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

Thema:

# Androgenrezeptor-unabhängige Induktion der Apoptose in Prostatakarzinomzellen durch Enzalutamid

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

vorgelegt von: Benedikt Martin geb. am: 13.04.1989 in: Wiesbaden

Dekan:	Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter:	PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Matthias Stope
2. Gutachter:	PD Dr. rer. nat. Patrick Ziegler
Ort, Raum:	Zoom-Meeting
Tag der Disputation:	23.09.2021, 15.30 Uhr

# Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	III
II.	. Abbildungsverzeichnis	IV
	I. Tabellenverzeichnis	IV
1	. Einleitung	1
	1.1 Anatomie und Physiologie der Prostata	1
	1.2 Das Prostatakarzinom – Entstehung, Diagnostik und Therapie	3
	1.3 Enzalutamid – ein neuartiges Antiandrogen	9
	1.4 Der Androgenrezeptor – Physiologie und Therapieresistenz	11
	1.5 Die Apoptose – der programmierte Zelltod	12
2	. Zielsetzung	15
3	. Material und Methoden	16
	3.1 Material	16
	3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
	3.1.2. Chemikalien und kommerzielle Lösungen	17
	3.1.3 Puffer und Lösungen	18
	3.1.4 Antikörper	20
	3.1.5 Zelllinien	20
	3.2. Zellbiologische Methoden	21
	3.2.1 Zellkulturgrundlagen	21
	3.2.2 Zellquantifizierung mittels CASY TT Cell Counter	21
	3.2.3 Wachstumskinetiken der PCa-Zelllinien	22
	3.2.4 Auftauen und Kryokonservierung der Zelllinien	22
	3.3. Molekularbiologische Methoden	23
	3.3.1 Detektion der apoptotischen DNA-Fragmentierung mittels T	UNEL
	(Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling) – Assay	23
	3.3.2 Objektivierung morphologischer Zellkernveränderungen	mittels
	DAPI-Kernfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	24
	3.4 Biochemische Methoden	25
	3.4.1 Zellkultur und Protein-Isolierung zur Analyse	25
	3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	26

3.4.3 Größenauftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-
Gelelektrophorese (SDS-PAGE)26
3.4.4 Western Blot
3.4.5 Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörper27
3.5 Statistische Auswertung
4. Ergebnisse
4.1 Optimierung des Zellkultur-Modellsystems von PCa-Zellen im 24-Well-
Maßstab29
4.2 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration von Enzalutamid
durch Wachstumskinetiken in PCa- Zellen30
4.3 Nachweis der Enzalutamid-induzierten apoptotischen Nukleinsäure-
fragmentierung in PCa-Zelllinien durch TUNEL Assay
4.4 Nachweis apoptotischer Änderungen der Kernmorphologie von PCa-in
Anwesenheit von Enzalutamid und Cycloheximid
4.4.1 Sinkende Kernflächen in PCa-Zellen in Anwesenheit von
Enzalutamid36
4.4.2 Effekt der Chemotherapeutikabehandlung auf verschiedene
Parameter der Kernmorphologie
4.5 Analyse der Expression der Apoptose-assoziierten Proteine p53 und P-
p53 in LNCaP Zellen unter Enzalutamid-Behandlung40
4.6 Analyse der Expression des Apoptose-Proteins Bax in LNCaP, PC3 und
PC3-AR Zellen unter Enzalutamid-Behandlung42
4.7 Analyse der Expression des Apoptose-Proteins Bcl-2 in LNCaP, PC3 und
PC3-AR Zellen unter Enzalutamid-Behandlung44
5. Diskussion
6. Zusammenfassung56
7. Anhang57
8. Literaturverzeichnis

# I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	LBD	Ligandenbindungsdomäne
A.bidest	Zweifach destilliertes Wasser	LH	Luteinisierendes Hormon
ADT	Androgenentzugstherapie	mCRPC	Metastasiertes CRPC
AK	Antikörper	mHSPC	Metastasiertes hormonsensitives
			Prostatakarzinom
APS	Ammoniumpersulfat	nmCRPC	Nichtmetastasiertes CRPC
AR	Androgenrezeptor	NF-kB	Nuclear factor kappa-B
ARE	Androgen response Element	PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
BPH	Benigne Prostatahyperplasie	PCa	Prostatakarzinom
BSA	Bovines Serumalbumin	PSA	Prostataspezifisches Antigen
CRPC	Kastrationsresistentes	PSMA	Prostataspezifisches Membranantigen
	Prostatakarzinom		
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
DHT	Dihydrotestosteron	RPE	Radikale Prostatektomie
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Sodiumdodecylsulfat
DRU	Digitorektale Untersuchung	SDS-	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
		PAGE	
ER	Östrogenrezeptor	StAbw	Standardabweichung
EtOH	Ethanol	TBS	Tris buffered saline
FSH	Follikelstimulierendes	TBST	TBS-Tween
	Hormon		
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-	TEMED	N,N,N <sup>4</sup> ,N <sup>4</sup> -Tetramethylethylendiamin
	Dehydrogenase		
GnRH	Gonadotropin releasing	TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
	Hormon		
GR	Glucocorticoid Rezeptor	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
HCI	Salzsäure	TRUS	Transrektaler Ultraschall
HOP	HSP-70/90-organizing	v/v	Volumen pro Volumen
	Protein		
HSP	Hitzeschock-Protein	VM	Vollmedium
HRP	Meerrettich-Peroxidase	WB	Western Blot
kHCT	Kombinierte	w/v	Masse pro Volumen
	Hormonchemotherapie		

# II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse2
Abbildung 2: Der Wirkmechanismus von Enzalutamid9
Abbildung 3: Die Hauptsignalwege der Apoptose14
Abbildung 4: Wachstumskinetik im 24-Well-Modell von LNCaP, PC3 und PC3-AR
Zellen bei unterschiedlichen Startzellzahlen über 120 h
Abbildung 5: Bestimmung der IC <sub>50</sub> von Enzalutamid für LNCaP, PC3 und PC3-AR
Zellen im 24-Well-Maßstab über 120 h31
Abbildung 6: Nachweis der Chromatinfragmentierung durch Enzalutamid in LNCaP,
PC3 und PC3-AR Zellen im TUNEL Assay nach 24 h und 48 h
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Analyse DAPI-gefärbter PCa-Zellen LNCaP
und PC3 nach 24 h Behandlung mit CHX oder Enzalutamid
Abbildung 8: Vergleichende Darstellung der Verteilung der Zellkerngrößen mit und
ohne Chemotherapeutika der LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen nach 24 h37
Abbildung 9: Quantifizierung der Kernmorphologie-Parameter Fläche, Umfang und
Helligkeit von CHX- und Enzalutamid behandelten LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen
nach 24 h
Abbildung 10: Western Blot Analyse von p53 und P-p53 in LNCaP Zellen nach
Enzalutamid-Inkubation für 4, 10 und 24 h41
Abbildung 11: Western Blot Analyse von Bax in LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen
nach Enzalutamid-Inkubation für 4, 10 und 24 h43
Abbildung 12: Western Blot Analyse von Bcl-2 in LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen
nach Enzalutamid-Inkubation für 4, 10 und 24 h45

# III. Tabellenverzeichnis

Anhangstabelle 1: TNM-Klassifikation des PCa nach UICC	.57
Anhangstabelle 2: Pipettierschema der Eichreihe beim Bradford-Assay	.58
Anhangstabelle 3: Pipettierschema für die SDS-PAGE	.58

# 1. Einleitung

#### 1.1 Anatomie und Physiologie der Prostata

Die menschliche Prostata, auch Vorsteherdrüse genannt, befindet sich zwischen der darüber gelegenen Harnblase und unten aufsitzend auf dem Diaphragma urogenitale, welches zum Beckenboden gehört; ventrokaudal grenzt die Prostata an die Symphyse, von dem dorsal benachbarten Rektum lässt sie sich als derbes Gebilde tasten. In kraniokaudaler Richtung führt die prostatische Harnröhre mittig durch das Organ. Weiterhin wird sie von den dorsolateral paarig gelegenen Bläschendrüsen (Glandulae vesiculosae) umgeben und den dazugehörigen Ductus ejaculatorii durchzogen, welche im Colliculus seminalis enden [1].

Die etwa kastaniengroße Prostata wiegt beim jungen Mann ca. 15-20 g und zählt neben den Hoden, Nebenhoden und Samenblasen zu den männlichen Adnexen. Das Organ besteht aus 30-50 Drüsen, welche über 15-30 Ausführungsgänge (Ductuli prostatici) in die Harnröhre münden. Sie bilden das dünnflüssige Sekret, welches ca. 30% des Ejakulats ausmacht. Neben anderen Zutaten bewirkt eine darin enthaltene Protease, das Prostata-spezifische Antigen (PSA), durch Verflüssigung des Ejakulats die progressive Motilität der Spermien und ist somit für die Fertilität mitentscheidend. Zudem ist PSA als Tumormarker für das Prostatakarzinom (PCa) etabliert. In der Prostata lassen sich weiterhin glatte Muskulatur und Stromagewebe histologisch unterscheiden, umgeben ist sie von einer bindegewebigen Kapsel [1,2]. In der gängigen Einteilung nach Mc Neal wird sie in drei wesentliche Zonen eingeteilt. Die periphere Zone macht ca. 70% des Drüsengewebes aus und ist Ursprung der meisten PCa. Weitere 25% der Drüsen entfallen auf die zentrale Zone, den Rest bildet die periurethrale Mantelzone oder auch Transitionalzone. Letztere führt bei übermäßiger Proliferation des Gewebes zur benignen Prostatahyperplasie (BPH) wie auch das PCa typischerweise eine Erkrankung des älteren Mannes [3,4].

Die Entwicklung und Funktion der Prostata ist entscheidend vom männlichen Sexualhormon Testosteron abhängig. Die Bildung von Testosteron im hormonellen Regelkreis nimmt Ihren Anfang im Hypothalamus mit der Ausschüttung des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH). Dieses bewirkt in der Hypophyse die Abgabe des luteinisierenden Hormons (LH) sowie des follikelstimulierenden Hormons (FSH). LH induziert in den Leydig-Zellen des Hodens die Testosteronproduktion und dessen Abgabe in den Blutstrom. Das Enzym 5-α-Reduktase der Prostatazellen

schließlich wandelt das originäre Testosteron in Dihydrotestosteron (DHT) um, welches eine mehrfach höhere Bindungsaffinität für das entscheidende Target, den Androgenrezeptor (AR) aufweist [5]. Neben dem entscheidenden DHT sind untergeordnet auch adrenale Androgene sowie das hypothalamische Prolaktin als endokrine Botenstoffe in der Prostata wirksam. Insbesondere die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse ist durch einen mehrstufigen Feedback-Loop selbstkontrolliert (siehe Abbildung 1) [1,6,7].



Abbildung 1: Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

Der hormonelle Regelkreislauf kumuliert in der Bildung von Testosteron sowie adrenaler Androgene, welche die Prostata zu Entwicklung und Funktion anregen. Negative feedback-Mechanismen regulieren den Kreislauf (nach [7]).

