Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Martin Burchardt) der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Charakterisierung der molekularen Wirkung des Cytochrom P450 17A1-Inhibitors Abirateron in Prostatakarzinom-Zellen

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der Universitätsmedizin

der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

2013

vorgelegt von: Hannah Großebrummel geboren am 26.05.1987 in Recklinghausen

Dekan:	Prof. Dr. Reiner Biffar
 Gutachter: Gutachter: 	Prof. Dr. Martin Burchardt PrivDoz. Dr. Frank vom Dorp
Ort, Raum:	Seminarraum der Klinik und Poliklinik für Chirurgie L02.22, Universitätsmedizin Greifswald
Tag der Disputation:	26.08.2014

Inhaltsverzeichnis

Ι.	Abkürzungsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	
III.	Tabellenverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Anatomie und Physiologie der Prostata	1
1.2	Screening, Einteilung, Klinik und Therapie des Prostatakarzinoms	2
1.3	Abirateron	6
1.4	Der Androgenrezeptor und molekulare Aspekte des CRPC	8
1.5	Hitzeschock-Proteine	9
1.6	Apoptosefaktoren	10
1.7	microRNA	12
1.8	Zielsetzung	13
2	Material	14
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Chemikalien und kommerzielle Lösungen	15
2.3	Puffer und Lösungen	16
2.4	Enzyme und Kits	
2.5	Antikörper	
2.6	Primer	
2.7	Antibiotika	19
2.8	Zelllinien	19
2.9	Medien und Zusätze für die Zellkultur	

3		Methoden	.20
	3.1	Zellbiologische Methoden	. 20
		3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	. 20
		3.1.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen	. 20
		3.1.3 Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter	. 21
		3.1.4 Inkubation von Zellen mit Wirkstoffen und Ernten von Zellen	. 21
	3.2	Proteinbiochemische Methoden	. 22
		3.2.1 Protein-Isolierung	. 22
		3.2.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	. 22
		3.2.3 SDS-PAGE	. 23
		3.2.4 Western Blotting	. 24
		3.2.5 Immunfärbung	. 25
	3.3	Molekularbiologische Methoden	. 25
		3.3.1 RNA-Isolierung	. 25
		3.3.2 Präparation von miR	. 26
		3.3.3 RNA-Konzentrationsbestimmung	. 26
		3.3.4 Reverse Transkription von RNA und miR	. 26
		3.3.5 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	. 27
	3.4	Statistische Auswertung	. 28
4		Ergebnisse	.29
	4.1	Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC ₅₀) von Abirateron und Wachstumskinetik in Abirateron-behandelten PCa-Zellen	. 29
	4.2	Analyse von Expression und Aktivität des AR unter Abirateron-Inkubation in PCa-Zellen	. 30
	4.3	Protein-Analyse der AR-assoziierten Hitzeschock-Proteine HSP70 und HSP90α in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation	. 32
	4.4	Protein-Analyse der Co-Chaperone HOP und HSP40 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation	. 34
	4.5	mRNA- und Protein-Analyse des apoptotischen Faktors Hitzeschock-Protein HSP60 unter Abirateron-Inkubation in PCa-Zelllinien	. 35
	4.6	Protein-Analyse von p53 und PARP unter Abirateron-Inkubation in LNCaP und PC-3 Zellen	. 37

	4.7	mRNA-Analyse der apoptotischen Faktoren Caspase-3, Caspase-9, BAX, p21 und Survivin in PCa-Zellen unter Abirateron-Inkubation	39
	4.8	mRNA- und Protein-Analyse des zytoprotektiven Hitzeschock-Protein HSP27 in PCa-Zellen unter Abirateron-Inkubation	41
	4.9	Analyse des Tumorsuppressors microRNA-1 unter Abirateron-Inkubation in LNCaP und PC-3 Zellen	44
5		Diskussion	46
6		Zusammenfassung	52
7		Anhang	53
8		Literaturverzeichnis	54

I. Abkürzungsverzeichnis

2D-LP	2D-Lysepuffer	LH	luteinisierendes Hormon
A.bidest	zweifach destilliertes Wasser	Μ	Molar
Abirateron	Abirateron Acetat	miR	microRNA
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	M-MLV	Moloney Murine Leukemia
AR	Androgenrezeptor		Virus
ASO	antisense oligonucleotide	mRNA	messenger RNA
BAX	Bcl-2-associated X protein	N_2PO_4	Dinatrium-
BPH	benigne Prostatahyperplasie		hydrogenphosphat
BSA	Albumin Fraktion V	Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
cDNA	complementary DNA	NaF	Natriumfluorid
CRPC	castration resistant PCa	OS	overall survival
CYP17A1	Cytochrom P450 17A1	PAGE	Polyacrylamid-
DEPC	Diethylpyrocarbonat		Gelelektrophorese
DHT	Dihydrotestosteron	PARP	Poly-ADP-Ribose-
DMSO	Dimethylsulfoxid		Polymerase
DNA	desoxyribonucleic acid	PCa	Prostatakarzinom
dNTP	Desoxynucleotid triphosphat	PCR	Polymerasekettenreaktion
DPBS	phosphate buffered saline	PMSF	Phenylmethyl-
ds	doppelsträngig		sulfonylfluorid
EDTA Ethylendiamin-N,N,N',N'tetraacetat PSA		Prostataspezifisches	
EMA	European Medicines Agency		Antigen
FCS	fetal calf serum	qRT-PCR	quantitative real-time PCR
FDA	U.S. Food and Drug Administratino	RNA	ribonucleic acid
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon	RNase	Ribonuklease
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-	RPLPO	ribosomal protein,
	Dehydrogenase		large PO
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon	RT	Raumtemperatur
НОР	HSP70-HSP90-Organizing-Protein	SD	Standardabweichung
H ₃ PO ₄	ortho-Phosphorsäure	SDS	Sodiumdodecylsulfat
HSP	Hitzeschock-Protein	TBS	tris buffered saline
IAP	inhibitior-of-apoptosis-protein	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-
IC ₅₀	mittlere inhibitorische		ethylendiamin
	Konzentration	Tris	Tris(hydroxymethyl)-
K ₂ PO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat		aminomethan
kDa	kilo Dalton	U/min	Umdrehung pro Minute
LNCaP	lymph node carcinoma of the	v/v	Volumen pro Volumen
	Prostate	w/v	Masse pro Volumen

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Hormon-Regelkreis	1
Abbildung 2 Steroidhormon-Synthese nach Harshman ⁶	7
Abbildung 3 Überblick über Apoptose-Signalwege nach Kavitha et al., ⁶⁸ Liu et al. ⁶⁹ und Reed ⁷⁰	12
Abbildung 4 Wachstumskinetik im 24-Well-Maßstab von LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation über 120h	30
Abbildung 5 qRT-PCR und Western Blot Analysen des AR in LNCaP Zellen unter 10 μM Abirateron-Inkubation über 120h	31
Abbildung 6 Western Blot Analysen von HSP70 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- Inkubation über 120h	32
Abbildung 7 Western Blot Analysen von HSP90α in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- Inkubation über 120h	33
Abbildung 8 Western Blot Analysen von HOP in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- Inkubation über 120h	34
Abbildung 9 Western Blot Analysen von HSP40 in PC-3 Zellen unter 30 μM Abirateron- Inkubation über 120h	35
Abbildung 10 qRT-PCR und Western Blot Analysen von HSP60 in LNCaP Zellen unter 10 μM Abirateron-Inkubatiom über 120h	36
Abbildung 11 qRT-PCR und Western Blot Analysen von HSP60 in PC-3 Zellen unter 30 μM Abirateron-Inkubation über 120h	37
Abbildung 12 Western Blot Analysen von p53 in LNCaP Zellen unter 10 μM Abirateron- Inkubation über 120h	38
Abbildung 13 Western Blot Analysen von PARP in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- Inkubation über 72h	39
Abbildung 14 qRT-PCR Analysen von Caspase-3 und Caspase-9 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- bzw. Docetaxel-Inkubation über 72h	40
Abbildung 15 qRT-PCR Analysen von BAX, p21 und Survivin in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation über 72h	41
Abbildung 16 qRT-PCR und Western Blot Analysen von HSP27 in LNCaP Zellen unter 10 μM Abirateron-Inkubation über 120h	42
Abbildung 17 qRT-PCR und Western Blot Analysen von HSP27 in PC-3 Zellen unter 30 μM Abirateron-Inkubation über 120h	43
Abbildung 18 Wachstumskinetik in PC-3 und PC3-HSP27 Zellen unter 30 μM Abirateron- Inkubation über 120h	44
Abbildung 19 qRT-PCR Analysen von miR-1 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- Inkubation über 72h	45

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Stadieneinteilung des PCa anhand der TNM-Klassifikation ⁸	3
Tabelle 2 Einschlusskriterien für Active Surveillance und Watchful Waiting Konzepte ⁸	4
Tabelle 3 Übersicht über Zulassungsstudien für CRPC-Therapeutika nach Bahl et al. ¹⁶	6
Tabelle 4 Zellaufschluss durch Ultraschall	22
Tabelle 5 Pipettierschema zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	23
Tabelle 6 Pipettierschema für ein Polyacrylamidgel	24
Tabelle 7 Pipettierschema cDNA-Synthese – reverse Transkription der mRNA	27
Tabelle 8 Pipettierschema cDNA-Synthese – reverse Transkription der miR	27
Tabelle 9 qRT-PCR Protokolle der verschiedenen Primer	28
Tabelle 10 TNM-Klassifikation nach Wittekind ¹¹	53

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Prostata

Die Prostata, auch Vorsteherdrüse genannt, ist ein unpaarig angelegtes Organ des Mannes und gehört zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen. Sie ist im kleinen Becken ventral des Rektums und kaudal der Harnblase lokalisiert und wird von der Pars prostatica der Urethra (Harnröhre) durchzogen, in welche die Ausführungsgänge der Prostatadrüsen münden. Mikroskopisch unterscheidet man zwischen Drüsengewebe und fibromuskulärem Stroma, welches sich aus Bindegewebe und glatten Muskelzellen zusammensetzt und mit circa 70% den Großteil des Prostatavolumens ausmacht.

Mit Bedeutung für verschiedene Pathologien der Prostata kann man nach McNeal folgende Zonen unterscheiden: Periurethrale Mantelzone, zentrale Zone, periphere Zone und das anteriore fibromuskuläre Stroma.¹ Die periurethrale Mantelzone, auch Transitionalzone genannt, ist bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH) vergrößert. Das Prostatakarzinom (PCa) dagegen entsteht nahezu ausschließlich in der peripheren Zone, wodurch es häufig von rektal aus tastbar ist. Damit wird deutlich, warum die digitale rektale Untersuchung (DRU) in der Diagnostik des PCa unverzichtbar ist.

Die Prostata selbst wird in ihrer Entwicklung, Differenzierung und Funktion durch Androgene wie Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) beeinflusst. Diese unterliegen einem Regelkreis aus Hypothalamus, Hypophyse und Hoden (Abb. 1).



Abbildung 1 Hormon-Regelkreis

(GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormon; LH = luteinisierendes Hormon; FSH = Follikel-stimulierendes-Hormon) In den Leydig-Zellen des Hodens wird unter Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH) Testosteron synthetisiert, welches im Zielorgan durch das Enzym 5α-Reduktase in die aktivere Form DHT umgewandelt wird.² DHT besitzt verglichen mit Testosteron eine etwa fünffach höhere Affinität zum Androgenrezeptor (AR), welcher nach Hormonbindung, Dimerisierung und Translokation in den Nukleus als Transkriptionsfaktor für AR-regulierte Gene dient.³ Ein Zielgen des AR ist u.a. das prostataspezifische Antigen (PSA)-Gen, wodurch die Bedeutung von PSA als Tumormarker bzw. Verlaufsparameter erklärt wird.⁴

1.2 Screening, Einteilung, Klinik und Therapie des Prostatakarzinoms

In Deutschland ist das PCa nach wie vor die häufigste Tumorerkrankung und die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache bei Männern.⁵ Es handelt sich um eine sehr heterogene Erkrankung, welche sowohl langsam wachsende Tumore umfasst, die nicht therapiert werden müssen, als auch aggressive Varianten mit raschem infiltrierendem Wachstum und hohem Metastasierungspotential, welche daher einer zeitigen systemischen Therapie bedürfen.⁶ Darüber hinaus entwickeln PCa unter hormonablativer Therapie in der Regel eine Kastrationsresistenz.⁷ Die Bedeutung der Erforschung von Resistenzmechanismen und die Weiterentwicklung von Wirkstoffen ist dementsprechend hoch.

Die Früherkennung hat zum Ziel, bei asymptomatisch erkrankten Patienten mit einer Lebenserwartung von mindestens 10 Jahren, aggressive Tumore bereits im organbegrenzten Stadium zu erfassen.⁸ Da das PCa im Frühstadium keine Beschwerden verursacht, dient zur Früherkennung die Kombination aus DRU und PSA-Serumspiegel, dessen Normbereich bei 0 - 4 ng/ml liegt. Nach Whittemore et al. geht man davon aus, dass der PSA-Spiegel beim Karzinom um 3 ng/ml Gewebe erhöht wird, während er bei der BPH nur um 0,3 ng/ml Gewebe ansteigt.⁹ Weiterhin kann der PSA-Spiegel auch durch Entzündungsgeschehen erhöht sein. Der PSA-Wert, der also nicht tumorspezifisch ist, sollte daher niemals isoliert, sondern immer unter Berücksichtigung von Alter, Prostatavolumen, DRU und weiteren Einflussfaktoren, betrachtet werden. Eine Probenentnahme mittels Stanzbiopsie ist indiziert, wenn der kontrollierte PSA ≥4 ng/ml beträgt, die DRU auffällig ist oder der PSA-Wert rasch ansteigt. Die Biopsie erfolgt ultraschallgestützt über das Rektum oder den Damm wodurch aus beiden Prostatalappen zwischen 3 und 6 Stanzen gewonnen werden. Hierdurch kann ein histologischer Nachweis des PCa, ebenso wie die Einstufung des Gleason-Score erfolgen, welcher den Entdifferenzierungsgrad und somit Aggressivität und Wachstumstendenz des

Tumors klassifiziert. Der Gleason-Score ist wichtig für die Tumoreinteilung sowie Diagnostikund Therapieentscheidungen. Er wird durch die Summe zweier Gleason-Werte gebildet, welche durch das vorherrschende und zweithäufigste Wachstumsmuster des Tumors bestimmt werden und zwischen 1 und 5 liegen. Er orientiert sich an der Drüsenmorphologie, wobei Grad 1 einen gut differenzierten Tumor mit großer Ähnlichkeit zum physiologischen Prostatagewebe beschreibt. Grad 5 dagegen charakterisiert einen schlecht differenzierten Tumor ohne erkennbare ursprüngliche Prostatadrüsenarchitektur. Der Gleason-Score kann somit also zwischen 2 und 10 liegen, wobei ein Score ≥7 als ungünstig, mit zu erwartendem malignen Verlauf bewertet wird.¹⁰

Die Einteilung des PCa wird wie in Tab. 1 dargestellt vorgenommen. Sie basiert auf der TNM-Klassifikation und orientiert sich damit an der Ausdehnung des Primärtumors (T1-4), am Vorhandensein und der Lokalisation von Lymphknotenmetastasen (N0-3) sowie am Vorliegen von Fernmetastasen (M0-1), welche am häufigsten im Knochen auftreten. N0 und M0 stehen für das Fehlen von Lymph- bzw. Fernmetastasen. Die vollständige TNM-Klassifikation findet sich in Tabelle 10 im Anhang.¹¹

Stadieneinteilung	TNM-Klassifikation
lokal begrenztes PCa	T1-2 N0 M0
lokal fortgeschrittenes PCa	T3-4 N0 M0
metastasiertes PCa	N1-3 und/oder M1 (jedes T)

Tabelle 1 Stadieneinteilung des PCa anhand der TNM-Klassifikation⁸

Die Wahl des Therapiekonzeptes orientiert sich an Tumorstadium, Gleason-Score, Lebenserwartung, Komorbiditäten und Patientenwunsch. Bei lokal begrenzten Tumoren kommt eine kurative Therapie, also eine Therapie die auf Heilung abzielt, infrage. Hierfür steht zum einen die radikale Prostatovesikulektomie zur Verfügung, bei der die Prostata, Samenbläschen, prostatische Urethra und regionale Lymphknoten entfernt werden. Die Ergebnisse von Langzeitstudien zeigten 10 Jahre nach Operation bei 70% der Patienten einen PSA unterhalb der Nachweisgrenze. Fernmetastasen traten in 7% und Lokalrezidive in nur 4% der Fälle auf.¹² Als Alternative zur Operation kann eine perkutane Strahlentherapie oder Brachytherapie durchgeführt werden. Nicht-kurative Therapiekonzepte beim lokal begrenzten PCa zielen darauf ab, Patienten mit langsam wachsenden und kaum aggressiven Tumoren nicht unnötig zu therapieren (Watchful Waiting) bzw. die kurative Behandlung durch intensive Überwachung und Kontrollbiopsien hinauszuzögern, bis sich möglicherweise das Wachstumsverhalten des Tumors oder der Patientenwunsch ändert (Active Surveillance).⁸ Einschlusskriterien für Active Surveillance und Watchful Waiting sind in Tab. 2 dargestellt.

