zum anderen die Chemotherapie mit Docetaxel plus Gabe von Steroiden (Dexamethason, Prednisolon, Prednison) (Berthold et al. 2008). Bei gutem Allgemeinzustand sollte eine kombinierte Hormon-Chemotherapie empfohlen werden. Seit der Zulassung von Docetaxel wurden vier weitere Mittel angemeldet, die einen Überlebensvorteil in randomisierten Phase-3-Studien gezeigt haben und mittlerweile zugelassen sind. Diese beinhalten Abirateronacetat und Enzalutamid, zwei Agenzien, die speziell entwickelt wurden, um die Androgenachse zu inhibieren: Sipuleucel-T zur Stimulation des Immunsystems und Cabazitaxel, ein Chemotherapeutikum. Diese Fülle an Behandlungsoptionen macht klinische Therapieentscheidungen auch in Zukunft immer komplexer (Beuzebec und Massard 2015). Noch vor 15 Jahren war die mittlere Überlebenszeit bei metastasiertem Prostatakrebs nicht höher als 12 Monate. Nach der Einführung von Docetaxel in die klinische Praxis im Jahr 2004 und den neusten Medikamenten wie Cabazitaxel, Abirateronacetat, Enzalutamid und Radium 223 hat sich die mittlere Überlebenszeit mit ca. 3 Jahren drastisch verbessert (Caffo 2015). Therapieentscheidungen werden aktuell durch *Liquid Biopsy*-Befunde erleichtert (Steinestel et al. 2015).

Um symptomatische Knochenmetastasen zu behandeln werden Bisphosphonate oder Anti-*RANKL*-Antikörper (Denosumab) eingesetzt. Auch die lokale perkutane Strahlentherapie hat zur Symptomkontrolle von Knochenmetastasen einen hohen Stellenwert.

1.1.8 Nachsorge

Laut S3-Leitlinie sollten nach der kurativ geplanten Therapie eines lokalen *PCA* die Nachsorgetermine innerhalb der ersten zwei Jahre vierteljährlich, in den darauffolgenden beiden Jahren halbjährlich und ab dem 5. Jahr einmal jährlich stattfinden. Hierbei kommt es neben dem aktuellen gesundheitlichen Befinden des Patienten vor allem auf den Verlauf des PSA-Wertes an, um ein eventuelles Rezidiv frühestmöglich zu erkennen. Unter hormonablativer Therapie sollten eine Anamnese und körperliche Untersuchung sowie eine Bestimmung des PSA-Werts alle drei bis sechs Monate erfolgen. Bei zwischenzeitlich auftretenden Symptomen müssen die Intervalle entsprechend verkürzt werden.

1.1.9 Pathologische und molekularbiologische Grundlagen der Kanzerogenese

Die allgemeinen pathologischen Eigenschaften eines malignen Tumors werden unter den folgenden sechs Merkmalen von Hannahan und Weinberg zusammengefasst:

- Selbstständige Angiogenese
- Resistenz gegenüber Apoptose
- Uneingeschränktes Replikationspotential
- Zellinvasion und Metastasierung
- Wachstumssignale werden vom Tumor selbst gesteuert
- Keine Reaktion auf Anti-Wachstumssignale von extern (Hanahan und Weinberg 2011)

All diese, im Vergleich zur normalen Zelle, veränderten Eigenschaften lassen sich durch genetische Aberrationen erklären. So kommt es zum Beispiel zur autokrinen Stimulation von Wachstumsfaktoren oder durch konstitutiv aktivierte Rezeptoren zur Selbststeuerung des Zellwachstums durch die Tumorzelle. Durch Aberrationen in den Tumorsuppressorgenen (s. u.) reagiert die Zelle auch nicht mehr auf externe Anti-Wachstumssignale (Knudsen und Penning 2010).

Bei der Tumorentstehung kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Wachstum und programmiertem Zelltod. Die Zelle verliert ihre Regulationsmechanismen bezüglich Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose. Grund hierfür können sowohl Genmutationen, als auch epigenetische Veränderungen sein. Die Genmutationen in Form von Punktmutationen, Translokationen oder Genamplifikationen können aus Protoonkogenen Onkogene generieren. Unter Protoonkogenen versteht man Gene, die physiologisch für z. B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren kodieren. Das AR-Gen steht beim Prostatakarzinom im Zentrum aller Therapieabwägungen. Durch eine *gain of function*-Mutation oder Deletionen entstehen hier Onkogene, deren Eigenschaft eine Daueraktivierung, auch ohne Androgene ermöglicht. Das bedeutet, dass es zu einem ungebremsten Wachstum der Zellen kommt. Bei den Tumorsuppressorgenen muss es hingegen zu einer *loss of function*-Mutation in beiden Allelen kommen, ehe die Eigenschaft des Gens antiproliferativ zu wirken, verloren geht. Diese Hypothese wird auch als *two hit*-Hypothese nach Knudson benannt. Laut Knudsons Theorie gibt es bei familiären Krebsarten (z. B. dem Retinoblastom) eine hereditäre Mutation eines Allels. Die Zweite wird dann erworben. Bei sporadischen Krebsformen müssen beide Mutationen erworben werden (Knudson 1996).

Unter epigenetischen Veränderungen, die zur Kanzerogenese beitragen, werden z. B. Veränderungen in der Histonacetylierung verstanden. Also Veränderungen, die nicht das Erbgut selbst betreffen, sondern die Regulation von Genexpression. Therapeutisch können diese Veränderungen durch Histondeacetylaseinhibitoren, z. B. Valproat, beeinflusst werden. In den letzten Jahren wurde auch vermehrt über den epigenetischen Einfluss von *Mikro-ribonucleic acid (RNA)* diskutiert, die die Transkription bestimmter Gene beeinflussen kann. Diese Regulation von Transkription bestimmter Gene kann heute mittels *small interfering RNA (siRNA)* nachgeahmt werden, allerdings nur in vitro.

1.1.10 Molekularbiologische Entstehung des CRPC

Das kastrationsresistente Prostatakarzinom entsteht aus lokal fortgeschrittenen bzw. metastasierten Karzinomen. Durch die therapeutische Blockade des Androgenrezeptors und herunterregulierte Androgensynthese im Prostatakarzinom kommt es zu Zelltod und Zellzyklusarrest im Tumor. Diese Situation setzt die verbliebenen Zellen einem Selektionsdruck aus, aus dem ein androgenunabhängiges Wachstum resultiert.

Mechanismen des Androgenrezeptors im kastrationsresistenten Prostatakarzinom (*castration-resistant prostate cancer, CRPC*), zusammengefasst aus dem Review Artikel „*Partners in crime*“ von K. Knudsen (Knudsen und Penning 2010):

A) Androgenrezeptor-Aberrationen:

- Deregulation durch Amplifikation und Überexpression der Androgenrezeptor-*messenger-RNA (mRNA)* mit entsprechend erhöhter Proteinexpression und Amplifikation des Rezeptors.
- Mutation in der Ligandenbindungsdomäne: Durch derartige Mutationen wird das Spektrum passender Liganden, die als Agonisten am Rezeptor wirken, erweitert. So können z. B. Progesteron, Östrogene und sogar ehemalige Antagonisten, wie Bicalutamid (BCA) als Agonisten wirken. Die Mutation im AR-T877A z. B. bewirkt eine Aktivierung des AR durch Flutamid (Knudsen und Penning 2010). Die Hormonentzugstherapie hat in diesen Stadien unter Umständen also sogar gegensätzliche Effekte hinsichtlich Tumormassenverkleinerung. Diese Mutationen werden als *gain of function*-Mutationen bezeichnet.

- Der Androgenrezeptor kann derart mutieren, dass er keine Ligandenbindungsdomäne mehr besitzt. Der Rezeptor ist dann häufig konstitutiv aktiviert, ohne dass eine Ligandenbindung nötig ist. Dies hat zur Folge, dass der Rezeptor auch nicht mehr durch nahezu alle gängigen Antagonisten gehemmt werden kann. Die sog. Spleiß-Varianten des AR entstehen aber zumeist nicht durch AR-Mutationen, sondern posttranskriptionell (s. u.).
- Posttranslationale Modifikation gilt auch als Feinabstimmung der Rezeptoraktivität. Durch Phosphorylierung des *Insulin like growth factors (IGF)* wird die Aktivität des Androgenrezeptors unabhängig von der vorhandenen Ligandenpräsenz verstärkt. Auch Onkogene können über Phosphorylierung aktiviert werden.

B) Androgenrezeptor-Co-Faktor-Modulationen:

- Co-Aktivatoren: Durch eine exzessive Co-Aktivator-Expression können die Androgenrezeptoren auch unter androgen-armen Bedingungen ausreichend aktiviert werden.
- Co-Repressoren: Funktionsverlust durch Herunterregulation. Durch die Co-Repressoren werden die Liganden aus der Bindungsstelle im Androgenrezeptorkomplex inaktiviert.

C) Intratumorale Ligandensynthese:

Der Tumor adaptiert sich an die Therapie mit *GnRH*-Agonisten, indem er selbst intrakrin und parakrin Androgene im Tumor synthetisiert.

D) Konstitutiv aktive Androgenrezeptorspleißvarianten (ARVs):

Diesen Spleißvarianten des AR fehlt die C-terminale-Ligandenbindungsdomäne, bedingt durch Exonausschluss und die Entstehung kryptischer Exons (Dehm et al. 2008; Lu et al. 2015).

Man findet sie sowohl im gesunden Prostatagewebe als auch im Prostatakarzinom. Die höchsten Konzentrationen wurden im *CRPC* gemessen (Watson et al. 2010). Die konstitutiven Spleißvarianten aktivieren den AR auch ohne Ligand und könnten daher wesentlich zur Entstehung des *CRPC* beitragen. Sie führen zum Tumorwachstum und Krankheitsprogress. Unter Androgenentzug steigt die Anzahl der Spleißvarianten akut an, während sie bei

Testosteronanstieg sinkt (Watson et al. 2010). In Studien wurden zahlreiche Spleißvarianten entdeckt, denen die Ligandenbindungsdomäne fehlt (Nagabhushan et al. 1996). In der Arbeit wurden ARV1 und ARV7 untersucht. Die Spleißvarianten fördern die Kastrationsresistenz, indem sie zusammen mit *full-length* AR (*flAR*) agieren. Der *flAR* entspricht dem Wildtyp AR. Das AR-Gen wird weiterhin für Transkriptionen benötigt (Watson et al. 2010).

Die Spleißvarianten können naturgemäß nicht durch Ligandenbindungsdomänen-abhängige Antagonisten wie Bicalutamid oder Enzalutamid blockiert werden, sodass ihre Hochregulation im *CRPC* eine große klinische Herausforderung darstellt (Knudsen und Penning 2010).

1.2 Markergene

In der Klinik hat sich das PSA als Markergen bereits etabliert. Auch das *PCA3* gewinnt an Bedeutung, wenn es darum geht zu entscheiden, ob ein auffälliger PSA-Wert mittels Stanze genauer abgeklärt werden soll. Weitere tumorspezifische Marker, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, werden im Folgenden beschrieben.

1.2.1 Androgenrezeptor (AR)

Der Androgenrezeptor ist ein nukleärer, ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor aus der Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Seine Liganden sind die Steroidhormone Testosteron und das durch die 5α -Reduktase im Prostatagewebe umgewandelte, fünffach affinere Dihydrotestosteron (DHT). Wenn kein Ligand an den Rezeptor gebunden ist, sorgen Hitzeschockproteine, so genannte Chaperone dafür, dass der Rezeptor als inaktives Homodimer im Zytoplasma erhalten bleibt. Bindet nun ein Ligand, erfolgt die Translokation in den Zellkern, und dort kommt es mit einem anderen Homodimer zur Dimerisierung und Bindung an das androgen-responsive Element der *Deoxyribonucleic Acid* (*DNA*). Dieser Komplex agiert als Transkriptionsfaktor und aktiviert oder inhibiert Transkriptionen um so zelluläre Signalwege der Androgene an der Prostatazelle über den aktivierten Androgenrezeptor zu übermitteln (Roy et al. 2001). Das Prostatakarzinom wächst zunächst androgen-abhängig. Das Mortalitätsrisiko steigt mit der Anzahl exprimierter Androgenrezeptoren. Schon bald hat sich deshalb der Androgenrezeptor als wesentliches therapeutisches Ziel herauskristallisiert. Die bereits oben beschriebene initial effektive antiandrogene Behandlung führt nach durch-

schnittlich 2-3 Jahren schließlich zum *CRPC*. Dieser nachhaltigen Androgenrezeptoraktivität liegen verschiedenste molekularbiologische Ursachen zugrunde, welche schlussendlich zum Versagen der antiandrogenen Therapie führen können.

1.2.2 Östrogenrezeptor β (ER β)

Vor mehr als einem halben Jahrhundert haben die Nobelpreisträger Huggins und Hodges den klinischen Nachweis erbracht, dass Hormone die Entwicklung von Prostatatumoren beeinflussen können. Ihre Ergebnisse legen nahe, dass Androgene Tumorwachstum beschleunigen und Östrogene es hemmen (Huggins et al. 1941; Christoforou et al. 2014).

Die Östrogenaktivität wird durch Östrogenrezeptoren (*ER*) vermittelt. *ER α* und *ER β* sind Mitglieder der Kernrezeptor-Superfamilie. *ER β* wird eine wachstumshemmende Rolle im Prostatagewebe zugeschrieben und wird als neues therapeutisches Target im Prostatakarzinom befürwortet (Christoforou et al. 2014; Kuiper et al. 1996). *ER β* wird auf dem Genlocus 14q22–24 kodiert (Enmark et al. 1997) und wird sowohl in stromalen, als auch in luminalen Epithelzellen der menschlichen Prostata exprimiert (Kuiper et al. 1996). *ER α* wird hauptsächlich im Stroma exprimiert (Christoforou et al. 2014; Fixemer et al. 2003).

ER β spielt eine wichtige Rolle im menschlichen Prostatakarzinom, da er das Fortschreiten des Karzinoms beeinflusst. Dies ist erkennbar anhand ausgeprägter Expression von Spleißvarianten während der Progressionsphase (Walton et al. 2009). Beim Menschen gibt es bislang fünf beschriebene Isoformen des *ER β* . *ER β 1*-, *ER β 2*-, *ER β 4*- und *ER β 5*-Isoformen sind in verschiedenen Zelltypen der normalen Prostata zu finden und sind während des Prostatazellzyklus unterschiedlich exprimiert (Christoforou et al. 2014; Hurtado et al. 2008).

Der Metabolismus des physiologischen Liganden von *ER β* : 3 β -Adiol-Aromatase wandelt Testosteron in Östradiol, welches von 5 α -Reduktase in Dihydrotestosteron überführt wird. DHT wird auf zwei Arten in 3 β -Adiol metabolisiert: 3-Keto-Reduktion von DHT zu 3 β -Adiol durch das Enzym *AKR1C1* (oder *AKR1C3*); oder alternativ: 3-Keto-Reduktion von DHT zu 3 α -Adiol durch *AKR1C2*, gefolgt von 3 α - zu 3 β -Hydroxysteroidepimerisation durch B17b-Hydroxysteroiddehydrogenase (17bHSD6). Anschließend wird 3 β -Adiol weiter metabolisiert zu Triolen durch *CYP7B1* (Christoforou et al. 2014).

3 β -Adiol wird als physiologischer Ligand des *ER β* erwogen (Baker 2013). Diese Hypothese wird gestützt von dem Fakt, dass *ER β* , durch 3 β -Adiol aktiviert, in die Regulation des AR in der Prostata der Wildtypmaus und in abgeschwächtes Epithelwachstum involviert ist (Weihua et al. 2001). Aktivierung von *ER β* durch 3 β -Adiol induziert Apoptose durch Hochregulation des proapoptotischen Faktors p53 und Hochregulation von Modulatoren der Apoptose (*PUMA*), ein Effekt der die Transkription von Faktor *forkhead box O3 (FOXO3a)* zur Folge hat (Christoforou et al. 2014; Dey et al. 2014).

Die abnormale Expression von Aromatase spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Prostata malignoms (Ellem und Risbridger 2010; Christoforou et al. 2014). Bemerkenswerterweise fungieren *AKR1C1*- und *AKR1C3*- Enzyme bereits als *Targets* in der Medikamentenentwicklung zur Behandlung des Prostatakarzinoms (Christoforou et al. 2014; Beranič et al. 2013).

ER β ist charakterisiert als wichtiger Mediator epithelialer Differenzierung in der menschlichen Prostata (Imamov et al. 2004). Zusätzlich scheint *ER β* antiproliferative Tätigkeiten zu haben, welche unabhängig sind von wechselnden systemischen Androgenkonzentrationen und der Aktivierung des *ER α* . Dies wurde bei Aromatase-*knock-out*-Mäusen, die mit *ER β* -spezifischen Agonisten behandelt wurden, im Versuch von McPherson et al. dokumentiert (McPherson et al. 2007).

Die Rolle von *ER β* in der Prostatakarzinomentstehung wurde durch Studien bestätigt, in denen *ER*-*knock-out*-Mäuse zum Einsatz kamen. *ER α* -*knock-out*-Mäuse entwickeln nach Testosteron- und/oder Östrogenbehandlung kein Prostatakarzinom, während Mäuse, denen der *ER β* -Rezeptor fehlt, Prostatakarzinome entwickeln, nachdem ihnen Sexualhormone zugeführt wurden (Ricke et al. 2008). Diese antiproliferative Rolle von *ER β* deckt sich auch mit immunhistochemischen Entdeckungen bei menschlichen Prostatakarzinomgewebeproben, die darauf schließen lassen, dass die *ER β* -Expression in höhergradigen Tumoren verloren gegangen ist (Gabal et al. 2007). Der *ER β* könnte also als prognostischer Faktor im Prostatakarzinom gesehen werden (Christoforou et al. 2014).