#### 1.2 Das Prostatakarzinom – Entstehung, Diagnostik und Therapie

Das PCa stellt die häufigste Tumorerkrankung des Mannes in den westlichen Industrienationen dar. Allein in Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei etwa 60.000 Neuerkrankungen, ca. 12.000 sterben jedes Jahr an den Folgen des PCa. was einen Anteil von 11,3% der tödlichen Krebserkrankungen ausmacht. Im Durchschnitt erkranken Männer im Alter von 69 Jahren, unter Berücksichtigung der demographischen Entwicklung und zu erwartenden Alterung der Gesellschaft ist national zukünftig mit einer deutlichen Zunahme an Inzidenz und Prävalenz zu rechnen [8]. Epidemiologisch betrachtet zeigt sich für Europa ein Nord-Süd-Gefälle mit abnehmender Inzidenz; das häufigste Auftreten findet sich bei afroamerikanischen Männern mit 185,4 /100.000/Jahr [9].

Als wichtigster Risikofaktor ist das Alter zu nennen, während die zugrundeliegenden Ursachen für die Entstehung eines PCa weiterhin unbekannt sind. Neben dem Alter scheinen ethnische Zugehörigkeit bzw. Lebensort als auch genetische Prädisposition eine Rolle zu spielen, so ist das Risiko einer Erkrankung für Verwandte 1. Grades doppelt so hoch wie bei einer unauffälligen Familienanamnese [10]. Weitere im Verdacht stehende Risikofaktoren umfassen Adipositas, Diabetes mellitus, lokale Entzündungsprozesse sowie ernährungsbedingte und sozioökonomische Faktoren. Basierend auf den allgemeinen Empfehlungen zur Krebsprävention gehören zu den präventiven Maßnahmen eine ausgewogene Ernährung, sportliche Aktivität sowie eine stabile psychosoziale Situation [11].

Die hohen Fallzahlen begründen den Fokus des Gesundheitssystems auf die Erkrankung, dem wird unter anderem mit dem Angebot einer jährlichen kostenlosen Vorsorgeuntersuchung für Männer ab 45 Jahren Rechnung getragen. Hierbei findet eine körperliche Begutachtung, eine digital-rektale Untersuchung (DRU) sowie nach ausführlicher Aufklärung auf Patientenwunsch die Bestimmung des PSA-Werts statt. Da ein PCa in frühen Stadien zumeist keine spezifischen Symptome aufweist wird die Diagnose häufig im Rahmen der Vorsorge gestellt; Späte Stadien fallen oft durch Symptome wie Harnverhalt, Hämaturie, Inkontinenz, Impotenz, Knochenschmerzen (mit ggf. pathologischen Frakturen) oder begleitende B-Symptomatik auf. Wie beschrieben bildet sich der Großteil der PCa im Bereich der peripheren Zone des Organs und ist somit häufig von dorsal in der DRU tastbar, die Aussagekraft variiert jedoch deutlich in Abhängigkeit von Untersucher und Tumorstadium [4]. Das exklusiv im Prostatagewebe gebildete PSA kann nicht als spezifischer Tumormarker gewertet

werden, da sich der Wert auch im Rahmen einer BPH, lokalen Entzündungen wie einer Prostatitis oder nach externer Manipulation (DRU, längeres Radfahren) erhöht zeigen kann [12]. Falls nach Aufklärung durch den Patienten eine PSA-Bestimmung gewünscht ist, richtet sich das weitere Procedere nach dem jeweiligen Wert mit ggf. Kontrollbestimmungen im Intervall. Allgemein gilt ein PSA-Wert unter 4 ng/ml nicht als malignitätsverdächtig, der Bereich von 4-10 ng/ml ist unter Berücksichtigung weiterer Faktoren abklärungsbedürftig und bei über 10 ng/ml hochsuspekt für ein PCa [13]. Aufgrund des Verdachts auf Übertherapie nach initialer Diagnose eines PCa mit fraglichen Auswirkungen auf die Mortalität besonders in älteren Patienten war zuletzt das PSA-Screening deutlich in die Kritik geraten und ist aktuell offiziell nicht mehr als Teil der Vorsorge empfohlen, weiterhin wird die PCa-Vorsorgeuntersuchung insgesamt kontrovers diskutiert. [14,15].

Im Falle eines auffälligen Befundes im Rahmen der Vorsorge steht als nächster diagnostischer Schritt eine Prostatastanzbiopsie als primäre Option zur Verfügung. Klassischerweise erfolgt hierbei mit Hilfe eines transrektalen Ultraschalls (TRUS) die randomisierte transrektale Entnahme von je 5-6 Stanzen aus den beiden Prostataseitenlappen mit ggf. zusätzlichen Biopsaten aus tastsuspekten Arealen [16]. Mittlerweile vor der Gewebeentnahme die Möglichkeit gibt es einer multiparametrischen Magnetresonanztomographie (mpMRT) der Prostata, hierbei werden suspekte Areale des Organs nach dem standardisierten PIRADS-Klassifikationssystem beurteilt [17]. Bei malignitätssuspekten Befunden der mpMRT kann neben der allenfalls empfohlenen randomisierten Biopsie eine zusätzliche gezielte Biopsie der auffälligen Herde per Fusionsbiopsie durchgeführt werden.

Anschließend an die Stanzbiopsie erfolgt die histopathologische Einschätzung des Gewebes, zumeist handelt es sich um ein Adenokarzinom der Prostata. Es erfolgt eine Graduierung nach Gleason anhand des Grades der Entdifferenzierung der Drüsenmorphologie. Im Gleason-Grad 1 bis 5 aufsteigend wird eine zunehmende Entartung des Gewebes beurteilt. Der Gleason-Score setzt sich bei einer Stanzbiopsie per Addition der höchsten und der häufigsten zellulären Entdifferenzierung zusammen und ergibt somit Werte zwischen 2 und 10. Ab einem Gleason-Score von 6 ist von einem PCa auszugehen und ggf. entsprechend weitere diagnostische bzw. therapeutische Schritte einzuleiten [18]. Bei einem primär diagnostizierten PCa wird von einer manifesten Erkrankung gesprochen, ein inzidentelles PCa wird eine Diagnose im Rahmen einer Therapie der BPH genannt

(z. b. per transurethraler Resektion). Ein okkultes Karzinom hingegen fällt initial durch Symptome der meist ossären sekundären Metastasierung im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf auf, die latente Form findet sich bei Erstbefunden im Rahmen von Autopsien [19].

Die Stadieneinteilung des PCa erfolgt nach der aktuellen UICC-Klassifikation (siehe Anhangstabelle 1) [20]. Unterschieden werden hierbei das lokal begrenzte (T1-2 N0 M0), das lokal fortgeschrittene (T3-4 N0 M0) sowie das fortgeschrittene bzw. metastasierte PCa (N1 und/oder M1). Dabei erfolgt im Falle eines lokal begrenzten Prostatakarzinoms eine weitere Risikostratifizierung nach *D'Amico* [21]. So wird bei einem niedrigen Risiko (PSA  $\leq$  10 ng/ml, Gleason-Score 6 sowie cT1c/cT2a) auf eine weitere Bildgebung zum Staging verzichtet, im Falle des intermediären Risikos (PSA > 10 ng/ml – 20 ng/ml oder Gleason-Score 7 oder cT2b) besteht aktuell keine eindeutige Empfehlungslage. Bei high-risk-Tumoren der Prostata (PSA > 20 ng/ml oder Gleason-Score  $\geq$  8 oder cT2c) sollten prätherapeutisch eine Bildgebung mittels CT/MRT des Beckens und ggf. bei Verdacht auf ossäre Metastasierung eine Skelettszintigraphie durchgeführt werden [22].

Die Therapie des PCa erfolgt adaptiert an Stadium, Risikogruppe und Prognose der Erkrankung. Im Falle eines lokal begrenzten Tumors mit niedrigem Risikoprofil nach D'Amico unterscheidet man die primäre Operation mittels radikaler Prostatektomie begleitender iliakaler Lymphadenektomie, (RPE) und ggf. die perkutane Strahlentherapie oder interstitielle Brachytherapie sowie Active Surveillance und Watchful Waiting [22]. Die primär kurativen Ansätze mittels RPE, externer Bestrahlung und Brachytherapie sind dabei aktuell als gleichberechtigte Therapieoptionen anzusehen – ein Überlebensvorteil einer Methode gegenüber der anderen konnte bisher nicht erwiesen werden [16,23]. Bei der RPE erfolgt entweder als offene, endoskopisch-extraperitoneale oder Roboter-assistierte Operation die Entnahme der gesamten Prostata mitsamt Samenblasen und je nach präoperativ festgelegtem Risikoprofil die iliakale Lymphadenektomie beider Seiten. Die externe Radiatio erfolgt perkutan, bei der Brachytherapie werden radioaktiv strahlende Seeds perineal in das Gewebe implantiert, um dort lokal über einen längeren Zeitraum eine zytotoxische Strahlendosis abzugeben [22]. Active Surveillance beschreibt ein abwartendes Vorgehen unter regelmäßigen Kontrolluntersuchungen, um einen Tumorprogress frühzeitig festzustellen. Durch das Abwarten sollen mögliche negative Nebenwirkungen einer ggf. ausbleibenden lokalen Therapie vermieden werden. In

festgelegten Intervallen erfolgt die Kontrolle mittels PSA-Wert-Bestimmung, DRU und erneuten Stanzbiopsien. In Folge eines Progresses kann eine entsprechende Therapie angeboten werden [24]. Beim Watchful Waiting erfolgt unter Berücksichtigung einer bei Erstdiagnose anzunehmenden Lebenserwartung von unter 10 Jahren eine nichtkurativ intendierte Behandlung. Hierbei wird unter regelmäßigen Kontrollen eine Therapie mittels Hormonentzug nur bei Auftreten von Symptomen eingeleitet [25].

Befindet sich das PCa bei Erstdiagnose im lokal begrenzten Stadium und mittleren bis hohen Risikoprofil nach *D'Amico* oder im lokal fortgeschrittenen Stadium kann zwischen der RPE (mit ggf. nachfolgender adjuvanter Strahlentherapie) und externer perkutaner Radiatio mit nachfolgender Hormontherapie als kurative Optionen gewählt werden [26]. Nach der lokalen Therapie erfolgt die regelmäßige Nachsorge mittels Bestimmung des PSA-Werts. Bei Nachweis eines biochemischen Rezidivs kann im Falle einer primär erfolgten RPE eine adjuvante Radiatio des ehemaligen Tumorbetts erfolgen. Nach primärer Radiatio besteht die Möglichkeit einer Salvage-Prostatektomie bei vorangegangener neuerlicher bioptischer Sicherung [27,28].