Active Surveillance			
Lebenserwartung	>10 Jahre		
PSA-Wert	≤10 ng/ml		
Gleason-Score	≤6		
T-Stadium	T1c und T2a		
Tumor in ≤2 Stanzen (von 10-12 Stanzen gesamt)			
≤50% Tumor pro Stanze			

Tabelle 2 Einschlusskriterien fü	Active Surveillance und	l Watchful Waiting Konzepte ⁸
----------------------------------	-------------------------	--

Watchful Waiting		
Lebenserwartung	<10 Jahre	
T-Stadium	T1-4	
Gleason-Score	≤7	
PSA-Wert	beliebig	

Zur Therapie des lokal fortgeschrittenen PCa stehen als kurative Therapieansätze die radikale Prostatovesikulektomie mit Lymphknotenresektion und adjuvanter perkutaner Strahlentherapie neben der alleinigen Strahlentherapie oder der perkutanen Strahlentherapie mit Hormonablation zur Verfügung. Darüber hinaus kann das Konzept Watchful Waiting bei Patienten mit einer Lebenserwartung unter 10 Jahren angewandt werden.

Beim metastasierten PCa erfolgt eine palliative Therapie, bei der keine Heilung erreicht werden kann, sondern das Ziel die Erhaltung bzw. Verbesserung der Lebensqualität und die Verlängerung des progressionsfreien Überlebens ist. Das Fortschreiten der Erkrankung wird initial in der Mehrheit der Fälle durch den Hormonentzug verzögert. Dieser kann operativ oder medikamentös, durch Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH)-Antagonisten (Abarelix, Degarelix) oder GnRH-Agonisten (u.a. Buserelin, Goserelin, Leuprorelin) sowie Antiandrogene (Flutamid, Bicalutamid, Cyproteronacetat), erfolgen. Bei Versagen einer Monotherapie erfolgt ein Präparatwechsel oder die Kombinationsmedikation zur maximalen Androgenblockade. Unter der hormonablativen Therapie entwickeln sich nahezu alle Tumore nach durchschnittlich 12-33 Monaten durch Selektionsdruck von einem hormonsensitiven zu einem kastrationsresistenten PCa (castration resistant prostate cancer = CRPC), welches unbehandelt innerhalb von 9-12 Monaten zum Tod des Patienten führt.⁷

Kastrationslevels befindet, aber das Karzinom dennoch weiter proliferiert. Die alleinige Hormontherapie ist nicht mehr wirkungsvoll und es kommen Chemotherapeutika wie Docetaxel und Cabazitaxel oder zusätzliche hormonablative Wirkstoffe wie Abirateron Acetat (Abirateron) und Enzalutamid zum Einsatz. Bis 2010 gab es in der Therapie des CRPC nur einen zugelassenen Wirkstoff, nämlich Docetaxel, der das Gesamtüberleben (overall survival = OS) verbessern konnte.¹³ Hierunter bestanden oder entwickelten sich aber häufig primäre¹⁴ bzw. therapieinduzierte^{15,16} Resistenzen. Die post-Docetaxel Behandlung hat sich in den letzten drei Jahren einem enormen Wandel unterzogen, da mehrfach neue Zulassungen zur CRPC-Therapie erfolgten. Dabei sind v.a. Cabazitaxel, Abirateron und Enzalutamid zu nennen.

Die Zulassungsstudien der drei Wirkstoffe beziehen sich alle auf CRPC-Patienten die nach oder unter Docetaxel-Therapie eine Progression des PCa entwickelten. Primärer Endpunkt war das OS, welches in allen Phase III Studien erreicht wurde. In der TROPIC-Studie lag das OS bei 15.1 Monaten für Cabazitaxel + Prednisolon vs. 12.7 Monaten für Mitoxantrone + Prednisolon. Die COU-AA-301-Studie war die Zulassungsstudie für Abirateron als Zweitlinientherapie. Das OS lag bei 14.8 vs. 10.9 Monaten für Abirateron + Prednisolon, verglichen mit Placebo + Prednisolon. Anfang 2013 wurde die AFFIRM-Studie abgeschlossen und Enzalutamid als Zweitlinientherapie beim CRPC zugelassen (OS 18.4 vs. 13.6 Monate für Enzalutamid bzw. Placebo).¹⁶ Eine Vergleichbarkeit der Wirkstoffe untereinander ist aufgrund unterschiedlicher Patientenpopulationen, sekundärer Endpunkte und Vergleichswirkstoffe nicht möglich,¹⁶ weshalb komparative Studien benötigt werden.

Für Abirateron wurde bereits die Studie zur Erstlinientherapie durchgeführt (COU-AA-302). Hier wurde der Einsatz von Abirateron + Prednisolon in Chemotherapie-naiven CRPC-Patienten mit alleiniger Prednisolon-Gabe verglichen. Primäre Endpunkte der Studie waren das radiologisch progressionsfreie Überleben (16.5 Monate mit Abirateron + Prednisolon vs. 8.3 Monate mit Prednisolon) und das OS (Median nicht erreicht mit Abirateron + Prednisolon vs. 27.2 Monate mit Prednisolon).¹⁷ Dies führte zur Zulassung von Abirateron als Erstlinientherapie beim CRPC durch die U.S. Food and Drug Administration (FDA) im Dezember 2012.^{16,18} Die beschriebenen zugelassenen Wirkstoffe zur zytostatischen bzw. erweiterten hormonablativen Therapie sind in Tab. 3 dargestellt.

Studie/Substanz/ Zulassung der FDA	Wirkmechanismus	Vergleichs- substanz	Überleben (Monate)	p-Wert
AFFIRM Enzalutamid ◆ 2012	AR-Signaling-Inhibitor	Placebo	18,4 vs. 13,6	<0,0001
COU-AA-301 Abirateron * • 2011	CYP17A1-Inhibitor	Placebo +Prednisolon	14,8 vs. 10,9	<0,0001
TROPIC Cabazitaxel ♦ 2010	Taxan-Zytostatikum	Mitoxantrone +Prednisolon	15,1 vs. 12,7	<0,0001

Tabelle 3 Übersicht über Zulassungsstudien für CRPC-Therapeutika nach Bahl et al.¹⁶

Die Herausforderung in der heutigen Zeit, mit einer Auswahl an wirksamen Medikamenten, ist also, diese zu koordinieren und herauszufinden wie, wann und in welcher Abfolge sie eingesetzt werden sollten um das optimale Outcome für den Patienten zu erreichen.^{18,19} Die Ausbildung von (Kreuz-)Resistenzen erschwert allerdings weiterhin die PCa-Therapie, weshalb auch hier ein Forschungsbedarf besteht.

1.3 Abirateron

Der Wirkstoff Abirateron ist ein 3-pyridyl-Steroid²⁰ und gehört als potenter, selektiver und irreversibler Cytochrom P450 17A1 (CYP17A1)-Inhibitor²¹ zur neuen Generation der CRPC-Therapeutika. CYP17A1 besitzt eine 17 α -Hydroxylase- und eine C_{17,20}-Lyase-Aktivität und ist ein essenzielles Enzym der Androgen- und Glukokortikoid-Synthese,²² welches im Gewebe der Nebennieren, des Hodens und der PCa-Zellen exprimiert wird.²³ Die Einnahme von Abirateron erfolgt peroral auf nüchternen Magen, in einer Dosierung von 1000 mg täglich, kombiniert mit 5 mg Prednisolon oder Prednison zweimal täglich. Die hormonablative Therapie mit Antiandrogenen und/oder GnRH-Therapeutika wird unter Abirateron-Therapie weitergeführt. Durch die Einnahme von Abirateron können spezifische Nebenwirkungen wie Ödeme, Hypertension oder Hypokaliämie, welche auf mineralokortikoide Wirkung zurückzuführen sind, entstehen. Wie in Abbildung 2 dargestellt, tritt die gesteigerte Synthese von Mineralokortikoiden wie z.B. Aldosteron als Ergebnis einer verminderten CYP17A1abhängigen Cortisol-Synthese und einem daraus resultierenden Wegfall der negativen Feedback-Hemmung auf das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) auf. Da hierdurch außerdem vermehrt Vorläufer von Cortison, welche mineralokortikoide Eigenschaften besitzen, gebildet werden, verabreicht man additiv zu Abirateron niedrig dosierte Glukokortikoide wie Prednison oder Prednisolon, welche die ACTH-Ausschüttung über negatives Feedback hemmen. Alternativ können Aldosteron-Antagonisten wie Eplerenon oder Spironolacton die mineralokortikoide Wirkung ausgleichen und die Schwere und Inzidenz von Abirateron-Nebenwirkungen abschwächen.



Abbildung 2 Steroidhormon-Synthese nach Harshman⁶

In Europa erfolgte die erstmalige Zulassung für Abirateron zur Zweitlinientherapie im September 2011 durch die European Medicines Agency (EMA) mit einer Erweiterung der Zulassung zur Erstlinientherapie im Dezember 2012. In der COU-AA-302-Studie konnte neben einem Überlebensvorteil auch ein verlängertes progressionsfreies Intervall beschrieben werden.¹⁸ Weiterhin ermöglicht die Behandlung mit Abirateron eine PSA-Reduktion ≥50% bei 29-63% der Patienten, ebenso wie ein verzögertes und reduziertes Auftreten von Skelettmetastasen bzw. dadurch bedingten pathologischen Frakturen und Schmerzen.⁶ Somit ist Abirateron als CYP17A1-Inhibitor ein derzeit sehr gut geeigneter Wirkstoff für die Therapie des CRPC vor oder nach Docetaxel, mit hoher Ansprechrate und einem nebenwirkungsarmen Profil, verglichen mit den Taxan-Zytostatika Docetaxel und Cabazitaxel. Es ist deshalb wichtig, Einsatzmöglichkeiten von Abirateron auch bei frühen PCa-Stadien zu evaluieren. Dazu wird Abirateron momentan in Phase II Studien evaluiert, in denen der neoadjuvante Einsatz bei Patienten mit intermediär- oder hoch-Risiko PCa vor radikaler Prostatovesikulektomie in Kombination mit Hormonentzug (GnRH-Agonist Leuprolide) analysiert wird.^{18,24}

Unter Abirateron-Behandlung kann es aber auch zur Resistenzentwicklung kommen. Leibowitz-Amit et al. führen dies beispielsweise auf eine gesteigerte intratumorale Expression von CYP17A1 zurück, nachdem sie Tumorbioptate von CRPC-Patienten nach CYP17A1-Inhibitor-Therapie untersuchten und eine erhöhte CYP17A1-Expression feststellten.²⁵ Auch in anderen Publikationen wird eine erhöhte CYP17A1-Expression in humanen CRPC-Xenografts nach Abirateron-Inkubation,^{26,27} ebenso wie die Hochregulation von AR und verkürzten AR Isoformen²⁶ beschrieben.

1.4 Der Androgenrezeptor und molekulare Aspekte des CRPC

Der AR gehört zu den Steroidhormon-Rezeptoren und entfaltet seine proliferative Wirkung über die Steuerung von AR-regulierten Genen, da er im aktivierten Zustand als Transkriptionsfaktor dient.²⁸ Im inaktiven Zustand liegt der AR im Komplex mit Hitzeschock-Proteinen (HSP) im Zytosol vor,²⁹ welche den AR stabilisieren und ihn vor vorzeitiger Proteolyse schützen.³⁰ Die Aktivierung, Dissoziation der HSPs und Konformationsänderung geschieht über Bindung der Liganden Testosteron und DHT.²⁸ Antiandrogene wirken, indem sie als kompetitive Inhibitoren die Liganden vom AR verdrängen und an den AR binden, ohne ihn zu aktivieren. Im Laufe der Entwicklung des CRPC können auch andere Liganden den AR in einen aktiven Zustand versetzen.³¹ Der aktivierte AR dimerisiert, wird phosphoryliert, dadurch in den Nukleus transloziert und löst über Bindung an AR-response-elements (ARE) der Zielgene die Transkription der AR-regulierten Gene aus.^{3,4}

Das CRPC ist dadurch gekennzeichnet, dass die PCa-Proliferation weiterhin größtenteils ARabhängig abläuft, obwohl die Androgenkonzentration unterhalb des Kastrationslevels liegt.²⁵ Eine neue Generation von anti-hormonalen Therapeutika hat gezeigt, dass ein weiteres Absenken des Testosteronspiegels für die CRPC-Therapie wirksam ist, auch wenn sich das Androgenlevel bereits unter Kastrationsniveau befindet. Darin liegt begründet, warum man nicht mehr wie früher vom hormon-insensitiven PCa spricht.³² Die Einbeziehung des AR erkennt man an der fortlaufenden Aktivierung von AR-regulierten Genen wie dem PSA-Gen, weshalb die CRPC-Entwicklung u.a. durch einen PSA-Progress gekennzeichnet ist.³²

Die Literatur beschreibt dabei zahlreiche mögliche Mechanismen der CRPC-Entstehung, wie etwa eine Amplifizierung des AR mit daraus resultierender erhöhter Ansprechbarkeit auf niedrige Androgenlevel,^{33,34} AR Mutationen, welche den AR auf Östrogene, Progesteron und sogar Antiandrogene ansprechen lassen,³¹ oder eine Dysregulation von Co-Faktoren des AR³⁵ wie etwa HSPs. Weiterhin wird eine intratumorale Androgensynthese,^{36,37} wie auch die vermehrte intratumorale Konversion von adrenalen Androgenen zu Testosteron und DHT³⁸ postuliert. Die intratumorale Androgensynthese ist auf das Enzym CYP17A1 angewiesen, weshalb es unter Therapie mit Abirateron zu einer Unterdrückung dieses Syntheseweges kommt. Chang et al. berichten allerdings über einen alternativen Stoffwechselweg der intratumoralen Androgensynthese, der unter Umgehung von Testosteron durch die 5 α -Reduktase eine Umwandlung von Androstenedione in DHT bewirkt (vgl. Abb. 2).³⁹ Dies kann daher als primäre oder therapieinduzierte Resistenz gegenüber einer Abirateron-Therapie gedeutet werden.

1.5 Hitzeschock-Proteine

HSPs beeinflussen als Chaperone zahlreiche zelluläre Faktoren. Sie regulieren aber nicht nur Proteinfaltung und -stabilität, sondern sind darüber hinaus auch in Protein-Transport und transkriptionelle Aktivität eingebunden.²⁹ HSPs sind in zahlreichen Tumoren überexprimiert und nehmen so Einfluss auf Tumorzellproliferation, Differenzierung, Invasion, Metastasierung und Immunantwort.⁴⁰ Sie stellen daher Wirkstoff-Targets in der Tumortherapie dar.⁴¹ Im PCa sind HSP27⁴² und HSP90⁴³ oftmals überexprimiert, weshalb sie mit Tumorgenese und Resistenzentwicklung in Zusammenhang gebracht werden.

HSP27 spielt beim CRPC eine zentrale Rolle, da es als AR-Induktor und somit als zytoprotektiver Faktor Einfluss auf die PCa-Proliferation nimmt. Unsere Arbeitsgruppe

beschreibt die Suppression von AR-Protein durch HSP27 silencing in PCa-Zellen,⁴⁴ ebenso wie Rocci et al. eine verstärkte AR-Aktivität durch transiente HSP27-Überexpression zeigen.⁴⁵ Da HSP27 in Docetaxel-behandelten PCa-Zellen induziert wird,⁴⁶ weist dies auf eine Resistenzentwicklung der PCa-Zellen gegenüber dem Taxan hin.

HSP70 und HSP90 stabilisieren als Chaperone den AR in seiner inaktiven zytoplasmatischen Form²⁹ und werden in ihrer Funktion durch die Co-Chaperone HSP70-HSP90-Organizing-Protein (HOP) und HSP40 unterstützt.⁴⁷ HSP90 besitzt darüber hinaus weitere Bindungspartner, welche zumeist in Signaltransduktion und Zellproliferation involviert sind. Weiterhin eignen sich HSPs zur prognostischen Einschätzung, beispielsweise werden HSP27^{40,48} und HSP60⁴⁸ im PCa als negativ prädiktive Marker beschrieben.