Es wurde eine neue Theorie bezüglich eines Rollentausches des *ER* während der Prostatakarzinogenese aufgestellt, die auf der Beobachtung von erhöhten *ER β* -Levels im *CRPC* basieren. Diese erhöhten Level sind auch mit einer niedrigeren Überlebensrate bei hormonnaiven Prostatakarzinomzellen verknüpft. Die Theorie legt nahe, dass in den frühen Phasen der Prostatakarzinomprogression der *ER β* die Rolle eines Tumorsuppressors hat und

sich dann zu einem Tumorpromotor wandelt. Es wird auch angenommen, dass der *ERβ*-Signalweg in hormonnaiven Prostatakarzinomzellen durch den Serin210-phosphorilierten Androgenrezeptor pAR (S210) vermittelt wird. Diese Beobachtung verliert allerdings an Bedeutung bei dem Denkansatz, dass im *CRPC* die Aktivierung der Genexpression vom AR übernommen wird, vermutlich aufgrund niedriger Androgenlevel. Der genaue Grund für diesen Wechsel ist noch nicht vollends verstanden, und die Bahn, die die Verbindung von pAR (S10) und *ERβ* in hormonnaiven Prostatakarzinomzellen triggert - falls eine existiert - ist aktuell noch unbekannt (Zellweger et al. 2013; Savoy und Ghosh 2013; Christoforou et al. 2014).

1.2.3 PSA

PSA wird in hohen Mengen in den luminalen Epithelzellen der Prostata gebildet und ist nicht oder nur in sehr geringen Mengen in anderen Geweben zu finden. Die PSA-Ausschüttung wird durch Androgene reguliert. Es wurden zwei Elemente im proximalen Promotor des PSA-Gens identifiziert, die auf Androgene ansprechen (Cleutjens et al. 1997).

Die PSA-Level sind in der normalen Prostata ca. 1.000.000-fach höher als im Serum. Normalerweise gelangt das PSA nur in das Serum, indem es in die prostatistische Extrazellulärflüssigkeit ausströmt. Während des Prostatakarzinomprogresses steigt der PSA-Level zunehmend an, aufgrund von Abweichungen in den duktalem Strukturen der Prostata durch neoplastische Epithelzellen. Diese wachsende entartete duktalem Struktur erlaubt es dem PSA, in den extrazellulären Raum und in die Zirkulation sezerniert zu werden (Stenman 1997).

Viele Studien haben den direkten Zusammenhang zwischen Serum-PSA-Werten und Tumorumfängen bewiesen. Dennoch ist der Wert unzuverlässig in der Vorhersage eines pathologischen Stadiums eines individuellen Patienten (Kleer und Oesterling 1993). Klinisch hat sich das Serum-PSA als Tumormarker etabliert, der besonders in der Vorsorge, der Therapiekontrolle sowie der Rezidivkontrolle seine Anwendung findet. Der Wiederanstieg des PSA-Wertes lässt sich meist auch als erstes klinisches Zeichen eines kastrationsresistenten Rezidivs werten.

1.2.4 *CYP17A1* und *AKR1C3*

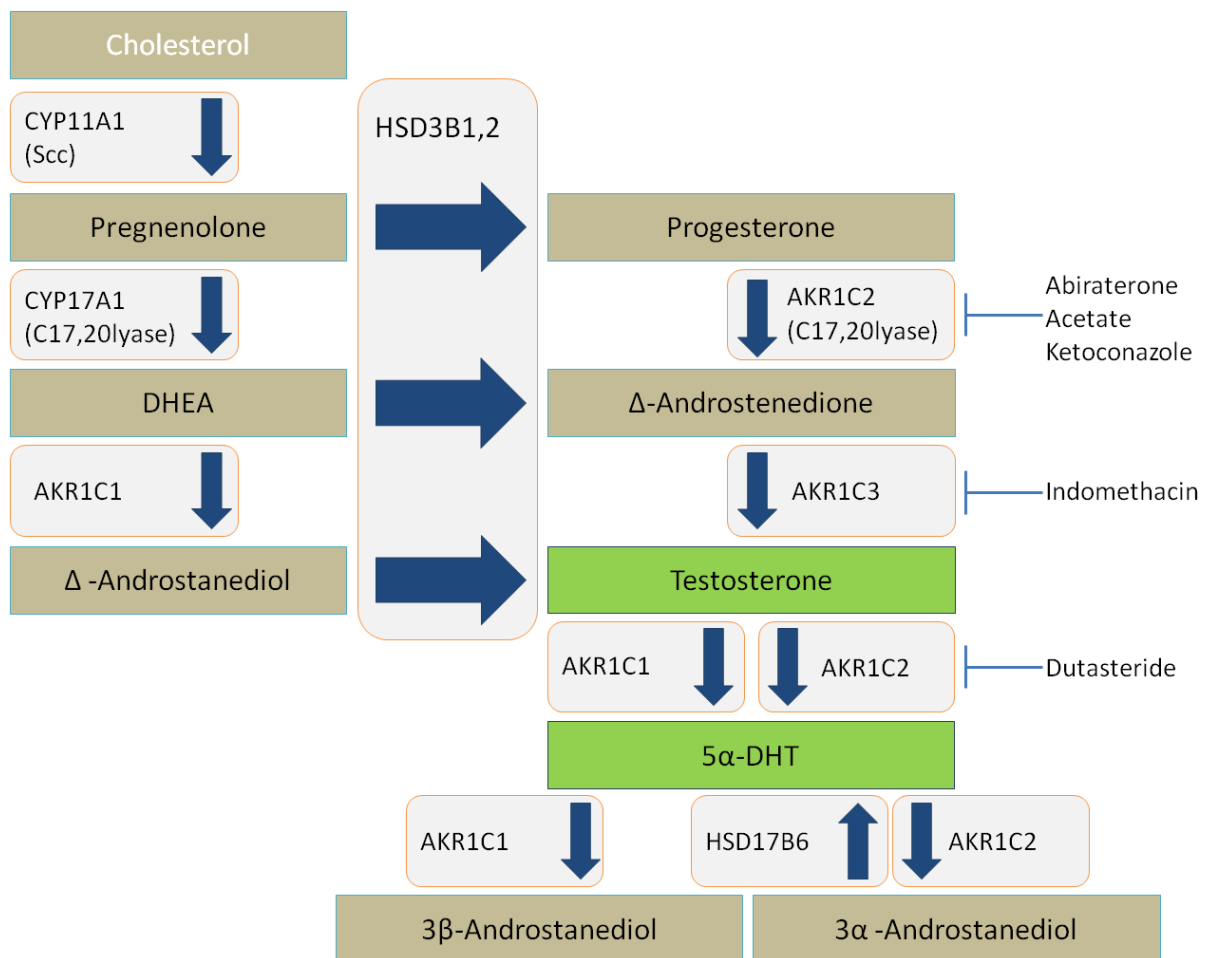


Abbildung 1 Einzelne Schritte der Testosteronbiosynthese

CYP17A1 (Steroid-17 α -Hydroxylase) und *AKR1C* (*Aldo-Keto Reductase Family 1, Member C*) sind Enzyme in der Androgenbiosynthese. *CYP17A1* katalysiert die Entstehung von Δ^4 -Androstendion aus Progesteron. Dieser Schritt kann medikamentös durch Abirateronacetat gehemmt werden. Aus Δ^4 -Androstendion werden schließlich Testosteron und das affinere Dihydrotestosteron gebildet (s. Abb. 1). Abirateronacetat ist ein steroidaler Androgen-Biosynthese-Inhibitor (Zhang et al. 2015). Abirateron, ein aktiver Metabolit, supprimiert die Androgenproduktion in Hoden, Nebenniere und Tumorgewebe, indem er selektiv *CYP17* (17 α -Hydroxylase/C17, 20-lyase) inhibiert (Fizazi et al. 2012).

Zur Erstlinienchemotherapie für Patienten mit hormonrefraktärem metastasierten Prostatakarzinom wird Docetaxel in Kombination mit Prednison oder Prednisolon eingesetzt. Das für die Zweitlinienchemotherapie in Kombination mit Prednison oder Prednisolon zugelassene Abirateronacetat zeigt bei Patienten mit Krankheitsprogression ein um 3,9 Monate ver-

längeres Gesamtüberleben im Vergleich zu Placebo mit Prednison. Dies zeigte die COU-AA-301 *double-blind*, Placebo-Kontroll-Studie Phase 3 von Fizazi et al., welche 2012 veröffentlicht wurde (Fizazi et al. 2012).

AKR1C3 katalysiert die Entstehung von Testosteron aus Δ^4 -Androstendion. Diese Reaktion kann durch Indometacin gehemmt werden. Eine Hemmung der Androgenbiosynthese spielt in der Therapie des *CRPC* eine wichtige Rolle. Es gilt jedoch zu beachten, dass es neben dem beschriebenen klassischen Biosyntheseweg auch noch einen bislang nicht vollends erforschten Umgehungsweg gibt, der von keinem der beschriebenen Medikamente beeinflusst wird: 3α -Androstanediol kann in 5α -Dihydrotestosteron umgewandelt werden und umgekehrt.

Neue bahnbrechende Therapien, die auf den Androgenrezeptorsignalweg im kastrationsresistenten Prostatakarzinom abzielen, beinhalten multifunktionale Androgenrezeptorblockaden und vollständigen Androgenentzug. Dennoch ist mit Einschränkungen hinsichtlich einer anhaltenden Wirksamkeit von neuen Medikamenten zu rechnen, da Resistenzmechanismen unter solchen Behandlungen zu erwarten sind. In der Studie von Bremmer et al. wurden sowohl *CRPC*-Zellmodelle *VCaP* und *LNCaP* verwendet als auch AR-negative- und nichtneoplastische Epithel *BPH1*-Zellen. Diese wurden mit Abirateronacetat (AA) behandelt. AA-Behandlung in AR-positiven Zellen führte zu einer verminderten Expression von androgenregulierten Genen, wie z. B. PSA. In diesen Zellen war eine verringerte Expression von androgenregulierten Zellen mit einer Hochregulation von *CYP17A1* begleitet. Solche Effekte konnten nicht in AR-negativen *PC-3*-Zellen gemessen werden. Durch eine Herunterregulation des Androgenrezeptors auf Gen-Ebene mittels *siRNA* konnte ebenfalls eine Hochregulation von *CYP17A1* gemessen werden, auch ohne Behandlung mit AA. Diese Ergebnisse zeigen eine sofortige Gegenregulation der *CYP17A1*-Expression wenn der AR adäquat gehemmt wird, aber keine andauernde Adaptation die zu einer Medikamentenresistenz führt (Bremmer et al. 2014).

1.2.5 IGF-Achse

Wachstumsfaktoren (*growth factors*) sind eine Gruppe von Peptiden, durch deren Signale die Zellen vom Zellzyklusarrest abgehalten werden. Diese Moleküle können in zwei Subgruppen klassifiziert werden: die "Kompetenzfaktoren", die es den Zellen ermöglichen in die G1-Phase zu starten, sowie die "Entwicklungsfaktoren" wie den *IGF*, die benötigt werden, um

von der G1-Phase in die Synthesephase im Zellzyklus (S-Phase) zu gelangen und letztendlich die Zellteilung zu ermöglichen (Samani et al. 2007). Die Überexpression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren ist in Malignomen weit verbreitet und trägt zu deren unkontrolliertem Wachstum bei.

Das *IGF*-System besteht aus zwei Liganden, *IGF-1* und *IGF-2*; drei Zellmembranrezeptoren, *IGF-1*-Rezeptor (*IGF-1R*) und *IGF-2*-Rezeptor (*IGF-2R*); und sechs hochaffinen *IGF*-Bindeproteinen (*IGFBP-1* bis -6) (Samani et al. 2007). Durch die Bindung von *IGF* an das Bindeprotein verlängert sich die Halbwertszeit von *IGF* und die Bindung an den Rezeptor wird reguliert.

IGF-1 wurde mit der Pathophysiologie von Diabetes mellitus, Osteoporose und Nierenerkrankungen in Zusammenhang gebracht. Es wird in jüngerer Zeit auch mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Brust- und Prostatakrebs assoziiert. Zusätzlich werden die Höhe des Serum-Spiegels von *IGFBP-3* invers und unabhängig von *IGF-1* mit dem Risiko für die Entwicklung eines Brust-bzw. Prostatakarzinom assoziiert (Kaklamani et al. 1999). *IGF-1* wirkt also proliferationsfördernd und antiapoptotisch.

IGFs induzieren Tumorzellmotilität via *crossstalk* zwischen der *IGF*-Achse und dem integrinen System. Es konnte gezeigt werden, dass *IGF-1R* und sein Hauptligand *IGF* Zell-Zell-Interaktionen beeinflussen können durch modulierende Interaktionen zwischen den unterschiedlichen *adherens junctions*. Verglichen mit äquivalentem normalen Gewebe, ist der *IGF-1R* im Tumor überexprimiert (Hellawell et al. 2002).

Die *IGF*-Achse scheint also an der Prostatakarzinompathogenese entscheidend mitzuwirken.

1.2.6 *TMPRSS2-ERG*

Ein weiterer genetischer Aspekt, der sich im Prostatakarzinom finden lässt, ist eine chromosomale Translokation die zur Fusion der Gene *TMPRSS2* (*Transmembrane protease, serine 2*) und *ERG* (E26 transformations-spezifisch (ETS)-*related gene*) führt. Dies hat nach aktuellem Forschungsstand weniger eine vermehrte Zellproliferation zur Folge als vielmehr einen aggressiveren Phänotyp des Tumors. Das ETS-verwandte Gen *ERG* ist der häufigste Fusionspartner für das androgen-regulierte *TMPRSS2*. Beide Gene sind auf dem Chromosom 21 lokalisiert und der häufigste Mechanismus der Fusion ist durch eine interstitielle Deletion

(Demichelis und Rubin 2007). Auf diese Weise wird nun auch der Transkriptionsfaktor *ERG* vom Androgenrezeptor kontrolliert.

Ein Modell, um die Folgen dieser Fusion zu zeigen, umfasst fünf morphologische Eigenschaften: blau gefärbtes Muzin, kribriiformes Wachstumsmuster, Makronucleoli, intraduktale Tumorausbreitung und Siegelzellring-ähnliche Zellen (Demichelis und Rubin 2007).

In einer aktuellen Studie von Merdan et al. wurde bereits eine klinische Anwendungsmöglichkeit erforscht. So konnte gezeigt werden, dass der *TMPRSS2-ERG*-Wert oder der *PCA3*-Wert aus dem Urin zur Entscheidungshilfe beitragen können, ob eine erneute Prostatabiopsie bei Patienten mit lokalem Prostatakarzinom, erhöhtem PSA-Wert und bereits erfolgter negativer Biopsie empfohlen werden sollte. Auf diese Weise könnten unnötige Re-Biopsien vermieden werden ohne die 10-Jahres-Überlebensrate signifikant zu verändern (Merdan et al. 2015).

1.2.7 *ARP* und *RPL*

Acidic ribosomal protein (ARP) und *ribosomal protein L (RPL)* werden als so genannte *Housekeeping*-Gene bezeichnet und dienen als Expressionskontrolle. *ARP* bzw. *RPL* sollten unter experimentellen Bedingungen weitestgehend konstant bleiben. Eine Erniedrigung weist auf höhergradige Zellschädigung hin. Auf diese Weise kann diskriminiert werden, ob die Erniedrigung eines Markergens aufgrund der experimentellen Methoden vorhanden ist oder ob es sich um eine rein artifizielle Erniedrigung, bedingt durch allgemeinen Zelluntergang, handelt (Rebouças de Lima et al. 2013).

1.3 Valproat / Valproinsäure (VPA)

Das gut verträgliche Antiepileptikum Valproat ist ein leistungsstarker Histondeacetylasehemmer. Histondeacetylase spielt eine wichtige Rolle in transkriptioneller Regulierung und Pathogenese von Krebs. Folglich sind Histondeacetylaseinhibitoren geeignete Medikamente in der Krebstherapie (Göttlicher et al. 2001). Durch seine Eigenschaft als Histondeacetylaseinhibitor hat Valproat eine epigenetische Wirkung. Die Wirkung bezieht sich also nicht auf die *DNA* selbst, sondern auf Proteine, die mit der *DNA* in Verbindung stehen und z. B. die Transkriptionsrate beeinflussen. In dieser Eigenschaft kann das Valproat

Apoptose induzieren und Angiogenese hemmen und somit antitumoral wirken (Hrebackova et al. 2010). Diese Proteine werden als Histone bezeichnet. Histone sind Eiweißmoleküle, um die die *DNA* gewickelt ist. Diesen Komplex nennt man Chromatin. Zwei Kopien von jedem Histonprotein H2A, H2B, H3 und H4 bilden zusammen ein Octamer, dass 145-147 Basenpaare an *DNA* um sich wickelt und als Nukleosom bezeichnet wird (Luger et al. 1997).

Histondeacetylasen sorgen für eine erhöhte Transkriptionsrate. Durch die Hemmung der Acetylierung wird die Transkriptionsrate und somit die Genexpression herunterreguliert. Valproinsäure unterdrückt die Aktivität der Histondeacetylase *in vitro*, höchstwahrscheinlich durch Bindung an das katalytische Zentrum der Histondeacetylase (Göttlicher et al. 2001). Dies führt zu oben genannten antitumoralen Effekten.

1.4 BCA

Bicalutamid ist ein nicht-steroidales Antiandrogen ohne sonstige endokrine Aktivität. Es bindet an den Androgenrezeptor, ohne die Genexpression zu aktivieren und hemmt somit den Androgenstimulus. Die Regression von Prostatumoren basiert auf dieser Hemmung. Zugelassen ist Bicalutamid laut Fachinformation entweder als alleinige Therapie oder adjuvant zur radikalen Prostatektomie oder Strahlentherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom mit hohem Progressionsrisiko oder zur Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem, nicht metastasierendem Prostatakarzinom, bei denen eine chirurgische Kastration oder eine andere medizinische Intervention nicht als geeignet oder akzeptabel erachtet werden (AstraZeneca AG 2018).

1.5 Fragestellung

Bis heute stellt die Behandlung des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms eine große Herausforderung dar. Hierfür standen in den letzten Jahren nur Androgenrezeptorantagonisten (z. B. Bicalutamid) sowie *GnRH*-Analoga (z. B. Buserelin) zur Verfügung. Der Wirkmechanismus der Androgenrezeptorantagonisten entsteht durch kompetitive Hemmung am Androgenrezeptor selbst. *GnRH*-Agonisten jedoch entziehen dem AR den Liganden, indem sie in den hypothalamisch-hypophysären Regelkreislauf eingreifen und so die Testosteronsynthese senken. Seit 2011 ist es jedoch zu einer revolutionären Erweiterung des Therapie-regimes um zwei zusätzliche Substanzklassen gekommen. Abirateron, dessen Enzym-

hemmung im Androgenbiosyntheseweg bereits oben beschrieben wurde und Enzalutamid (MDV 3100). Enzalutamid inhibiert die Androgen-Rezeptor-Signalkaskade auf drei Ebenen:

- 1) Inhibition der Bindung von Testosteron an den Androgen-Rezeptor
- 2) Inhibition der nukleären Translokation des Hormon-Rezeptor-Komplexes
- 3) Inhibition der Bindung des Liganden-Rezeptor-Komplexes an die *DNA*

Die Effekte können unter geeigneten Bedingungen letztlich zu vermindertem Wachstum der Karzinomzellen, zur Apoptose-Induktion und zur Tumorregression führen (Merseburger et al. 2015).