Falls initial keine Heilung durch die beschriebenen Methoden erreicht werden konnte oder eine Diagnose erst bei fortgeschrittener Erkrankung gestellt wird, werden aktuell drei verschiedene Formen des weiteren Krankheitsverlaufs mit entsprechenden Therapieoptionen beschrieben: Das metastasierte hormonsensitive (mHSPC), das nicht-metastasierte kastrationsresistente (nmCRPC) sowie das metastasierte kastrationsresistente PCa (mCRPC) [29]. Für viele Jahre war die Monotherapie mittels Hormonentzugstherapie bzw. Androgendeprivationstherapie (ADT) die einzige verfügbare Möglichkeit - mittlerweile haben sich mit der Zulassung zahlreicher neuer Medikamente, teilweise in Kombinationstherapie mit der klassischen ADT, neuartige therapeutische Optionen ergeben [30]. Die konventionelle ADT wird dabei heute zumeist medikamentös durchgeführt, der Hormonentzug mittels Orchiektomie ist deutlich in den Hintergrund gerückt. Aus pharmakologischer Sicht stehen hierfür GnRH-Antagonisten, steroidale nichtsteroidale GnRH-Analoga und sowie Antiandrogene zur Verfügung. Der Sinn besteht im Testosteronentzug des PCa, da der Tumor im hormonsensiblen Stadium entscheidend auf das männliche Sexualhormon als Wachstumsfaktor angewiesen ist. Unter ADT kommt es daher zunächst zu einer vorübergehenden Pausierung des Tumorwachstums bis hin zum teilweisen Rückgang des PCa [31].

Im Falle des mHSPC haben sich in prospektiven randomisierten Studien kombinierte Hormonchemotherapien (kHCT) als vorteilhaft erwiesen. So wird neben der herkömmlichen medikamentösen ADT das therapeutische Schema in Abhängigkeit des Allgemeinzustands des Patienten um das semisynthetische Docetaxel oder Abirateron (inklusive begleitender Prednisolongabe) erweitert [32]. Docetaxel ist als klassisches Chemotherapeutikum im Spindelapparat wirksam und erreicht per Zellzyklusarrest die Einleitung der zellulären Apoptose; Abirateron ist ein selektiver Inhibitor des CYP-17-Enzyms, welches in der Bildungskaskade von Testosteron beteiligt ist, und senkt somit den systemischen Testosteronspiegel entscheidend [33,34]. Neuerdings wurden in der kHCT des mHSPC auch die neuartigen Androgenrezeptorinhibitoren Enzalutamid und Apalutamid zugelassen (ein weiterer neuer Vertreter dieser Stoffgruppe ist Darolutamid). Diese Pharmaka erreichen ihre Wirkung über eine äußerst spezifische Affinität zur Ligandenbindungsdomäne des AR und verhindern hierdurch die AR nachgeschaltete dem Signaltransduktionskaskade (siehe Abschnitt 1.3) [29].

Das nmCRPC stellt das Stadium des PCa dar, in welchem eine Aussaat im Körper noch nicht stattgefunden hat und nach initialer ADT ein neuerlicher PSA-Anstieg aufgetreten ist. Zugelassen für die Therapie sind die Präparate Enzalutamid, Apalutamid sowie Darolutamid mit einem nachgewiesenen Benefit in der aktuellen Literatur [29]. Kontrovers diskutiert wird jedoch die Frage, ob die Diagnose eines nmCRPC auf unzureichend genauer Bildgebung basiert und nicht in den meisten Fällen bereits unbemerkt metastasiert und zu einem mCRPC übergegangen ist. Durch den Einsatz der modernen PSMA-PET/CT, in welcher das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) der PCa-Zellen nachgewiesen wird, mussten zuletzt viele initial diagnostizierten nmCRPC nachträglich in die Diagnose eines mCRPC umgewandelt werden [35].

Die grundsätzlich palliative Therapiesequenz des mCRPC richtet sich, neben der Patientengesundheit und den Nebenwirkungsspektren der Präparate, auch nach den möglicherweise vorangegangenen Therapieschemata, welche meist im Rahmen eines initialen mHSPC durchgeführt wurden. Zugelassen sind in der Erstlinientherapie aktuell Abirateron, Enzalutamid oder Docetaxel. Weiterhin kann bei einer exklusiv ossär metastasierten Erkrankung die Gabe von Radium-223 erwogen werden [22]. Hierbei handelt es sich um ein Radiopharmazeutikum, welches sich im Bereich der Knochenstoffwechsel-aktiven ossären Metastasen anreichert und dort

spezifisch α-Strahlung emittiert [36]. In der Zweitlinientherapie erweitert sich das Spektrum um das Taxan Cabazitaxel, welches nach vorangegangener Therapie mit Docetaxel einen zusätzlichen Überlebensvorteil aufweist [37].

Seit kurzem sind weitere vielversprechende Therapieoptionen in der Diskussion. Dabei handelt es sich zum einen um den mittlerweile zugelassenen Wirkstoff Olaparib, einen PARP-Inhibitor, welcher nach vorangegangenem Nachweis eines Defekts bestimmter DNA-Reparatur-Gene bereits in anderen Tumorentitäten (z. B. Mammakarzinom) Anwendung fand. Bis zu 20% der mCRPC weisen eine entsprechende Mutation auf und können in Zweitlinie von der Therapie profitieren [38]. Eine zusätzliche aufkommende Möglichkeit besteht in der PSMA-basierten Radioligandentherapie, bei welcher gezielt das PSMA der Krebszellen mit radioaktiv strahlenden Elementen anvisiert und therapiert wird – die Anwendung ist jedoch aktuell noch auf individuelle Heilversuche und klinische Studien beschränkt [39].

Abschließend ist die Therapie symptomatischer ossärer Metastasen ein wichtiger Pfeiler des onkologischen Konzepts beim metastasierten PCa. Hierfür kann Patienten eine supportive medikamentöse Schmerztherapie sowie fallabhängig eine lokale Bestrahlung zur Stabilisierung oder operative Intervention angeboten werden. Auch die Gabe von Radium-223 kann schmerzbedingt erfolgen [22]. Eine weitere Knochen-stabilisierende Wirkung kann bei mCRPC durch die Gabe von Bisphosphonaten oder den monoklonalen Antikörper Denosumab erreicht werden [40].

#### 1.3 Enzalutamid – ein neuartiges Antiandrogen

Enzalutamid, initial MDV3100, ist ein Diarylthiohydantoin welches in einem breiten Screening für nicht-steroidale Androgene entdeckt und nachfolgend zur Marktreife wurde. Es zeiat eine 5-8fach höhere Affinität für die gebracht Ligandenbindungsdomäne (LBD) des AR als das nichtsteroidale Antiandrogen Bicalutamid und bietet den Vorteil, dass eine partielle AR-Aktivierung auch bei AR-Überexpression nicht stattfindet [41]. Der überlegene Wirkmechanismus wird laut Hersteller über eine dreifache Ansatzstelle des Wirkstoffs in der intrazellulären Signalkaskade des AR begründet: Die Blockade der Ligandenbindungsdomäne für DHT am AR, die Blockade der AR-Translokation in den Nukleus sowie die Blockade der Bindung des AR an die Androgen Response Elemente (ARE) der DNA und der nachfolgenden Transkription (siehe Abbildung 2) [41,42].



#### Abbildung 2: Der Wirkmechanismus von Enzalutamid

Enzalutamid behindert die physiologische Signalkaskade des AR an drei entscheidenden Stellen wie dargestellt. Es blockiert dabei erstens die Bindungsstelle für DHT am AR, zweitens die Translokation des AR in den Nukleus und drittens die Bindung an die DNA (nach [42]). Die grundlegende Intention war die Entwicklung eines Wirkstoffs, welcher nach initialer ADT im Falle des Krankheitsprogresses in ein CRPC eine zusätzliche Wirkung und somit eine Verlängerung der Lebenszeit bewirkt. In zwei doppelverblindeten, kontrolliert randomisierten Phase-III-Studien wurde die Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens sowie das Erreichen weiterer Endpunkte nachgewiesen. In der AFFIRM-Studie, welche insgesamt 1199 Patienten mit vorangegangener Taxan-Chemotherapie einschloss, konnte eine Verbesserung des Gesamtüberlebens um 4,8 Monate (18,4 vs. 13, 6 Monate) nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich signifikante Verbesserungen aller sekundären Studienendpunkte [43]. Die PREVAIL-Studie, welche 1717 Chemotherapie-naive Patienten einschloss, erreichte ihre beiden primären Endpunkte verbessertes Gesamtüberleben (32,4 vs. 30,2 Monate) sowie radiographisch progressionsfreies Überleben (Verringerung des Progressionsrisikos um 81%). Auch hier zeigten sich alle sekundären Endpunkte signifikant gebessert [44]. Die europaweite Medikamentenzulassung erfolgte am 21. Juni 2013. Nach initialer Indikation ausschließlich beim mCRPC ist Enzalutamid mittlerweile, wie unter 1.2 beschrieben, auch beim nmCRPC zugelassen.

Enzalutamid wird einmal täglich angewendet per oraler Tabletteneinnahme in Dosis von 160 mg. Zu den häufigsten möglichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen zählen Übelkeit, Fatigue, Anorexie, Rückenschmerzen, Obstipation und Diarrhoe, welche mit einer Frequenz ≥ 20% bei den Patienten auftreten. Eine selten beschriebene signifikante Nebenwirkung ist der Krampfanfall. Zur Kontrolle des Therapieerfolgs erfolgt wie auch bei der ADT eine regelmäßige Kontrolle des PSA-Werts, ggf. unter Hinzunahme bildgebender Verfahren zum neuerlichen Staging [45]. Während der Wirkstoff bei einem Großteil der Patienten mit CRPC einen eindeutigen Überlebensvorteil erlangt, weisen jedoch 20-30% der Behandelten eine primäre Resistenz gegen den Wirkstoff nach vorangegangener ADT auf [43]. Zudem entwickelt sich auch unter einer Therapie mit Enzalutamid im Verlauf eine sekundäre Resistenz gegen den Wirkstoff [46]. Die möglichen Mechanismen der primären und sekundären Resistenz sind äußerst komplex, grundsätzlich kann man in AR-abhängige und AR-unabhängige Vorgänge einteilen (siehe 1.4) [47].

#### 1.4 Der Androgenrezeptor – Physiologie und Therapieresistenz

Der AR ist der entscheidende Faktor für die physiologische Entwicklung und Funktion der Prostata; In der Entstehung, dem Progress und vor allem der nachgeschalteten Resistenzbildung gegen klassische ADT und neuartige Antiandrogene beim PCa ist der AR essenziell. Das für den AR kodierende Gen befindet sich auf dem X-Chromosom und kodiert für das 110 kDa messende Protein [48]. Der AR ist ein Mitglied der Steroidhormon-Rezeptor-Familie und fungiert als Liganden-aktivierter nukleärer Transkriptionsfaktor. Er besteht aus vier funktionellen Domänen: Aus der Transaktvierungsdomäne, der DNA-Bindungsdomäne, der Gelenksregion, sowie der für die Bindung von DHT entscheidenden LBD [49].