HSP60 gilt laut Literatur als Faktor der Apoptose, da er u.a. mit p53, Bcl-2-associated X protein (BAX), Caspasen und Survivin interagiert. Es gehört zur Gruppe der mitochondrialen Chaperone, wodurch es Einfluss auf den Proteintransport vom Zytoplasma in die mitochondriale Matrix, ebenso wie auf die Faltung dieser Proteine nimmt.⁴⁹ Eine klare Einordnung von HSP60 zu pro- bzw. anti-apoptotischen Faktoren gibt es in der Literatur aber nicht. Einige Gruppen beschreiben aufgrund einer Aktivierung von Caspasen eine pro-apoptotische Funktion von HSP60.^{50,51} Andere Daten deuten eine anti-apoptotische Funktion von HSP60 an, da eine Überexpression von HSP60 und dem zugehörigen HSP10 zur Desintegration von BAX, einem pro-apoptotischen Faktor führt.⁵² Darüber hinaus beschreiben Ghosh et al., dass HSP60 mit dem Tumorsuppressor p53 Bindungen eingeht, welche p53 in seiner Funktion behindern.⁵³

1.6 Apoptosefaktoren

Die Apoptose ist als eine Form des programmierten Zelltods, im Gegensatz zur Nekrose, ein kontrolliert ablaufender Prozess, der ab einem gewissen Punkt irreversibel verläuft. Ein zentrales Protein der Apoptose ist der Tumorsuppressor p53, der durch seine proapoptotische Funktion Apoptose auslösen kann. p53 wird bei Zellschädigung, Einwirkung von Noxen oder DNA-Schädigung stabilisiert, und es induziert und reguliert als Transkriptionsfaktor Gene, Apoptoseeinleitung, DNA-Reparatur die an und Zellzykluskontrolle beteiligt sind.^{54,55} Die apoptotische Wirkung von p53 wird zum Teil über die proteolytische Aktivierung von Caspasen vermittelt, welche als inaktive Procaspasen synthetisiert werden und im aktiven Zustand die Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PolyADP-Ribose-Polymerase (PARP) bewirken.^{54,56} Durch die Spaltung wird PARP inaktiviert, da eine DNA-Reparatur bei Apoptose-Einleitung nicht mehr sinnvoll ist.⁵⁷ Die Spaltung von PARP kennzeichnet zugleich den Eintritt in die irreversible Phase der Apoptose und ist daher ein wichtiger Apoptosemarker.

p53 ist in 50% aller Tumore mutiert, was die Bedeutung von veränderten Apoptose-Signalwegen bei der Progression von benignen zu malignen Zellen hin verdeutlicht.^{55,58} In PCa-Zellen liegt p53 in unterschiedlicher Expression vor. LNCaP Zellen exprimieren wildtyp p53, wohingegen in PC-3 Zellen aufgrund einer frameshift-Mutation eine verkürzte p53 Isoform vorliegt.⁵⁹ Dies kann als ein Bestandteil der PCa-Karzinogenese gewertet werden.

Survivin wirkt als Faktor der inhibitor-of-apoptosis-protein (IAP)-Familie der proapoptotischen Funktion von p53 entgegen und hemmt die Aktivierung der Caspasen. Es unterliegt zudem einem hemmenden Einfluss von p53 und ist in der Mehrzahl aller soliden Tumore überexprimiert.⁶⁰ Weiterhin ist beschrieben, dass die Überexpression von Survivin mit Tumor-Progression und Therapieresistenz korreliert.⁶¹ Die Regulation von Survivin wird in MCF-7 (Brustkrebszellen) und HeLa Zellen (Zervixkarzinomzellen) über Phosphorylierung durch Cyclin-abhängige Kinasen vorgenommen.⁶² Daher stellen CDK- bzw. Survivin-Inhibitoren mögliche therapeutische Ansätze in der Tumortherapie dar.

BAX und p21 unterstehen beide einem positiven Einfluss von p53, unterscheiden sich jedoch in ihrer Wirkung. p21 reguliert als Mitglied der Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitoren u.a. p53,⁶³ inhibiert jedoch die Caspase-3⁶⁴ und Caspase-9-Aktivität⁶⁵ z.B. durch eine Blockierung der Protease-Bindungsstelle. Weiterhin verhindert es die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien.⁶⁶ p21 sorgt somit für ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Faktoren. BAX dagegen bewirkt als pro-apoptotischer Faktor der Bcl-2-Familie die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien durch die Formierung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch indirekt, zusätzlich zum direkten Weg, Caspase-3 aktiviert wird.⁶⁷ Eine schematische Übersicht über Apoptose-Signalwege ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abbildung 3 Überblick über Apoptose-Signalwege nach Kavitha et al., 68 Liu et al. 69 und Reed 70

1.7 microRNA

MicroRNAs (miR) sind kurze, nicht-kodierende RNA-Stränge, welche über Bindung an die Ziel-mRNA regulierend auf mRNA-Stabilität und -Translation wirken können und somit in die Expression von Protein-kodierenden Genen eingreifen.⁷¹ Sie sind dadurch in elementare Prozesse wie Differenzierung, Apoptose und Proliferation eingebunden.⁷¹ Dabei können veränderte miR-Level je nach Ziel-mRNA sowohl tumorsuppressiv als auch onkogen wirken.⁷² Die am häufigsten herrunterregulierte miR in soliden Tumoren ist die miR-1⁷² und auch auf das PCa bezogen spielt v.a. die miR-1 eine wichtige Rolle. Ambs et al. und Kojima et al. machten die Beobachtung, dass miR-1 in PCa-Zellen, verglichen mit umliegendem physiologischem Gewebe, herunterreguliert ist, weshalb eine tumorsuppressive Eigenschaft von miR-1 vermutet wird.^{71,73} Dies wird durch die Feststellung untermauert, dass PCa-Zellen mit transienter miR-1-Überexpression eine herabgesetzte Proliferationsrate⁷¹ und eine verminderte AR-Expression⁴⁴ aufweisen. Aktuelle Arbeiten unserer Gruppe zeigen außerdem einen hemmenden Einfluss von HSP27 auf die miR-1 in PCa-Zellen.⁴⁶ miR-1 ist daher ein

zentraler Bestandteil von Signal-Netzwerken in PCa-Zellen und spielt möglicherweise bei der Resistenzentwicklung im CRPC eine Rolle.

1.8 Zielsetzung

Der selektive CYP17A1-Inhibitor Abirateron hemmt die zelluläre Androgensynthese in Nebennieren, Hoden und epithelialen Zellen der Prostata²³ und ist neben einem weiteren neuen antiandrogenen Wirkstoff für die Behandlung des CRPC zugelassen. Zudem befinden sich einige Wirkstoffe mit zum Teil neuartigen Wirkmechanismen kurz vor der Zulassung. Diese Erweiterung der medikamentösen Therapieoptionen macht es notwendig, die molekularen Effekte dieser Wirkstoffe zu untersuchen und beteiligte Signal- und Effektorkaskaden zu identifizieren. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse auf Ebene von Zellund Molekularbiologie können dann zur Beurteilung herangezogen werden, ob potentiell synergistische Therapeutika kombiniert werden sollten, welche Wirkstoffe bei sequentiellen Therapien eingesetzt werden könnten und ob bei Applikation verschiedener Medikamente mit Kreuzresistenzen zu rechnen wäre. Zur molekularen Charakterisierung von Abirateron liegen bisher nur sehr wenige experimentelle Daten vor.

Inhalt dieser Arbeit ist es, ein PCa Zellkultur-Modell zu etablieren, mit welchem Abirateron-Inkubationsversuche durchgeführt und in der Folge die PCa-Zellen molekular analysiert werden können. Hierzu werden initial die IC₅₀-Konzentrationen für AR-positive LNCaP und AR-negative PC-3 Zellen ermittelt. Die verschiedenen Zelllinien repräsentieren hierbei unterschiedliche Progressionsstadien des CRPC. Anschließend werden verschiedene Faktoren untersucht, die sowohl für die Progression der Tumorzellen als auch für die therapeutische Wirkung von Abirateron entscheidend sein können. Dies sind einerseits der AR und AR-assoziierte HSPs (HSP40, HSP70, HSP90, HOP) welche in PCa-Zellen maßgeblich das Zellwachstum regulieren, sowie Faktoren der Apoptose (p53, PARP, p21, BAX, Survivin, Caspase-3, Caspase-9). Die molekulare Analyse dieser Faktoren erfolgt mittels qRT-PCR und Western Blotting.

2 Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Verbrauchsmaterial	Hersteller
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Absaugvorrichtung VACUSIP	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Brutschrank function line	Heraeus Instruments (Hanau)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CFX96 [™] Real-Time-PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories (München)
ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories (München)
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Filterpapier	Whatman (Dassel)
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Heizblock QBT 1	CLF Laborgeräte (Emersacker)
Inkubator Nuaire [™] US Autoflow	NuAire (Plymouth, USA)
Invertierer	VWR International (Darmstadt)
Klebefolie BZO Seal Film für PCR	Biozym (Wien, Österreich)
Magnetrührer IKA RH basic 2	VWR International (Darmstadt)
Mikroskop IT400+	VWR International (Darmstadt)
Neubauer Zählkammer	Carl Roth (Karlsruhe)
Nitrozellulose-Membran PROTEAN®	Whatman (Dassel)
PCR-96-Well TW-MT-Platte weiß	Biozym (Wien, Österreich)
pH-Meter FiveEasy [™] FE20	Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)
Pipettensatz, 0,5-1000 μl	Carl Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
	BD Biosciences (Heidelberg)
	Biozym (Wien, Österreich)
Pipettierhilfe peqMATE	Peqlab (Erlangen)
PowerPack [™] Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories (München)
Reinstwasseranlage Milli-Q [®]	Millipore (Billerica, USA)
Rollmischer RS-TR 5	Phoenix Instruments (Garbsen)
Schüttler Vibramax 100	Heidolph Instruments (Schwabach)
SDS-PAGE Zubehör Mini-PROTEAN System	Bio-Rad Laboratories (München)
Spektralphotometer Nano-Drop 2000c	Thermo Scientific (Wilmington, USA)
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments (Hanau)
Thermoschüttler TS-100	BioSan (Riga, Lettland)
Thermocylcer T3000	Biometra (Göttingen)
Trans-Blot [®] SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Überkopfschüttler Multi Bio RS-24	BioSan (Riga, Lettland)
Ultraschallgerät Transsonic 460/H	Elma (Singen)
Vortex Mixer peqTWIST	Peqlab (Erlangen)
Waage EMB 2000-2	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Wasserbad W14	Grant Instruments (Cambridge, Großbritannien)
Wippschüttler UNITWIST-RT	Armin Baack (Schwerin)
Wippschüttler MR-1	BioSan (Riga, Lettland)

Zellkulturplastik	Sarstedt (Nümbrecht) Greiner bio-one (Frickenhausen) TPP AG (Trasadingen, Schweiz)
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products AC (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifuge Centrifuge 5415R Zentrifuge PerfectSpin P Zentrifuge Mikro 120	Eppendorf (Hamburg) Peqlab (Erlangen) Hettich Lab Technology (Tuttlingen)

2.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth (Karlsruhe)
1-Bromo-3-Chloropropan	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2-Ethanolsulfonsäure (HEPES)	Carl Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Abirateron Acetat (Abirateron)	Janssen Cilag
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Feinchemie KH. Kallies KG (Sebnitz)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Complete [™] Mini, EDTA-frei	Roche Diagnostics (Mannheim)
Coomassie [®] Brilliant Blue G 250	Fluka (Buchs, Schweiz)
D(+)-Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe)
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Docetaxel	Sigma-Aldrich (Steinheim)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Guanidinhydrochlorid	AppliChem (Darmstadt)
Harnstoff	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe)

para-Hydroxycoumarinsäure Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Poly-L-Lysin Ponceau S Sodiumdodecylsulfat (SDS) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Steinheim) Sigma-Aldrich (Steinheim) Sigma-Aldrich (Steinheim) Carl Roth (Karlsruhe) SERVA Electrophoresis (Heidelberg) Carl Roth (Karlsruhe)
Thioharnstoff	Merck (Darmstadt)
Trichloressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton® X-100	Ferak (Berlin)
Trypsin, Sequencing Grade	Promega (Madison, USA)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth (Karlsruhe)

kommerzielle Lösung	Hersteller
10x Rotiblock-Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Geneticindisulfat (G418)-Lösung	Carl Roth (Karlsruhe)
Pager Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
peqGOLD TriFast [™]	Peqlab (Erlangen)
Sensimix SYBR Hi-ROX	Bioline (Luckenwalde)
SuperSignal West Dura	Thermo Scientific (Rockford, USA)

2.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung
10% SDS	10% w/v SDS-Pellets
10x Laufpufferstocklösung	192 mM Glycin; 24,8 mM Tris; pH 8,3
1x SDS-Laufpuffer	10% v/v 10x Laufpuffer; 0,1% v/v 10% SDS
10x DPBS	1,37 M NaCl; 26,8 mM KCl; 101,1 mM Na2HPO4 x 2 H2O; 17,6 mM KH2PO4; pH 7,4
1x Roti Blockierlösung	10% v/v 10x Rotiblock-Konzentrat
10x TBS	0,2 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,6
1x TBS-T	10% v/v 10x TBS; 0,1% v/v Tween 20
2D-Lysepuffer	8 M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 65 mM CHAPS; 130 mM; 80 mM Tris
5x Proteinladepuffer	156 mM Tris, pH 6,8; 25% v/v Glycerol; 5% v/v SDS; 12,5% v/v ß-Mercaptoethanol; 0,2% w/v Bromphenolblau

Antikörperlösung	5% w/v BSA; 10% v/v 10x TBS; 0,001% v/v Tween 20
Bradford-Reagenz	10% w/v Coomassie® Brilliant Blue G 250; 5% v/v Ethanol; 8,5% v/v H₃PO₄
BSA-Standard in 2D-Lysepuffer	100% w/v BSA in 2D-Lysepuffer
BSA-Standard in A.bidest	100% w/v BSA in A.bidest
CASY ton	154 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; in A.bidest
DEPC-Wasser	0,1% v/v DEPC, autoklaviert
ECL-Lösung A	25% w/v Luminol Natriumsalz; in 0,1 M Tris; pH 8,6
ECL-Lösung B	110% w/v para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
Elutionspuffer	200 mM Glycin; 0,2% w/v SDS; 0,1% v/v Tween 20; in 100 mM Tris-HCl; pH 6,8
Guanidinhydrochlorid	0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol
Home-Made Solution	90,99% v/v ECL-Lösung A, 0,027% v/v 30% H ₂ O ₂ , 9,088% v/V ECL-Lösung B
Poly-L-Lysin Solution	0,01% w/v Poly-L-Lysin in sterilem Wasser
Ponceau-S	0,2% w/v Ponceau S; 3% v/v Trichloressigsäure
RIPA-Lysepuffer-Gebrauchslösung	67% v/v Lysepuffer-Stammlösung; 1 mM Na₃VO₄; 20 mM NaF; 20 mM Glycerol-2- Phosphat; 0,1 mM PMSF; 20% w/v Complete [™] Mini EDTA-frei
RIPA-Lysepuffer-Stammlösung	50 mM Tris (pH 7,5); 5 mM EDTA (pH 8,0); 150 mM NaCl; 10 mM K ₂ HPO ₄ ; 10% v/v Glycerol; 1% v/v Triton X-100; 0,05% v/v SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
Transferpuffer	20% v/v Methanol; 10% v/v 10x Laufpufferstocklösung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8

2.4 Enzyme und Kits

Enzym	Hersteller
M-MLV Reverse Transkriptase RiboLock [™] RNase	Promega (Mannheim) Thermo Scientific (Rockford, USA)
Kit	Hersteller

2.5 Antikörper

Primärantikörper	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Anti-AR-XP [™] rabbit	1:10000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-GAPDH rabbit	1:10000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-HOP rabbit	1:1000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-HSP27 mouse	1:10000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-HSP40 rabbit	1:3000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-HSP60 rabbit	1:15000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-HSP70 rat	1:3000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-HSP90a rabbit	1:5000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-HSP90ß rabbit	1:3000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-p53 mouse	1:10000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-PARP rabbit	1:10000	Cell Signaling (Danvers, USA)
Sekundärantikörper	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Goat anti-rabbit-IgG	1:5000	Cell Signaling (Danvers, USA)

Cell Signaling (Danvers, USA)

Cell Signaling (Danvers, USA)

1:5000

1:5000

2.6 Primer

Horse anti-mouse-IgG Goat anti-rat IgG

Primer für qRT-PCR	Sequenz (5' nach 3')
AR FOR	TGCCTGATCTGTGGAGATGA
AR REV	CGAAGACGACAAGATGGACA
BAX FOR	TCCCCCGAGAGGTCTTTT
BAX REV	CGGCCCCAGTTGAAGTTG
Casp3 FOR	GCTCCTAGCGGATGGGTGCT
Casp3 REV	GATTTCAAGGCGACGCCAAC
Casp9 FOR	GCTGCAGGTGGACCAGCTCT
Casp9 REV	GATCAGCTGCCTGGCCTGAT
HSP27 FOR	GCTGACGGTCAAGACCAAGGATG
HSP27 REV	GGATGGTGATCTCGTTGGACTGC
HSP60 FOR	GATGCTGTGGCCGTTACAA
HSP60 REV	TAGTGCCATCCCCAGCTTC

p21 REV GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC	
PSA FOR CCGGAGAGCTGTGTCACCAT	
PSA REV GTGCAGCACCAATCCACGTC	
RPLPO FOR CAATGGCAGCATCTACAACC	
RPLPO REV ACTCTTCCTTGGCTTCAACC	
Survivin FOR TGCCCCGACGTTGCC	
Survivin REV CAGTTCTTGAATGTAGAGATGC	GGT

2.7 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml Penicillin 10 g/ml Streptomycin	PAN Biotech (Aidenbach)

2.8 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
LNCaP	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
PC-3	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
PC3-HSP27	Stope et al. ⁷⁴

2.9 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Produkt	Hersteller/Herstellung
10x Trypsin-EDTA 0,5/0,2 % in DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
2x Trypsin	20% v/v 10x Trypsin-EDTA in DPBS
DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
Einfriermedium	70% v/v RPMI 1640 mit Phenolrot 20% v/v FCS 10% v/v DMSO
Fetales Rinderserum (FCS)	Invitrogen (Darmstadt)
Pyruvat	PAN Biotech (Aidenbach)
Medium RPMI 1640 mit Phenolrot	PAN Biotech (Aidenbach)
Vollmedium (RPMI ^{+/+/+})	RPMI 1640 mit Phenolrot 1% Penicillin/Streptomycin 1% Pyruvat 10% FCS (hitzeinaktiviert)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die im Labor verwendeten PCa-Zelllinien LNCaP, PC-3 und PC3-HSP27 wurden zur dauerhaften Lagerung der niedrigen Passagen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mittels Trypsinbehandlung aus den Zellkulturgefäßen gelöst, die Zellsuspension in Vollmedium resuspendiert und durch Zentrifugation (1000 U/min für 5 min) pelletiert. Das dabei entstandene Sediment wurde in 3 ml Einfriermedium resuspendiert und die Zellzahl/ml mittels CASY TT Cell Counter bestimmt. Pro Kryovat wurden 3 x 10⁶ Zellen in einem mit Isopropanol befülltem Behälter zunächst bei -80 °C tiefgekühlt und anschließend in einem Tank mit Flüssigstickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch langsames Erwärmen des Kryovats bei 37 °C, anschließender Vereinzelung der Zellen in 3 ml Vollmedium, 5 minütiger Zentrifugation (1000 U/min) mit Verwerfung des Überstands und erneuter Resuspendierung des Sediments in 3 ml Vollmedium. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellsuspension in T75-Zellkulturflaschen überführt, in welche 17 ml Vollmedium vorgelegt wurde und welche dann im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit gelagert wurden. Bei Subkonfluenz wurden die Zellen erneut umgesetzt und mit frischem Vollmedium versetzt.