Nach initial erfolgreicher Therapie mit Antiandrogenen, unter der es durch die herunterregulierte Androgenrezeptorfunktion zur Tumorregression kommt, entsteht nach zwei bis drei Jahren ein erneuter Progress der Erkrankung, erkennbar unter anderem an einem Anstieg des PSA. Der Androgenrezeptor ist durch oben genannte molekularbiologische Mechanismen resistent geworden gegen die antiandrogene Therapie. Mehr noch: Der Androgenrezeptor hat sich dermaßen verändert, dass die Therapie nun sogar proliferativ auf den Tumor wirken kann.

Das Antiandrogen-Entzugssyndrom ist charakterisiert durch Tumorregression und einen Abfall des PSA-Wertes im Serum bei intermittierender antiandrogener Therapie. Dieses Phänomen wurde bereits vielfach beim Entzug von nichtsteroidalen Antiandrogenen wie Bicalutamid und Flutamid beschrieben, aber auch bei einer Vielzahl von hormonellen Mitteln. Mutationen, die in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen auftreten und durch Hormone einen partiell aktiven Androgenrezeptor induzieren, wurden als Hauptmechanismus in der Entstehung des Antiandrogen-Entzugssyndroms nahegelegt. Kortikosteroide, als Monotherapie oder in Kombination mit Abirateron, Docetaxel und Cabazitaxel können auch mit dem Antiandrogen-Entzugssyndrom assoziiert werden. Die Entdeckung der Phe876Leu-Mutation im Androgenrezeptor, die durch Enzalutamid ausgelöst wird, erhöht die Möglichkeit von Entzugsreaktionen auf neuartige Antiandrogene (Lorente et al. 2015).

Trotz der beschriebenen Resistenzmechanismen des AR auf die bislang entwickelten Therapieregime sollte bei den bislang erforschten Tumoreigenschaften weiterhin die Androgenrezeptorsignalkaskade Ziel der zu entwickelnden Therapiemöglichkeiten sein.

Die vorliegende Arbeit basiert auf zwei Versuchspfeilern. Als Modell dienen Zellversuche an der *VCaP*-Zelle. Diese Zelle zeichnet sich durch eine hohe AR-Amplifikation, das Vorkommen des Fusionsproteins *TMPRSS2-ERG*, sowie der konsekutiv aktiven AR-Spleißvariante ARV7 aus. Zum einen wird der Androgenrezeptor mittels *siRNA* physikalisch auf Proteinebene ausgeschaltet indem die Zellen mit *siRNA* gegen den AR transfiziert werden. Dies ist experimentell - so exakt - nur *in vitro* möglich. Die mutmaßlichen Anwendungen *in vivo* sind daher nur theoretisch zu diskutieren. Ein komplettes Ausschalten des Androgenrezeptors wäre die optimale Therapie des *CRPC*. Somit könnte das androgenabhängige Tumorstadium unterdrückt werden. Der andere Versuchspfeiler besteht aus Stimulationsversuchen. Einmal mit dem klassischen Antiandrogen Bicalutamid sowie mit dem Histondeacetylaseinhibitor Valproat. Bei letzterem soll die antiandrogene Wirkung über eine Hochregulation des Östrogenrezeptor β erreicht werden. Beobachtet werden Auswirkungen auf den Androgenrezeptor, Signalwege sowie androgenabhängige Proteinexpression. Hierfür werden die Markerexpressionen der *VCaP* mittels *polymerase chain reaction (PCR)* gemessen und dann untereinander verglichen und diskutiert. Folgende Fragestellungen sollen mithilfe dieser Promotion bearbeitet werden:

Therapieziel Androgenrezeptor:

Kann unter Valporat (VPA) eine suffiziente Suppression der Androgen-Signale beobachtet werden?

Gibt es im *CRPC* Anzeichen für Resistenzmechanismen gegen VPA?

Wie verhält sich VPA im Gegensatz zum klassischen Antiandrogen BCA?

Welche Effekte können unter einem *knock-down* der AR auf Expressionsebene mittels *siRNA* gegen den AR beobachtet werden?

Welche Effekte können mit VPA erzielt werden im Vergleich zur neuen Generation an Antiandrogenen wie AA?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Zellbank Heraeus LaminAir HA 2472 GS	Heraeus, Hanau
Zentrifuge LABOFUGE GL	Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe VACUMAT 100	Bachofer, Reutlingen
Zellkulturschrank CO ₂ INKUBATOR, Einstellung: 37 °C, 5 % CO ₂	Sanyo Electric Co., Ltd., Moriguchi, Japan
Lichtmikroskop LABOVERT	Leitz, Lindlar
Gefrierschrank -20 °C	
<i>Bioanalyzer</i> Agilent 2100 <i>bioanalyzer</i>	Agilent Technologies, Santa Clara USA
<i>Thermocycler</i> <i>Gene PCR System 2400</i>	Perkin ElmerWaltham, USA
<i>Real-Time-PCR</i> <i>MyiQ Single color Real-Time PCR Detection System, iCycler</i>	Bio-Rad, München

2.1.2 Chemikalien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
VPA (Valproat) 100 mM in Medium	Sigma Aldrich, Hannover
BCA (Bicalutamid) 10 mM in DMSO	Astra Zeneca, Wedel
DMSO (Dimethylsulphoxide HYPRI-MAX von SIGMA) 100 ml	Sigma Aldrich, Hannover
<i>Quick-RNA MiniPrep</i> ZR <i>RNA Buffer</i> 100 ml RNA <i>Pre-Wash Buffer</i> 100 ml RNA <i>Wash Buffer</i> 24 ml + 96 ml Ethanol DNase/RNase-free water 10 ml Zymo-Spin III C <i>Columns</i> <i>Collection Tubes</i>	Zymo Research (ZR) Europe, Irvine, USA
Agilent <i>RNA 6000 Nano Kit</i> <i>RNA Nano Chip</i> <i>Chip Priming Station</i> Spritze 1 ml Agilent <i>RNA 6000 Ladder</i> <i>RNA Nano DyeConcentrate</i> Agilent <i>RNA 6000 Nano Marker</i> Agilent <i>RNA 6000 Nano Gel Matrix</i>	Agilent Technologies, Santa Clara USA
Omniskript RT KIT 200 RT (4 <i>units</i> /μl) 50 μl <i>Random-Primer</i> StopRNase Inhibitor 250 μl Buffer RT 10x 150 μl dnTP-Mix 5 mM <i>each</i> 100 μl RNase-free water 1,9 ml	Qiagen, Hilden
SofastEvaGreenSybermix <i>Primer</i> (0,1 nmol/μl): TM_ERGa rv CCG TAG GCA CAC TCA AAC AAC GA TMPRSS2_RT fw CAG GAG GCG GAG GCG GA Se B-P fw CCC CAA GTC TCC CCA GTA TT Se B-P rv CAC GTC CAC CAC ATA GAT GC PSA fw TGA ACC AGA GGA GTT CTT GAC PSA rv CCC CAG AAT CAC CCG AGC AG PCA-3 fw CCG AGG GAG ACC AGG AAG AT PCA-3 rv ATC GAT GAC CCA AGA TGG CG IGF B-P fw GAA CTT CTC CTC CGA GTC CA IGF B-P rv CTG GGA CTC AGC ACA TTG AG hAR fw AGG AAC TCG ATC CTA TCA TTG C hAR rv CTG CCA TCA TTT CCG GAA hTERTvar1-2 fw GCT CTG CAG CCT GTG CTA CGG hTERTvar 1-2 rv GCC GGC ATC TGA ACA AAA GCC G ERb abc fw TTG CTG AAC GCC GTG ACC GA ERb abc rv CCT CGC ATG CCT GAC GTG GG ARP fw CGA CCT GGA AGT CCA ACT AC	Bio-Rad, München

ARP rv IGF1-R fw IGF1-R rv	ATC TGC TGC ATC TGC TTG CCG AAG GTC TGT GAG GAA GA AAT GGC GGA TCT TCA CGT AG	
PDEF <i>validated Primer</i> Kat.Nr. / ID: QT00073311, Hs SPDEF 1 SG <i>QuantiTect Primer Assay</i>		Qiagen, Hilden
Transfektionsreagenz <i>Oligofectamine reagent</i>		Invitrogen, Carlsbad, USA
Passagiermittel Trypsin EDTA		Lonza, Schweiz

2.1.3 Zelllinie

Bezeichnung	Hersteller
VCaP Zellen	LGC Standards GmbH, Wesel

2.1.4 Nukleinsäure siRNA

Bezeichnung	Hersteller
<p>Androgenrezeptor <i>siRNA</i> für vier verschiedene Exonbereiche: IBONI si-RNA 4-duplexes Flex 4x 5nmol si-RNA Arex 4 5`- AUU ACC AAG UUU CUU CAG CCC CC`-3 antisens 5`- GGG GGC UGA AGA AAC UUG GUA AU`-3 sens</p> <p>Arex2 5`-UUG AAG AAG ACC UUG CAG CCC CC`-3 antisens 5`-GGG GGC UGC AAG GUC UUC UUC AA`-3 sens</p> <p>Arex2/3 5`-ACU UCU GUU UCC CUU CAG CCC CC`-3 antisens 5`-GGG GGC UGA AGG GAA ACA GAA GU`-3 sens</p> <p>Arex7 5`-AUC UCU GCC AUC AUU UCC GCC CCC`-3 antisens 5`-GGG GGC GGA AAU GAU GGC AGA GAU`-3 sens</p>	Riboxx GmbH, Radebeul
Transfektionskontrolle <i>si-Luciferase (Luc) control duplex</i>	Eurogentec GmbH, Köln

2.1.5 Medien

Bezeichnung	Hersteller
RPMI-Medium: 10 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Österreich), 2 % <i>Amino Acid Score</i> (AAS) (Sigma Aldrich, Hannover), 1 % L-Glutamin (L-Glu)	Lonza, Schweiz
DHT-Medium (10-8)	Sigma Aldrich, Hannover
GIBCO OptiMem	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.6 Zellkulturartikel, Platten, Gefäße

Hersteller	Bezeichnung
Zellkulturflaschen 25 cm ² <i>Nunclon Surface</i>	Thermo Fisher Scientific Corp., USA
Reagenzgefäße BD <i>Falcon</i> 15 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pipetierpumpe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten 0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettierspitzen 10 µl Typ Gilson/Biohit von Biosphere (Sarstedt AG Nümbrecht), 100 µl Typ Eppendorf/Gilson von Biosphere (Sarstedt AG Nümbrecht), 1 ml SafeSeal-TipsPremium	Biozym, Hessisch Oldendorf
Serologische Pipetten 10 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht
Neubauer-Zählkammer Neubauer <i>Improved</i>	Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Reaktionsgefäße 3810X 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße <i>Multiply-Pro</i> Gefäß 0,2 ml, PP	Sarstedt AG, Nümbrecht
6-Well-Zellkulturplatte	Sarstedt AG, Nümbrecht

2.1.7 Software

Bio-Rad IQ	Bio-Rad, München
Software der Real-Time-PCR	
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, USA
Statistische Auswertung der Versuche, graphische Darstellung der Versuchsergebnisse	

2.1.8 Die Zelllinie VCaP

Die *VCaP* (*Vertebral Cancer of Prostate*) ist eine ursprünglich aus einem Menschen gewonnene Zelle aus einer vertebralen Metastase eines Patienten mit *CRPC*. Das Gewebe wurde in eine *Severe Combined Immunodeficiency*-Maus (*SCID*-Maus) xenotransplantiert und später in eine Zellkultur überführt (Korenchuk et al. 2001). Die *VCaP*-Zelllinie zeichnet sich nicht nur durch die Kastrationsresistenz aus, sondern auch durch einen hoch regulierten Androgenrezeptor und PSA-Sekretion. Des Weiteren findet sich auch hier das als Marker relevante androgenregulierte Fusionsprotein (*TMPRSS2-ERG*). Die *VCaP*-Zelllinie eignet sich aus genannten Eigenschaften besonders gut als experimentelles Modell für das *CRPC*, um Veränderungen in Expressionen *in vitro* zu untersuchen.

Daten der Firma *American Type Culture Collection* (*ATCC*) zur *VCaP*:

Organismus: *Homo sapiens*

Gewebe: Prostatakarzinom

Alter: 59 Jahre

Geschlecht: männlich

Ethnische Herkunft: Europäisch, (weiß)

Verdopplungszeit: etwa 53 Stunden

Morphologie: epitheliale Zellen

Wachstumseigenschaften: anhaftend

Kanzerogen: ja bei Nacktmäusen und *SCID*-Mäusen

Antigen Expression: positiv für Cytokeratin-18, PSA, *prostaticacidphosphatase* (PAP), Rb-Protein und p53-Protein

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Experimente werden an so genannten *VCap*-Zellen durchgeführt. Gezüchtet wird die Zelllinie in sterilen Zellkulturflaschen. Als flüssiges Kulturmedium wird 3 ml *Roswell Park Memorial Institute*-Medium (*RPMI*-Medium) pro Flasche eingesetzt. Das Nährmedium setzt sich folgendermaßen zusammen: 10 % fetales Kälberserum, 2 % AAS, 1 % L-Glutamin. Aufbewahrt im Zellkulturschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einem Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Gehalt von 5 % können die Zellen unter optimalen Bedingungen wachsen.

Das Medium wird mindestens einmal die Woche gewechselt und die Zellkultur bei entsprechender Dichte auf weitere Flaschen aufgeteilt. Hierfür wird das Medium abgesaugt und 2 ml Trypsin auf die am Boden der Flasche festgewachsenen Zellen gegeben. Nach einer 4-minütigen Inkubation im Zellkulturschrank haben sich die Zellen vom Boden der Flasche gelöst und schwimmen nun frei im Trypsin. Das Trypsin-Zell-Gemisch wird in ein konisches Röhrchen überführt. Um das Umgebungsmilieu für die Zellen zu verbessern, wird 2 ml *RPMI*-Medium zugegeben. Da die Zellen aber trotzdem auf Dauer den hohen Trypsinanteil in der Lösung nicht tolerieren würden, muss das Gemisch zentrifugiert werden, um die Zellen von ihrer wässrigen Phase zu trennen. Die 5-minütige Zentrifugation ergibt ein weißliches Zellpellet in der unteren Phase und ein wässriges Medium-Trypsin-Gemisch in der oberen Phase. Nur die wässrige Phase wird abgesaugt. Das Pellet muss im Röhrchen verbleiben und wird anschließend unter Zuhilfenahme einer Pipette mit frischem Medium durchmischt und auf mindestens 2 Zellkulturflaschen passagiert, sodass sich am Ende in jeder Flasche 3 ml Zell-Medium-Gemisch befindet. In den folgenden Stunden und Tagen werden die Zellen auf den Boden der Flasche absinken und dort festwachsen.

2.2.2 Stimulationsversuch

Die Zellen werden mit Valproat 5 mM und Bicalutamid 5 μ M stimuliert.

Um Kontrollwerte für die Stimulationsergebnisse zu erhalten, werden jeweils parallel auch *RPMI*-Medium und DMSO auf die Zellen gegeben. Im folgenden Experiment gilt das Medium als Kontrolle für das Valproat und das DMSO als Kontrolle für das Bicalutamid, da das Bicalutamid in DMSO gelöst ist.

Mithilfe der Neubauerzählkammer werden die Zellen gezählt und dann 300.000 Zellen pro *Well* in vier *Wells* einer 6-*Well*-Platte gegeben. Die Zellen sind für die folgende Stimulation empfänglicher, wenn sie zusätzlich DHT im Medium haben. Folglich werden die Zellen mit 2 ml DHT-*RPMI*-Medium bedeckt und für 24 Stunden in den Zellkulturschrank gestellt. Wenn die Zellen gut am Boden der *Wells* angewachsen sind, kann mit der Stimulation begonnen werden. Hierfür werden 1 μ l DMSO in *Well* 2, 1 μ l BCA in *Well* 4 und 100 μ l VPA in *Well* 3 gegeben (s. Abb. 2). Um die Konzentrationen exakt zu halten, werden die entsprechend zugegebenen Volumina vorher aus dem Medium entfernt. Nach 24 Stunden kann die *RNA* extrahiert werden.

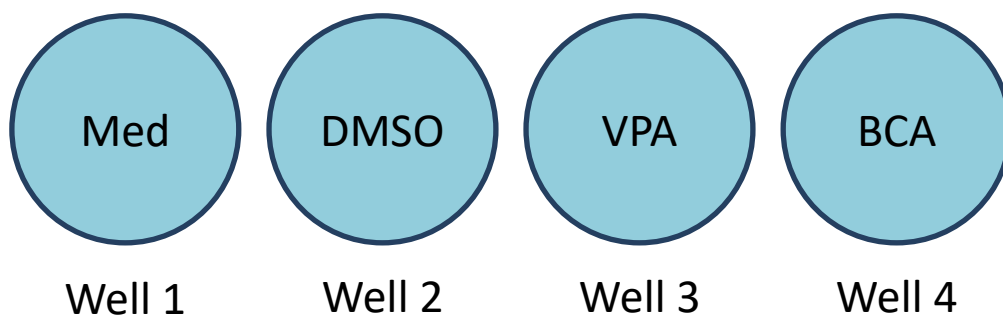


Abbildung 2 Pipettieransatz für die Stimulationsversuche

2.2.3 *RNA*-Interferenz mit *siRNA*

Bei der Methode der *RNA*-Interferenz wird durch sogenanntes *gene silencing* experimentell die Expression bestimmter Gene unterdrückt. Die Funktion eines bestimmten Gens kann also erforscht werden, wenn man das Gen ausschaltet. Die *siRNA*-Moleküle sind kleine Abschnitte

von Basenpaaren, die nicht für ein Protein kodieren, sondern sich komplementär an einem bestimmten *mRNA*-Genabschnitt anheften und auf diese Weise die Translation von diesem Abschnitt und somit die Proteinbiosynthese verhindern.