Inaktiviert liegt der AR als Monomer im Zytoplasma, wo er von einem vor lysosomalem Abbau schützenden Komplex aus Chaperonen umgeben ist. Dieser Komplex aus Hitzeschock-Proteinen (HSP) besteht aus HSP40, HSP 70, HSP 90 α/β sowie dem HSP-organizing-Protein (HOP) [50]. Nach der Bindung von DHT an der LBD löst er sich aus dem beschriebenen Komplex, bildet ein Homo-Dimer und transloziert in den Nukleus. Hier bindet er an AREs der DNA und reguliert die Transkription von Genen, die sowohl die normale Prostatafunktion als auch pathologisches Wachstum und Progress des PCa bewirken [51]. PSA beispielsweise ist in der Bildung direkt von der AR-Signalkaskade abhängig und kann somit im klinischen Verlauf als indirekter Marker für die AR-Aktivität und die Tumorgröße genutzt werden [47].

Wie unter 1.3 angedeutet zeigen sich gegen die neuartigen Antiandrogene wie Enzalutamid primäre und sekundäre Resistenzen im CRPC. Mehrere Escape-Mechanismen der PCa-Tumorzellen sind dabei AR-abhängig. Eine häufig beobachtete Entwicklung ist hierbei die zelleigene Überexpression des AR, welche den Zellen eine Proliferation auch bei niedrigen Konzentrationen zirkulierender Androgene bzw. unter Anwesenheit spezifischer Hemmer wie Enzalutamid ermöglicht [52]. Ein weiterer Mechanismus kommt durch diverse Splice-Varianten des AR zustande. Unter diesen finden sich viele konstitutiv aktive AR-Formen, so ist beispielsweise in der klinisch relevanten **AR-V7-Variante** die Ligandenbindungsdomäne nicht mehr Teil des finalen Proteins, was in einer dauerhaft aktivierten Signalkaskade resultiert [53]. Hinzu kommen weitere ARabhängige Optionen wie AR-Punktmutationen oder eine veränderte intratumorale Androgen-Biosynthese. So wiesen beispielsweise Enzalutamid-resistente PCa-Zellen

eine endogen deutlich verstärkte Synthese von Androgenen und dafür verantwortlicher Gene auf [54].

Neben den AR-abhängigen Resistenzmechanismen sind auch weitere, ARunabhängige Vorgänge aktueller Forschungsarbeit. im Fokus So bewirkt beispielsweise eine pathologisch vermehrte Expression des Glucocorticoid-Rezeptors (GR) aufgrund der verwandten Struktur und Funktion beider Rezeptoren eine teilweise Aktivierung der AREs mit nachfolgend verbessertem Tumorwachstum [55]. Die neuroendokrine Differenzierung eines CRPC stellt eine andere Möglichkeit der Resistenz dar. Hierbei entdifferenziert das PCa von seiner zumeist ursprünglichen histopathologischen Charakteristik als AR-exprimierendes Adenokarzinom in eine AR-negative neuroendokrine Form. Bis zu 30% der mCRPC weisen diese Form der Tumorprogression auf und sind somit weder für klassische ADT noch neuartige Antiandrogene therapeutisch sinnvoll zugänglich [56].

#### 1.5 Die Apoptose – der programmierte Zelltod

Der Tod einer Zelle ist hauptsächlich auf zwei unterschiedlichen Wegen möglich. Die unkontrollierte Nekrose wird durch externe Noxen wie Hypoxie oder Entzündung in Gang gesetzt und führt zu einer Ruptur der Zellmembran mit begleitendem Austritt Zellbestandteilen umliegende Gewebe nachfolgendem ins und von Umgebungsschaden (Inflammation) [57]. Die Apoptose hingegen gibt multizellulären Organismen die Möglichkeit auf geordnetem Weg eine Homöostase zwischen Zellerneuerung und Zellabbau (insbesondere beschädigter Zellen) zu etablieren und führt dadurch zu einem konstanten Zellumsatz [58]. Bei dieser stillen Art des Zelltods kommt es nach Auslösen der apoptotischen Signalkaskade zu multiplen morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle. Neben einer Schrumpfung der Zelle sowie des Nukleus treten DNA-Fragmentierung, ein Einstülpen der Zellmembran und ein Abschnüren von Zellbestandteilen durch intakte Membranen, die schließlich hauptsächlich durch Fresszellen eliminiert werden, auf ein Schaden für das umliegende Gewebe durch Inflammation bleibt aus. Im physiologischen zellulären Metabolismus liegen eine Vielzahl von pro- und antiapoptotischen Faktoren zeitgleich in verschiedenen Kompartimenten der Zelle vor. Diese bilden ein sensibles Gleichgewicht, welches bei Bedarf jederzeit zugunsten der Apoptose verschoben werden kann [59,60].

Die Initiationsphase der Apoptose erfolgt nach Einschaltung eines von zwei Signalwegen (s. Abbildung 3). Beim extrinsischen Todesrezeptor-Signalweg werden membranständige Rezeptoren (z. B. CD95, TRAMP, TRAIL) durch extern von Immunzellen abgegebenen Todesliganden aktiviert, welche nachgeschaltet über Pro-Caspase-8 für die Bildung von Caspase-8 sorgen. Caspase-8 leitet als Initiator-Molekül die nachgeschaltete Caspasen-Kaskade ein, welche in der Effektorphase die zelluläre Apoptose induziert [61]. Der intrinsische, mitochondriale Signalweg wird hauptsächlich nach Exposition der Zelle gegenüber Noxen wie Toxinen, Strahlung, reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) oder Zytostatika aktiviert. Hierdurch entstandene DNA-Schäden werden typischerweise von dem Tumorsuppressor-Protein p53 (bzw. seiner aktivierten, phosphorylierten Form P-p53) an das Mitochondrium in proapoptotischer Wirkung signalisiert. In Folge kippt das sensible Gleichgewicht der Mitglieder der Bcl-2-Familie. Ein Teil dieser strukturverwandten Proteinfamilie wirkt anti-apoptotisch (z.B. Bcl-2, Bcl- $x_L$ ) während des physiologischen Zustands, wohingegen der andere Teil (z. B. Bax, Bak, Bid) eine pro-apoptotische Funktion innehat [62]. Die Proteine Bax und Bak formen beim intrinsischen Signalweg durch Oligomerisation Poren der Mitochondrien-Membran und ermöglichen somit den Austritt von Cytochrom c, was zur Bildung des hochmolekularen Apoptosoms führt. Dieses bedingt letztlich die autoproteolytische Umwandlung von Procaspase-9 zu Caspase-9, welche als Initiatorcaspase des intrinsischen Wegs die nachgeschaltete Kaskade initiiert und zur Apoptose führt [63]. Grundsätzlich unabhängig voneinander, besteht jedoch über Bid auch Verbindung vom extrinsischen zum intrinsischen Signalweg im Sinne einer positiven Verstärkung [64].

In vielen Tumorentitäten wurde eine dysregulierte Apoptose nachgewiesen, wodurch sich maligne entartete Zellen dem geordneten Abbau entziehen können. Im Falle des PCa führt beispielsweise eine verstärkte Expression von Bcl-2 oder Bcl- $x_L$  zu einem effektiven Schutz vor Zelltod, eine weitere Möglichkeit stellen Mutationen oder Verlust des Tumorsuppressorgens p53 dar und auch die Aktivierung antiapoptotischer Faktoren wie Akt und NF-KB spielt häufig eine Rolle [65]. Diese Mechanismen zählen neben den AR-abhängigen sowohl zu den entscheidenden CRPC Faktoren des Krankheitsprogresses als auch bei der zum Resistenzentwicklung gegenüber neuartigen Androgenen wie Enzalutamid.



#### Abbildung 3: Die Hauptsignalwege der Apoptose

Sowohl der extrinsische Todesrezeptor-abhängige als auch der intrinsische mitochondriale Signalweg der Apoptose enden in der gemeinsamen Caspase-Kaskade. Diese löst schließlich den geregelten Abbau der Zelle aus. Apoptose-hemmende Proteine wie Bcl-2 oder IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins) sind Beispiele für das Gleichgewicht pro- und antiapoptotisch wirksamer Moleküle im physiologischen Zellhaushalt (modifiziert nach [64]).

## 2. Zielsetzung

Durch den Progress des PCa in seine kastrationsresistente Form, das CRPC, wird die klassische ADT hinfällig und neue therapeutische Strategien sind erforderlich. Das neuartige Antiandrogen Enzalutamid ist hierbei mittlerweile für das nichtmetastasierte sowie das metastasierte CRPC zugelassen und zeigt über seine hohe Affinität für den AR in der Anwendung beim Patienten einen deutlichen Überlebensvorteil. Das Verständnis der zusätzlichen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen über die einfache Bindung an den AR hinaus kann Aufschluss über die Bildung von Resistenzen in der Anwendung beim PCa geben und eventuell sogar die therapeutische Anwendung bei weiteren Tumorentitäten ermöglichen.

Für diese Arbeit wurde die Wirkung von Enzalutamid auf verschiedene PCa-Zellen untersucht. Die untersuchten Zelllinien präsentieren dabei unterschiedliche Progressionsstadien des PCa und sind AR-positiv oder AR-negativ. Neben der Bestimmung des für die jeweiligen Zelllinie spezifischen Enzalutamid-Wirkspiegels erfolgten verschiedene Untersuchungen, um die Induktion von Apoptose unter Behandlung nachzuweisen. Molekulare Analysen beinhalteten die Untersuchung der Expression pro- und anti-apoptotischer Moleküle (Bcl-2, Bax) und der Apoptoseassoziierten DNA-Fragmentierung per TUNEL-Assay. Weiterhin erfolgte die Analyse der Apoptose-spezifischen Änderungen der Kernmorphologie.

Die übergeordnete Fragestellung war hierbei, ob Enzalutamid auch AR-unabhängig eine Wirkung in PCa-Zellkulturen entfalten kann, wodurch die zelleigene Apoptose induziert wird.

# 3. Material und Methoden

# 3.1 Material

.