3.1.2 Kultivierung und Normalpassage von Zellen

Das Passagieren erfolgte zweimal wöchentlich, nachdem die Zellen 80-90% Konfluenz erreicht hatten. Hierfür wurde das verbrauchte Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml 2xTrypsin und 3 minütiger Inkubation aus den Kulturgefäßen gelöst. Reste von anhaftenden Zellen wurden mit Medium abgespült und die Zellsuspension ausreichend vereinzelt. Ein entsprechender Anteil aus der Zellsuspension wurde in eine neue T75-Zellkulturflasche überführt, in welche 19 ml frisches Vollmedium vorgelegt wurde. Für die Kultivierung der Zelllinie PC3-HSP27 wurden zusätzlich 320 µl G418 pro T75-Zellkulturflasche zugegeben. Das Umsetzen der PC-3 Zellen erfolgte im Verhältnis 1:6 bis 1:8. Für PC3-HSP27 Zellen lag das Verhältnis bei 1:3 bis 1:4 und für LNCaP Zellen bei 1:3 bis 1:5. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 9 bis 33 verwendet.

3.1.3 Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter

Vor der erstmaligen Analyse einer Probe wurde das Gerät auf die jeweilige Zelllinie geeicht, um vitale Zellen von toten Zellen und Zelltrümmern unterscheiden zu können, da die Zellen der unterschiedlichen Zelllinien in Größe und Form variieren. Für die Messung mit dem CASY TT Cell Counter wurde eine Zellsuspension verwendet, in der die Zellen ausreichend vereinzelt vorlagen. Dafür wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben zunächst durch Trypsinbehandlung gelöst und in Medium oder DPBS resuspendiert. Für die Zählung wurden 100 µl der Probe in 10 ml CASY ton verdünnt. Angegeben wurde ein Zelltiter (Zellen/ml), welcher sich als Mittelwert aus 3 Messwerten ergab. Bezogen auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension konnte somit die absolute Zellzahl der Probe ermittelt werden.

3.1.4 Inkubation von Zellen mit Wirkstoffen und Ernten von Zellen

Wachstumskinetiken wurden im 24-Well-Maßstab durchgeführt, wohingegen die Kultivierung der Zellen für Protein- und RNA-Analysen im 6-Well-Maßstab erfolgte. Es wurden dafür Zellzahlen ausgesät, bei denen ein sigmoidales Wachstum über den gewählten Zeitraum und keine Inhibition durch bereits bestehende Konfluenz oder Nährstoffmangel zu erwarten war. Ausschlaggebend für die ausgesäte Zellzahl war somit die Größe des Zellkulturgefäßes, ebenso wie die geplante Inkubationsdauer.

Die Zellkulturgefäße wurden vor Versuchsbeginn mit Poly-L-Lysin Solution beschichtet. 24h nach der Aussaat wurde ein Mediumswechsel mit Wirkstoffzugabe vorgenommen. Die Wirkstoffe wurden dafür zu Versuchsbeginn aus den jeweiligen Stammlösungen mit Vollmedium auf die berechnete Arbeitskonzentration verdünnt, in der Regel eine 1:1000 Verdünnung. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und frisches Vollmedium mit zugesetztem Wirkstoff vorsichtig auf die adhärenten Zellen gegeben. Als Kontrollansatz wurden parallel weitere Zellen mit einer äquivalenten Menge an Lösungsmittel inkubiert. Abirateron und das Zytostatikum Docetaxel wurden in DMSO gelöst und in den jeweiligen IC₅₀ Konzentrationen für die verschiedenen Zelllnien eingesetzt. Die IC₅₀ Bestimmung für Abirateron erfolgte im Rahmen dieser Arbeit. Für Docetaxel dagegen konnte die IC₅₀ in Vorversuchen der Arbeitsgruppe bereits ermittelt werden (10 nM für LNCaP und PC-3). Nach gewünschter Behandlungszeit wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen

mittels DPBS und Zellschaber oder mittels Trypsin vereinzelt, die Oberfläche mit Medium oder DPBS nachgespült und die Zellen der Zählung oder der weiteren Aufbereitung zugeführt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Protein-Isolierung

Zur Isolierung des Gesamtproteins aus den PCa-Zellen wurde RIPA-Lysepuffer verwendet. Zunächst wurde das verbrauchte Medium aus den Zellkulturgefäßen verworfen und die Zellen in DPBS mithilfe eines Zellschabers geerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000 U/min für 5 min) pelletiert, der Überstand abgesaugt, das verbliebene Sediment je nach Größe in 30-100 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert und durch Ultraschall weiter aufgeschlossen (Tabelle 4). Das entstandene Lysat konnte für die folgende Analysen verwendet werden oder bei -20 °C gelagert werden. Zur simultanen Extraktion von Proteinen und RNA aus Zellen wurde das Reagenz peqGOLD TriFast[™] (Peqlab) nach Herstellerangaben verwendet. Die Isolation basiert auf einer Einschritt-Flüssigphasen-Separation. Das dadurch gewonnene Proteinpellet wurde abhängig von seiner Größe in 70-200 μl 2D-Lysepuffer (2D-LP) für 1h bei Raumtemperatur (RT) mittels Rüttler gelöst. Gelagert wurden die Proben bei -20 °C.

Tabelle 4 Zellaufschluss durch Ultraschall		
Stoßanzahl	Amplitude [%]	Cycle
15-20	40	0,3

.

3.2.2 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm.⁷⁵ Grundlage ist die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant blue G250 an verschiedene Aminosäurereste der Proteine, welche eine Änderung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm bewirken.⁷⁵ Durch Verdünnung eines definierten BSA-Proteinstandards wurde eine Eichreihe erstellt (siehe Tabelle 5), anhand derer die Protein-Konzentrationen der Lysate bestimmt werden konnten. Für die Konzentrationsbestimmung der Proben wurden 2 µl Lysat mit 18 µl zweifach destilliertem Wasser (A.bidest) und 300 µl Bradford Reagenz pipettiert.

Die Absorptionsmessung erfolgte in Doppelbestimmung in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Abhängig von der Art der Proteingewinnung wurde der BSA-Standard in A.bidest oder in 2D-LP gelöst verwendet.

Eichreihe	µg BSA	BSA (0,2 μg/μl) in H₂O bzw. 2D-LP [μl]	A.bidest [µl]	Bradford Reagenz [µl]
1.	Leerwert		20	300
2.	0,4	2	18	300
3.	0,8	4	16	300
4.	1,2	6	14	300
5.	1,6	8	12	300
6.	2	10	10	300
7.	2,4	12	8	300
8.	2,8	14	6	300
9.	3,6	18	2	300

Tabelle 5 Pipettierschema zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

3.2.3 SDS-PAGE

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteingemischen nach Molekulargewicht und bietet somit die Möglichkeit zur Analyse einzelner Proteine.

Die Auftrennung im Polyacrylamid-Gel, welches nach Polymerisation eine porenartige Struktur aufweist, erfolgt ausschließlich anhand der Proteingröße. Kleinere Proteine können schneller durch das Gel wandern und finden sich nach dem Durchlauf näher an der Anode als größere Proteine. Um den Einfluss der Protein-Eigenladung auf die Geldurchwanderung zu unterbinden, wird im Ladepuffer enthaltenes Sodiumdodecylsulfat (SDS) zugegeben. Dieses bewirkt einerseits eine gleichmäßige negative Ladung aller Proteine durch Wechselwirkung mit den Aminosäureseitenketten und verursacht weiterhin die Denaturierung und Auflösung der Quartärstrukturen. Zur Reduktion von Disulfidbrücken im Protein wurde 2-Mercaptoethanol genutzt.

Die Elektrophorese wurde in einer Minigelapparatur mit 1x Laufpuffer durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte anhand eines diskontinuierlichen Systems, bestehend aus einem 5% Sammelgel und einem 10% Trenngel, welches nach dem unten stehenden Pipettierschema (Tabelle 6) hergestellt wurde. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert, danach auf

Eis abgekühlt, zentrifugiert und anschließend aufgetragen. Die verwendeten Proteinmengen lagen zwischen 40 und 120 μ g. Als Größenstandard wurde ein Marker (Page Ruler Prestained) auf jedem Gel mitgeführt. Der Gellauf wurde für 10 min bei 80 Volt gestartet und bei 140 Volt fortgesetzt, bis die Lauffront das Gelende erreichte.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)	
A.bidest	2,1 ml	2,4 ml	
Sammelgelpuffer	0,375 ml	-	
Trenngelpuffer	-	1,5 ml	
30% Acrylamid	0,5 ml	2 ml	
10% SDS	30 µl	60 µl	
10% APS	30 µl	60 µl	
TEMED	3 µl	6 µl	

Tabelle 6 Pipettierschema für ein Polyacrylamidgel

3.2.4 Western Blotting

Durch das Western Blotting erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteinmischung auf eine adsorbierende Membran, um somit die Proteine einer Analyse zugänglich zu machen. Verwendet wurden Nitrozellulose-Membranen, welche die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen binden und sich für Protein- und Immunfärbungen eignen. Als Blotsystem diente ein Semi-Dry-Blot, bei dem in Transferpuffer-getränktes Filterpapier in jeweils vier Lagen die Nitrozellulose-Membran und das darauf liegende Gel einschlossen. Geblottet wurde für 60 min mit 0,06 Ampere pro Membran. Im Anschluss an den Western Blot erfolgte zur Überprüfung der Proteinübertragung eine Anfärbung der Proteine auf der Membran. Die Membran wurde dafür direkt nach dem Blotten für 3-5 min in Ponceau-S-Färbelösung auf einem RT-Schüttler geschwenkt. Anschließend wurde zweimal mit A.bidest gewaschen, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen und Proteinbanden erkennen zu können. Entfärbt wurde darauffolgend mit 1xTBS-T. Zum Absättigen von freien Bindungsstellen wurde die Membran für 1-3h in 1xRoti blockiert. Nachfolgend wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung zugegeben und über Nacht auf einem 4 °C-Schüttler inkubiert.

3.2.5 Immunfärbung

Die Methode der Immunfärbung dient der Detektion und der Darstellung spezifischer Proteine. Nach der Inkubation des primären Antikörpers über Nacht wurde am nächsten Tag die Antikörperlösung abgenommen und die Membran drei Mal für je 5 min in 1xTBS-T gewaschen. Nachfolgend wurde der sekundäre Antikörper zugegeben (Verdünnung 1:5000) und für 1h bei RT inkubiert. Die Antikörperlösung wurde nach einmaligem Gebrauch verworfen und es erfolgte erneut ein dreimaliger Waschschritt mit 1xTBS-T für je 5 min bei RT, um ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Für den Proteinnachweis wurde frisch angesetzte Home-Made Solution verwendet. Jede Membran wurde mit 2 ml Detektionslösung benetzt und 5 min inkubiert. Der enzymgekoppelte Sekundärantikörper konnte nun über eine peroxidasevermittelte biochemische Reaktion der Detektionlösung, nämlich der Oxidation von Luminol und somit der Auslösung von Chemilumineszenz, nachgewiesen werden. Für den Nachweis von AR-Protein wurde dagegen die Detektionslösung SuperSignal West Dura eingesetzt. Der Signalnachweis, die Dokumentation und Quantifizierung über Densitometrie erfolgte mit dem ChemiDoc XRS+ und der Image Lab[™] Software Version 3.0. Vor erneutem Proteinnachweis wurde für 1-3h mit 1xRoti blockiert, und erst darauffolgend der nächste primäre Antikörper über Nacht inkubiert. Auf diese Art konnten bis zu drei verschiedene Proteine auf einer Membran nachgewiesen werden. Die Proteinexpression der Zellen wurde abschließend auf die Glycerinaldehyd-3phosphatdehydrogenase (GAPDH) normiert, welche als Referenz und Ladungskontrolle für alle Western Blot Analysen diente.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolierung

Die Präparation von RNA erfolgte mittels Einschritt-Flüssigphasen-Separation durch das Reagenz peqGOLD TriFast[™] (Peqlab) welches nach Herstellerangaben verwendet wurde. Die dabei entstandenen RNA-Pellets wurden in 16-50 µl DEPC-Wasser gelöst. Gelagert wurden die Proben bei -20 °C.

3.3.2 Präparation von miR

Die Präparation von microRNA (miR) wurde mithilfe des mirPremier microRNA Isolation Kits von Sigma Aldrich durchgeführt. Die präparierte miR wurde in elution solution gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.3.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von RNA und miR erfolgte mittels photometrischer Messung durch den Nano-Drop 2000c (Thermo Scientific, Peqlab). Gemessen wurde mit einem Probevolumen von 2 µl gegen das Lösungsmittel als Leerwert. Die Reinheit der Proben wurde anhand des Quotienten Absorption $_{260 \text{ nm}}$ / Absorption $_{280 \text{ nm}}$ bestimmt, welcher \geq 1,8 betragen sollte. Somit konnten Kontaminationen wie z.B. durch Proteine oder Phenolreste ausgeschlossen werden.

3.3.4 Reverse Transkription von RNA und miR

Die reverse Transkription, also die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA), ist ein notwendiger vorbereitender Schritt für die Polymerasekettenreaktion (PCR), da das PCR-Schlüsselenzym nur DNA als Substrat verwendet. Der erste Schritt der RNA-Umschreibung bestand in der Denaturierung der RNA mit der Entstehung von RNA-Einzelsträngen. Durch die Verwendung von Oligo-dT-Primern, welche sich an die Poly-A-Sequenz der mRNA anlagern, wurde sichergestellt, dass ausschließlich mRNA als Vorlage für die Umschreibung diente. Ein Ansatz wurde aus 1 µg RNA, 1 µl Olido-dT-Primer und RNase-freiem Wasser mit einem Gesamtvolumen von 13,7 µl hergestellt. Dieser wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert, bevor 6,3 µl Master Mix (siehe Tabelle 7) zugegeben wurde. Die reverse Transkription erfolgte für 60 min bei 42 °C und die abschließende Inaktivierung der Polymerase für 10 min bei 72 °C. Gelagert wurde die cDNA bei -20 °C.