Die *siRNA* wird endogen in der Zelle gebildet und z. B. genutzt, um die Stabilität des Genoms zu gewährleisten. Die *siRNA* wird in der Forschung vor allem zur Funktionsanalyse bestimmter Gene verwendet. Indem das Gen ausgeschaltet wird, kann dessen Funktion erforscht werden. In den zugrunde liegenden Versuchen wird synthetisch hergestellte *siRNA* mittels Transfektion in die Zellen eingebracht.

Mit der Negativkontrolle (Luciferase) sollen unspezifische Effekte, die durch die Transfektion mit *siRNA* auftreten könnten, erkannt werden. Luciferase ist ein Enzym im Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Sie kommt im humanen Genom nicht vor und eignet sich daher als Kontrolle.

Das Vorgehen bei diesem Versuch unterscheidet sich in einigen Details vom Stimulationsversuch. Ausplattiert werden hier nur 100.000 Zellen auf alle 6 *Wells*. Bedeckt werden diese mit reinem *RPMI*-Medium. Der Zusatz von DHT ist nicht förderlich. Nach 24 Stunden werden die *siRNAs* zugegeben (s. Abb. 3). Als Kontrolle dient hier die Luciferase. Die *RNA*-Extraktion erfolgt ebenfalls nach 24 Stunden.



Abbildung 3 Pipettieransatz für die *siRNA*-Versuche

2.2.4 *RNA*-Extraktion

Für die Experimente eignet sich die *mRNA* besonders gut, da sie nur noch aus Exons besteht, also aus genetischem Material, das später auch für Proteine codiert. Um die *RNA* aus den Zellen zu extrahieren, wird das *RNA*-Isolierungs-Kit “*Quick-RNA MiniPrep*” von Zymo

Research verwendet. Vorteil dieses Kits ist, dass alle benötigten Substanzen und Reaktionsgefäße bereits RNase-frei geliefert werden.

Als erstes wird das Medium-Substanz-Gemisch aus den *Wells* abgesaugt. In jedes einzelne *Well* wird nun 600 µl ZR *RNA-Buffer* gegeben. Dadurch werden die Zellen lysiert, d. h. die *RNA* wird aus den Zellen freigesetzt, und noch vorhandene RNasen werden denaturiert. Das Lysat wird in eine Zymo-Spin IIC-Säule überführt und für die folgende Zentrifugation auf ein Sammelröhrchen gesteckt. Um nun die restlichen Zellbestandteile und den *Buffer* von der *RNA* zu trennen, wird die Säule plus Sammelröhrchen für eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Die Säule bindet die *RNA* und der abzentrifugierte Durchfluss im Röhrchen wird verworfen. Anschließend werden 400 µl *RNA Pre-Wash Buffer* auf die Säule gegeben und wieder eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Jetzt werden 700 µl *RNA Wash Buffer* auf die Säule gegeben. Mit der Zentrifugation und dem Durchfluss wird in oben beschriebener Weise verfahren. Dieser Schritt wird noch einmal mit 400 µl *RNA Wash Buffer* wiederholt. Um sicher den kompletten *Wash Buffer* von der *RNA* zu trennen, werden die Säulen noch einmal für zwei Minuten ohne Zugabe einer weiteren Substanz in den leeren Sammelröhrchen zentrifugiert (13.000 g). Nun wird die Säule auf ein 1,5 ml großes RNase-freies Reaktionsgefäß gesetzt und 30 µl DNase/RNase-freies Wasser (H₂O) direkt auf die Matrix der Säule gegeben. Nach einer Minute bei Raumtemperatur befindet sich die *RNA* im Reaktionsgefäß und wird bei -20 °C eingefroren.

2.2.5 RNA-Messung

Der *RNA*-Gehalt wird mit dem Agilent 2100 *bioanalyzer* gemessen. Vorbereitend wird ein so genanntes Gel hergestellt, indem 550 µl *RNA 6000* Picogelmatrix in einen Rotationsfilter gegeben und dann bei 1.500 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Auf 65 µl Gel wird nun 1 µl Farbstoffkonzentrat gegeben. Der *RNA 6000* Pico Chip wird nun, wie in der Hersteller-Anleitung beschrieben, mit *RNA*, *RNA 6000* PicoConditioning Solution, *RNA 6000* Picomarker, *ladder* und dem Gel-Farbstoff-Konzentrat beladen. Die Chips enthalten kleine untereinander verbundene Kanalsysteme, mit denen die einzelnen *RNA*-Stücke elektrophoretisch größenabhängig separiert werden.

2.2.6 *cDNA*-Synthese

Die *RNA* wird nun mithilfe der reversen Transkription (RT) in *complementary DNA (cDNA)* umgeschrieben. Dies ist nötig, da die *PCR* nur mit *DNA* funktionieren kann. Da diese *cDNA* zur *mRNA* komplementär ist, enthält sie ebenso nur Exons.

Umgeschrieben werden je nach *RNA*-Ausbeute 250 oder 500 ng *RNA*/ml. Verwendet wird hierfür das Omniskript-Kit, welches unter anderem eine Reverse Transkriptase als Polymerase und einen *Random-Primer* als *Start-Primer* enthält. Die *RNA* und die Reverse Transkriptase werden auf Eis gelagert. In 0,2 µl-Reaktionsgefäßen wird eine *RNA*-Konzentration von 250 bzw. 500 ng/ml für eine Menge von 14,2 µl pro Reaktionsgefäß gemischt und im *Thermocycler* auf das Temperaturoptimum (37-42 °C) der anschließend zugegebenen Enzyme erwärmt.

Nun wird der *Mastermix* pipettiert. Der Pipettieransatz für 6 Reaktionsgefäße sieht folgendermaßen aus:

- 12 µl 10 x RT *Buffer*
- 12 µl dNTPs
- 6 µl Reverse Transkriptase
- 3 µl *Random-Primer*
- 1,8 µl StopRNase Inhibitor

Vom *Mastermix* werden 5,8 µl in jedes Reaktionsgefäß pipettiert, sodass dann die reverse Transkription unter optimalen Temperaturen im *Thermocycler* stattfinden kann.

Der *Random-Primer* bindet an unterschiedlichen Stellen an die *RNA*, von denen ausgehend dann die Polymerase den komplementären Strang transkribiert. Anschließend zerstört die RNase Stück für Stück Teile der *mRNA*, die von der Polymerase komplementär zum synthetisierten *cDNA*-Strang nachgebildet werden. Dieser Vorgang dauert an, bis die *mRNA* komplett aufgebraucht und durch einen *cDNA*-Strang ersetzt ist.

Die fertigen 20 µl *cDNA* werden 1:5 mit DNase- und RNase-freiem Wasser verdünnt.

2.2.7 PCR

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion werden die zu untersuchenden Genabschnitte amplifiziert. Die Reaktion besteht grundsätzlich aus drei Schritten:

- 1) Denaturierung
- 2) *Annealing*
- 3) Elongation

Diese Schritte werden dann in 60 Zyklen nacheinander wiederholt. Um die Reaktion stattfinden zu lassen benötigt man unterschiedliche Zusätze deren Bedeutung im Folgenden erläutert wird: *DNA*, *Thermus aquaticus* (*Taq*)-Polymerase, Nukleotide (dNTPS), *Primer* und Wasser. Bei der Denaturierung erhitzt sich der *Thermocycler* auf 90 °C. Bei dieser Temperatur brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren und die *DNA* liegt in Einzelsträngen vor. In der *Annealing*-Phase lagern sich die *Primer* an. Die *Primer* sind Oligonukleotide, deren *DNA*-Sequenz exakt komplementär zu einer bestimmten Stelle der zu amplifizierten *DNA* ist. Ziel ist es, dass die *Primer* so an die *DNA* binden, dass sie den zu vervielfältigenden Genabschnitt flankieren. Dafür bindet ein *Primer* an den einen Einzelstrang und der andere an den andern Einzelstrang. Die *Annealing*-Temperatur, die am *Thermocycler* eingestellt wird, hängt vom Schmelzpunkt der *Primer* ab. Im durchgeführten Experiment betragen diese 55 °C, 60 °C ,61 °C oder 62 °C. In der Elongationsphase bindet die *Taq*-Polymerase an die *Primer* und beginnt mit der *DNA*-Replikation des entsprechenden Abschnitts. Die *Taq*-Polymerase ist eine hitzebeständige *DNA*-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, das in heißen Quelle wächst, isoliert wird. Das Temperatur-optimum dieses Enzyms beträgt 72 °C und wird vom *Thermocycler* dementsprechend reguliert. Es ist wichtig eine solche hitzebeständige *DNA*-Polymerase zu benutzen, da sonst das Enzym bereits in der Denaturierungsphase ebenfalls denaturieren würde. Die Menge an amplifizierter *DNA* wächst von Zyklus zu Zyklus exponentiell. Um eine quantitative Aussage über den *DNA*-Zuwachs und die tatsächliche Menge treffen zu können, wird in diesem Experiment eine *Real-Time-PCR* durchgeführt. Darunter versteht man die oben beschriebene Methode in Kombination mit einer Fluoreszenzmessung. Der fluoreszierende Farbstoff (hier *SYBR Green*) bindet an amplifizierte *DNA* und gibt so, analog zur entstehenden *DNA*-Menge, ein exponentiell zunehmendes, fluoreszierendes Signal ab, das über Detektoren im *Thermocycler* aufgenommen und umgerechnet wird (Hunt 2013).

Um die *Real-Time-PCR* durchzuführen wird als erstes ein so genannter *Mastermix* pipettiert. Der Pipettieransatz für 5 Proben sieht folgendermaßen aus:

- 50 μ l SybermixSsofast
- 1,2 μ l *Primer forward*
- 1,2 μ l *Primer reward*
- 23 μ l H₂O

Der Sybermix enthält die *Taq*-Polymerase und die vier Nukleotide Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin in je gleichen Mengen. Für die Reaktion müssen sie als Desoxynukleosidtriphosphate vorliegen. Gelöst sind diese Zusätze in einem speziellen Puffer, der bei der Reaktion für einen optimalen pH-Wert und entsprechende Elektrolytkonzentrationen sorgt.

Der *Mastermix* wird also für jedes zu untersuchende Gen mit den spezifischen *Primern* in jeweils ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Anzahl der *Mastermix*-Ansätze sind nun äquivalent zur Anzahl der zu untersuchenden Gene. Die fünf Proben entsprechen im Stimulationsversuch der Mediumkontrolle, der DMSO-Kontrolle, dem Valproatansatz, dem Bicalutamidansatz und der Negativkontrolle für die *PCR*. In der Negativkontrolle befindet sich statt *cDNA* H₂O. Für jedes Gen wird ein *Epi-Strip*, das fünf Probengefäße enthält, mit 15 μ l des jeweiligen *Mastermix* beladen. Anschließend werden je 5 μ l der Proben *cDNA* entsprechend der Abb. 4 in die *Epi-Strips* gegeben.

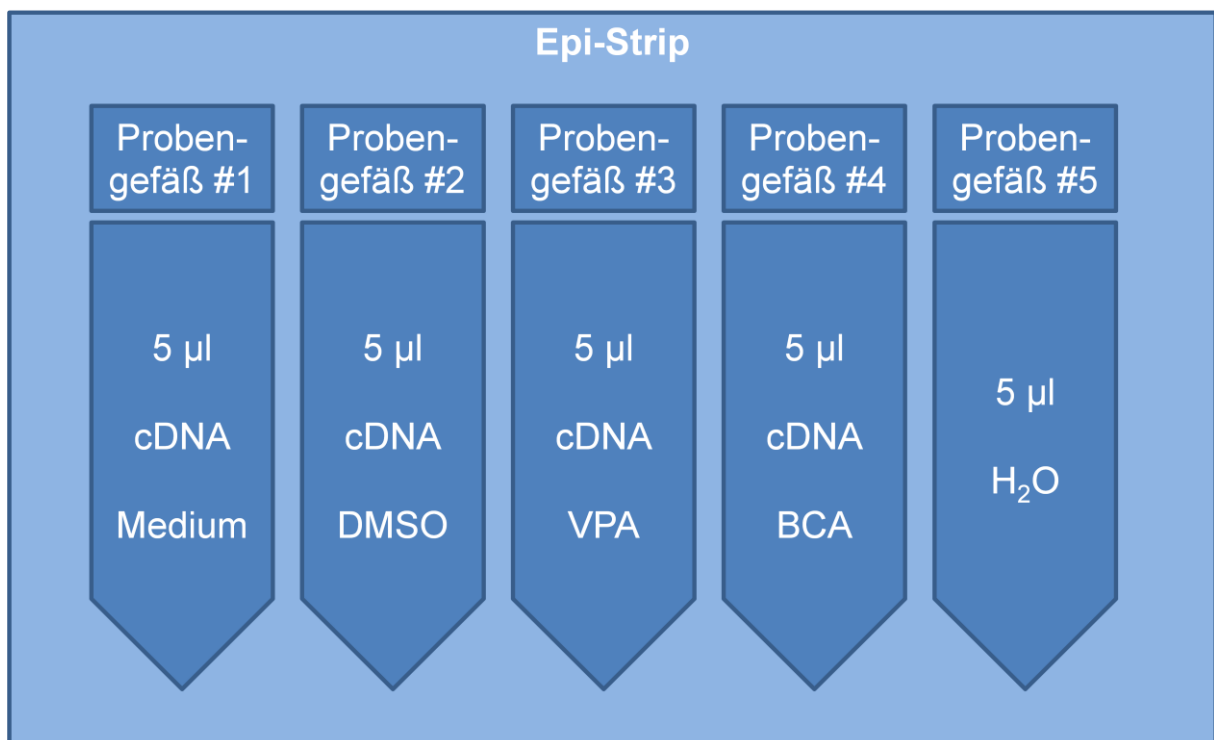


Abbildung 4 Pipettieransatz für die PCR

Der *Thermocycler* wird mit den *Epi-Strips* beladen, die die gleiche *Annealing*-Temperatur besitzen und entsprechend programmiert. Über das Programm Bio-Rad IQ können die Ergebnisse anschließend auch graphisch dargestellt werden.

2.3 Statistische Auswertung

Jeder Versuch wurde als Triplet einer Reihe durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit zufälliger Ausreißer zu minimieren. Der *Ct*-Wert (*Cycle threshold*) beschreibt als theoretische Größe den Anfang des exponentiellen Wachstums. Die Konzentration an *mRNA* eines Proteins zum Zeitpunkt des *Ct*-Wertes wird für die Auswertung logarithmiert. Diese Werte gehen in die Statistik ein.

Die statistische Auswertung und eine graphische Darstellung mittels Balkendiagrammen wurden mit der Statistiksoftware GraphPad PRISM 7.1 durchgeführt.

Für die Berechnung des p-Wertes wird ein ungepaarter parametrischer T-Test mit einem 95 %-igen Konfidenzintervall durchgeführt. Es wird davon ausgegangen, dass die experimentellen Ergebnisse normalverteilt sind. Diese Hypothese wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests, ebenfalls durch GraphPad PRISM 7.1 bestätigt.

3. Ergebnisse

3.1 Humaner Androgenrezeptor (hAR)

Im Stimulationsversuch konnte weder unter Stimulation mit VPA noch unter Stimulation mit BCA eine signifikante Veränderung in den Expressionslevel des hAR gemessen werden. Tendenziell scheint der hAR im Vergleich zu den Kontrollgruppen bei den Reagenzien sogar vermehrt exprimiert zu werden. Eine signifikante Erhöhung konnte jedoch nicht festgestellt werden (s. Abb. 5).

Bei der Transfektion der *VCaP* mit *siRNA* gegen den hAR kann hingegen eine signifikante Verringerung der Expression des hAR gemessen werden und zur Funktionsanalyse der AR-Expression eingebunden werden (s. Abb. 6). In den nachfolgenden Abbildungen werden signifikante Expressionsveränderungen folgendermaßen gekennzeichnet: *= $p < 0.05$, **= $p < 0.005$ und ***= $p < 0.0005$.

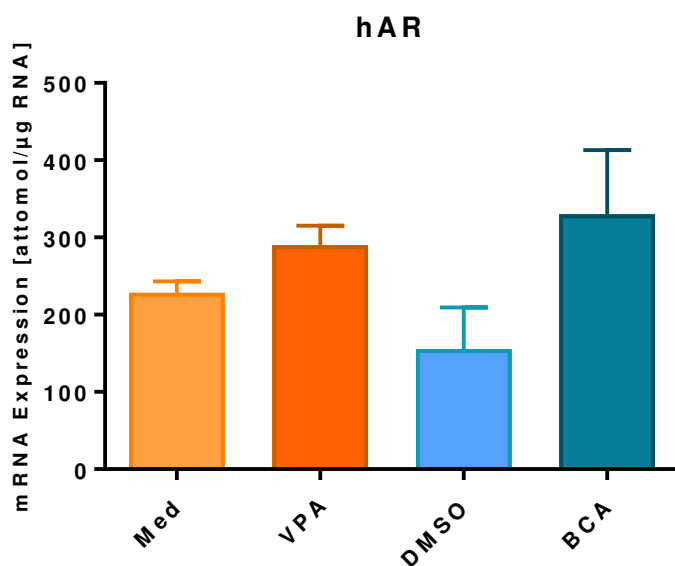


Abbildung 5 Expressionsprofil des humanen Androgenrezeptors unter Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen Medium bzw. DMSO

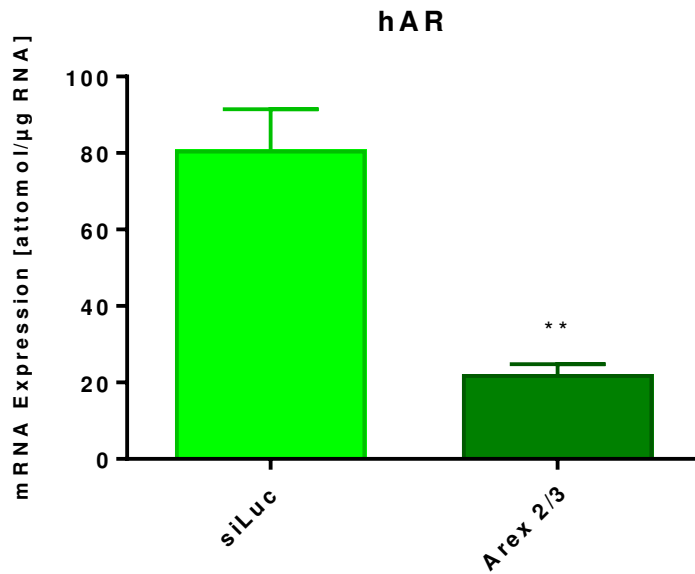


Abbildung 6 Expressionsprofil des humanen Androgenrezeptors nach Behandlung mit *siRNA* gegen den Androgenrezeptor (Arex 2/3) im Vergleich zur Kontrollgruppe *siRNA* gegen die Luciferase (*siLuc*)

3.2 PSA

Das androgenregulierte PSA wird unter der Behandlung mit VPA signifikant weniger exprimiert. Bei der Stimulation mit BCA kann keine signifikante Senkung der PSA *mRNA* gemessen werden (s. Abb. 7). Auch beim *siRNA*-Versuch, kann trotz signifikanter Senkung der AR-Expression kein signifikanter Abfall im PSA-Expressionsniveau gemessen werden. Tendenziell scheint jedoch auch hier die Expression von PSA abzufallen (s. Abb. 8).