## 3.1.1 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	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Analyzer	
ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories (München)
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories (München)
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Filterpapier	Whatman (Dassel)
Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Keyence (Osaka, Japan)
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Heizblock QBT 1	CLF Laborgeräte (Emersacker)
Invertierer	VWR International (Darmstadt)
Magnetrührer IKA RCT classic	VWR International (Darmstadt)
Mikroskop IT400+	VWR International (Darmstadt)
Miniwippe-Schüttler R1	Sucofin (Zeven)
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare (Chalfont St Giles,
	Großbritannien)
Photospektrometer Infinite® M200 PRO	Tecan (Männedorf, Schweiz)
pH-Meter FiveEasy™ FE20	Mettler-Toledo (Schwerzenbach,
	Schweiz)
Pipettensatz, 0,5-1000µl	Carl Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
	BD Biosciences (Heidelberg)
	Biozym (Wien, Österreich)
Pipettierhilfe peqMATE	Peqlab (Erlangen)
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Powerpac™ HC	Bio-Rad Laboratories (München)
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore (Billerica, USA)
Rollmischer RS-TR 5	Phoenix Instruments (Garbsen)
SDS-PAGE Zubehör Mini-PROTEAN	Bio-Rad Laboratories (München)
System	
Sterilbank HERA Safe	Heraeus Instruments (Hanau)
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Ultraschallgerät UP200S	Hielscher Ultrasonics (Teltow)
Vortex Mixer peqTWIST	Peqlab (Erlangen)

Waage EMB 2000-2 KERN & Sohn (Balingen-Frommern) Memmert (Schwabach) Wasserbad WNB 10 Armin Baack (Schwerin) Wippschüttler UNITWIST-RT Zellkulturplastik Sarstedt (Nümbrecht) Zentrifuge Centrifuge 5424 Eppendorf (Hamburg) Zentrifuge Centrifuge 5810 Eppendorf (Hamburg) Zentrifuge C1301 Bio-Rad Laboratories (München) Zentrifuge Mikro 120 Hettich Lab Technology (Tuttlingen)

3.1.2 Chemikalien und kommerzielle Losungei	3.1	.2 Chemikalien u	und k	kommerzielle	Lösungen
---	-----	------------------	-------	--------------	----------

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Life technologies (Carlsbad, USA)
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Brilliant Blue G 250	Carl Roth (Karlsruhe)
Complete™ Mini, EDTA frei	Roche Diagnostics (Mannheim)
Cyloheximid	Roche Diagnostics (Mannheim)
D(+)-Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe)
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dulbecco's phosphate buffered saline	PAN Biotech (Aidenbach)
(DPBS)	
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Enzalutamid (MDV3100)	Astellas (Northbrook, USA)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol (EtOH) (unvergällt)	Carl Roth (Karlsruhe)
EtOH (vergällt)	Carl Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Darmstadt)
Formaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe)
G418 Geneticin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Hydrogenchlorid (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth (Karlsruhe)

Natriumvanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim)
ortho-Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech (Aidenbach)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ponceau S	Carl Roth (Karlsruhe)
Pyruvat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Carl Roth (Karlsruhe)
(TEMED)	
Trichloressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton® X-100	Ferak (Berlin)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	Carl Roth (Karlsruhe)
Zellmedium RPMI 1640 mit Phenolrot	PAN Biotech (Aidenbach)

Kommerzielle Lösung	Hersteller
10x Rotiblock-Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe)
10x Trypsin-EDTA	PAN Biotech (Aidenbach)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth (Karlsruhe)
SuperSignal West Dura	Thermo Scientific (Rockford, USA)
TiterTACS™ Colorimetric Apoptosis	Trevigen (Gaithersburg, USA)
Detection Kit, diverse Lösungen	

# 3.1.3 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben wurden die Puffer und Lösungen in zweifach destilliertem Wasser (A.bidest) angesetzt.

Puffer/Lösung	Herstellung
10% SDS	10% w/v SDS-Pellets
10x Laufpufferlösung	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 K2HPO4; pH
	7,4
1x Rotiblock	10% v/v 10x Rotiblock-Konzentrat
10x Tris buffered saline (TBS)	0,2 M Tris; 1,5 M NaCl; pH7,6
1x TBS-Tween (TBST)	10% v/v 10x TBS; 0,1% v/v Tween 20

2x Trypsin	20% v/v 10x Trypsin-EDTA in DPBS
3% Wasserstoffperoxid	10% v/v Wasserstoffperoxid; 90% v/v Methanol
3,7% Formaldehyd gepuffert	20% w/v Saccharose; 10% v/v 10x PBS; 5% v/v Formaledvhd
4% Paraformaldehyd	4% w/v Paraformaldehyd; 50% v/v 2x PBS;
5x Proteinladepuffer	156 mM Tris, pH 6,8; 25% v/v Glycerol; 5% v/v SDS; 12,5 % v/v β- Mercaptoethanol; 0,2% w/v Bromophenolblau
Antikörperlösung	5% w/v BSA; 10% v/v 10x TBST
Bradford-Reagens	10% w/v Coomassie Brillant Blue G 250; 5% v/V Ethanol; 8,5% v/v H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
BSA-Standard	100% w/v
CASYton	154 mM NaCl; 0,1 mM EDTA
DAPI-Färbelösung	0,1% w/v in 1x PBS
Einfriermedium	70% v/v RPMI 1640 mit Phenolrot; 20%
	v/v FCS; 10% v/v DMSO
Elutionspuffer	200 mM Glycin; 0,2% w/v SDS; 0,1% v/v
	Tween 20; in 100 mM Tris-HCl; pH 6,8
Milch-Block	100% w/v Magermilchpulver in TBST
Poly-L-Lysin Lösung	0,01% w/v Poly-L-Lysin
Ponceau-S-Lösung	0,2 % w/v Ponceau S; 3% v/v
-	Trichloressigsäure
RIPA-Lysepuffer-Gebrauchslösung	67% v/v Lysepuffer-Stammlösung; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 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
Vollmedium (RPMI +/+/+) (VM)	RPMI 1640 mit Phenolrot mit 1%
	Penicillin/Streptomycin, 1% Pyruvat sowie 10 %FCS

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Bcl-2 mouse	1:1.000	Cell Signaling Technology, Inc.
		(Danvers, USA)
Anti-Bax rabbit	1:1.000	Cell Signaling Technology, Inc.
		(Danvers, USA)
Anti-GAPDH rabbit	1:10.000	Cell Signaling Technology, Inc.
		(Danvers, USA)
Anti-p53 rabbit	1:10.000	Cell Signaling Technology, Inc.
		(Danvers, USA)
Anti-P-p53 rabbit	1:1.000	Cell Signaling Technology, Inc.
		(Danvers, USA)
Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse, HRP-linked	1:5.000	Cell Signaling Technology, Inc.
		(Danvers, USA)
Anti-rabbit, HRP-linked	1:5.000	Cell Signaling Technology, Inc.

(Danvers, USA)

#### 3.1.4 Antikörper

## 3.1.5 Zelllinien

Die verwendeten Zellkulturen stellen gängige PCa-Modelle in der Forschung dar. Bei LNCaP handelt es sich um eine aus der Lymphknotenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata gewonnene Linie, die hormonsensitiv ist und eine funktionale AR-Variante exprimiert [66]. PC-3 wurde aus einer Knochenmetastase eines fortgeschrittenen PCa etabliert und stellt einen entdifferenzierten Status des Krankheitsverlaufs dar. Die Zellen sind AR-negativ und somit hormoninsensitiv [67]. In PC-3-AR wiederum ist nachträglich per Transfektion stabil per Vektor die cDNA des AR eingebracht, wodurch dieser in physiologischer Menge exprimiert wird [68,69].

Zelllinie	Hersteller
LNCaP	American Type Culture Collection
	(Manassas, USA)
PC-3	American Type Culture Collection
	(Manassas, USA)
PC-3-AR	Vor Transfektion initial von American
	Type Culture Collection (Manassas,
	USA)

# 3.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1 Zellkulturgrundlagen

Die Zellkultur erfolgte im Rahmen des Passagierens in T-75 Zellkulturflaschen bei 37°C in Vollmedium (VM) bei LNCaP und PC-3, im Falle von PC-3-AR unter Zugabe von G418 zur fortwährenden Selektion des transfizierten Vektors. Während des Wachstums erfolgte die tägliche Kontrolle der Kulturen und deren Konfluenz lichtmikroskopisch. Die Passage wurde ca. 2mal pro Woche bei 80-90% Konfluenz durchgeführt, die verwendeten Materialien wurden hierfür auf 37°C vorgewärmt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und hiernach durch Zugabe von 1 ml 2x Trypsin und Inkubation bei 37°C für 1-2 min vom Flaschenboden gelöst. Im Falle von LNCaP wurde die gewonnene Suspension für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und erneut in VM resuspendiert, um weiteren Schaden durch das Lysin abzuwenden. Die jeweils entstandene Zellsuspension wurde im entsprechenden Verhältnis mit weiterem VM gemischt und anschließend 1 ml des Gemischs mit 19 ml VM in einer neuen T-75 Zellkulturflasche angesetzt. Das Umsetzungsverhältnis betrug hierbei in Abhängigkeit der initialen Zelldichte bei LNCaP 1:3 bis 1:5, bei PC-3 und PC-3-AR 1:5 bis 1:10. Für die Versuche der genannten Zellreihen wurden die Passagen 10 bis 30 verwendet und danach verworfen.

## 3.2.2 Zellquantifizierung mittels CASY TT Cell Counter

Um für die nachfolgenden Versuche eine Quantifizierung der Zellen in Kultur zu ermöglichen wurde der CASY TT Cell Counter genutzt. Hierfür erfolgte das Suspendieren der Zellen und Gewinnen einer Zellsuspension analog der unter 3.2.1. genannten Schritte mit entsprechend angepassten Volumina. Je 100µl (oder 50 µl bei hohen Zellzahlen) der Zellsuspension wurden in 10 ml CASYton gemischt und nach mehrfachem Invertieren eine entsprechende Messung am Gerät durchgeführt. Hierbei wurde das Gerät auf die jeweilig verwendete Zelllinie eingestellt. Jede Zellzahlmessung wurde nach erneutem Invertieren insgesamt dreimalig durchgeführt und der daraus entstehende Mittelwert weiterverwendet. Das Ergebnis wurde entsprechend der Verdünnung auf die Zellzahl/ml zurück berechnet.

#### 3.2.3. Wachstumskinetiken der PCa-Zelllinien

Die in den Versuchen außerhalb der Zellpassage genutzten Zellkulturgefäße wurden zur besseren Haftung der Zellen vorab mit Poly-L-Lysin beschichtet, wofür eine kurze Benetzung der Böden mit der Flüssigkeit und nachfolgendem Eintrocknen der dünnen Schicht durchgeführt wurden. Die Wachstumskinetiken der drei Zelllinien erfolgten in wie beschrieben beschichteten 24-Well-Platten. Initial wurden definierte Zellmengen wie im Ergebnisteil genannt in die Wells eingebracht. Pro Well wurde insgesamt 1 ml VM mit entsprechender Zellzahl appliziert. Im Falle der Exposition durch Wirkstoff wurde nach einer Ruhephase für 24 h das Medium über dem angewachsenen Zellrasen abgesaugt und das mit dem Wirkstoff bzw. der Kontrolle versetzte Medium in den untersuchten Konzentrationen vorsichtig appliziert. Hierbei entsprach die Wirkstoffkonzentration stets der Konzentration der Kontrolle (welche das Lösungsmittel des Wirkstoffs darstellte). Zum jeweiligen Erntezeitpunkt wurden die Zellen wie unter 3.2.1 genannt mit PBS gewaschen, durch Trypsin gelöst und in VM resuspendiert. Die Quantifizierung erfolgte analog zu 3.2.3 und resultierte in der absoluten Zellzahl pro Well. Die initial verwendete Zellzahl wurde dabei so gewählt, dass zum Ende des Experiments noch ein logarithmisches Wachstum beobachtbar war und keine Wachstumsreduzierung aufgrund von Nährstoff- oder Platzmangel stattfand.