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
1 μg RNA	4 μl 5xReaktionspuffer	
1 μl Oligo-dT-Primer	1 μl dNTP-Mix [10 mM]	
[100 μM]	0,5 μl RiboLock [20 U/μl]	
ad 13,7 ml A.bidest	0,8 μl M-MLV Reverse Transkriptase	
(RNase-frei)	[200 U/µI]	
= 1 Ansatz	Masterniu Zuscheuren C.2	= Deaktivierung der
	= Mastermix, Zugabe Von 6,3 μi pro Ansatz	reversen Transkriptase
5 Min bei 65°C	60 Min bei 42°C	10 Min bei 72°C

Tabelle 7 Pipettierschema cDNA-Synthese – reverse Transkription der mRNA

Die reverse Transkription der miR erfolgte mithilfe des miScript II RT Kits (Qiagen) nach dem in Tabelle 8 abgebildeten Schema. Nach Abschluss der Umschreibung wurde die synthetisierte cDNA mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 8 Pipettierschema cDNA-Synthese – reverse Transkription der miR

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
	4 μl HighSpec Buffer	
1 µg miR	2 μl NucleicMix	
ad 12 μl A.bidest	2 μl Reverse Transkriptase	
(RNase-frei)	0,8 μl M-MLV RT [200 U/μl]	
= 1 Ansatz	Mastawiy Zuzaha yan Qulana Apasta	= Deaktivierung der
	= Mastermix, Zugabe von 8 µl pro Ansatz	reversen Transkriptase
	60 Min bei 37°C	10 min bei 72 °C

3.3.5 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die PCR ist eine Methode, um eine definierte DNA-Sequenz zu vervielfältigen. Das Grundprinzip basiert auf drei Phasen (siehe Tabelle 9), welche mehrfach durchlaufen werden und somit zur Verdopplung der vorliegenden DNA-Sequenz (Template) pro Zyklus führt. Initial wurde die doppelsträngige (ds) DNA denaturiert (95 °C), da sich die DNA-Polymerase zur Amplifizierung des Templates nur an einsträngige DNA anlagern kann. Es folgte die Bindung der spezifischen Primer über Basenpaarung an die Einzelstränge (Annealingphase). Das Temperaturoptimum ist dabei primerabhängig, und wurde bei erstmaliger Benutzung des Primers über eine Gradienten-PCR mit verschiedenen Temperaturen ermittelt. Als drittes folgte die Elongationsphase, in welcher die Polymerase ausgehend vom Primer die komplementäre DNA in 5'-3'-Richtung vervollständigte. Da nun wieder dsDNA vorlag, musste erneut denaturiert werden. Die Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation wurden in 44 Zyklen wiederholt, wodurch eine exponentielle Zunahme der DNA-Sequenz stattfand, welche durch den Verbrauch der Reaktionskomponenten begrenzt war und somit einen Sättigungsbereich erreichte. Das Besondere bei der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR), ist die Beobachtung der Amplifizierung in Echtzeit ("real-time") durch einen interkalierenden SYBR-Green Farbstoff, welcher sich an dsDNA anlagert. Das Fluoreszenzsignal, welches nach jedem Elongationsschritt gemessen wurde, stieg dabei proportional zur Menge der PCR-Produkte an. Zur relativen Quantifizierung wurde das Ribosomale Protein LPO (RPLPO) als Referenztranskript verwendet, da es keiner Regulation unterliegt und somit als Ladungskontrolle diente. Die Expression der behandelten Proben wurden auf die RPLPO-Expression normiert. miR hingegen wurde in der qRT-PCR auf die RNA U6 als Referenz und Ladungskontrolle normiert.

	BAX, p21, Survivin	AR, PSA, HSP27, HSP60	Casp-3, Casp-9	miR-1
cDNA-Verdünnung	1:5	1:15	1:15	1:10
initiale Denaturierung	95°C; 10 min	95°C; 10 min	95°C; 10 min	95°C; 15 min
Phase I: Denaturierung	95°C; 10 sek	95°C; 10 sek	95°C; 10 sek	94°C; 15 sek
Phase II: Annealing	65°C; 15 sek	60°C; 15 sek	60°C; 12 sek	55°C; 30 sek
Phase III: Elongation	72°C; 20 sek	72°C; 20 sek	72°C; 20 sek	70°C; 30 sek
Wiederholung Phase I-III	44 Zyklen	44 Zyklen	44 Zyklen	44 Zyklen
Denaturierung	95°C; 10 sek	95°C, 10 sek	95°C; 10 sek	95°C; 10 sek
Schmelzkurvenanalyse	65-95°C,	65-95°C,	65-95°C,	55-95°C,
	in 0,5°C Schritten	in 0,5°C Schritten	in 0,5°C Schritten	in 0,5°C-Schriten

Tabelle 9 qRT-PCR Protokolle der verschiedenen Primer

3.4 Statistische Auswertung

Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert ±Standardabweichung (standard deviation = SD), normiert auf die Kontrolle (Co=1,0), nach Durchführung von mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Experiment. Für die Auswertung mit Microsoft Excel 2010 wurde der Student's t-Test verwendet. Statistische Signifikanz wurde mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (***) und p≤0,001 (***) angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von Abirateron und Wachstumskinetik in Abirateron-behandelten PCa-Zellen

Mittels Proliferationsassay wurde im Zellkultur-Modell die IC₅₀ von Abirateron bestimmt, welche die Wirkstärke einer Substanz angibt. Die IC₅₀ eignete sich für nachfolgende Versuche, da es durch das halbmaximale Wachstum der Zellen möglich war, Effekte auf das Wachstumsverhalten sowohl in positiver als auch negativer Richtung zu untersuchen.

LNCaP Zellen zeigten eine statistisch signifikante Wirkung ab einer Abirateron-Konzentration von 10 μ M (Abb. 4A). Die antiproliferative Wirkung unter 20 μ M war bereits zu stark, weswegen die IC₅₀ für LNCaP Zellen auf 10 μ M nach 120h festgelegt wurde. PC-3 Zellen zeigten bereits ab 2 μ M statistisch signifikante Unterschiede zwischen Abirateron- und DMSO-behandelten Zellen (Abb. 4B), jedoch war hier noch keine halbmaximale Wirkung erreicht. Diese trat erst bei einer Konzentration von 30 μ M nach 120h auf, welche somit als IC₅₀ für PC-3 Zellen bestimmt wurde.

Die anschließend durchgeführten Wachstumskinetiken mit den ermittelten IC₅₀-Konzentrationen der jeweiligen Zelllinie zeigten die durch Abirateron ausgelöste Wachstumshemmung, sowohl in AR-positiven LNCaP (Abb. 4C) als auch in AR-negativen PC-3 Zellen (Abb. 4D). Dieses unerwartete Ergebnis deutete darauf hin, dass Abirateron neben der CYP17A1-Inhibition weitere AR-unabhängige Wirkungen auslöst.



Abbildung 4 Wachstumskinetik im 24-Well-Maßstab von LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation über 120h

(A+B) Die Ergebnisse aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten wurden als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0). (C+D) Die Ergebnisse aus mindestens zehn unabhängigen Experimenten wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. (A-D) Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***).

4.2 Analyse von Expression und Aktivität des AR unter Abirateron-Inkubation in PCa-Zellen

Der AR stand zunächst im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen, da er einer der wichtigsten proliferativen Faktoren in PCa-Zellen darstellt und darüber hinaus auch bei der Entwicklung von Resistenzmechanismen in PCa-Zellen von großer Bedeutung ist. Da PC-3 Zellen ARnegativ sind, wurden die Analysen von AR-mRNA, AR-Protein und AR-Aktivität nur in ARpositiven LNCaP Zellen durchgeführt. Die AR-Aktivitätsbestimmung erfolgte anhand von PSAmRNA, da der AR im aktivierten Zustand als Transkriptionsfaktor für das PSA-Gen fungiert⁴ und die Transkription des PSA-Gens somit einen direkten Nachweis für die transkriptionelle Aktivität des AR darstellt.

Die Analyse der AR-mRNA (Abb. 5A) zeigte unter Abirateron-Einfluss von einer Induktion ausgehend, eine dann über die Zeit abnehmende mRNA-Expression, mit einem Wiederanstieg nach 120h. Dagegen wurde das AR-Protein (Abb. 5B+D) statistisch signifikant über den gesamten Zeitraum von 24h bis 120h supprimiert, mit p<0,001 zu allen fünf analysierten Zeitpunkten. Auch die Synthese von PSA-mRNA (Abb. 5C) wurde über 120h statistisch signifikant zu allen fünf untersuchten Zeitpunkten reprimiert (24h p<0,01; 48h -120h p<0,001).



Abbildung 5 qRT-PCR und Western Blot Analysen des AR in LNCaP Zellen unter 10 μM Abirateron-Inkubation über 120h

Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen qRT-PCR (A+C) und Western Blot (B) Analysen wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***). (C) qRT-PCR Analyse der AR-Aktivität gemessen als relative PSA-mRNA Expression über 120h. (D) Der gezeigte Blot steht repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

4.3 Protein-Analyse der AR-assoziierten Hitzeschock-Proteine HSP70 und HSP90α in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation

Der AR ist in einem Protein-Komplex an die Hitzeschock-Proteine HSP70 und HSP90α gebunden, wodurch der proteolytische Abbau des Steroidrezeptors im Zytoplasma verhindert wird.⁷⁶ HSP70 und HSP90α dienen somit der Stabilisierung seiner inaktiven Form, bestimmen die Halbwertszeit des AR und in der Folge auch die Aktivität der AR-Signalwege. Der HSP70-HSP90-AR-Komplex wird u.a. durch Bindung von Testosteron oder DHT in seiner Konformation verändert, was letztlich zur Dimerisierung, Translokation in den Nukleus und Aktivierung des AR führt.⁷⁶

In AR-positiven LNCaP Zellen zeigte sich keine signifikante Beeinflussung des HSP70 Proteins (Abb. 6A+C), ebenso wie in AR-negativen PC-3 Zellen (Abb. 6B+D), mit Ausnahme einer minimalen, aber signifikanten Suppression der HSP70 Expression nach 24h (Mittelwert 0,8 \pm 0,07; p≤0,05).



Abbildung 6 Western Blot Analysen von HSP70 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- Inkubation über 120h

Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit LNCaP (A) und PC-3 (B) wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***). (C+D) Die gezeigten Blots stehen repräsentativ für je drei unabhängige Experimente.

HSP90 α dagegen zeigte in LNCaP Zellen (Abb. 7A+C) eine Induktion nach 24h und 48h (p≤0,05), darauffolgend eine statistisch signifikante Repression nach 72h (p≤0,05) und eine erneute minimale Induktion nach 96h und 120h ohne statistische Signifikanz. In PC-3 Zellen (Abb. 7B+D) wurde HSP90 α nahezu über die gesamte Zeit supprimiert, mit statistischer Signifikanz an drei von fünf analysierten Zeitpunkten (48h p≤0,05; 96h + 120h p≤0,01).



Abbildung 7 Western Blot Analysen von HSP90 α in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- Inkubation über 120h

Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit LNCaP (A) und PC-3 (B) wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***). (C+D) Die gezeigten Blots stehen repräsentativ für je drei unabhängige Experimente.

4.4 Protein-Analyse der Co-Chaperone HOP und HSP40 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation

Nachdem die Modulation der AR-Komplex-Faktoren HSP70 und HSP90α unter Abirateron nicht eindeutig zu werten war, wurden in der Folge auch die Co-Chaperone HSP70-HSP90-Organizing-Protein (HOP) und Hitzeschock-Protein HSP40 untersucht. HOP und HSP40 agieren im Zytosol als Co-Chaperone von HSP70 und HSP90, wodurch sie ebenfalls in die AR-Stabilisierung und AR-Signalkaskade involviert sind. Die Hauptaufgabe von HOP besteht in der Bindung von HSP70 und HSP90,⁷⁷ wodurch es zur Komplexbildung mit dem AR beiträgt.⁴⁷ HSP40 reguliert die Bindung von HSP70 an ungefaltete Proteine.⁷⁸

Durch Abirateron-Inkubation in LNCaP Zellen (Abb. 8A+C) wurde das Co-Chaperon HOP über 120h reprimiert, mit zwei von fünf statistisch signifikanten Werten (72h p \leq 0,001, 96h p \leq 0,05). In PC-3 Zellen (Abb. 8B+D) erfolgte durch Abirateron-Einfluss eine ähnlich starke Repression von HOP mit ebenfalls zwei von fünf statistisch signifikanten Werten (96h p \leq 0,05, 120h p \leq 0,01).



Abbildung 8 Western Blot Analysen von HOP in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation über 120h

Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit LNCaP (A) und PC-3 (B) wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***). (C+D) Die gezeigten Blots stehen repräsentativ für je drei unabhängige Experimente.

Das Co-Chaperon HSP40 wird laut Literatur in beiden untersuchten Zelllinien exprimiert.⁷⁹ Im Rahmen dieser Arbeit gelang allerdings nur der Nachweis in PC-3 Zellen.

Auf Proteinebene (Abb. 9A+B) zeigte sich in PC-3 Zellen eine kurze, jedoch statistisch signifikante Induktion von HSP40 nach 24h (2,5fach; $p\leq0,01$) und eine nachfolgende signifikante Suppression über 120h mit $p\leq0,05$ nach 96h und 120h.



Abbildung 9 Western Blot Analysen von HSP40 in PC-3 Zellen unter 30 μ M Abirateron-Inkubation über 120h

Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit PC-3 (A) wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***). Der in (B) gezeigte Blot steht repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

4.5 mRNA- und Protein-Analyse des apoptotischen Faktors Hitzeschock-Protein HSP60 unter Abirateron-Inkubation in PCa-Zelllinien

In der Literatur wird HSP60 als apoptotischer Faktor beschrieben und stellte daher für diese Arbeit den Einstieg in die Analyse von apoptotischen Signalwegen unter Abirateron Einfluss dar.^{50, 53}

HSP60 wurde in LNCaP Zellen auf mRNA-Ebene (Abb. 10A) ab 72h reprimiert mit einer signifikanten Suppression nach 96h (Mittelwert 0,4 ±0,01; p≤0,001). Auf Proteinebene dagegen (Abb. 10B+C) zeigte sich eine stete Induktion von HSP60 über den gesamten Zeitraum von 120h (96h + 120h p≤0,05).



Abbildung 10 qRT-PCR und Western Blot Analysen von HSP60 in LNCaP Zellen unter 10 μM Abirateron-Inkubatiom über 120h

Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen qRT-PCR (A) und Western Blot (B) Analysen wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***). Der in (C) gezeigte Blot steht repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

In PC-3 Zellen zeigte sich auf mRNA-Ebene (Abb. 11A) eine tendenzielle Zunahme der Transkription von HSP60 mit einer bis zu 2,9fachen Induktion nach 120h. Auf Proteinebene (Abb. 11B+C) dagegen zeigte sich eine leichte Repression der relativen HSP60 Expression mit einem statistisch signifikanten Unterschied nach 48h (p \leq 0,01).



Abbildung 11 qRT-PCR und Western Blot Analysen von HSP60 in PC-3 Zellen unter 30 μM Abirateron-Inkubation über 120h

Die Ergebnisse aus mindestens fünf unabhängigen qRT-PCR (A) und Western Blot (B) Analysen wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***). Der in (C) gezeigte Blot steht repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

4.6 Protein-Analyse von p53 und PARP unter Abirateron-Inkubation in LNCaP und PC-3 Zellen

Neben HSP60 wurden anschließend weitere Faktoren der Apoptose analysiert. Dem p53 Protein, welches in 50% aller menschlichen Tumore mutiert vorliegt,⁵⁸ kommen hierbei als Tumorsuppressor im Falle einer DNA-Schädigung vielfältige Aufgaben zu.^{54,55} Die p53 Expression in LNCaP Zellen (Abb. 12A+B) wurde unter Abirateron mit p<0,01 (24h) und p≤0,001 (72h) statistisch signifikant induziert, mit einer maximalen Induktion von 2,2

±0,03 nach 72h. Abbildung 12C zeigt den fehlenden p53 Nachweis in PC-3 Zellen welche bekanntermaßen p53-negativ sind.^{80,81}



Abbildung 12 Western Blot Analysen von p53 in LNCaP Zellen unter 10 μM Abirateron-Inkubation über 120h

(A) Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***). Die in (B+C) gezeigten Blots stehen repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

PARP wird proportional zur Zahl der Strangbrüche in der DNA aktiviert⁵⁶ und verhindert in seiner Funktion als DNA-Reparaturenzym die Degradation der genomischen DNA. Bei Eintritt der Zelle in die irreversible Phase der Apoptose wird PARP durch die Caspase-3 gespalten und somit inaktiviert, da zu diesem Zeitpunkt eine DNA-Reparatur nicht mehr sinnvoll ist.⁵⁷ Es gilt daher als Marker für die Apoptose. Durch die Spaltung entstehen aus dem 116 kDa großen Protein zwei Spaltprodukte mit Größen von 24 und 89 kDa.

Abbildung 13 zeigt, dass durch Abirateron-Inkubation über 72h weder in LNCaP (Abb. 13A) noch in PC-3 Zellen (Abb. 13B) eine PARP-Spaltung erfolgte. Die Zeitpunkte 6h, 12h, 24h, 48h und 72h wurden dabei in vier unabhängigen Durchgängen untersucht.



Abbildung 13 Western Blot Analysen von PARP in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation über 72h

(A+B) Die gezeigten Blots stehen repräsentativ für mindestens vier unabhängige Experimente. Die Signale waren im Bereich von 116 kDa nachzuweisen. Der Nachweis der PARP-Spaltprodukte bei 89 und 24 kDa war negativ.