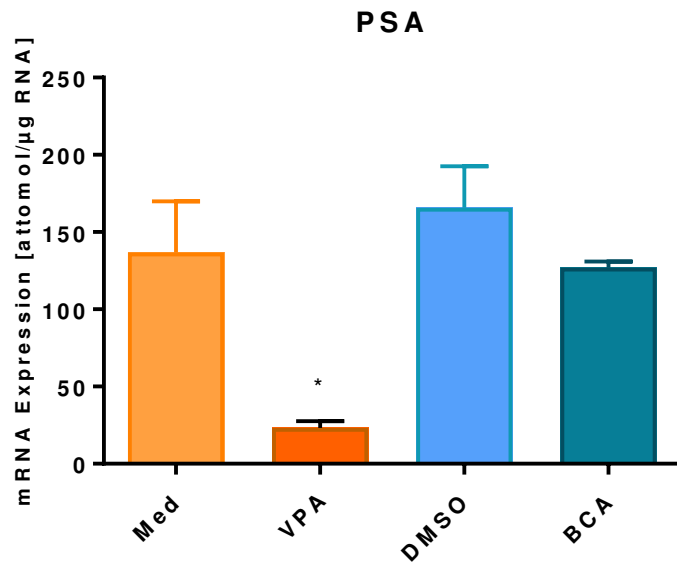


Abbildung 7 Expressionsprofil von PSA unter Stimulationsversuchen mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

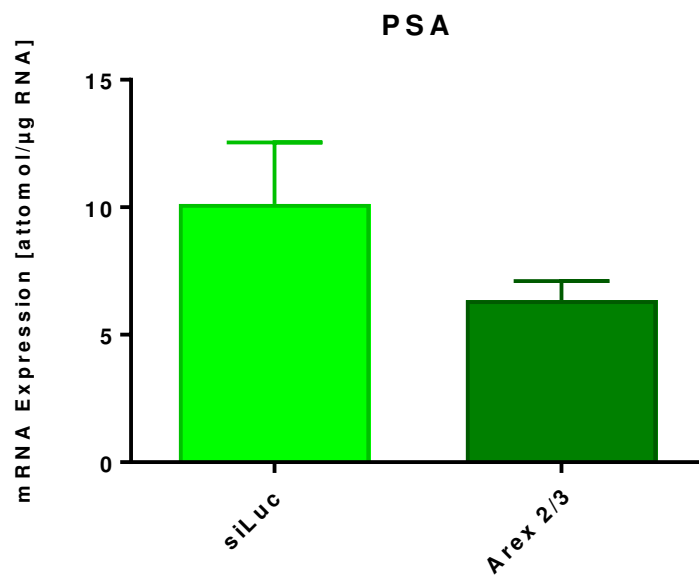


Abbildung 8 Expressionsprofil von PSA nach Transfektion der VCaP mit siRNA gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der VCaP mit siRNA gegen Luciferase

3.3 *ERβ*

Weder im Stimulationsversuch, noch im *siRNA*-Versuch konnte das Expressionslevel des *ERβ* signifikant beeinflusst werden. Auch wenn unter VPA tendenziell ein Anstieg zu beobachten ist (s. Abb. 9 und 10).

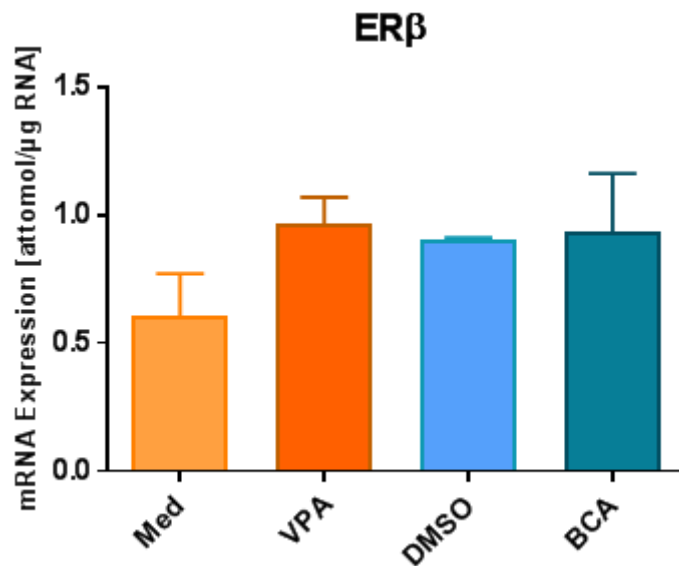


Abbildung 9 Expressionsprofil des *ERβ* nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

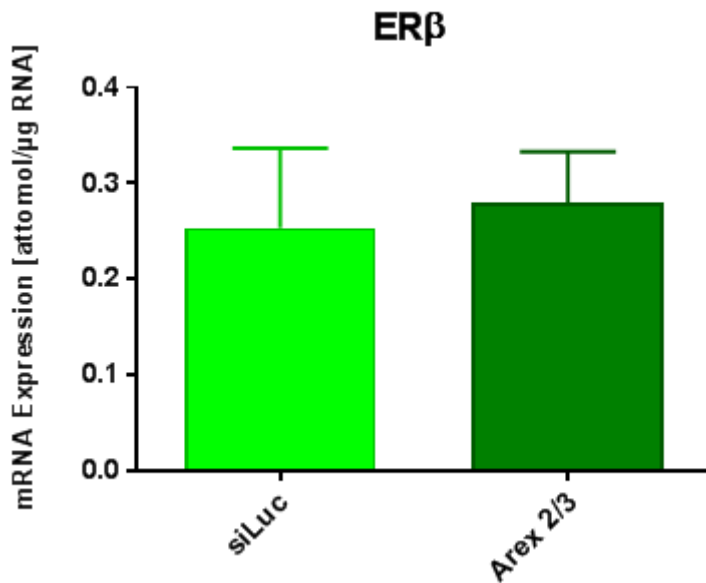


Abbildung 10 Expressionsprofil von *ERβ* nach Transfektion der *VCaP* mit *siRNA* gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der *VCaP* mit *siRNA* gegen Luciferase

3.4 *CYP17A1* und *AKR1C3*

Hier wurde in den Stimulationsversuchen unter VPA ein signifikanter Anstieg der Expression von *CYP17A1* gemessen. Unter BCA zeigte sich ebenfalls eine steigende Tendenz, jedoch nicht über der Signifikanzschwelle (s. Abb. 11). Bei *AKR1C3* zeigen sich die Expressionslevel genau gegenläufig zu *CYP17A1*. Besonders unter VPA lässt sich auch hier eine signifikante Veränderung messen. Unter BCA verändert sich die *AKR1C3*-Expression nicht signifikant (s. Abb. 12).

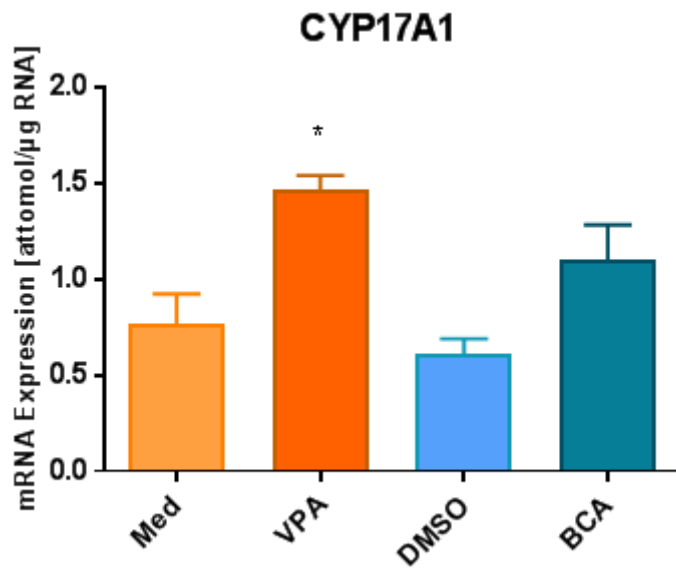


Abbildung 11 Expressionsprofil von CYP17A1 nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

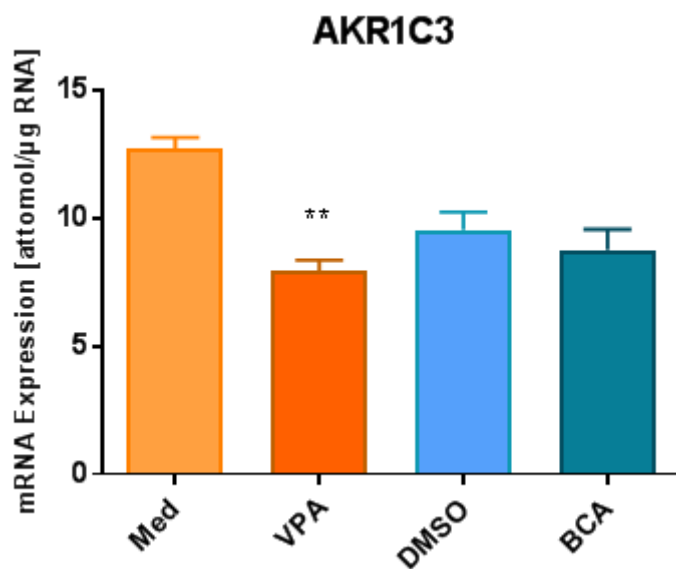


Abbildung 12 Expressionsprofil von AKR1C3 nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

3.5 *TMPRSS2-ERG*

Die Expression des Fusionsprotein sinkt unter der Behandlung mit VPA (s. androgen-reguliertes PSA) signifikant ab. Beim Stimulation mit BCA lässt sich ebenfalls eine abfallende Tendenz im Expressionslevel darstellen, jedoch nicht im signifikanten Bereich (s. Abb. 13). Durch die Transfektion des AR mit *siRNA* konnte die Expression des Fusionsproteins *TMPRSS2-ERG* nicht signifikant gesenkt werden (s. Abb. 14).

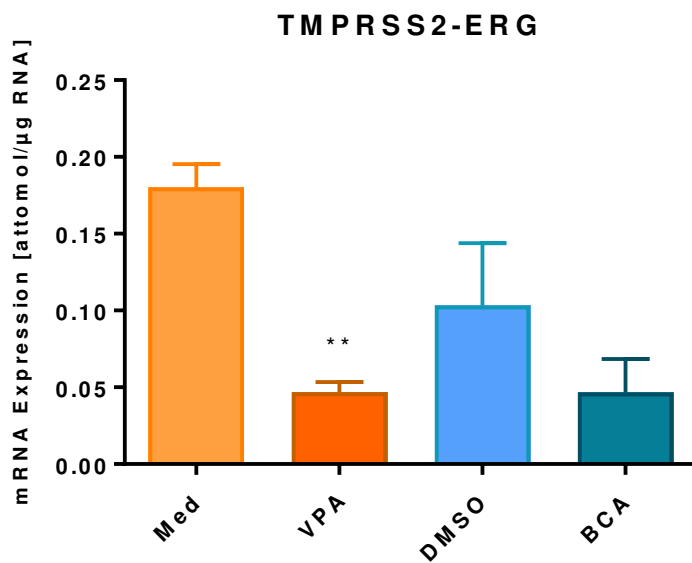


Abbildung 13 Expressionsprofil von *TMPRSS2-ERG* nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

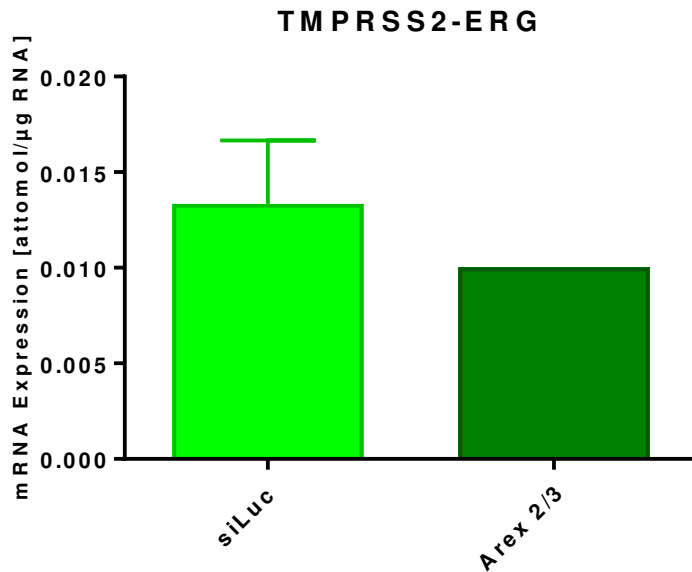


Abbildung 14 Expressionsprofil von *TMPRSS2-ERG* nach Transfektion der *VCaP* mit *siRNA* gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der *VCaP* mit *siRNA* gegen Luciferase

3.6 ARV7 und ARV1

Weder die Spleißvariante ARV1 noch die Spleißvariante ARV7 kann signifikant in den Stimulationsversuchen beeinflusst werden. Unter VPA lässt sich tendenziell ein Anstieg von ARV7 und ein Abfall von ARV1 beobachten, jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus (s. Abb. 15 und 16). Beim *siRNA*-Versuch zeigen die Untersuchungen am Beispiel ARV1 keine signifikante Veränderung der ursprünglichen Expression (s. Abb. 17).

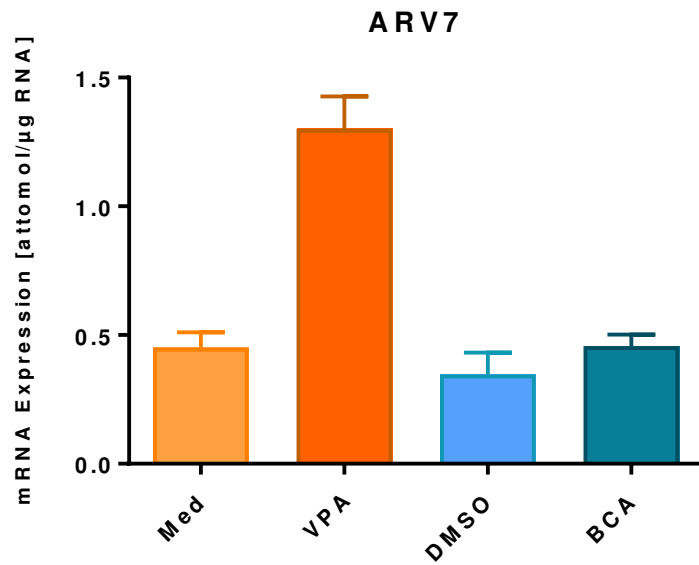


Abbildung 15 Expressionsprofil von ARV7 nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

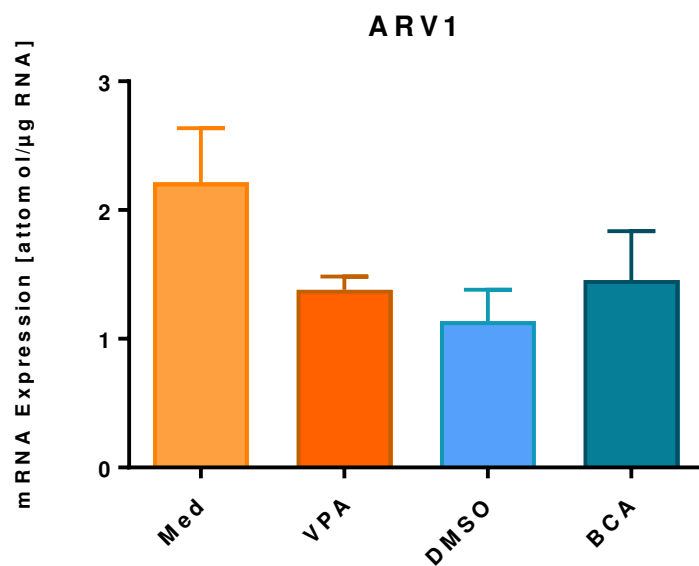


Abbildung 16 Expressionsprofil von ARV1 nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

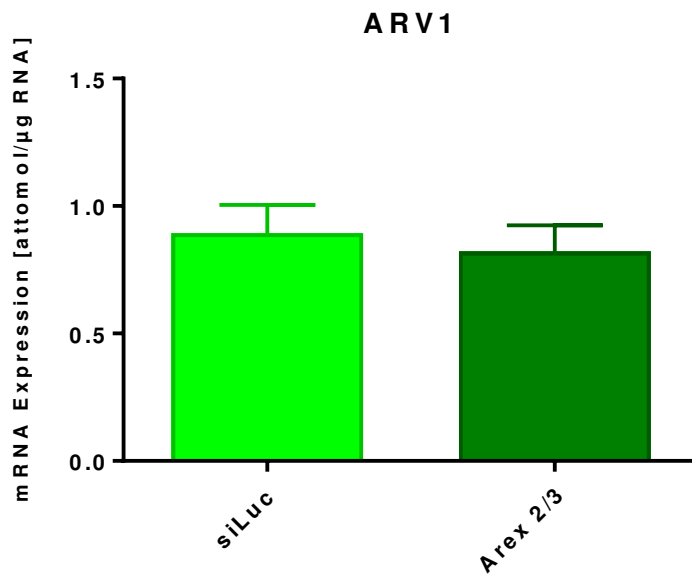


Abbildung 17 Expressionsprofil von ARV1 nach Transfektion der VCaP mit *siRNA* gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der VCaP mit *siRNA* gegen Luciferase

3.7 IGF-Achse

Das IGFBP-3 wird unter VPA signifikant weniger exprimiert. Unter BCA lassen sich keine eindeutig signifikanten Ergebnisse erzielen. Tendenziell jedoch steigt die Expression (s. Abb. 18). Unter *siRNA* gegen den AR lässt sich keine signifikante Veränderung in der Expression von IGFBP-3 messen (s. Abb. 19). Die Expression von IGF-1R hingegen steigt unter der Behandlung mit VPA signifikant an. Unter BCA lassen sich keine eindeutig signifikanten Veränderungen messen (s. Abb. 20). Im *siRNA*-Versuch fällt die Expression des IGF-1R signifikant ab (s. Abb. 21).