#### 3.2.4 Auftauen und Kryokonservierung der Zelllinien

Die im Rahmen der Arbeit untersuchten Zelllinien wurden zur Konservierung vor Beginn der Experimente bei -140°C in niedriger Passage gelagert. Um derart gelagerte Zellen aufzutauen, wurden die jeweiligen Aliquots langsam bis auf Raumtemperatur (RT) erwärmt. Hiernach wurde die enthaltene Zelllösung vorsichtig in VM bei 37°C resuspendiert, für eine Minute bei 1000 U/min zentrifugiert und das entstandene Zellpellet nach Verwerfen des Überstands erneut in VM gelöst. Mit der entstandenen Suspension begann die Kultur in T-75 Zellkulturflaschen analog 3.2.1. Zum Einfrieren der Zellen für die Kryokonservierung wurden niedrige Passagezahlen in hoher Zellzahl kultiviert (T-175-Zellkulturflaschen). Nach Quantifizierung und Zentrifugation wurden je 1,5 bis 2 Millionen Zellen in 1ml VM mit 5 % DMSO gelöst, in ein entsprechendes Kryo-Röhrchen gegeben und zügig bei -140°C konserviert.

#### 3.3 Molekularbiologische Methoden

# 3.3.1 Detektion der apoptotischen DNA-Fragmentierung mittels TUNEL (Tdtmediated dUTP-biotin nick end labeling) - Assay

Zur Quantifizierung der DNA-Fragmentierung im Rahmen der zellulären Apoptose mittels TUNEL-Assay erfolgte die Zellkultur und Behandlung der Zellen auf Lysinbeschichteten 96-Well-Platten. Hierbei wurden im Falle von PC-3 und PC-3-AR je 5.000 Zellen und bei LNCaP je 10.000 Zellen pro Well appliziert. Untersucht wurden die Zellen nach 24 und 48 h Behandlung mit Enzalutamid bzw. der Kontrolle DMSO. Weiterhin wurden weitere Wells mit Zellen bestückt, welche als Positivkontrolle (Nuclease-Behandlung und Docetaxel) sowie Negativkontrolle (Unlabeled) dienten. Die verwendeten kommerziellen Lösungen entstammten hierbei dem TiterTACS™ Kit wie oben genannt. Nach initialer Zellapplikation und Ruhezeit für 24 bzw. 48 h wurden die Zellen nach vorsichtiger Entfernung des Vollmediums (je Well 200 µl) entsprechend mit dem Medikament bzw. der Kontrolle behandelt. Analog erfolgte der exakt gleiche Zellkulturversuch ohne nachgeschalteten TUNEL-Assay in einer zweiten 96-Well-Platte, um später eine Referenz zur Zellzahlbestimmung zu erhalten. Zu Beginn des TUNEL-Assays erfolgte die Zentrifugation der Zellkulturplatten für 3 min bei 1000 U/min, das Absaugen des Mediums und nachfolgend einmaliges vorsichtiges Waschen durch PBS mit anschließendem Absaugen. Zur Fixierung der Zellen erfolgte hiernach die Inkubation mit 200 µl 3,7% gepufferter Formaldehyd-Lösung für 7 min bei RT, anschließend das erneute Waschen mit PBS und eine erneute Inkubation mit reinem Methanol für 20 min bei RT. Nach erneutem Waschen mit PBS, kurzer Zentrifugation und nochmaliger PBS-Waschung waren die fixierten Zell-Monolayer bereit für das Labeling. Hierfür wurden je 50 µl Cytonin auf den fixierten Zellen für 15 min bei RT inkubiert und nach Absaugen der Lösung mit A bidest gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 3 min bei 1000 U/min wurden alle Wells außer der Nuclease-Behandlung mit PBS bedeckt. Im Falle der Positivkontrolle wurden 50 µl Nuclease-Lösung hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden alle Wells erneut zweimalig mit PBS gewaschen mit Zwischenschritt einer Zentrifugation. Als nächstes erfolgte die Behandlung aller Wells mit frischer 3% Wasserstoffperoxid-Lösung für exakt 5 min bei RT vor erneutem Waschen mit PBS und Zentrifugation. In die leeren Wells wurden dann je 150 µl 1 x TdT Labeling Puffer gegeben, es folgte eine erneute Inkubation für 5 min bei RT und Zentrifugation sowie Absaugen der Lösung. Im nächsten Schritt wurden je Well 50 µl Labeling Reaction Mix appliziert (Im Falle der Unlabeled-Negativkontrolle ohne das TDT Enzym) und nachfolgend für 1 h bei 37°C inkubiert unter Lichtschutz. Zum Stoppen der Reaktion wurden nach der Inkubation je 150 ul Stop-Puffer zugefügt und für 5 min bei RT belassen, bevor eine erneute Zentrifugation und zweifaches Waschen mittels PBS und Zentrifugation erfolgten. Anschließend wurden je 50 µl Strep-HRP-Lösung zugegeben und erneut nach 10 min Inkubation bei RT abgesaugt vor 4fachem Waschen und Zentrifugation mit PBST. Abschließend wurden je 100 µl TACS-Sapphire zugefügt und die Absorption der Lösungen in den Wells bei einer Wellenlänge von 630 nm durch das Photospektrometer Infinite® M200 PRO minütlich kontrolliert. Nach Verlassen des linearen Anstiegs der Absorption nach ca. 30 min wurde in den Wells die Reaktion mittels Zugabe von 100 µl HCl 0,2 M gestoppt und abschließend die Messung der optischen Dichte bei 450 nm pro Well durchgeführt. Die Normalisierung der gemessenen Werte erfolgte durch die Zellzahlen der parallel in Zellkultur analog behandelten 96-Well-Platte, welche zeitgleich zum TUNEL-Assay mit unter 3.2 genannter Methodik ausgewertet wurde.

# 3.3.2 Objektivierung morphologischer Zellkernveränderungen mittels DAPI-Kernfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Um Apoptose-assoziierte Veränderungen der Kernmorphologie nachzuweisen, wurden Zellen nach Kultur unter Behandlung mit Enzalutamid oder der Kontrolle DMSO mit DAPI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. DAPI ist ein Farbstoff, welcher in der Doppelhelix-Struktur der DNA gleichmäßig interkaliert und somit Chromatin fluoreszenzmikroskopisch detektierbar macht. In der Zellkultur wurden in zuvor mit Poly-L-Lysin behandelten 6 cm<sup>2</sup>-Petrischalen zunächst je 200.000 Zellen (PC-3 und PC-3-AR) bzw. 400.000 Zellen (LNCaP) ausgesät und zunächst für 24 h inkubiert. Hiernach erfolgte die Therapie entsprechend mit Enzalutamid bzw. DMSO versetztem Medium für 24 h. Als Positivkontrolle zur Auslösung der Apoptose erfolgte parallel in weiteren Ansätzen die Behandlung mit Cycloheximid (bzw. dem Lösungsmittel EtOH) ebenso für 24 h. Nach der genannten Behandlung wurde das Medium vorsichtig entfernt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und danach mit frisch hergestellter 4% Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei RT fixiert. Nach Entfernen der Lösung und zweifachem Waschen mit PBS

erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mittels 0,2% Triton-Lösung in PBS für 10 min bei RT und hiernach erneutes Waschen mit PBS. Die anschließende DAPI-Färbung erfolgte mittels DAPI-Färbelösung für 30 min bei RT im Dunkeln. Abschließend folgte die erneute Entfernung der Lösung und zweifaches Waschen mit PBS. Zellen wurden hiernach mit Hilfe des Die gefärbten BZ-9000 Fluoreszenzmikroskops analysiert. Hierfür wurden zehn randomisierte Ausschnitte der gesamten Petrischale repräsentativ für 0,5% der Gesamtfläche bei Weißlicht sowie zur DAPI-Detektion (Absorptionsmaximum bei 360 nm, Emissionsmaximum bei 460 nm) fotografiert. Von jeder Petrischale wurden somit ca. 800-1200 Zellkerne erfasst. Die Auswertung der Bilder erfolgte anschließend mittels der BZ II Analyzer Software (Keyence) sowie des Hybrid Cell Count BZ-H2C Moduls, jeder einzelne der fotografierten Kerne wurde hierfür auf unterschiedliche morphologische Parameter untersucht. Um fragmentierte Kerne sowie Kern-Cluster in der Auswertung auszuschließen, wurden in der Analyse die jeweils größten und kleinsten 5% der Zellkerne von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

# 3.4 Biochemische Methoden

#### 3.4.1 Zellkultur und Protein-Isolierung zur Analyse

Für den semiquantitativen Proteinnachweis mittels Western Blot erfolgte zunächst die Zellkultur in 6-Well-Platten. Im Falle von LNCaP wurden 300.000 Zellen, für PC-3 und PC-3-AR je 150.000 Zellen pro Well appliziert. Nach 24 h Ruhephase zum Anwachsen analog den Wachstumskinetiken wurde das mit dem Wirkstoff bzw. der Kontrolle in entsprechender Konzentration versetzte Medium zugefügt. Nach Erreichen der gewählten Zeitpunkte zur Proteinanalyse erfolgte die Zellernte zunächst analog 3.2, nach Lösen mit Trypsin und zweimaligem Waschen des Wells mit PBS wurde die jeweilige Zellsuspension bei 5000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das resultierende Pellet sofort in Eis gekühlt, um den Zellstoffwechsel zu reduzieren. Die Pellets wurden hiernach in 40 µl frischen RIPA-Lysepuffer resuspendiert und die Suspension im Ultraschallgerät für 10 s lysiert. Die so gewonnen Zelllysate wurden hiernach bei -20°C gelagert.

#### 3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um im nachfolgenden Western Blot das Auftragen von Proben mit gleicher absoluter Proteinmenge zu ermöglichen, wurden die Proteinkonzentrationen der unter 3.3.1 gewonnenen Lysate mittels Bradford-Assay bestimmt. Hierfür wurden je 2 µl des jeweiligen Lysates mit 18 µl A.bidest gemeinsam mit 300 µl Bradford-Reagens in Doppelbestimmungen in eine 96-Well-Platte aufgetragen. Neben der zu analysierenden Proben wurde pro Versuch eine Eichreihe mittels definierter Verdünnungen des BSA-Standards aufgetragen und ebenso mit 300 µl Reagens kombiniert (siehe Anhangstabelle 2). Die so vorbereiteten Proben wurden für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mittels Tecan reader die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen die Referenzwellenlänge 360 nm bestimmt. Die aus der Eichreihe über Anwendung in Excel erstellte Eichkurve diente über die Steigung zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten.