4.7 mRNA-Analyse der apoptotischen Faktoren Caspase-3, Caspase-9, BAX, p21 und Survivin in PCa-Zellen unter Abirateron-Inkubation

Aufgrund der Diskrepanz zwischen p53-Induktion in LNCaP Zellen (Abb. 12A+B) und ausbleibender PARP-Spaltung (Abb. 13) wurden im Folgenden die apoptotische Faktoren Caspase-3, Caspase-9, p21, BAX und Survivin auf mRNA-Ebene untersucht. Eine Übersicht über das regulative Netzwerk gibt Abb. 3 in Abschnitt 1.6 wider.

Abbildung 14A-D zeigt die Modulation der Caspasen unter Abirateron-Inkubation auf DMSOinkubierte Kontrollzellen normiert. Neben Abirateron wurde das zytostatische Taxan Docetaxel als Apoptose-Induktor eingesetzt.

Aufgrund großer Streuungen und fehlender statistischer Signifikanz gehen wir davon aus, dass die Expression von Caspase-3 mRNA (Abb. 14A+B) in keiner der Zelllinien durch Abirateron oder Docetaxel gesteuert wurde.

Die Caspase-9 mRNA schien in PC-3 unter Abirateron (Abb. 14D) und in LNCaP Zellen unter Docetaxel-Inkubation (Abb. 14C) tendenziell supprimiert, während die mRNA Konzentration in den anderen Zellen unverändert blieb. Der 48h Wert aus Abbildung 14C wurde aufgrund einer großen Streuung der Mittelwerte und fehlender statistischer Signifikanz nicht als Induktion gewertet.



Abbildung 14 qRT-PCR Analysen von Caspase-3 und Caspase-9 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron- bzw. Docetaxel-Inkubation über 72h

(A-D) Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit $p \le 0,05$ (*), $p \le 0,01$ (**) und $p \le 0,001$ (***).

Die Faktoren BAX und p21 werden im Allgemeinen vom p53 Protein induziert, welches in LNCaP Zellen nach Abirateron-Inkubation vermehrt exprimiert wurde (vgl. Abb. 12). Survivin als anti-apoptotischer Faktor dagegen wird in der Regel durch p53 gehemmt und dadurch u.a. in seiner Funktion als Inhibitor der Procaspase-9 gestört (vgl. Abb. 3).

Abbildung 15 zeigt das mRNA-Niveau der drei Apoptosemarker, normiert auf die Kontrollansätze über 72h in beiden PCa-Zelllinien. In LNCaP Zellen (Abb. 15A) waren p21 und Survivin nahezu unverändert, mit Schwankungen ihrer mRNA Level um die 1,0. BAX dagegen wurde nach 24h induziert, um dann statistisch signifikant supprimiert zu werden (72h; Mittelwert 0,6 \pm 0,3; p<0,05).

In PC-3 Zellen (Abb. 15B) wurde BAX über 72h supprimiert (72h; Mittelwert 0,4 ±0,09; p≤0,001), ebenso wie der anti-apoptotische Faktor Survivin (24h p≤0,05; 72h p≤0,001). p21 wurde dagegen auf mRNA-Ebene in p53-negativen PC-3 Zellen bis zu 5fach induziert, mit statistischer Signifikanz nach 48h (p≤0,05) und 72h (p≤0,01).



Abbildung 15 qRT-PCR Analysen von BAX, p21 und Survivin in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation über 72h

Die Ergebnisse aus mindestens vier unabhängigen Experimenten mit LNCaP (A) und PC-3 (B) wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***).

4.8 mRNA- und Protein-Analyse des zytoprotektiven Hitzeschock-Protein HSP27 in PCa-Zellen unter Abirateron-Inkubation

In vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe wurde HSP27 bereits als wichtiges Protein bei Docetaxel-induzierten Resistenzmechanismen im CRPC charakterisiert⁴⁶ und ist außerdem als zytoprotektiver Faktor, Induktor des AR^{44,45} und Suppressor der miR-1⁴⁶ bekannt.

In den AR-positiven LNCaP-Zellen zeigte sich auf mRNA-Ebene (Abb. 16A) ein kurzzeitiger Anstieg von HSP27 (48h; Mittelwert 1,4 ±0,25; p≤0,05), worauf eine über 120h anhaltende Unterdrückung folgte (96h; Mittelwert 0,7 ±0,05; p≤0,05). Auf Protein-Ebene (Abb. 16B+C) war die Suppression von HSP27 bereits früher zu verzeichnen und hielt ebenfalls über 120h an, mit einer maximalen Suppression nach 120h (Mittelwert 0,4 ±0,33). Statistische Signifikanz war zu vier von fünf Zeitpunkten gegeben, mit p≤0,001 (48h + 72h), p<0,01 (120h) und p≤0,05 (96h). Dies stellt einen bedeutenden Unterschied zu den durch Docetaxel induzierten Effekten dar.



Abbildung 16 qRT-PCR und Western Blot Analysen von HSP27 in LNCaP Zellen unter 10 μM Abirateron-Inkubation über 120h

Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen qRT-PCR (A) und Western Blot (B) Analysen wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=100%) mit p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***). Der in (C) gezeigte Blot steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

In den AR-negativen PC-3 Zellen unterlag HSP27 auf mRNA-Ebene (Abb. 17A) nur einer sehr geringen Modulation, da die Werte um 1,0 schwankten und keine statistische Signifikanz vorlag. Auf Protein-Ebene (Abb. 17B+C) hingegen fand eine, im Vergleich zu LNCaP-Zellen später einsetzende, aber stärkere Suppression, mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen Abirateron- und DMSO-behandelten Zellen (72h p≤0,05; 96h p≤0,01; 120h p≤0,001) statt. Die stärkste Suppression in PC-3 Zellen zeigte sich nach 120h (Mittelwert 0,1 ±0,11). Somit wurde der zytoprotektive Faktor HSP27 durch Abirateron-Inkubation in beiden PCa-Zellinien stark reprimiert.



Abbildung 17 qRT-PCR und Western Blot Analysen von HSP27 in PC-3 Zellen unter 30 μM Abirateron-Inkubation über 120h

Die Ergebnisse aus drei unabhängigen qRT-PCR (A) und Western Blot (B) Analysen wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***). Der in (C) gezeigte Blot steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Da HSP27 als Faktor von Chemoresistenz beschrieben wurde,⁸² sollte untersucht werden, ob die Sensitivität der Zellen gegenüber Abirateron vom HSP27-Level der Zellen abhängt. Hierzu eigneten sich unsere Zelllinie PC-3, eine Zelllinie mit niedrigem HSP27-Basallevel, und die transfizierte Zelllinie PC3-HSP27 mit stabiler Überexpression von HSP27. Diese wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens unter Inkubation mit 30 µM Abirateron verglichen. Wie aus Abb. 18A ersichtlich, nahm sowohl die relative Zellzahl (Abirateron/DMSO) der PC-3 Zellen als auch der PC3-HSP27 Zellen über die Zeit ab. In der Zelllinie PC-3 (—•—) sank die relative Zellzahl von 0,63 ±0,15 (24h) auf 0,36 ±0,12 (120h). Dagegen war die relative Zellzahl von PC3-HSP27 Zellen (---•---) zu jedem Zeitpunkt überlegen. Die Wachstumskinetiken unterschieden sich statistisch signifikant zu vier von fünf analysierten Zeitpunkten (24h + 120h p≤0,05; 72h + 96h p≤0,01), wodurch die Hypothese von HSP27 als zytoprotektivem Faktor gegenüber Abirateron bestätigt werden konnte.



Abbildung 18 Wachstumskinetik in PC-3 und PC3-HSP27 Zellen unter 30 μ M Abirateron-Inkubation über 120h

Vergleich von PC-3 Zellen mit niedrigem HSP27-Basallevel und der Zelllinie PC3-HSP27 mit stabiler Überexpression und somit einem hohen nichtregulierten HSP27-Level. Die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***).

4.9 Analyse des Tumorsuppressors microRNA-1 unter Abirateron-Inkubation in LNCaP und PC-3 Zellen

Die microRNA-1 (miR-1) wird als Tumorsuppressor beschrieben und ist in malignen Zellen

des PCa gegenüber nicht-malignen Zellen herunterreguliert.^{71,73}

miR-1 untersteht einem hemmenden Einfluss von HSP27⁴⁶ und ist weiterhin an der Regulation von HSP60 und des AR beteiligt, wodurch sie eine wichtige Rolle bei der Proliferation von PCa-Zellen spielt. Im Abschnitt 4.8. konnte gezeigt werden, dass das zytoprotektive Protein HSP27 als Suppressor der miR-1 unter Abirateron-Inkubation in beiden Zelllinien supprimiert wurde. Es war daher mit einer Induktion von miR-1 zu rechnen. Diese konnten wir in beiden PCa-Zelllinien zeigen (Abb. 19A+B), wobei die Effekte in PC-3 Zellen (30fache Induktion nach 48h, $p\leq0,01$) ausgeprägter waren. Gleichermaßen war aber auch die Suppression von HSP27 in den PC-3 Zellen stärker als in den LNCaP Zellen. Die Daten deuteten außerdem darauf hin, dass die Induktion nur kurzzeitig anhielt, da die 72h-Werte beider Zelllinien sich 1,0 annäherten. miR-1 wurde also in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Behandlung induziert.



Abbildung 19 qRT-PCR Analysen von miR-1 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Abirateron-Inkubation über 72h

Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit LNCaP (A) und PC-3 (B) wurden mit Student's t-Test statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm SD der relativen Expression dargestellt, normiert auf die Kontrolle (Co=1,0) mit p≤0,05 (*), p≤0,01 (**) und p≤0,001 (***).

5 Diskussion

Die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie des CRPC haben sich in den letzten Jahren rasch entwickelt. Bis 2010 war Docetaxel der einzige Wirkstoff, der eine Verbesserung des OS bei Patienten mit CRPC erzielen konnte. Unter oder nach der Chemotherapie mit dem Taxan kam es aber in der Mehrheit der Fälle zur Tumorprogression.¹⁶ Seitdem sind mehrere neue Wirkstoffe zugelassen worden oder befinden sich noch in der klinischen Testung.¹⁶ Die Ergebnisse, die mit den neuen Wirkstoffen erreicht werden, zeigen jedoch, dass primäre und sekundäre Resistenzen sowie Kreuzresistenzen bei sequentieller Therapie weiterhin Probleme bereiten.^{83,84,85,86} Ein Grund dafür scheint der im Mittelpunkt der Proliferation stehende AR zu sein, welcher im Rahmen von Resistenzentstehung häufig reaktiviert wird.^{31,33} Für die Zukunft ist es also wichtig, weitere Wirkstoffe, die nicht nur über Hormonentzug und die Blockade von AR-Signalwegen wirken, zu entwickeln und die bereits zugelassenen Wirkstoffe bezüglich sinnvoller Kombinations- oder Sequenztherapien zu erforschen. Dabei spielt die molekulare Charakterisierung der Pharmaka eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Abirateron, welches als CYP17A1-Inhibitor zu den neuen hormonablativen Therapeutika des CRPC zählt, in seiner Auswirkung auf verschiedene Proliferations- und Apoptosefaktoren im Zellkultur-Modell evaluiert.

Bei der Bestimmung der IC₅₀ für Abirateron in den PCa-Zelllinien als Grundlage für Zellkulturversuche, ergab sich für LNCaP Zellen eine niedrigere IC₅₀ (10 μM, 120h) als für PC-3 Zellen (30 μM, 120h). In der aktuellen Literatur gab es nur zwei Veröffentlichungen die für Vergleiche herangezogen werden konnten. Die von Soifer et al. verwendeten Abirateron-Konzentrationen in LNCaP Zellen decken sich mit der hier bestimmten IC₅₀ (10 μM).⁸⁷ Brossard et al. inkubierten PC-3 Zellen mit geringeren Abirateron-Konzentrationen (0,01 μM) um eine 50%ige Proliferationshemmung zu erreichen, allerdings wurde hier auch ein anderes Messverfahren zur Proliferationsanalyse verwendet, was einen direkten Vergleich unmöglich macht.⁸⁸ In dieser Arbeit wurde die Proliferation anhand von absoluten Zellzahlen beurteilt, da diese Methode mehr Aussagekraft besitzt, als beispielsweise die Bestimmung der physiologischen Aktivität mittels MTT-Assay.

Mit den IC₅₀ Konzentrationen wurden Wachstumskinetiken unter Abirateron-Einfluss durchgeführt. Diese zeigten in beiden Zelllinien ein nahezu stagnierendes Wachstumsverhalten unter Abirateron im Vergleich zum exponentiellen Wachstum der DMSO-behandelten Kontrollzellen. Die Effekte von Abirateron sind somit nicht ausschließlich auf die Inhibition der Androgensynthese und die AR-Hemmung zurückzuführen, da die unterdrückte Proliferation in AR-negativen PC-3 Zellen nur durch AR-unabhängige Wirkungen zustande kommen kann.

Die in dieser Arbeit gezeigte Inhibition der AR Expression und Aktivität wird durch eine Publikation von Soifer et al. bestätigt.⁸⁷ Da die AR-mRNA keine stabile Suppression zeigte, kann man mutmaßen, dass Abirateron auf Proteinebene und somit post-transkriptional wirkt. Der verminderte Proteinnachweis muss demnach nicht zwangsläufig durch eine verminderte Expression des AR zustandekommen, sondern kann ebenso durch Destabilisierung und vermehrten Abbau des Rezeptors ausgelöst werden. Eine posttranskriptionale Modulation des AR durch Abirateron wäre beispielsweise durch die veränderte Expression von Chaperonen und Co-Chaperonen möglich, welche so eine ARabhängige Abirateron-Wirkung vermitteln könnten. Die Western Blot Analysen zeigten, dass die evaluierten (Co-)Chaperone mit Ausnahme von HSP70 durch Abirateron auf Proteinebene tendenziell supprimiert wurden. Eine AR-Destabilisierung über die verminderte Expression der Chaperone und Co-Chaperone ist also anzunehmen. Da der AR eine entscheidende Rolle in der PCa-Proliferation spielt, stellt die Inhibition des Chaperons HSP90 einen neueren Ansatz der CRPC-Therapie dar. Eine HSP90-Inhibition verursacht die Degradation von Bindungspartnern, wie beispielsweise des AR, über die Aufhebung des Schutzes vor proteolytischem Abbau.^{89,90} Lamoureux et al. zeigten eine verzögerte CRPC-Progression im LNCaP Xenograft-Modell durch den HSP90-Inhibitor PF-04928473, was sie zum Teil auf verminderte AR-Level und -Aktivität, sowie die gestörte Translokation in den Nukleus zurückführten.³⁰ Aktuell laufen klinische Studien mit HSP90-Inhibitoren der zweiten Generation, z.B. Retaspimycin Hydrochlorid (IPI-504) bei CRPC-Patienten vor und nach Docetaxel-Therapie.⁹¹ Eine Kombinationstherapie von Abirateron und HSP90-Inhibitoren wäre also sinnvoll, um die gleichgerichteten Effekte zu verstärken. Das Chaperon HSP90 besitzt darüber hinaus weitere Bindungspartner, die in wichtige Proliferations- und Apoptose-Signalwege eingebunden sind,⁹² wie z.B. den antiapoptotischen Faktor Survivin,⁹³ welcher im PCa häufig überexprimiert vorliegt.⁶⁰ Die Supprimierung von HSP90α in PC-3 Zellen und die nachfolgende Degradation von Survivin könnte somit einen AR-unabhängigen Signalweg der Abirateron-Wirkung darstellen. Darauf basierend wurden neue Wirkstoffe wie etwa LY2181038, ein antisense oligonukleotid (ASO) entwickelt, welche Survivin als Target beeinflussen und sich derzeit in der klinischen Testung befinden.⁹⁴

Neben proliferativen Faktoren spielen auch veränderte Apoptose-Signalwege bei der Karzinogenese und Chemoresistenz von vielen Tumoren eine wichtige Rolle. Besonders p53 ist hier zu erwähnen, da es bei einer hohen Anzahl von Tumoren mutiert ist.⁵⁵ Auch im PCa konnten Expressionsänderungen von Apoptose-Faktoren beschrieben werden, wie z.B. die Überexpression von Survivin⁶⁰ oder der Expressionsverlust von Caspase-1⁹⁵ in Karzinomgewebe gegenüber physiologischem Prostatagewebe, die Mutation von p5355,58 oder die erhöhten HSP60-Expressionslevel in Tumoren mit hohem Gleason Score.^{79,96} HSP60 ist ein prädiktiver Faktor im PCa^{48,96} und wird in der Literatur weiterhin als Apoptosefaktor diskutiert. Gemäß den Literaturangaben ist dabei unklar, ob dem Protein pro-50,51 oder anti-apoptotische^{52,53} Funktion zukommt. Transfektionsversuche mit transienter HSP60-Überexpression, die eine antiproliferative Wirkung erzeugten, ebenso wie eine miR-1induzierte HSP60-Expression konnten durch unsere Gruppe beschrieben werden, weshalb wir von einer pro-apoptotischen Funktion des Faktors HSP60 in den von uns verwendeten PCa Zellen ausgehen. Unter Abirateron-Inkubation wurde HSP60 in LNCaP Zellen signifikant induziert, wohingegen es in PC-3 Zellen keiner Regulation oder einer leichten Suppression unterlag. Vor diesem Hintergrund muss die Induktion von HSP60 in LNCaP als antiproliferativer Abirateron-Effekt und nicht als Resistenzentwicklung bewertet werden.