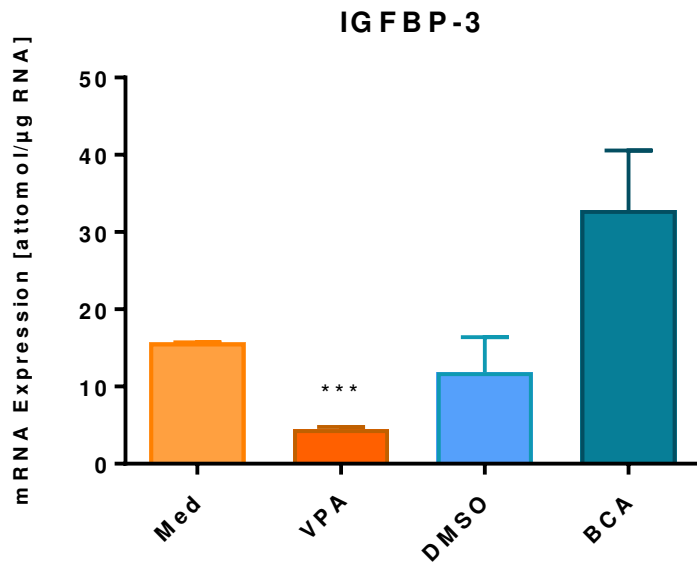


Abbildung 18 Expressionsprofil von *IGFBP-3* nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

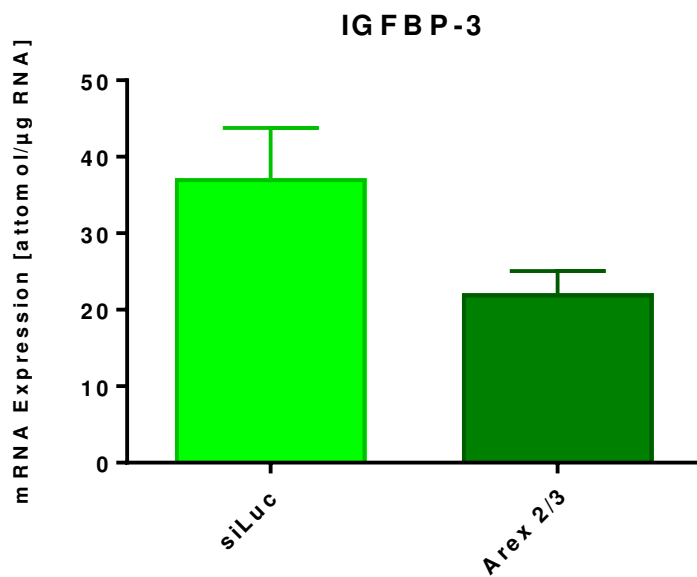


Abbildung 19 Expressionsprofil von *IGFBP-3* nach Transfektion der *VCaP* mit *siRNA* gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der *VCaP* mit *siRNA* gegen Luciferase

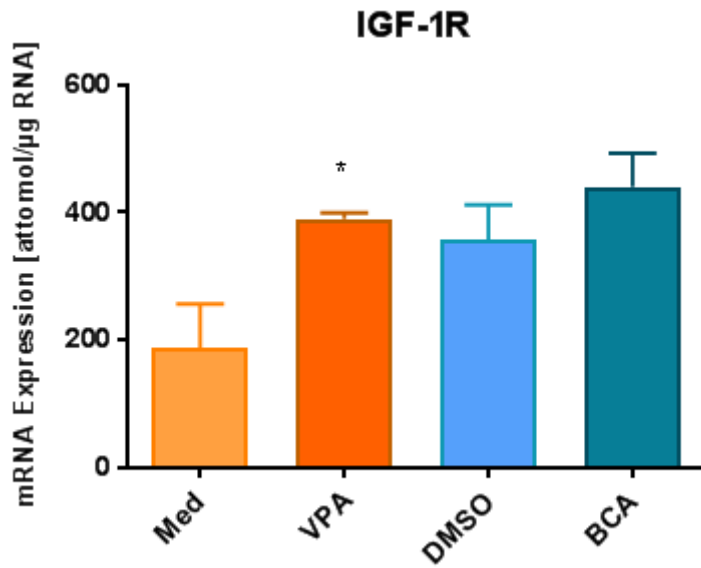


Abbildung 20 Expressionsprofil von *IGF-1R* nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

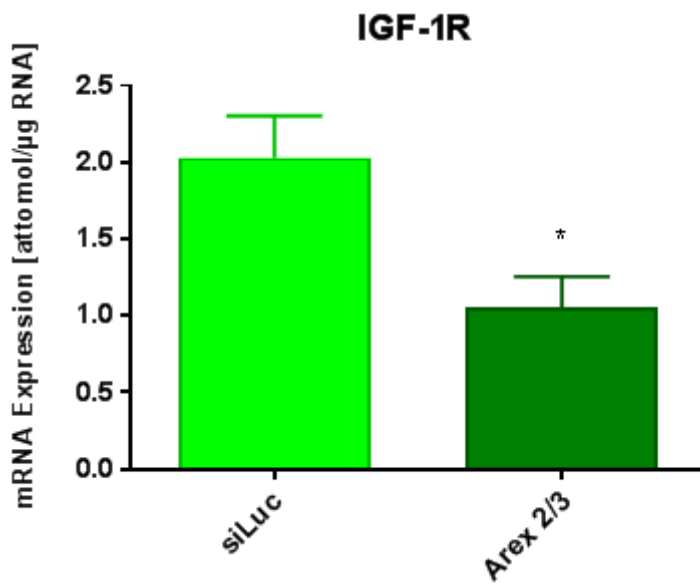


Abbildung 21 Expressionsprofil von *IGF-1R* nach Transfektion der *VCaP* mit *siRNA* gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der *VCaP* mit *siRNA* gegen Luciferase

3.8 *RPL* und *ARP*

Die Untersuchung der *Housekeeping*-Gene zeigt, dass insbesondere unter VPA das Expressionslevel von *RPL* stabil geblieben ist. Auch unter BCA zeigten sich keine signifikanten Änderungen des Expressionsniveaus (s. Abb. 22). Auch unter der *siRNA* konnte ein stabiles *ARP* gemessen werden (s. Abb. 23). Bei de Lima Rebouças et al. wurde beschrieben, wie wichtig die richtige Auswahl des geeigneten *Housekeeping*-Gens entsprechend der experimentellen Methode ist, da sonst auch bei *Housekeeping*-Genen Expressionsveränderungen gemessen werden können (Rebouças de Lima et al. 2013).

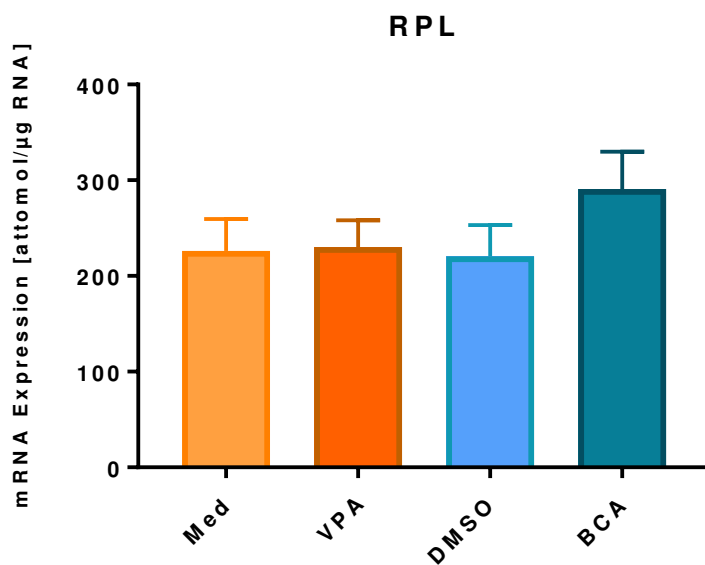


Abbildung 22 Expressionsprofil des *Housekeeping*-Gens *RPL* nach Stimulation mit VPA bzw. BCA im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen Med bzw. DMSO

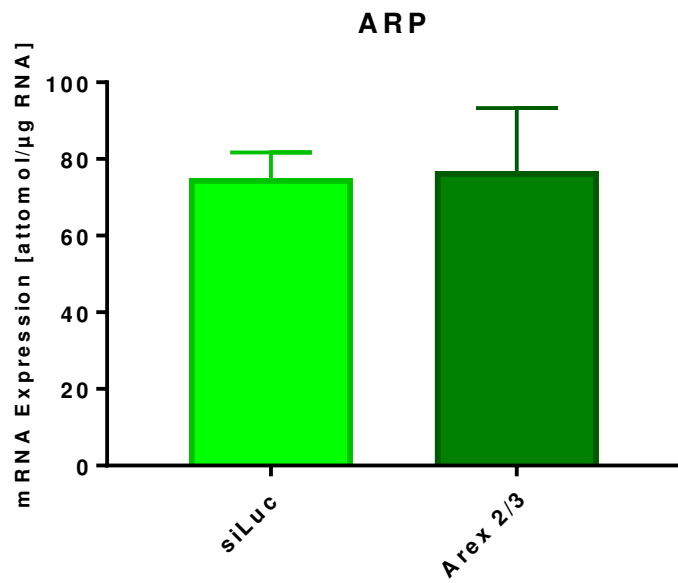


Abbildung 23 Expressionsprofil des *Housekeeping*-Gens ARP nach Transfektion der *VCaP* mit *siRNA* gegen den Androgenrezeptor im Vergleich zur Kontrollgruppe der *VCaP* mit *siRNA* gegen Luciferase

4. Diskussion

Die Therapie des Prostatakarzinoms ist in den letzten Jahrzehnten erfolgreich weiterentwickelt worden. Besonders die lokal begrenzten Karzinomstadien können meist sehr gut behandelt werden. Eine Herausforderung stellen bis heute allerdings metastasierte bzw. kastrationsresistente Prostatakarzinome dar, die initial zwar sehr erfolgreich antiandrogen behandelt werden können, jedoch nach 2-3 Jahren Mechanismen entwickelt haben, die zum therapieunabhängigen Tumorprogress führen. Die Mechanismen, die zur Kastrationsresistenz führen, wurden bereits erläutert. Es zeigt sich, dass der Androgenrezeptor insbesondere in der Phase der Kastrationsresistenz durch oben genannte Mechanismen (z. B. Androgenrezeptoraberrationen oder konstitutiv aktive Spleißvarianten des AR usw.) eine zentrale Rolle für den Tumorprogress zu spielen scheint. Daher ist der AR auch bei der Behandlung des *CRPC* von zentraler Bedeutung. In den letzten Jahren wurden neue Medikamente (Enzalutamid und Abirateron), deren Wirkweisen bereits beschrieben wurden, entwickelt. Auch diese zielen direkt bzw. indirekt auf den Androgenrezeptor. Aber auch hier kommt es allerdings nach ca. 8 Monaten ebenfalls zu einem Wiederanstieg des PSA (Schrader et al. 2014).

Ziel dieser Arbeit ist es, hier Ansatzpunkte für mögliche zukünftige Therapieoptionen in diesem Krankheitsstadium aufzuzeigen.

Um im experimentellen Modell der Wirklichkeit möglichst nahe zu kommen, wurden die Versuche an der *VCaP*-Zelle, einer vertebrealen Metastasenzelle mit einem hochreguliertem AR, durchgeführt. Diese Zelle bildet die tumorbiologischen Eigenschaften des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms gut ab. Im Folgenden wurden die Zellen mit dem klassischen Antiandrogen Bicalutamid sowie im Vergleich dazu mit dem Histondeacetylasehemmer Valproat behandelt. Verglichen wurde dann die Expression einiger androgenabhängiger Proteine. Das angestrebte Optimum wäre es, den Androgenrezeptor komplett zu inhibieren. Dies kann bisher jedoch nur in Maßen mittels *siRNA* erreicht werden. Auch diese limitierte Ausschaltung des AR durch *siRNA* wurde durchgeführt, und deren Auswirkungen auf androgenabhängige Proteinexpression werden im Folgenden mit den Ergebnissen der Stimulationsversuche verglichen und diskutiert.

In einer Studie von Lee et al. wurden Proben der Prostata von Prostatakarzinompatienten untersucht, die zuvor keinerlei präoperative Behandlung erhalten hatten, und es konnte ge-

zeigt werden, dass eine hohe AR-Expression, d. h. eine Sensibilisierung für niedrige Androgenwerte, mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall sowie schnellerem Krankheitsprogress korrelierte (Lee 2003). Ziel der Behandlung wäre also, die Expression des AR zu minimieren, um ein verbessertes Therapieansprechen zu erreichen.

Im Experiment lässt sich eine tatsächliche Herunterregulation des AR nur mit *siRNA* nachweisen (s. Abb. 6). Bei den Stimulationsversuchen kommt es sogar eher zu einem - wenn auch nicht signifikanten - Anstieg der AR-Expression. Auch unter der Behandlung mit Bicalutamid kommt es nicht zu einem Abfall der AR-Expression (s. Abb. 5).

Auch bei Bremmer et al. konnte bei der Androgendeprivation der *VCaP* mit AA keine signifikante Auswirkung auf die Expression von AR gemessen werden (Bremmer et al. 2014). Ein bisher nur ansatzweise gelöstes Problem bleibt zudem im spontanen Auftreten der AR-Spleißvarianten bei der Kastrations- und Therapieresistenz.

Bei der Zelllinie *LNCaP* gelang es Chou et al. mit VPA die Expression des AR herunterzuregulieren (Chou et al. 2015).

Auch wenn eine Herunterregulation des AR im hier vorliegenden Experiment nicht deutlich geworden ist, so konnte jedoch die Beeinflussung androgenregulierter Gene nachgewiesen werden. So kommt es unter Stimulation mit VPA zu einem signifikanten Abfall der Expression von *PSA-mRNA* (s. Abb. 7). Dies lässt auf einen verminderten androgenen Stimulus schließen, da die Bildung der Serinprotease PSA unter androgener Kontrolle steht. Auch bei Thelen et al. verursacht die Inhibierung der Histondeacetylaseaktivität durch VPA eine abnehmende Tumorzellproliferation, eine verminderte Expression vom *prostate-derived* ETS factor (*PDEF*) und PSA sowie eine gesteigerte Expression von *IGFBP-3* und Gewebeinhibitoren der Metalloproteinase 3 in *LNCaP*-Zellen (Thelen et al. 2004). Die enge Verknüpfung der Androgenrezeptorachse mit der *IGF*-Achse konnte im hier vorliegenden Zellmodell jedoch nicht am *IGFBP-3* nachvollzogen werden. Allerdings beruht die Kastrationsresistenz bei der *LNCaP* auf einer AR-Mutation mit *gain-of-function*, bei der *VCaP* auf AR-Deregulation.

Beim antiandrogenen BCA kann keine signifikant abfallende PSA-Expression verzeichnet werden (s. Abb. 7). Die PSA-Sekretion aus Tumorzellen wird in der Praxis als Tumormarker bzw. bei Wiederanstieg als ein Anzeichen für ein Rezidiv gewertet. Ein derartiger Abfall könnte sich also durch einen verminderten androgenen Einfluss und somit ein vermindertes

Tumorstadium erklären lassen. Auch im Versuch von Bremmer et al. konnte durch AA kein Einfluss auf die AR-Expression gezeigt werden, jedoch ebenfalls ein signifikanter Abfall der PSA *mRNA* und PSA-Sekretion (Bremmer et al. 2014).

Im *siRNA*-Versuch kann ein Abfall des PSA-Signals gemessen werden, jedoch nicht im signifikanten Bereich (s. Abb. 8).

Ein wichtiger Mechanismus, der die AR-Reaktivierung vermittelt, ist die intratumorale Konversion von Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion in die AR-Liganden Testosteron und Dihydrotestosteron. DHEA und Androstendione werden durch die sequentielle Aktivierung der Cytochrom P 450-Enzyme *CYP11A1* und *CYP17A1* auch in den Nebennieren synthetisiert, sodass *CYP17A1*-Inhibitoren wie AA effektive Therapien für das *CRPC* sind. Auch wenn die Bedeutung von intratumoraler *CYP17A1*- und de novo-Androgensynthese aus Cholesterol im *CRPC* sowie der Mechanismus, der zu *CYP17A1*-Inhibitor Resistenz führt, noch detaillierter erforscht werden müsste. Cai et al. konnten zeigen, dass AR-Aktivität in kastrationsresistenten *VCaP*-Tumor-Xenotransplantationen durch *CYP17A1*-abhängige Androgen-de novo-Synthese wiederhergestellt werden kann. Außerdem wurde gezeigt, dass die Behandlung mit AA selektiven Druck auf die Xenotransplantate ausübt, vermehrt intratumoral *CYP17A1* zu exprimieren und dadurch vermutlich einen Mechanismus zur Entwicklung einer Resistenz gegenüber *CYP17A1*-Inhibitoren zu erzeugen. Auch klinische Untersuchungen deuten darauf hin, dass dieser Mechanismus vorliegen könnte. So zeigte sich, dass die intratumorale Expression von *CYP17A1* in Tumorbiopsien von *CRPC*-Patienten nach der Therapie mit *CYP17A1*-Inhibitoren deutlich angestiegen war (Cai et al. 2011).

Auch in der Studie von Bremmer et al. konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der *VCaP* mit AA mit einer verminderten Expression androgenregulierter Gene und mit einer Hochregulation von *CYP17A1* einhergeht. Diese Effekte konnten nicht in AR-negativen *PC-3*-Zellen beobachtet werden. Ein Ausschalten des AR auf Gen-Ebene mittels *siRNA* führte, auch ohne die Behandlung mit AA, zu einer Hochregulation von *CYP17A1*. Eine Herunterregulation von androgenregulierten Genen führte trotzdem zu einer erhöhten Expression von *CYP17A1*, dem Zielzym von AA. Die Hochregulation von *CYP17A1* findet bereits bei kurzen Behandlungszeiten mit AA statt und bedarf keiner Adaptationsdauer von mehreren Zellzyklen. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Hemmung des AR-Signalwegs eine sofortige

Gegenregulation der *CYP17A1*-Expression erfolgt, aber keine anhaltende Adaptation (Bremmer et al. 2014).