# 3.4.3 Größenauftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um eine Protein-Größenauftrennung der aus den Zellkulturen gewonnenen Lysate zu erreichen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Hierfür wurden die Proben in Volumen entsprechend den zuvor errechneten Proteinkonzentrationen bemessen und im Verhältnis 1:5 mit 5x Proteinladepuffer gemischt (Gesamtvolumen 15-25 µl). Hiernach erfolgte die Denaturierung über Erhitzen auf 95°C für 5 min und abschließend vor Applikation Lagerung auf Eis. Die in der SDS-PAGE benutzten Gele wurden zweizeitig erstellt (siehe Anhangstabelle 3). Initial erfolgte das Gießen des Trenngels und nach ausreichender Polymerisierung die Zugabe des Sammelgels unter Anwendung des Probenkamms. Zur Gelelektrophorese wurden die in den Glasvorrichtungen eingespannten Gele in die Elektrophorese-Systeme eingebracht und mit kaltem Laufpuffer befüllt. Hiernach erfolgte die Probenapplikation in den Taschen des Sammelgels neben 4µl Größenstandard (Page Ruler Prestained Protein Ladder). Anschließend erfolgte die Elektrophorese zunächst unter einer Spannung von 80 V für 15 min, bis die Proben zuverlässig ins Sammelgel übergegangen waren. Hiernach wurde die Größenauftrennung für ca. 1,5 h bei 130 V unter wiederholter Kontrolle der Lauffront durchgeführt.

#### 3.4.4 Western Blot

Zur Übertragung der per SDS-PAGE größenaufgetrennten Proteine der Zelllysate wurde im nächsten Schritt das Western Blotting (WB) durchgeführt. Hierfür wurde ein Sandwich aus in Transferpuffer getränkten Filterpapieren, einer Nitrozellulose-Membran, dem Trenngel und einer erneuten 4fachen Schicht von feuchten Filterpapieren auf dem WB-Gerät aufgebaut. Nachfolgend wurden die Proteine mit einer Stromstärke von 60 mA je Blot für eine Stunde auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Um den erfolgreichen Transfer optisch zu sichern erfolgte nach dem WB eine kurze Färbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung auf der mechanischen Wippe und hiernach das zweimalige Spülen mit A.bidest sowie einmalig mit TBST. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde die Membran danach für mindestens 1 h in 5 ml Roti-Block bei 4°C invertiert und abschließend mit TBST erneut gewaschen

#### 3.4.5 Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörper

Für den abschließenden Schritt, die Detektion gesuchter Proteine durch Anwendung spezifischer Antikörper (AK), wurden die durch das WB-Verfahren gewonnenen Membranen über Nacht bei 4°C in der mit dem Primärantikörper versetzten AK-Lösung invertiert. Die optimalen Konzentrationen basierten hierbei auf den für die AK jeweils experimentell eruierten Werten (siehe 3.1.4). Nach der Behandlung mit dem Primärantikörper wurde die Membran per Invertieren dreimal mit TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Anwendung des auf den Primärantikörpers passenden, mit Meerrettich-Peroxidase-getaggtem Sekundärantikörper. So wurden beispielsweise aus der Maus isolierte Primärantikörper im zweiten Schritt mit anti-mouse, HRP-linked Sekundär-AK inkubiert. Die Sekundär-AK wurden hierfür jeweils in Verdünnung 1:5000 in Roti-Block für 1 h bei 4°C invertiert, wonach ein erneutes dreifaches Waschen der Membranen in TBST für je 5 min durchgeführt wurde.

Hiernach wurden die Membranen mit 300 µl frisch angesetzter Supersignal-Lösung West Dura für 3 min inkubiert. Die so behandelten Membranen wurden danach sofort im ChemiDoc-System auf Lumineszenz detektiert, die Belichtungszeiten variierten hierbei spezifisch für die verwendeten Primär-AK zwischen 10 und 120 s. Zur Auswertung erfolgte die semiquantitative Analyse mittels der Image Lab Software 3.0.

# 3.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der in den Versuchsreihen gewonnenen Daten wurde Excel 2017 verwendet, die Erstellung der Graphen und Diagramme wurde mittels Excel und PowerPoint 2017 durchgeführt. Die präsentierten Daten stellen dabei Mittelwerte der Versuchsreihen bzw. repräsentative Werte dar mit der dazugehörigen Standardabweichung (StAbw). Sofern nicht anders angegeben wurden mindestens drei unabhängige Versuche der Experimente durchgeführt und ausgewertet. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde der ungepaarte Student's T-Test verwendet, die Signifikanz wurde hierbei wie folgt definiert:  $p \le 0,05$  (\*),  $p \le 0,01$  (\*\*) sowie  $p \le 0,001$ (\*\*\*).

## 4. Ergebnisse

# 4.1 Optimierung des Zellkultur-Modellsystems von PCa- Zellen im 24-Well-Maßstab

Um für nachfolgende Inkubationsversuche mit den drei PCa-Zelllinien bei Enzalutamidbehandlung ein geeignetes Modell zu etablieren, wurden über einen Verlauf von 5 Tagen Zellkulturen mit unterschiedlicher ausgesäter Startzellzahl ausgewertet. Für jede Zelllinie wurden dabei 4 unterschiedliche Startzellzahlen benutzt. Hierbei wurde berücksichtigt, dass die LNCaP-Zellen, wie aus früheren Laborerfahrungen bekannt, zum optimalen Wachstum eine etwas dichtere Zellaussaat benötigt.





Abbildung 4. Wachstumskinetik im 24-Well-Modell von LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen bei unterschiedlichen Startzellzahlen über 120 h

Die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten werden in den Kinetiken als Mittelwert ± StAbw der absoluten Zellzahlen dargestellt. Für anschließende Kinetiken wurden als Startpunkt für LNCaP 30000, für PC3 und PC3-AR je 10000 Zellen gewählt.

LNCaP-Zellen zeigten für die Startzellzahlen von 20000, 30000 und 50000 im Verlauf über 120 h eine beinahe logarithmische Wachstumskinetik (Abb. 4 A), wohingegen die Aussaat von 10000 Zellen im Wachstum eindeutig zurückblieb. Für die Zelllinien PC3 und PC3-AR (Abb. 4 B+ C) zeigte sich bei allen ausgesäten Zellzahlen von 1000, 3000, 5000, und 10000 Zellen jeweils ein nahezu logarithmischer Verlauf des Zellwachstums.

Für anschließende Inkubationsversuche mit Enzalutamid wurden für die LNCaP-Zellen eine Startzellzahl von 30000, für PC3 und PC3-AR jeweils 10000 ausgewählt.

# 4.2 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) von Enzalutamid durch Wachstumskinetiken in PCa- Zellen

In diesem Versuch wurde die IC<sub>50</sub> von Enzalutamid für die drei PCa-Zelllinien bestimmt. Die IC<sub>50</sub> gibt den Konzentrationswert des benutzten Chemotherapeutikums an, bei dem sich ein halbmaximales Wachstum der Zellen im Vergleich zur Kontrolle zeigt und somit die Untersuchung der Effekte von Enzalutamid möglich macht. Sie steht für die Wirkstärke einer Substanz in einem definierten System [70].

Um die IC<sub>50</sub> der drei PCa- Zelllinien zu bestimmen, wurden die in 4.1 ermittelten Startzellzahlen der jeweiligen Zelllinie ausgesät, nach 24 h mit je DMSO als Kontrolle oder entsprechender Versuchskonzentration von Enzalutamid behandelt und alle 24 h geerntet und gezählt.

Dabei zeigte sich für LNCaP Zellen eine gute Näherung der  $IC_{50}$  bei einer Behandlung mit 10µM Enzalutamid (Abb. 5 A). Die antiproliferative Wirkung von Enzalutamid war unter der Testkonzentration von 1 µM deutlich zu schwach, wohingegen bei 30 µM zu wenige Zellen gezählt wurden (Abb. 2 B).

Im Falle der PCa-Zelllinie PC3 konnte eine experimentelle  $IC_{50}$  von 30 µM ermittelt werden (Abb. 5 C). Hier zeigten die anderen Versuchskonzentrationen von 10 µM und 100 µM einen jeweils zu schwachen bzw. zu starken antiproliferativen Effekt (Abb. 5 D). Das gleiche Bild wie für PC3-Zellen ergab sich bei der experimentellen  $IC_{50}$ -Bestimmung von Enzalutamid für die PC3-AR-Zelllinie, welche ebenso bei 30 µM lag (Abb. 5 E+F).


### Abbildung 5. Bestimmung der IC<sub>50</sub> von Enzalutamid für LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen im 24-Well-Maßstab über 120 h

Die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten wurden dargestellt als Mittelwert  $\pm$ StAbw der absoluten gemessenen Zellzahl (A+C+E). Dieselben Ergebnisse zusätzlich der zu hohen bzw. niedrigen Enzalutamidkonzentrationen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden als Mittelwert  $\pm$  StAbw der relativen Expression dargestellt und auf die Kontrolle (Ko=1,0) normiert (B+D+F). Alle Ergebnisse sind mit Hilfe des Studentschen t-Tests ausgewertet worden mit p≤0,05 (\*), p≤0,01 (\*\*) und p≤0,001 (\*\*\*).

Somit zeigte Enzalutamid nicht nur einen antiproliferativen Effekt bei der Anwendung auf AR-positiven LNCaP-Zellen (Abb. 2 A+B), sondern auch bei AR-negativen PC3-(Abb. 2 C+D) und PC3-AR (Abb. 2 E+F). Dieses Ergebnis deutete für das Chemotherapeutikum Enzalutamid, neben der Blockade des AR, noch weitere ARunabhängige Wirkungen an.

Für die weiteren Experimente wurden daher die Behandlungs-Konzentrationen von Enzalutamid auf 10 µM für LNCaP und je 30 µM für PC3 und PC3-AR festgelegt.

### 4.3 Nachweis der Enzalutamid-induzierten apoptotischen Nukleinsäurefragmentierung in PCa-Zellen durch TUNEL Assay

Nach dem initialen Ergebnis aus 4.2, welches auf eine auch AR-unabhängige Wirkung von Enzalutamid hindeutete, wurde nachfolgend per TUNEL Assay die Wachstumsinhibition in den drei PCa-Zelllinien weiter untersucht. Enzalutamid ist als Induktor von Apoptose in AR-positiven PCa-Zellen bekannt [71]. Diesen möglichen Mechanismus der Wachstumsinhibition auch in den AR-negativen PC3-zellen nachzuweisen war Ziel der nachfolgenden Experimente.

Die Behandlung der Zellen mit Enzalutamid zeigte im TUNEL Assay für LNCaP Zellen eine signifikante Erhöhung der Chromatinfragmentierung nach 24 h und 48 h im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Dabei war der Effekt nach Inkubation für 24 h stärker ausgeprägt mit p=0,0017 (Abb. 6A).

Auch bei der AR-negativen Zelllinie PC3 konnte ein signifikanter Anstieg des TUNEL Signals für 24 h (p=0,0408) und 48 h (p=0,0315) nachgewiesen werden (Abb. 6 B). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Untersuchung von PC3-AR im genannten System (24 h: 1,5±0,1-fach, p=0,0018; 48 h: 1,4±0,1-fach, p=0,013) (Abb. 6 C).