Der Tumorsuppressor p53 wurde durch Abirateron-Inkubation in LNCaP Zellen signifikant induziert, was im Widerspruch zur ausbleibenden PARP-Spaltung steht. In der Regel wird PARP als DNA-Reparaturprotein beim Eintritt in die irreversible Phase der Apoptose durch die Caspase-3 proteolytisch gespalten und dadurch inaktiviert.⁵⁷ Die Aktivierung der Caspase-3 und die Spaltung von PARP kann dabei p53-abhängig⁵⁴ als auch unabhängig⁹⁷ ablaufen. Da die Induktion von p53 bereits nach 24h signifikant ist und bis 72h anhält, wurde PARP zu den Zeitpunkten 6h, 12h, 24h, 48h und 72h auf Spaltprodukte untersucht. Ein möglicher Grund für den fehlenden Spaltungs-Nachweis wäre die Tatsache, dass PARP nur kurzzeitig gespalten wird und sich somit der Analyse entzieht. Zur Überprüfung dessen

könnten kürzere Abstände der Analyse-Zeitpunkte gewählt werden. In vorherigen Arbeiten unserer Gruppe konnte eine PARP-Spaltung in Docetaxel-inkubierten Zellen nachgewiesen werden, wodurch der Apoptose-Nachweis durch PARP-Spaltung etabliert wurde.

Bei der Analyse der Caspasen kam es aufgrund des sehr sensitiven Verfahrens der qRT-PCR zu großen Schwankungen in den Standardabweichungen und somit zu nicht-signifikanten Ergebnissen. Es deutet sich an, dass Caspase-3 auf mRNA-Ebene weder durch Abirateron, noch durch das Zytostatikum Docetaxel reguliert wurde. Caspase-9 mRNA schien tendenziell eher supprimiert (in PC-3 unter Abirateron und in LNCaP unter Docetaxel-Inkubation) bis unverändert. Zu bedenken ist allerdings, dass Caspasen als inaktive Procaspasen synthetisiert und erst durch Proteolyse aktiviert werden.⁵⁴ Ihre Regulation wird also weniger durch Expressionsänderung und Neusynthese, sondern durch proteolytische Aktivierung vorgenommen, welche mittels qRT-PCR nicht nachweisbar ist. Eine weiterführende Analyse könnte daher mittels kommerzieller Caspase-Assay-Kits vorgenommen werden. Vor diesem Hintergrund kann nicht bewertet werden, ob die Caspasen-3 und -9 aktiviert werden, und ob eine Spaltung von PARP zu erwarten wäre.

Die Apoptosemarker p21 und BAX wurden auf mRNA-Level hinsichtlich des Einflusses durch Abirateron analysiert. Während der pro-apoptotische Faktor BAX in LNCaP Zellen supprimiert wurde und p21 unverändert blieb, wurde in PC-3 Zellen der pro-apoptotische Faktor p21 induziert und BAX supprimiert. In der Regel induziert p53 als Apoptose-Initiator die pro-apoptotischen Faktoren BAX und p21 und inhibiert das anti-apoptotische Protein Survivin. Die Regulation der betrachteten apoptotischen Faktoren ist damit widersprüchlich, weshalb sich ihre Rolle bei der Abirateron-Wirkung nicht abschließend beurteilen lässt.

Proteine mit tumorsuppressiver bzw. zytoprotektiver Wirkung weisen in Tumorzellen oftmals veränderte Expressionslevel oder Mutationen auf, wodurch sie in ihrer Funktion verändert sind. HSP27, im PCa häufig überexprimiert,⁴² gilt beim PCa als zytoprotektiver Faktor,⁹⁸ wodurch seine Bedeutung als Therapie-Target und Prognosefaktor entsteht. Es kann sowohl durch Docetaxel-Therapie⁴⁶ als auch durch Hormonentzug^{45,98} induziert werden, wodurch die Wirkung einer nachfolgenden Chemotherapie abgeschwächt wird. Mithilfe der Zelllinien PC-3 (niedriges HSP27 Basallevel) und PC3-HSP27 (stabile Überexpression von HSP27) konnte HSP27 bezüglich seiner zytoprotektiven Funktion gegenüber Abirateron untersucht werden. Die geringere Sensitivität von PC3-HSP27 gegenüber Abirateron bestätigt die Zytoprotektion durch HSP27. Eine Induktion des Faktors HSP27 unter Abirateron würde demnach eine therapieinduzierte Resistenzentwicklung, wie sie unter Docetaxel-Therapie besteht,⁴⁶ bedeuten. Die Protein-Analysen in LNCaP und PC-3 Zellen zeigten allerdings eine deutliche Suppression der HSP27-Expression in Abirateronbehandelten Zellen. Dieses Ergebnis stützt die klinischen Erfahrungen, die eine hohe Ansprechrate von Abirateron bei einer Zweitlinientherapie nach Docetaxel zeigen.⁹⁹ Da HSP27 mit einer schlechten Prognose,^{40,100} einem aggressiven Tumorwachstum und hohem Metastasierungspotential des PCas korreliert,^{101,102} ist es ein wichtiger Faktor beim PCa. Wirkstoffe wie OGX-427, ein ASO der zweiten Generation, zielen darauf ab und haben bereits Phase I Studien als Einzel- oder Kombinationstherapie mit Docetaxel im PCa abgeschlossen. Randomisierte Phase II Studien von OGX-427 mit CRPC-Patienten laufen derzeit.^{103,104} Rocci et al. berichten über einen ASO-induzierten HSP27 knockdown in LNCaP und PC-3 Zellen mit Apoptose-Induktion und antiproliferativen Effekten beim Einsatz als Monotherapie und eine zusäztlich erhöhte Ansprechrate auf Hormon- und Chemotherapie bei einem Einsatz in Kombinationstherapie.^{102,105} Eine Kombinationstherapie aus HSP27-Inhibitor und Abirateron dürfte aber, aufgrund der bestehenden HSP27-Suppression unter Abirateron, kaum einen bedeutenden Unterschied zur Abirateron-Monotherapie erbringen.

miR-1, in der Literatur als tumorsuppressiv beschrieben,⁷¹ untersteht einem hemmenden Einfluss von HSP27⁴⁶ und inhibiert die AR-Synthese.⁴⁴ Es ist somit von einer Enthemmung der miR-1 unter Abirateron-Inkubation auszugehen. Der Nachweis von miR-1 erfolgte mittels qRT-PCR, welches als besonders sensitives Verfahren starken Schwankungen unterlag. Die Ergebnisse waren daher nur zum Teil statistisch signifikant. Dennoch deuten wir die Daten als miR-1-Induktion in LNCaP und PC-3 Zellen, wodurch auch miR-1 als Inhibitor des AR⁴⁴ zur antiproliferativen Abirateron-Wirkung in PCa Zellen beiträgt. Aufgrund des positiven Einflusses der miR-1 auf HSP60 wird hierüber neben der AR-abhängigen Wirkung ebenso eine AR-unabhängige Abirateron-Wirkung vermittelt, da das pro-apoptotische HSP60 u.a. die Aktivierung der Procaspase-3 durch Cytochrom c forciert.⁵⁰

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkung von Abirateron auf PCa Zellen nicht ausschließlich über die Inhibition der adrenalen und intratumoralen Steroidsynthese und der daraus folgenden geringeren Aktivierung der AR-Signalwege erklärt werden kann. Auch die Hemmung von (Co-) Chaperonen mit nachfolgender Destabilisierung von Proteinen die an

Proliferation (AR) und Apoptose (Survivin) beteiligt sind, bedingen die Effekte von Abirateron in PCa-Zellen, die somit zum Teil AR-unabhängig sind. Dies ist beispielsweise an der Abirateron-Wirkung auf AR-negative PC-3 Zellen zu erkennen.

Weiterhin muss die Unterdrückung des Faktors HSP27, welcher zytoprotektiv gegenüber Abirateron wirkt, und der daraus folgenden Induktion des Tumorsuppressors miR-1 an dieser Stelle betont werden. Abirateron ist demnach ein wirkungsvolles Therapeutikum, welches im Gegensatz zu Docetaxel keine therapieinduzierte Resistenz durch HSP27-Induktion aufkommen lässt, wodurch der Einsatz als first- und second-line Therapeutikum beim CRPC untermauert wird.

Letztendlich muss aber bedacht werden, dass Ergebnisse aus Zellkultur-Modellen nur in begrenztem Maße auf Abläufe und Vorgänge in vivo übertragbar sind. Sie können dennoch hilfreiche Anregungen enthalten, weshalb es interessant sein wird, die klinischen Ergebnisse von aufgezeigten möglichen Kombinationstherapien abzuwarten.

Zusammenfassung

6 Zusammenfassung

Abirateron ist ein selektiver CYP17A1-Inhibitor und hemmt die Synthese von Steroiden wie Testosteron und DHT. Molekulare Analysen an unserem PCa Zellkultur-Modell zeigten, dass Abirateron eine Hemmung der AR-Aktivität bewirkte, die sowohl durch eine unterdrückte Expression des AR selbst als auch durch die Suppression AR-assoziierter HSPs vermittelt wurde. Von besonderer Bedeutung waren die Analysen der AR-negativen Zelllinie PC-3 deren Proliferation unerwartet ebenso durch Abirateron gehemmt wurde. Diese Beobachtung ließ weitere, AR-unabhängige Wirkmechanismen von Abirateron vermuten.

So konnte gezeigt werden, dass Abirateron die Expression von Survivin unterdrückt, möglicherweise durch die Hemmung des Survivin-Bindungspartners HSP90, was eine ARunabhängige Reduktion der Zellzahl zur Folge hätte. Ein weiterer durch Abirateron regulierter Faktor ist die microRNA miR-1. Diese als Tumorsuppressor charakterisierte miR wurde in Gegenwart von Abirateron induziert und kann unabhängig von der Steroid-Synthese-Hemmung das Wachstum der PCa-Zellen reduzieren. Die Analyse apoptotischer Mechanismen zeigte zudem die Induktion der pro-apoptotischen Faktoren p53, HSP60 und p21, was ebenfalls auf eine antiproliferative Abirateron-Wirkung unabhängig von AR-Signalwegen hinweist.

In der Gesamtheit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Abirateron nicht nur ein Inhibitor der Androgensynthese ist, sondern auch auf davon unabhängige Signal- und Effektorkaskaden wirken kann, welche zu einer Reduktion des Zellwachstums führen. Abirateron ist ein äußerst wirksames Mittel zur Therapie des CRPC. Diese Effektivität liegt möglicherweise in den vielfältigen Wirkmechanismen begründet und könnte die Applikation von Abirateron auch in frühen PCa-Stadien sinnvoll erscheinen lassen.

7 Anhang

Tabelle 10 TNM-Klassifikation nach Wittekind¹¹

Prima	ärtumor
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar oder positive Zytologie
т0	Kein Hinweis auf Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
	klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar
T1	ist
	Tumor, zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in 5% oder weniger des
T1a	resezierten Gewebes
	Tumor, zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in mehr als 5% des
T1b	resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
Т3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
ТЗа	Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig)
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen, z.B.
	Blasenhals, Sphincter externus, Rektum und/oder Levatormuskel und/oder ist an der
T4	Beckenwand fixiert
Lymp	hknotenmetastasen
Nx	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
NO	kein Befall der regionären Lymphknoten
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
Fern	netastasen
Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	nichtregionäre Lymphknoten
M1b	Knochenmetastasen
M1c	andere Lokalisation(en)

8 Literaturverzeichnis

- 1 McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. Prostate 1981; 2: 35–49.
- 2 Azzouni F, Mohler J. Role of 5alpha-reductase inhibitors in prostate cancer prevention and treatment. Urology 2012; 79: 1197–1205.
- 3 Kobayashi T, Inoue T, Kamba T, Ogawa O. Experimental evidence of persistent androgen-receptor-dependency in castration-resistant prostate cancer. Int J Mol Sci 2013; 14: 15615–15635.
- 4 Vis AN, Schroder FH. Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 1: the androgen receptor and steroidogenic pathways. BJU Int 2009; 104: 438–448.
- 5 Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland 2007/2008.
- 6 Harshman LC, Taplin M. Abiraterone acetate: targeting persistent androgen dependence in castration-resistant prostate cancer. Adv Ther 2013; 30: 727–747.
- 7 Hellerstedt BA, Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. CA Cancer J Clin 2002; 52: 154–179.
- 8 Wirth, M., et al. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms (Version 1.03 – März 2011). Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V. (DGU) (2009) 2011.
- 9 Whittemore AS, Lele C, Friedman GD, Stamey T, Vogelman JH, Orentreich N. Prostatespecific antigen as predictor of prostate cancer in black men and white men. J Natl Cancer Inst 1995; 87: 354–360.
- 10 Green GA, Hanlon AL, Al-Saleem T, Hanks GE. A Gleason score of 7 predicts a worse outcome for prostate carcinoma patients treated with radiotherapy. Cancer 1998; 83: 971–976.
- 11 Wittekind C (Hrsg. 2010). TNM Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl Wiley-Blackwell; Wiley-VCH-Verl, [Weinheim], Weinheim, 2010.
- 12 Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. J Urol 1994; 152: 1831–1836.
- 13 Eymard J, Oudard S, Gravis G, Ferrero J, Theodore C, Joly F, Priou F, Krakowski I, Zannetti A, Thill L, Beuzeboc P. Docetaxel reintroduction in patients with metastatic castrationresistant docetaxel-sensitive prostate cancer: a retrospective multicentre study. BJU Int 2010; 106: 974–978.
- 14 Tannock IF, Wit R de, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Engl J Med 2004; 351: 1502–1512.
- 15 Corcoran C, Rani S, O'Brien K, O'Neill A, Prencipe M, Sheikh R, Webb G, McDermott R, Watson W, Crown J, O'Driscoll L. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes. PLoS One 2012; 7: e50999.
- 16 Bahl A, Masson S, Birtle A, Chowdhury S, Bono J de. Second-line treatment options in metastatic castration-resistant prostate cancer: A comparison of key trials with recently approved agents. Cancer Treat Rev 2014; 40: 170–177.
- 17 Ryan CJ, Smith MR, de Bono, Johann S, Molina A, Logothetis CJ, Souza P de, Fizazi K, Mainwaring P, Piulats JM, Ng S, Carles J, Mulders, Peter F A, Basch E, Small EJ, Saad F, Schrijvers D, van Poppel H, Mukherjee SD, Suttmann H, Gerritsen WR, Flaig TW, George DJ, Yu EY, Efstathiou E, Pantuck A, Winquist E, Higano CS, Taplin M, Park Y, Kheoh T,

Griffin T, Scher HI, Rathkopf DE. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. N Engl J Med 2013; 368: 138–148.

- 18 Sridhar SS, Freedland SJ, Gleave ME, Higano C, Mulders P, Parker C, Sartor O, Saad F. Castration-Resistant Prostate Cancer: From New Pathophysiology to New Treatment. Eur Urol 2013.
- 19 Zhao S, Yu EY. Castrate-resistant prostate cancer: postdocetaxel management. Curr Opin Urol 2013; 23: 201–207.
- 20 Nandha R. Abiraterone acetate: a novel drug for castration-resistant prostate carcinoma. J Postgrad Med 2012; 58: 203–206.
- 21 O'Donnell A, Judson I, Dowsett M, Raynaud F, Dearnaley D, Mason M, Harland S, Robbins A, Halbert G, Nutley B, Jarman M. Hormonal impact of the 17alphahydroxylase/C(17,20)-lyase inhibitor abiraterone acetate (CB7630) in patients with prostate cancer. Br J Cancer 2004; 90: 2317–2325.
- 22 Rehman Y, Rosenberg JE. Abiraterone acetate: oral androgen biosynthesis inhibitor for treatment of castration-resistant prostate cancer. Drug Des Devel Ther 2012; 6: 13–18.
- 23 Goldberg T, Berrios-Colon E. Abiraterone (zytiga), a novel agent for the management of castration-resistant prostate cancer. P T 2013; 38: 23–26.
- 24 Taplin ME, Montgomery RB, Logothetis C, et al. Effect of neoadjuvant abiraterone acetate (AA) plus leuprolide acetate (LHRHa) on PSA, pathological complete response (pCR), and near pCR in localized high-risk prostate cancer (LHRPC): Results of a randomized phase II study. - See more at: http://www.cancernetwork.com/asco-2012/asco-adding-abiraterone-leuprolide-prostatectomy-can-eliminate-tumor-somemen-high-risk-prostate#sthash.w1NjrUYZ.dpuf. J Clin Oncol. 2012: Abstract 4521.
- 25 Leibowitz-Amit R, Joshua AM. Targeting the androgen receptor in the management of castration-resistant prostate cancer: rationale, progress, and future directions. Curr Oncol 2012; 19: S22-31.
- 26 Mostaghel EA, Marck BT, Plymate SR, Vessella RL, Balk S, Matsumoto AM, Nelson PS, Montgomery RB. Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castrationresistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. Clin Cancer Res 2011; 17: 5913–5925.
- 27 Cai C, Chen S, Ng P, Bubley GJ, Nelson PS, Mostaghel EA, Marck B, Matsumoto AM, Simon NI, Wang H, Chen S, Balk SP. Intratumoral de novo steroid synthesis activates androgen receptor in castration-resistant prostate cancer and is upregulated by treatment with CYP17A1 inhibitors. Cancer Res 2011; 71: 6503–6513.
- 28 van de Wijngaart, Dennis J, Dubbink HJ, van Royen, Martin E, Trapman J, Jenster G. Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. Mol Cell Endocrinol 2012; 352: 57–69.
- 29 Hessenkemper W, Baniahmad A. Targeting heat shock proteins in prostate cancer. Curr Med Chem 2013; 20: 2731–2740.
- 30 Lamoureux F, Thomas C, Yin M, Kuruma H, Fazli L, Gleave ME, Zoubeidi A. A novel HSP90 inhibitor delays castrate-resistant prostate cancer without altering serum PSA levels and inhibits osteoclastogenesis. Clin Cancer Res 2011; 17: 2301–2313.
- 31 Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, van Rooij, H C, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. Biochem Biophys Res Commun 1990; 173: 534–540.
- 32 Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Schmid H, Van der Kwast, Theo, Wiegel T, Zattoni F, Heidenreich A. EAU guidelines on prostate cancer. Part II:

Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. Eur Urol 2011; 59: 572–583.