Auch im hier durchgeführten Experiment zeigt sich ein signifikanter Anstieg von *CYP17A1* unter VPA. Daraus läßt sich auf ein vermindertes Aktivierungspotenzial des AR schließen. Dieser Effekt kann unter dem Antiandrogen BCA, das keinen direkten Einfluss auf die Androgensynthese hat, nicht dargestellt werden (s. Abb. 11).

Bei Bremmer et al. kann unter Stimulation mit AA ein signifikanter Abfall von *AKR1C3* gezeigt werden (Bremmer et al. 2014). Auch im hier durchgeführten Experiment zeigt sich unter VPA dieser gegenläufige Verlauf von steigender *CYP17A1*-Expression und abfallender *AKR1C3*-Expression (s. Abb. 11 und 12).

Neben der These der intratumoralen *CYP17A1*-de novo-Synthese könnte auch noch eine andere Erklärung für die hohe *CYP17A1*-Expression nach VPA bzw. nach Behandlung mit AA in Frage kommen: Unter der Annahme einer verringerten Testosteronbiosynthese durch das gehemmte Enzym würde man konstante oder sogar sinkende Expressionswerte für *CYP17A1* erwarten. Betrachtet man allerdings die Entwicklung von *AKR1C3*, kann man eine Erklärung herleiten, die sich mit einer verringerten Testosteronbiosynthese in Einklang bringen lässt. Besonders unter der Behandlung mit VPA kann eine verminderte Expression des Enzyms *AKR1C3* festgestellt werden. *AKR1C3* katalysiert letztendlich die Entstehung von Testosteron aus Δ^4 -Androstendion. Da dieser enzymatische Schritt zur Entstehung des Testosterons chronologisch nach der Entstehung des Δ^4 -Androstendion folgt, scheint die Vermutung schlüssig, dass die *CYP17A1*-Expression als Reaktion auf die verringerte Testosteronmenge durch einen Feedbackmechanismus sekundär hochreguliert wird.

In der Prostata hat der *ER β* - als bevorzugter Rezeptor für sogenannte Phytoöstrogene - Eigenschaften eines Tumorsuppressors. In der Versuchsreihe von Stettner et al. wurden Mechanismen untersucht, die den nutzbringenden Effekt von Valproat und Phytoöstrogenen wie Tectorigenin auf das Prostatakarzinom aufzeigen. Hierfür wurde die Expression von *ER β* gemessen, nachdem eine Behandlung der *LNCaP* mit VPA bzw. Tectorigenin erfolgt ist. Für weitere funktionelle Analysen wurde zusätzlich noch die *ER β* -Expression mit RNA-Interferenz herunterreguliert. Die Expression von *ER β -mRNA* und *ER β -Protein* stieg nach VPA oder Tectorigenin-Behandlung deutlich an. Bei der Herunterregulation von *ER β* durch *siRNA* wurde die Expression der androgenregulierten Gene *PDEF*, *PSA*, *PCA3*, *IGF1-R* und

ERα hochreguliert und die von Tectorigenin herbeigeführten Effekte waren aufgehoben. Die *ERβ*-Level waren vermindert im Prostatakarzinom messbar, und ein Verlust von *ERβ* wird mit malignem Wachstum assoziiert. In der Versuchsreihe von Stettner et al. wurde gezeigt, dass ein *siRNA*-vermittelter *knock-down* von *ERβ* die Expression von Genen erhöht, welche hochrelevant sind für die Tumorzellproliferation. Zusätzlich konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass ein herausstechendes Ergebnis der Behandlung mit VPA bzw. Tectorigenin die Hochregulation von *ERβ* ist. Eine Wiederherstellung der *ERβ*-Funktion in Tumorzellen, vermittelt durch VPA oder Tectorigenin, resultiert in einem antiproliferativem Effekt (Stettner et al. 2007).

Auch im hier durchgeführten Experiment steigt der *ERβ* unter VPA-Behandlung an. Ein signifikanter Anstieg konnte jedoch nicht gemessen werden. Unter der Behandlung mit BCA lässt sich dieser Effekt nicht darstellen (s. Abb. 9). Bei Stettner et al. kommt es unter *siRNA* vermitteltem *knock-down* des *ERβ* zur vermehrten Expression von Genen der Tumorzellproliferation (Stettner et al. 2007). Aufgrund dieser Ergebnisse von Stettner et al. würde man bei einer Transfektion des AR mit *siRNA* gegen AR eine Hochregulation der *mRNA* des *ERβ* im Sinne einer reziproken Wechselseitigkeit erwarten. Dies lässt sich jedoch im hier durchgeführten Experiment so nicht nachweisen (s. Abb. 10). Also bestehen offensichtlich unterschiedliche Therapieziele, in Abhängigkeit vom verwendeten *CRPC*-Zellmodell, da die Versuche für diese Arbeit an der *VCaP* durchgeführt wurden und nicht wie bei Stettner et al. an der *LNCaP*.

Die antiproliferative Rolle des *ERβ* in Prostatakarzinomzellen wurde vielfach in Publikationen beschrieben und auch als vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Prostatakarzinomtherapie und Prävention untersucht. Walton et al. gelang es, Apoptose in Prostatakarzinomzellen zu induzieren. Hierfür wurden Histondeacetylaseinhibitoren und Agenzien zur *DNA*-Demethylierung verwendet, um die *ERβ*-Expression von epigenetischem *Silencing* loszulösen (Walton et al. 2008). Hurtado et al. konnten zeigen, dass hohe Level an *ERβ* bei *LNCaP*-Zellen zum Zellzyklusarrest in der frühen *G1*-Phase führen (Hurtado et al. 2008).

Auch wenn vorklinische Studien den protektiven Effekt von *ERβ* beschrieben haben, wurde der klinische Nutzen von *ERβ*-selektiven Medikamenten in der Behandlung von Männern mit Prostatakarzinom nie bewiesen. Eine mögliche Erklärung für die Inkonsistenz zwischen in vitro- und in vivo-Ergebnissen ist, dass die Prostatakarzinomzelllinien (*LNCaP*, *PC-3*,

DU145), die in den in vitro-Studien genutzt werden, unterschiedliche Expressionsprofile des nukleären Rezeptors, aber höchstwahrscheinlich auch verschiedene *ERβ*-Funktionen aufweisen (Christoforou et al. 2014; Nelson et al. 2014).

Das prostataspezifische Gen *TMPRSS2* ist in einer großen Anzahl der Prostatakarzinome mit dem Transkriptionsfaktor-Gen *ERG* fusioniert. Die klinische Relevanz dieses Fusionsproduktes ist noch nicht komplett erforscht. Nam et al. untersuchten 26 Patienten, die aufgrund eines lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms operiert wurden, auf das Vorhandensein des *TMPRSS2-ERG*-Fusionsproteins mittels *RT-PCR* und direkter *DNA*-Sequenzierung und bewerteten dessen prognostische Bedeutsamkeit. Alle 26 Patienten hatten Krebs vom gleichen histologischen *Grade* (*Gleason Score* 7). Das Fusionsprotein konnte in den Tumorzellen von 11 Patienten gefunden werden (42,3 %). Neun Patienten erlitten ein Rezidiv (erhöhtes PSA) nach einem durchschnittlichem *Follow-up* von 12 Monaten (Intervall 1-48 Monate). Patienten mit dem Fusionsprotein hatten eine signifikant höhere Rate an Rückfällen (5-Jahres-Rückfallrate 79,5 %, $p=0,009$), im Vergleich zu den Patienten ohne Fusionsprotein, bei denen sich eine 5-Jahres-Rückfallrate von 37,5 % zeigte (Nam et al. 2007).

Urbinati et al. konnten mit *siRNA* gegen *TMPRSS2-ERG* antiproliferative Effekte erzielen. So konnte das Zellüberleben signifikant gesenkt und eine Gruppe antiapoptotischer Proteine inhibiert werden. Nanopartikel von *siRNA TMPRSS2-ERG*-Squalen wurden intravenös in *SCID*-Mäuse gespritzt und reduzierten dort das Wachstum von *VCaP*-Tumoren, inhibierten Onkoproteinexpression und stellten teilweise die Zelldifferenzierung wieder her. Dies zeigte sich durch eine Abnahme von Ki67 (Urbinati et al. 2015).

Bei Bremmer et al. konnte unter der Behandlung mit AA eine Reduktion der Expression von *TMPRSS2-ERG mRNA* in der *VCaP* gemessen werden (Bremmer et al. 2014).

Auch im hier durchgeführten Experiment konnte unter VPA eine signifikante Reduktion der *TMPRSS2-ERG mRNA* gemessen werden (s. Abb. 13). Bei der Stimulation mit dem klassischen Antiandrogen BCA konnten diese Ergebnisse nicht erzielt werden. Auch beim *knock-down* des AR mittels *siRNA* kam es nicht zu einem signifikanten Abfall der Expression von *TMPRSS2-ERG mRNA* (s. Abb. 14). Dieser Therapie-Effekt auf die beiden androgen-regulierten Gene, PSA und *TMPRSS2-ERG* zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen AR-Aktivierbarkeit und reiner AR-Blockade. Die vollständige AR-Inhibition mit BCA ist entweder noch unvollständig und offenbar nur mit dem neueren Wirkstoff Enzalutamid möglich

oder wird unmittelbar von Resistenzmechanismen unterlaufen. Diese Frage musste aber in der vorliegenden Arbeit unbeantwortet bleiben.

Tatsächlich hat die *siRNA*-Kontrolle im Versuch von Urbinati et al. keine spezifische Gruppe von Genen reguliert, während Gene, die durch *TMPRSS2-ERG* Typ IV reguliert werden, hauptsächlich zu Gruppen gehören, die für Zellbewegung, Entwicklung, Wachstum, Tod und Proliferation verantwortlich sind. Interessanterweise hat sich herausgestellt, dass diese Gene andere sind als jene, die durch den Androgenrezeptor - Hauptziel der Prostatakarzinomtherapie - reguliert werden. Dies legt nahe, dass Proliferation im *CRPC* durch AR-unabhängige Mechanismen stimuliert werden könnte, z. B. *TMPRSS2-ERG*-Aktivierung durch AR-Spleißvarianten. Überdies inhibiert der *knock-down* von *TMPRSS2-ERG* durch *siRNA* Wachstum und Proliferation, unabhängig vom AR-Signalweg. Deshalb könnten *siRNA-TMPRSS2-ERG*-Squalen-Nanopartikel hinsichtlich der malignen Funktion des Fusionsgens eine vielversprechende Alternativtherapie für Patienten mit *CRPC* sein (Urbinati et al. 2015).

Diese Erkenntnisse eines androgenunabhängig gesteuerten Fusionsproteins *TMPRSS2-ERG* könnten erklären warum keine signifikante Reduktion mittels Antiandrogen BCA bzw. *siRNA* gegen AR, erreicht werden kann.

Die Entwicklung des Prostatakarzinoms hin zum *CRPC* geht mit einer erhöhten Expression von *IGF-1* und *IGF-1R* einher (Nickerson et al. 2001). *IGF-1* ist ein Peptid-Hormon, das Mitose stimuliert und Apoptose inhibiert. Zu 99 % zirkuliert *IGF-1* gebunden an *IGFBP* (meist *IGFBP-3*) in einem dreifach-Komplex mit einer säureinstabilen Untereinheit. Weniger als 1 % des *IGF-1* zirkuliert ungebunden (Key et al. 2010).

Toropainen et al. konnten zeigen, dass unter Androgenzugabe die Expressionslevel von *IGF-1R* in der *VCaP* steigen (Toropainen et al. 2016). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen dem androgenregulierten PSA (=Serinprotease Kallikrein 3). Dieses Enzym spaltet *IGFBP-3* und reduziert somit seine protektive Funktion.

Die Hochregulation des *IGF-1R*-Signalwegs führt zu Wachstum und Progress des Prostatakarzinoms, indem Überleben der Zellen und Angiogenese gefördert wird (Fahrenholtz et al. 2013). Bei Stettner et al. konnte gezeigt werden, dass in der *LNCaP* nach der Behandlung mit VPA die *IGF-1R*-Expression abfällt. Nachdem die *LNCaP*-Zellen mit einer *siRNA* gegen den *ERβ* transfiziert wurden, kam es zum Anstieg der *IGF-1R*-Expression (Stettner et al. 2007).

Auch beim hier durchgeführten *siRNA*-Versuch konnte der *IGF-1R* signifikant gesenkt werden (s. Abb. 21)

Bei den Stimulationsexperimenten zeigte sich diesbezüglich ein konträres Ergebnis. So steigt unter der Behandlung mit VPA der *IGF-1R* in der *VCaP* sogar signifikant an (s. Abb. 20). Eventuell könnte die Hochregulation des *IGF-1R* in der *VCaP* unter Stimulation mit VPA als rückgekoppelter Resistenzmechanismus gewertet werden. Sollten die Expressionsniveaus von *IGF-1* bzw. *IGF-2* steigen, könnte dies für die bei Lubik et al. und Comstock et al. vermutete *de novo*-Synthese sprechen (s. u.).

Bremmer et al. konnten einen Anstieg von *IGF-2* in der *VCaP* nach Behandlung mit AA messen. In Studien von Lubik et al. und Comstock et al. konnte ein neuer molekularer Signalweg offengelegt werden, bei dem *IGF-2* androgenunabhängiges Wachstum ermöglicht und die *de novo*-Steroidogenese-Maschinerie in Gang setzt und somit Tumorprogress fördert und Hormontherapien umgeht. *IGF-2* kann den *IGF-1R*, den Insulinrezeptor oder Hybride dieser zwei Rezeptoren aktivieren und somit zum Progress vom Prostatakarzinom zum *CRPC* beitragen (Bremmer et al. 2014; Comstock und Knudsen 2013; Lubik et al. 2013).

Im Experiment sinkt das *IGFBP-3* unter Behandlung mit VPA in der *VCaP* signifikant ab (s. Abb. 18). Wenn der AR mittels *siRNA* auf Gen-Ebene ausgeschaltet wird, kommt es nicht zu einer signifikanten Veränderung der Expression von *IGFBP-3-mRNA* (s. Abb. 19).

Androgenrezeptorspleißvarianten werden im *CRPC* exprimiert. Ihnen fehlt die C-terminale Bindungsdomäne und sie sind deshalb konstitutiv aktiv. ARVs sind daher resistent gegenüber traditionellen Antiandrogenen, da ihnen die Ligandenbindungsdomäne als molekulares Target fehlt. ARVs werden durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen, unter anderem antiandrogene Therapien, induziert und könnten daher auch zum Progress des *CRPC* und zur Resistenz gegenüber antiandrogener Therapie beitragen (Lu et al. 2015).

In der Studie von Mostaghel et al. stellte sich heraus, dass unter AA das Wachstum im *CRPC* durch die Suppression intratumoraler Androgene gehemmt wird. Allerdings konnten erhöhte Expressionen der ARVs gemessen werden. Die Resistenz, die sich gegen AA im *CRPC* entwickelt, könnte durch Mechanismen hervorgerufen werden, wie möglicherweise Hochregulation von *CYP17A1*, insbesondere aber durch Induktion des AR und Androgenrezeptorspleißvarianten, die ligandenunabhängige AR-Transaktivierung ermöglichen (Mostaghel et al. 2011).

Im hier durchgeführten Experiment konnte die Expression von *AR-mRNA* mittels *siRNA* gegen den AR signifikant gesenkt werden (s. Abb. 6). Unter Androgenentzug steigt die Anzahl der Spleißvarianten akut an, während sie bei Testosteronanstieg sinkt (Watson et al. 2010). Man würde bei den *siRNA*-Versuchen also einen Anstieg der Spleißvarianten messen müssen. Hier zeigte sich in Zellen mit signifikant herunterreguliertem AR allerdings keine signifikante Änderung in der Expression der Androgenrezeptorspleißvariante ARV1 (s. Abb. 17).

Knudsen et al. beschreiben, dass die Spleißvarianten durch ligandenbindungsabhängige Antagonisten wie Bicalutamid oder Enzalutamid nicht blockiert werden können (s. o.) (Knudsen und Penning 2010).

Diese Ergebnisse scheinen auch für VPA zu gelten. So zeigt sich, dass in den Stimulationsversuchen weder durch VPA noch durch BCA die Expression der Spleißvarianten des AR - ARV7 bzw. ARV1 - signifikant beeinflusst werden konnten (s. Abb. 15 und 16). Die Hochregulation der ARVs stellt im *CRPC* eine große klinische Herausforderung dar, auf die bislang getestete Medikamente keine Antwort zu geben scheinen.

Aktuelle präklinische wie klinische Befunde liefern deutliche Hinweise darauf, dass das Auftreten von AR-Spleißvarianten im signifikanten Zusammenhang mit der Therapieresistenz unter Abirateron und Enzalutamid stehen und die Kreuzresistenz für beide Agenzien begründen. In diesem Zusammenhang scheinen die hier vorgestellten unterschiedlichen Herangehensweisen an das Therapieziel noch einmal hinsichtlich der beobachteten rückgekoppelten Therapieresistenz-Mechanismen beachtenswert.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Prostatakarzinom ist das häufigste Malignom des Mannes. Initial können auch metastasierte Erkrankungsstadien gut mit Antiandrogenen behandelt werden. Nach zwei bis drei Jahren kommt es jedoch zur Kastrationsresistenz. In diesem Stadium hat der Androgenrezeptor Mechanismen entwickelt, trotz Kastrationsbedingungen einen Tumorprogress zu erreichen. In den letzten Jahren wurde für diese palliative Situation neue Generationen von Androgendeprivationen und Antiandrogenen entwickelt (Abirateronacetat und Enzalutamid). Doch auch hierunter entwickelt der Tumor bereits nach einigen Monaten Resistenzen. In der vorliegenden Arbeit wurden nun die Effekte auf androgenregulierte Gene der *VCaP* als Zellmodell des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms bei Stimulation mit Valproat bzw. Bicalutamid untersucht, also experimentelle oder bis dahin etablierte Therapieansätze. Hierbei wurde vor allem der Effekt des Histondeacetylaseinhibitors Valproat ergründet. Eine weitere rein experimentelle Strategie ist das Ausschalten des Androgenrezeptors auf Gen-Ebene mittels *siRNA* gegen den Androgenrezeptor. Dies ist bislang nur in vitro denkbar. Eine klinische Anwendung, insbesondere nach Etablierung von Abirateron und Enzalutamid, bleibt fraglich.