- 33 Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinanen R, Palmberg C, Palotie A, Tammela T, Isola J, Kallioniemi OP. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat Genet 1995; 9: 401–406.
- 34 Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, Trapman J, Cleutjens K, Noordzij A, Visakorpi T, Kallioniemi OP. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. Cancer Res 1997; 57: 314–319.
- 35 Lamont KR, Tindall DJ. Minireview: Alternative activation pathways for the androgen receptor in prostate cancer. Mol Endocrinol 2011; 25: 897–907.
- 36 Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, Hess DL, Kalhorn TF, Higano CS, True LD, Nelson PS. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. Cancer Res 2008; 68: 4447–4454.
- 37 Mohler JL, Gregory CW, Ford, O Harris 3rd, Kim D, Weaver CM, Petrusz P, Wilson EM, French FS. The androgen axis in recurrent prostate cancer. Clin Cancer Res 2004; 10: 440–448.
- 38 Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, Febbo PG, Balk SP. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. Cancer Res 2006; 66: 2815–2825.
- 39 Chang K, Li R, Papari-Zareei M, Watumull L, Zhao YD, Auchus RJ, Sharifi N. Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108: 13728–13733.
- 40 Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones 2005; 10: 86–103.
- 41 Ischia J, Saad F, Gleave M. The promise of heat shock protein inhibitors in the treatment of castration resistant prostate cancer. Curr Opin Urol 2013; 23: 194–200.
- 42 Acunzo J, Katsogiannou M, Rocchi P. Small heat shock proteins HSP27 (HspB1), alphaBcrystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as regulators of cell death. Int J Biochem Cell Biol 2012; 44: 1622–1631.
- 43 Gillis JL, Selth LA, Centenera MM, Townley SL, Sun S, Plymate SR, Tilley WD, Butler LM. Constitutively-active androgen receptor variants function independently of the HSP90 chaperone but do not confer resistance to HSP90 inhibitors. Oncotarget 2013; 4: 691– 704.
- 44 Stope MB, Bradl J, Peters S, Streitborger A, Weiss M, Zimmermann U, Walther R, Lillig CH, Burchardt M. Shortened Isoforms of the Androgen Receptor Are Regulated by the Cytoprotective Heat-shock Protein HSPB1 and the Tumor-suppressive MicroRNA miR-1 in Prostate Cancer Cells. Anticancer Res 2013; 33: 4921–4926.
- 45 Rocchi P, Beraldi E, Ettinger S, Fazli L, Vessella RL, Nelson C, Gleave M. Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. Cancer Res 2005; 65: 11083–11093.
- 46 Stope MB, Weiss M, Stender C, Preuß M, Peters S, Schubert T, Streitbörger, Andreas, Rönnau, Cidny, Ziegler P, Ritter CA, Kroeger N, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. HSP27 phosphorylation and miR-1 promote chemoresistance in prostate cancer; under review.
- 47 Daniel S, Bradley G, Longshaw VM, Soti C, Csermely P, Blatch GL. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock,

and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. Biochim Biophys Acta 2008; 1783: 1003–1014.

- 48 Glaessgen A, Jonmarker S, Lindberg A, Nilsson B, Lewensohn R, Ekman P, Valdman A, Egevad L. Heat shock proteins 27, 60 and 70 as prognostic markers of prostate cancer. APMIS 2008; 116: 888–895.
- 49 Ghosh JC, Siegelin MD, Dohi T, Altieri DC. Heat shock protein 60 regulation of the mitochondrial permeability transition pore in tumor cells. Cancer Res 2010; 70: 8988–8993.
- 50 Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. EMBO J 1999; 18: 2040–2048.
- 51 Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW. Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. EMBO J 1999; 18: 2049–2056.
- 52 Shan Y, Liu T, Su H, Samsamshariat A, Mestril R, Wang PH. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. J Mol Cell Cardiol 2003; 35: 1135–1143.
- 53 Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. J Biol Chem 2008; 283: 5188–5194.
- 54 Frank AK, Pietsch EC, Dumont P, Tao J, Murphy ME. Wild-type and mutant p53 proteins interact with mitochondrial caspase-3. Cancer Biol Ther 2011; 11: 740–745.
- 55 Gupta K, Thakur VS, Bhaskaran N, Nawab A, Babcook MA, Jackson MW, Gupta S. Green tea polyphenols induce p53-dependent and p53-independent apoptosis in prostate cancer cells through two distinct mechanisms. PLoS One 2012; 7: e52572.
- 56 Althaus FR, Richter C. ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance. Mol Biol Biochem Biophys 1987; 37: 1–237.
- 57 Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. Apoptosis 2002; 7: 321–328.
- 58 Ecke TH, Schlechte HH, Hubsch A, Lenk SV, Schiemenz K, Rudolph BD, Miller K. TP53 mutation in prostate needle biopsies--comparison with patients follow-up. Anticancer Res 2007; 27: 4143–4148.
- 59 van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. Prostate 2003; 57: 205–225.
- 60 Węsierska-Gądek J, Schmid G. Transcriptional repression of anti-apoptotic proteins mediated by the tumor suppressor protein p53. Cancer Therapy 2007: 203–212.
- 61 Cheung, Chun Hei Antonio, Huang C, Tsai F, Lee JY, Cheng SM, Chang Y, Huang Y, Chen S, Chang J. Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology. Onco Targets Ther 2013; 6: 1453–1462.
- 62 Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. Cancer Res 2003; 63: 230–235.
- 63 Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. J Biomed Biotechnol 2012; 2012: 170325.
- 64 Suzuki A, Tsutomi Y, Yamamoto N, Shibutani T, Akahane K. Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3-p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. Mol Cell Biol 1999; 19: 3842–3847.

- 65 Sohn D, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. Cancer Res 2006; 66: 11254–11262.
- 66 Le H, Minn AJ, Massague J. Cyclin-dependent kinase inhibitors uncouple cell cycle progression from mitochondrial apoptotic functions in DNA-damaged cancer cells. J Biol Chem 2005; 280: 32018–32025.
- 67 Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell 2004; 116: 205–219.
- 68 Kavitha CV, Nambiar M, Narayanaswamy PB, Thomas E, Rathore U, Ananda Kumar, Channapillekoppalu S, Choudhary B, Rangappa KS, Raghavan SC. Propyl-2-(8-(3,4difluorobenzyl)-2',5'-dioxo-8-azaspirobicyclo3.2.1 octane-3,4'-imidazolidine-1'-yl) acetate induces apoptosis in human leukemia cells through mitochondrial pathway following cell cycle arrest. PLoS One 2013; 8: e69103.
- 69 Liu Y, Peck K, Lin J. Involvement of prohibitin upregulation in abrin-triggered apoptosis. Evid Based Complement Alternat Med 2012; 2012: 605154.
- 70 Reed JC. The Survivin saga goes in vivo. J Clin Invest 2001; 108: 965–969.
- 71 Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nohata N, Fuse M, Ichikawa T, Naya Y, Nakagawa M, Seki N. Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. Br J Cancer 2012; 106: 405–413.
- 72 Hudson RS, Yi M, Esposito D, Watkins SK, Hurwitz AA, Yfantis HG, Lee DH, Borin JF, Naslund MJ, Alexander RB, Dorsey TH, Stephens RM, Croce CM, Ambs S. MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer. Nucleic Acids Res 2012; 40: 3689–3703.
- 73 Ambs S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, Wallace TA, Liu C, Volinia S, Calin GA, Yfantis HG, Stephens RM, Croce CM. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. Cancer Res 2008; 68: 6162–6170.
- Stope MB, Schubert T, Staar D, Ronnau C, Streitborger A, Kroeger N, Kubisch C,
 Zimmermann U, Walther R, Burchardt M. Effect of the heat shock protein HSP27 on
 androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. World J Urol 2012;
 30: 327–331.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248–254.
- 76 Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 1988; 240: 889–895.
- 77 Murphy ME. The HSP70 family and cancer. Carcinogenesis 2013; 34: 1181–1188.
- 78 Fan C, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. Cell Stress Chaperones 2003; 8: 309–316.
- 79 Tang D, Khaleque MA, Jones EL, Theriault JR, Li C, Wong WH, Stevenson MA, Calderwood SK. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. Cell Stress Chaperones 2005; 10: 46–58.
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Invest Urol 1979; 17: 16–23.

- 81 Liu C, Zhu Y, Lou W, Nadiminty N, Chen X, Zhou Q, Shi XB, deVere White, Ralph W, Gao AC. Functional p53 determines docetaxel sensitivity in prostate cancer cells. Prostate 2013; 73: 418–427.
- 82 Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. Cancer Res 1997; 57: 2661–2667.
- 83 van Soest, R J, van Royen, M E, de Morree, E S, Moll JM, Teubel W, Wiemer, E A C, Mathijssen, R H J, Wit R de, van Weerden, W M. Cross-resistance between taxanes and new hormonal agents abiraterone and enzalutamide may affect drug sequence choices in metastatic castration-resistant prostate cancer. Eur J Cancer 2013.
- 84 Schrader AJ, Boegemann M, Ohlmann C, Schnoeller TJ, Krabbe L, Hajili T, Jentzmik F, Stoeckle M, Schrader M, Herrmann E, Cronauer MV. Enzalutamide in Castrationresistant Prostate Cancer Patients Progressing After Docetaxel and Abiraterone. Eur Urol 2013.
- 85 Noonan KL, North S, Bitting RL, Armstrong AJ, Ellard SL, Chi KN. Clinical activity of abiraterone acetate in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after enzalutamide. Ann Oncol 2013; 24: 1802–1807.
- 86 Mezynski J, Pezaro C, Bianchini D, Zivi A, Sandhu S, Thompson E, Hunt J, Sheridan E, Baikady B, Sarvadikar A, Maier G, Reid, A H M, Mulick Cassidy A, Olmos D, Attard G, Bono J de. Antitumour activity of docetaxel following treatment with the CYP17A1 inhibitor abiraterone: clinical evidence for cross-resistance? Ann Oncol 2012; 23: 2943– 2947.
- 87 Soifer HS, Souleimanian N, Wu S, Voskresenskiy AM, Collak FK, Cinar B, Stein CA. Direct regulation of androgen receptor activity by potent CYP17 inhibitors in prostate cancer cells. J Biol Chem 2012; 287: 3777–3787.
- 88 Brossard D, Zhang Y, Haider SM, Sgobba M, Khalid M, Legay R, Duterque-Coquillaud M, Galera P, Rault S, Dallemagne P, Moslemi S, El Kihel L. N-substituted Piperazinopyridylsteroid Derivatives as Abiraterone Analogues Inhibit Growth and Induce Pro-apoptosis in Human Hormone-independent Prostate Cancer Cell Lines. Chem Biol Drug Des 2013; 82: 620–629.
- 89 Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Hohfeld J, Patterson C. The cochaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. Nat Cell Biol 2001; 3: 93–96.
- 90 Demand J, Alberti S, Patterson C, Hohfeld J. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. Curr Biol 2001; 11: 1569–1577.
- 91 Oh WK, Galsky MD, Stadler WM, Srinivas S, Chu F, Bubley G, Goddard J, Dunbar J, Ross RW. Multicenter phase II trial of the heat shock protein 90 inhibitor, retaspimycin hydrochloride (IPI-504), in patients with castration-resistant prostate cancer. Urology 2011; 78: 626–630.
- 92 Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, Sessa WC, Altieri DC. Regulation of survivin function by Hsp90. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 13791–13796.
- 93 Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. Endocr Relat Cancer 2006; 13 Suppl 1: S125-35.
- 94 Talbot DC, Ranson M, Davies J, Lahn M, Callies S, Andre V, Kadam S, Burgess M, Slapak C, Olsen AL, McHugh PJ, de Bono, Johann S, Matthews J, Saleem A, Price P. Tumor

survivin is downregulated by the antisense oligonucleotide LY2181308: a proof-of-concept, first-in-human dose study. Clin Cancer Res 2010; 16: 6150–6158.

- 95 Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. Cancer Res 2001; 61: 1227–1232.
- 96 Castilla C, Congregado B, Conde JM, Medina R, Torrubia FJ, Japon MA, Saez C. Immunohistochemical expression of Hsp60 correlates with tumor progression and hormone resistance in prostate cancer. Urology 2010; 76: 1017.e1-6.
- 97 Raja Singh P, Arunkumar R, Sivakamasundari V, Sharmila G, Elumalai P, Suganthapriya E, Brindha Mercy A, Senthilkumar K, Arunakaran J. Anti-proliferative and apoptosis inducing effect of nimbolide by altering molecules involved in apoptosis and IGF signalling via PI3K/Akt in prostate cancer (PC-3) cell line. Cell Biochem Funct 2013.
- 98 Parcellier A, Schmitt E, Brunet M, Hammann A, Solary E, Garrido C. Small heat shock proteins HSP27 and alphaB-crystallin: cytoprotective and oncogenic functions. Antioxid Redox Signal 2005; 7: 404–413.
- 99 Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, Staffurth JN, North S, Vogelzang NJ, Saad F, Mainwaring P, Harland S, Goodman, Oscar B Jr, Sternberg CN, Li JH, Kheoh T, Haqq CM, de Bono, Johann S. 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. Lancet Oncol 2012; 13: 983–992.
- 100 Foster CS, Dodson AR, Ambroisine L, Fisher G, Moller H, Clark J, Attard G, De-Bono J, Scardino P, Reuter VE, Cooper CS, Berney DM, Cuzick J. Hsp-27 expression at diagnosis predicts poor clinical outcome in prostate cancer independent of ETS-gene rearrangement. Br J Cancer 2009; 101: 1137–1144.
- 101 Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, Solary E. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. Cancer Res 1998; 58: 5495–5499.
- 102 Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L, Hurtado-Coll A, Yamanaka K, Gleave M. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res 2004; 64: 6595– 6602.
- 103 Zoubeidi A, Gleave M. Small heat shock proteins in cancer therapy and prognosis. Int J Biochem Cell Biol 2012; 44: 1646–1656.
- 104 Chi KN, Hotte SJ, Ellard S, et al. A randomized Phase II study of OGX-427 plus prednisone versus prednisone alone in patients with chemotherapy-naive metastatic castration-resistant prostate cancer. J Clin Oncol. 2012: Abstr 121.
- 105 Rocchi P, Jugpal P, So A, Sinneman S, Ettinger S, Fazli L, Nelson C, Gleave M. Small interference RNA targeting heat-shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase-3 activation in vitro. BJU Int 2006; 98: 1082– 1089.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät oder wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Danksagung

Mit der Fertigstellung dieser Arbeit ist es an der Zeit mich bei allen Beteiligten für ihre Unterstützung zu bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Martin Burchardt danke ich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit im molekular-urologischen Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universitätsmedizin Greifswald durchzuführen, ebenso wie für das in mich gesetzte Vertrauen und die hilfreichen und anregenden Diskussionen während der Forschungsseminare, die zum Voranbringen der Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Stope, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand, meine Arbeit kritisch hinterfragt hat und zu Diskussionen bereit war. Weiterhin möchte ich dem gesamten Team des urologischen Forschungslabores für die tolle Atmosphäre und Gemeinschaft und besonders Anne Brandenburg und Stefanie Peters für ihren fachlichen Rat danken. Die Zusammenarbeit war fachlich sowie persönlich bereichernd.

Auch meine Freunde in Rostock, Greifswald und der Heimat, vor allem Sebastian Sturm, möchte ich hier erwähnen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Sarah. Sie haben mich zu dieser Arbeit ermutigt, mich auf meinem Weg begleitet und mich von Anfang an in absolut jeder Hinsicht unterstützt.