Unter der Behandlung mit Valproat als Histondeacetylaseinhibitor scheinen androgenhemmende Mechanismen in der Zelle stattzufinden. So kann zwar nicht der erwünschte Effekt eines herunterregulierten Androgenrezeptors nachgewiesen werden, jedoch eine Reihe an anderen antitumoralen Effekten. Es zeigt sich eine signifikante Senkung des prostataspezifischen Antigens und dem Fusionsprotein *TMPRSS2-ERG*. Diese Entwicklungen lassen auf eine verminderte androgene Regulation schließen. So können im Vergleich zum klassischen Antiandrogen Bicalutamid mit Valproat auch in der *VCaP* mit ihrem extrem hochregulierten Androgenrezeptor signifikante antiandrogene Effekte gemessen werden. Auch beim *siRNA*-Versuch lässt sich der Androgenrezeptor zwar signifikant herunterregulieren, die antiandrogenen Effekte fallen jedoch nicht so deutlich aus wie unter Valproat.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zelle auf den verminderten androgenen Stimulus reagiert, indem sie *CYP17A1* hochreguliert. Gleichzeitig zeigte sich ein signifikant herunterregulierter *AKRIC3*. Die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme des androgenen Stimulus unter Valproat könnte also als eine Art Resistenzmechanismus gewertet werden. Dies wäre somit als vielfach auftretender Feedbackmechanismus zu interpretieren.

Ein weiterer Resistenzmechanismus in der *VCaP* unter Valproat könnte in der Hochregulation der *insulin-like growth factor*-Achse liegen. So zeigte sich hier ein signifikant steigender *insulin-like growth factor*-1-Rezeptor.

Bei Vergleichen der Beeinflussung von Expressionsniveaus mittels Stimulationsversuchen zeigt sich, dass die Ergebnisse auch stark von der untersuchten Zelllinie abhängen. So sollte bei allen Überlegungen nicht außer Acht gelassen werden, dass die Zelllinien nur Modelle für das kastrationsresistente Prostatakarzinom sind und den wirklichen Zellinteraktionen dieser kastrationsresistenten Zellen *in vivo* unter Umständen nicht gerecht werden und eher der Überlebensfähigkeit in Kultur geschuldet sind.

Die *LNCaP* zeichnet sich durch eine *gain-of-function*-Mutation des Androgenrezeptors aus. Hier kann der Androgenrezeptor durch alternative Liganden, auch bei völliger Abwesenheit von Testosteron, stimuliert werden. Die *VCaP* hingegen zeigt eine deutliche Androgenrezeptor-Überexpression und Androgenrezeptor-Spleißvarianten. Hier benötigt es für die Stimulation des Androgenrezeptors also nur wenig oder gar kein Testosteron.

Die hier durchgeführten Studien scheinen einen antiandrogenen Effekt des Valproat auf Zellen des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms nahelegen. Es gibt jedoch auch Effekte, die auf eine Resistenz, ähnlich der bei Abiateronacetat, hindeuten. Es werden noch weitere Untersuchungen benötigt, um die Ursachen für Resistenzmechanismen unter Abiateronacetat und Valproat aufzudecken.

So geht die Suche nach effektiven Therapien weiter: z. B. auf Androgenrezeptor-Spleißvarianten oder auf bestimmte *gain-of-function*-Androgenrezeptor-Mutationen gerichtete Agenzien.

6. Literaturverzeichnis

Baker ME (2013): What are the physiological estrogens? *Steroids* 78(3), 337–340

Bastian PJ, Carter BH, Bjartell A, Seitz M, Stanislaus P, Montorsi F, Stief CG, Schröder F (2009): Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *European Urology* 55(6), 1321–1330

Beranič N, Stefane B, Brus B, Gobec S, Rižner TL (2013): New enzymatic assay for the AKR1C enzymes. *Chemico-Biological Interactions* 202(1-3), 204–209

Berthold DR, Pond GR, Soban F, Wit R de, Eisenberger M, Tannock IF (2008): Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *Journal of Clinical Oncology* 26(2), 242–245

Beuzebec P, Massard C (2015): How to manage patients with CRPC? *Bull Cancer* 102(6), 509–515

Borboroglu PG, Sur RL, Roberts JL, Amling CL (2001): Repeat biopsy strategy in patients with atypical small acinar proliferation or high grade prostatic intraepithelial neoplasia on initial prostate needle biopsy. *The Journal of urology* 166(3), 866–870

Bremmer F, Jarry H, Strauß A, Behnes CL, Trojan L, Thelen P (2014): Increased expression of CYP17A1 indicates an effective targeting of the androgen receptor axis in castration resistant prostate cancer (CRPC). *SpringerPlus* 3(1), 574

Caffo O (2015): Treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Recenti progressi in medicina* 106(1), 35–39

Cai C, Chen S, Ng P, Bublely GJ, Nelson PS, Mostaghel EA, Marck B, Matsumoto AM, Simon NI, Wang H et al. (2011): Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors. *Cancer Research* 71(20), 6503–6513

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, Fozard JL, Walsh PC (1992): Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *Jama* 267(16), 2215–2220

- Chou YW, Lin FF, Muniyan S, Lin FC, Chen CS, Wang J, Huang CC, Lin MF (2015): Cellular prostatic acid phosphatase (cPacP) serves as a useful biomarker of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in prostate cancer cell growth suppression. *Cell and bioscience*(5), 38
- Christoforou P, Christopoulos PF, Koutsilieris M (2014): The role of estrogen receptor β in prostate cancer. *Molecular Medicine* 20(1), 427–434
- Cleutjens KB, van der Korput, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW, Trapman J (1997): An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen. *Molecular Endocrinology* 11(2), 148–161
- Comstock CES, Knudsen KE (2013): IGF2 revs the steroidogenesis engine. *Endocrine-Related Cancer* 20(5), C19-21
- Damm RR (2006): Das Anwenden von Nomogrammen zur Vorhersage des pathologischen Stadiums und Behandlungsergebnisse bei Prostatakrebspatienten
- Davidson D, Bostwick DG, Qian J, Wollan PC, Oesterling JE, Rudders RA, Siroky M, Stilmant M (1995): Prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for adenocarcinoma: predictive accuracy in needle biopsies. *The Journal of urology* 154(4), 1295–1299
- 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 Research* 68(13), 5469–5477
- Demichelis F, Rubin MA (2007): TMPRSS2-ETS fusion prostate cancer: biological and clinical implications. *Journal of clinical pathology* 60(11), 1185–1186
- Dey P, Ström A, Gustafsson JA (2014): Estrogen receptor β upregulates FOXO3a and causes induction of apoptosis through PUMA in prostate cancer. *Oncogene* 33(33), 4213–4225
- Eichler K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachmann LM, Kleijnen J (2006): Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review. *The Journal of urology* 175(5), 1605–1612

Ellem SJ, Risbridger GP (2010): Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *118*(4-5), 246–251

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997): Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *82*(12), 4258–4265

Fahrenholtz CD, Beltran PJ, Burnstein KL (2013): Targeting IGF-IR with ganitumab inhibits tumorigenesis and increases durability of response to androgen-deprivation therapy in VCaP prostate cancer xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* *12*(4), 394–404

Fernandez-Serra A, Casanova-Salas I, Rubio L, Calatrava A, García-Flores M, García-Casado Z, López-Guerrero JA, Rubio-Briones J (2015): Update on the diagnosis of PCa in urine. The current role of urine markers. *Archivos Españoles de Urología* *68*(3), 240–249

Fischer HP: Gallenwege, Pankreas. In: Roessner, A; Pfeifer, U; Müller-Hermelink, HK (Hrsg.): *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*, 11. Auflage; Elsevier Urban & Fischer, München 2010, 439-440

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. *The Prostate* *54*(2), 79–87

Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, Staffurth JN, North S, Vogelzang NJ, Saad F et al. (2012): Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet. Oncology* *13*(10), 983–992

Gabal SM, Habib FM, Helmy DO, Ibrahim MF (2007): Expression of estrogen receptor-B (ER-B) in benign and malignant prostatic epithelial cells and its correlation with the clinicopathological features. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute* *19*(4), 239–248

Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer 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. *The EMBO journal* *20*(24), 6969–6978

Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*(5)

- Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulson 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 Research* 62(10), 2942–2950
- Hrebackova J, Hrabeta J, Eckschlager T (2010): Valproic acid in the complex therapy of malignant tumors. *Current Drug Targets* 11(3), 361–379
- Huggins C, Stevens RE, Jr, Hodges, C. V. (1941): Studies on prostatic cancer: II. the effects of castration on advanced carcinoma of the prostate gland. *Archives of surgery* 43(2), 209–223
- Hurtado A, Pinós T, Barbosa-Desongles A, López-Avilés S, Barquinero J, Petriz J, Santamaria-Martínez A, Morote J, Torres I de, Bellmunt J et al. (2008): Estrogen receptor beta displays cell cycle-dependent expression and regulates the G1 phase through a non-genomic mechanism in prostate carcinoma cells. *Cellular oncology* 30(4), 349–365
- Iczkowski KA, Bassler TJ, Schwob VS, Bassler IC, Kunnel BS, Orozco RE, Bostwick DG (1998): Diagnosis of "suspicious for malignancy" in prostate biopsies: predictive value for cancer. *Urology* 51(5), 749–757
- Imamov O, Morani A, Shim GJ, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, Gustafsson JA (2004): Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(25), 9375–9380
- 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. *Journal of Clinical Oncology* 17(3), 813–817
- Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW (2010): Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: Pooled individual data analysis of 17 prospective studies. *The Lancet Oncology* 11(6), 530–542
- Kleer E, Oesterling JE (1993): PSA and staging of localized prostate cancer. *Urologic Clinics of North America* 20(4), 695–704
- Klotz L (2012): Active surveillance for prostate cancer: for whom? *Journal of Clinical Oncology* 30(24), 3035

Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A (2010): Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* 28(1), 126–131

Knudsen KE, Penning TM (2010): Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21(5), 315–324

Knudson AG (1996): Hereditary cancer: two hits revisited. *Journal of cancer research and clinical oncology* 122(3), 135–140

Korenchuk S, Lehr JE, MClean L, 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

Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). Berlin, 2013

Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin, 2015

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(12), 5925–5930

Lamont KR, Tindall DJ (2011): Minireview: Alternative activation pathways for the androgen receptor in prostate cancer. *Molecular Endocrinology* 25(6), 897–907

Lee D (2003): High androgen receptor levels are predictive of decreased survival in prostate cancer. *Clinical Prostate Cancer* 2(1), 13–14

Lilja H, Cronin AM, Dahlin A, Manjer J, Nilsson PM, Eastham JA, Bjartell AS, Scardino PT, Ulmert D, Vickers AJ (2011): Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50. *Cancer Research* 117(6), 1210–1219

Lorente D, Mateo J, Zafeiriou Z, Smith AD, Sandhu S, Ferraldeschi R, Bono JS de (2015): Switching and withdrawing hormonal agents for castration-resistant prostate cancer. *Nature reviews. Urology*. 12(1), 37–47

- Lu J, van der Steen T, Tindall DJ (2015): Are androgen receptor variants a substitute for the full-length receptor? *Nature reviews. Urology* 12(3), 137–144
- Lubik AA, Gunter JH, Hollier BG, Ettinger S, Fazli L, Stylianou N, Hendy SC, Adomat HH, Gleave ME, Pollak M et al. (2013): IGF2 increases de novo steroidogenesis in prostate cancer cells. *Endocrine-Related Cancer* 20(2), 173–186
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648), 251–260
- McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzsche KH, Risbridger GP (2007): Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 148(2), 566–574
- Merseburger AS, Scher HI, Bellmunt J, Miller K, Mulders PF, Stenzl A, Sternberg CN, Fizazi K, Hirmand M, Franks B et al. (2015): Enzalutamide in European and North American men participating in the AFFIRM trial. *BJU International* 115(1), 41–49
- Mostaghel EA, Marck BT, Plymate S. R., Vessella. R. L., Balk S, Matsumoto AM, Nelson PS, Montgomery RB (2011): Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clin Cancer Res* 17(18), 5913–5925
- Nagabhushan M, Miller CM, Pretlow TP, Giaconia JM, Edgehouse NL, Schwartz S, Kung HJ, de Vere White, R. W., Gumerlock PH, Resnick MI et al. (1996): CWR22: the first human prostate cancer xenograft with strongly androgen-dependent and relapsed strains both in vivo and in soft agar. *Cancer Research* 56(13), 3042–3046
- Nam RK, Sugar L, Wang Z, Yang W, Kitching R, Klotz LH, Venkateswaran V, Narod SA, Seth A (2007): Expression of TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer biology & therapy* 6(1), 40–50
- Nelson AW, Tilley WD, Neal DE, Carroll JS (2014): Estrogen receptor beta in prostate cancer: friend or foe. *Endocrine-Related Cancer* 21(4), 219–234

Nguyen PL, D'Amico AV, Lee AK, Suh WW (2007): Patient selection, cancer control, and complications after salvage local therapy for postradiation prostate-specific antigen failure: a systematic review of the literature. *Cancer Research* 110(7), 1417–1428

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 Research* 61(16), 6276–6280

Ornstein DK, Rao GS, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW, Catalona WJ (1997): Effect of digital rectal examination and needle biopsy on serum total and percentage of free prostate specific antigen levels. *Journal of Urology* 157(1), 195–198

Rebouças de Lima E, Costa JJ, Passos MJ, Passos JR, van den Hurk R, Silva JRV (2013): Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Braz. arch. biol. technol.* 56(1), 143–154

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 Journal* 22(5), 1512–1520

Roy AK, Tyagi RK, Song CS, Lavrovsky YAN, Ahn SC, Oh TS, Chatterjee B (2001): Androgen Receptor :Structural Domains and Functional Dynamics after Ligand-Receptor Interaction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 949(1), 44–57

Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P (2007): The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocrine Reviews* 28(1), 20–47

Savoy RM, Ghosh PM (2013): The changing roles of steroid nuclear receptors with prostate cancer progression. *Endocrine-Related Cancer* 20(4), C9-11

Schrader AJ, Boegemann M, Ohlmann CH, Schnoeller TJ, Krabbe LM, Hajili T, Jentzmik F, Stoeckle M, Schrader M, Herrmann E et al. (2014): Enzalutamide in castration-resistant prostate cancer patients progressing after docetaxel and abiraterone. *European Urology* 65(1), 30–36

- Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003): Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction* 9(8), 437–448
- Steinestel J, Luedeke M, Arndt A, Schnoeller TJ, Lennerz JK, Wurm C, Maier C, Cronauer MV, Steinestel K, Schrader AJ (2015): Detecting predictive androgen receptor modifications in circulating prostate cancer cells. *Journal of Clinical Oncology* 33(S15)
- Stenman UH (1997): Prostate-specific antigen, clinical use and staging: An overview. *British Journal of Urology* 79(S1), 53–60
- 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. *Molecular Cancer Therapeutics* 6(10), 2626–2633
- Taichman RS, Loberg RD, Mehra R, Pienta KJ (2007): The evolving biology and treatment of prostate cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 117(9), 2351–2361
- 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. *International journal of oncology* 24(1), 25–31
- Toropainen S, Niskanen EA, Malinen M, Sutinen P, Kaikkonen MU, Palvimo JJ (2016): Global analysis of transcription in castration-resistant prostate cancer cells uncovers active enhancers and direct androgen receptor targets. *Scientific Reports*(6), 33510
- Urbinati G, Ali HM, Rousseau Q, Chapuis H, Desmaële D, Couvreur P, Massaad-Massade L (2015): Antineoplastic Effects of siRNA against TMPRSS2-ERG Junction Oncogene in Prostate Cancer. *PLoS one* 10(5), e0125277
- Walton TJ, Li G, McCulloch TA, Seth R, Powe DG, Bishop MC, Rees RC (2009): Quantitative RT-PCR analysis of estrogen receptor gene expression in laser microdissected prostate cancer tissue. *The Prostate* 69(8), 810–819
- Walton TJ, Li G, Seth R, McArdle SE, Bishop MC, Rees RC (2008): DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines. *The Prostate* 68(2), 210–222

Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, Kim K, Sawyers CL (2010): Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(39), 16759–16765

Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, Jensen EV, Nilsson S, Warner M, Gustafsson JA (2001): A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(11), 6330–6335

Zellweger T, Stürm S, Rey S, Zlobec I, Gsponer JR, Rentsch CA, Terracciano LM, Bachmann A, Bubendorf L, Ruiz C (2013): Estrogen receptor β expression and androgen receptor phosphorylation correlate with a poor clinical outcome in hormone-naïve prostate cancer and are elevated in castration-resistant disease. *Endocrine-Related Cancer* 20(3), 403–413

Zhang T, Zhu J, George DJ, Armstrong AJ (2015): Enzalutamide versus abiraterone acetate for the treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy* 16(4), 473–485

AstraZeneca AG (2018): Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz - Casodex

<https://compendium.ch/mpro/mnr/5447/html/de#7100>, abgerufen am: 01.03.2018

Hunt M (2013): Real Time PCR Tutorial

<http://www.microbiologybook.org/pcr/pcr-home.htm>, abgerufen am: 02.10.2016

Leitlinienprogramm Onkologie (2016): (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 4.0, 2016, AWMF Registernummer: 043/022OL

<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html>, abgerufen am: 20.12.2017

Merdan S, Tomlins SA, Barnett CL, Morgan TM, Montie JE, Wei JT, Denton BT (2015): Assessment of long-term outcomes associated with urinary prostate cancer antigen 3 and TMPRSS2:ERG gene fusion at repeat biopsy.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280815>, abgerufen am: 23.09.2015

Danksagung

PD Dr. rer. nat. Paul Thelen möchte ich für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit der Durchführung der Experimente in der Abteilung für experimentelle Urologie danken. Insbesondere seine fachlichen Ratschläge und Erläuterungen haben maßgeblich dazu beigetragen, dass ich mich in die Thematik meiner Dissertation einarbeiten konnte. Bei der Durchführung der Experimente und dem Verfassen der Arbeit stand er mir stets mit wertvollen Anregungen, fachlicher Expertise und viel Geduld zu Seite. Vielen Dank auch an Dr. med. Oliver Hahn für die Übernahme der Betreuungstätigkeit nach dem Ruhestand von PD Dr. rer. nat. Paul Thelen.

Prof. Dr. med. Lutz Trojan möchte ich für die Möglichkeit zur Vorstellung meines Dissertationsthemas sowie seine fachlichen und motivierenden Impulse in diesem Rahmen danken.

Danken möchte ich auch Marion Striepe für ihre Einführung in die Laborarbeit und ihre exzellente Hilfe bei den Experimenten.