Abbildung 6. Nachweis der Chromatinfragmentierung durch Enzalutamid in LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen im TUNEL Assay nach 24 h und 48 h

Die Ergebnisse von mindestens 3 unabhängigen Experimenten mit LNCaP(A), PC-3(B) und PC-3-AR (C) als Mittelwert  $\pm$ StAbw der relativen Intensität der Fluoreszenz normiert zur DMSO-Kontrolle (Ko=1,0). Alle Ergebnisse sind mit Hilfe des Studentschen t-Tests ausgewertet worden mit p≤0,05 (\*), p≤0,01 (\*\*) und p≤0,001 (\*\*\*). (Enzal = Enzalutamid; UL Kontr = Unlabeled Kontrolle; Nucl Kontr = Nuclease Kontrolle)

# 4.4 Nachweis apoptotischer Änderungen der Kernmorphologie von PCa-in Anwesenheit von Enzalutamid und Cycloheximid

In Bildern wie den hier für LNCaP- und PC3-Zellen beispielhaft gezeigten wurden die Veränderungen in der zellulären Kernmorphologie nach unterschiedlichen Behandlungen nachgewiesen. Im Rahmen der Apoptose findet durch die Kondensierung und Fragmentierung des nukleären Chromatins eine Verkleinerung des Zellkerns statt, gefolgt von einer Kernfragmentierung als Teil der Abbauprozesse [59,72]. Vergleichend zur Wirkung von Enzalutamid wurde hier der experimentell bewährte und vom AR unabhängige Apoptose-Induktor Cycloheximid genutzt. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder nach DAPI-Färbung wurden im Folgenden hinsichtlich verschiedener Parameter ausgewertet (s. Abschnitte 4.4.1 und 4.4.2).

Sowohl LNCaP- als auch PC3-Zellen zeigten für die Enzalutamid- und die CHX-Behandlung spezifische Apoptose-assoziierte Veränderungen der Kernmorphologie im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbehandlung (Abb. 7 A+B). Diese umfassen die in 4.4.1 und 4.4.2 ausgewerteten Parameter der verringerten nukleären Fläche und des Umfangs als auch die durch die Kondensierung bedingte gesteigerte Signalstärke/Helligkeit (Abb. 7 A+B). Im Bild der mit CHX behandelten LNCaP-Zellen zeigt sich zudem eine deutliche Kernfragmentierung (Abb. 7 A).

(PC3-AR Bilder aufgrund großer Ähnlichkeit zu den Aufnahmen der PC3-Zellen hier aufgrund der exemplarischen Bilddarstellung nicht gesondert gezeigt.)



# Abbildung 7. Fluoreszenzmikroskopische Analyse DAPI-gefärbter PCa-Zellen LNCaP und PC3 nach 24 h Behandlung mit CHX oder Enzalutamid.

Die gezeigten Bilder repräsentieren jeweils einen ausgesuchten Bereich einer Aufnahme von mehreren Dutzend Zellkernen, um Veränderungen der Kernmorphologie darzustellen (A+B). Die korrespondierenden Paare von Behandlung mit Chemotherapeutikum und der jeweiligen Kontrolle wurden bei gleichbleibenden Einstellungen des Mikroskops und einer 400fachen Vergrößerung aufgenommen. (EtOH=Ethanol; CHX=Cycloheximid; Enzal=Enzalutamid)

#### 4.4.1 Sinkende Kernflächen in PCa-Zellen in Anwesenheit von Enzalutamid

Im Rahmen der apoptotischen Degradation der Zelle nimmt die Größe des Zellkerns ab; durch die Kondensierung des Chromatins erscheinen die Zellkerne in der mikroskopischen Analyse klein, die Fläche der Kerne in der Aufsicht nimmt ab.

Wie die in 4.4 gezeigten mikroskopischen Bilder der für 24 h inkubierten Zellen wurden die Ausschnitte hinsichtlich ihrer Kernfläche jedes einzelnen Kerns mittels der BZ II Analyzer Software (Keyence) sowie des Hybrid Cell Count BZ-H2C Moduls ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Histogrammen mit ihrer jeweiligen Kontrolle zum Vergleich dargestellt. Gezeigt sind die korrespondierenden Wirkstoffe und Lösungsmittel Enzalutamid-DMSO und Cycloheximid-Ethanol in überlappenden Histogrammen. Die Darstellung zeigt die Verteilung der Kernflächen.

So zeigte sich für LNCaP Zellen für beide Chemotherapeutika eine sichtbare Verschiebung der Flächenverteilung; dabei traten unter Inkubation mit dem Wirkstoff insgesamt kleinere Kernflächen auf (Abb. 8 A+B). Dasselbe ließ sich auch für die Vergleichshistogramme der PC3 und PC3-AR-Zelllinien zeigen, wobei der Effekt vor allem im unteren Größenbereich zu sehen ist; im oberen Bereich der Kernflächen ist diese Differenz weniger ausgeprägt (Abb. 8 C-F). Im Gesamtbild zeigte sich für die Flächenverteilung aller untersuchten PCa-Zelllinien eine Verschiebung der mit Chemotherapeutika behandelten Zellen und deren Kerngrößen hin zum kleineren Spektrum.



# Abbildung 8. Vergleichende Darstellung der Verteilung der Zellkerngrößen mit und ohne Chemotherapeutika der LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen nach 24 h

Die Ergebnisse entstammen der Auswertung von je ca. 800-1200 Zellen, welche in der Fluoreszenzmikroskopie fotografiert und anschließend digital ausgewertet wurden. Sie entsprechen jeweils ca. 0,5% der Gesamtfläche der für die Zellkultur verwendeten 6cm<sup>2</sup>-Petrischalen. Bei der Auswertung wurden zur Eliminierung statistischer Ausreißer in jeder Reihe die größten und kleinsten 5% der gemessenen Zellkerne ausgelassen. Die Säulen für Chemotherapeutikum und Kontrolle sind jeweils als relativer Anteil nebeneinander angeordnet, die jeweiligen dazugehörigen Trendlinien zur besseren Vergleichbarkeit eingefügt. (EtOH=Ethanol; CHX=Cycloheximid; Enzal=Enzalutamid)

# 4.4.2 Effekt der Chemotherapeutikabehandlung auf verschiedene Parameter der Kernmorphologie

Neben der bereits beschriebenen Reduzierung Kernfläche der durch Chromatinkondensation lassen sich auch andere fluoreszenzmikroskopisch erfassbare nukleäre Parameter detektieren [72]. Diese umfassen auch den Kernumfang und die per Integral durch die Signalintensität errechnete Gesamthelligkeit des Kerns, welche neben der Fläche aus den in 4.4.1. verwendeten Bildern ermittelt wurden.

In den AR-positiven LNCaP Zellen zeigte sich nach 24 h sowohl für die Behandlung mit der Apoptose-Kontrolle CHX als auch mit Enzalutamid in den Messparametern Kernfläche und -Umfang eine signifikante Reduktion der Messwerte mit jeweils  $p \le 0,001$  (Abb. 9 A+B). Im Falle des Messparameters Helligkeit/Kern zeigten die behandelten LNCaP Zellen jedoch eine signifikante Steigerung mit  $p \le 0,001$  (Abb. 9 C). Auch in den AR-negativen PC3 Zellen ließ sich eine deutliche Agens-abhängige Reduktion in Kernfläche und Umfang nachweisen (Abb. 9 D+E), gekoppelt mit einer damit einhergehenden Erhöhung der durchschnittlichen Kernhelligkeit je mit  $p \le 0,001$  (Abb. 9 F). Die gleichen Beobachtungen wie für die ersten beiden Zelllinien konnten zudem in den ebenso für 24 h behandelten gentechnisch modifizierten PC3-AR Zellen gemacht werden mit signifikanten Änderungen aller drei Parameter mit  $p \le 0,001$  (Abb. 9 G-I).



### Abbildung 9. Quantifizierung der Kernmorphologie-Parameter Fläche, Umfang und Helligkeit von CHX- und Enzalutamid behandelten LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen nach 24 h

Die Ergebnisse von ca. 800-1200 ausgewerteten Zellen je Versuchsansatz wurden als Mittelwert ±StAbw der absoluten Werte dargestellt, wobei je die Differenz zwischen korrelierendem Agens und Kontrolle auf statistische Signifikanz geprüft wurde. Dabei wurden für die drei Zellreihen die durchschnittliche Kernfläche in  $\mu$ m<sup>2</sup> (A+D+G), der Kernumfang in  $\mu$ m (B+E+H) und die Gesamthelligkeit je Zelle als Integral der Intensität in AU (C+F+I) angegeben. Alle Ergebnisse sind mit Hilfe des Studentschen t-Tests ausgewertet worden mit  $p\leq 0,05$  (\*),  $p\leq 0,01$  (\*\*) und  $p\leq 0,001$  (\*\*\*). (EtOH=Ethanol; CHX=Cycloheximid; Enzal=Enzalutamid; AU=Arbitrary Units)

### 4.5 Analyse der Expression der Apoptose-assoziierten Proteine p53 und Pp53 in LNCaP Zellen unter Enzalutamid-Behandlung

Das Apoptose-assoziierte Protein p53 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus und der sog. "Wächter des Genoms". Bei Akkumulation und Aktivierung durch Phosphorylierung löst es unter anderem die für die Apoptose entscheidende Kaskade über Gene der Bcl-2 Familie aus [62]. Es sollte nun also der Effekt von Enzalutamid auf die Expression von p53 und seiner aktivierten Form P-p53 in PCa-Zelllinien bestimmt werden. Aufgrund von Mutationen sind die Zelllinien PC3 und folglich PC3-AR jedoch p53-negativ [73], weshalb der Nachweis nur in LNCaP Zellen stattfand.

Dabei zeigte sich eine durchgehend statistisch signifikante Erhöhung der Expression von p53 (Abb. 10 A+B) nach 4, 10 und auch 24 h in LNCaP Zellen bei Inkubation mit Enzalutamid (4 h p $\leq$ 0,05; 10 h und 24 h p $\leq$ 0,01).

Die aktivierte Version des p53 Proteins, P-p53, (Abb. 10 C+D) hingegen zeigte keinen signifikanten Anstieg in den Zellen nach 4 h, aber nach Ablauf von je 10 h/24 h mit je p≤0,05. Somit zeigte sich für beide untersuchte Proteine eine Steigerung der Expression in LNCaP Zellen nach entsprechender Inkubationsdauer.

#### Ergebnisse



### Abbildung 10. Western Blot Analyse von p53 und P-p53 in LNCaP Zellen nach Enzalutamid-Inkubation für 4, 10 und 24 h

Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert ±StAbw der relativen Expression (A+C). Sowohl Behandlung als auch Kontrolle wurden zunächst gegen die interne Kontrolle GAPDH relativiert und die Behandlung danach auf die Kontrolle normiert (Ko=1,0) mit p≤0,05 (\*), p≤0,01 (\*\*) und p≤0,001 (\*\*\*). Gezeigt ist jeweils ein für drei unabhängige Experimente repräsentativer Blot als auch das jeweilige Schema der Probenauftragung und die Dauer der Inkubation (B+D).

# 4.6 Analyse der Expression des Apoptose-Proteins Bax in LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen unter Enzalutamid-Behandlung

Nachdem die Inkubation mit Enzalutamid in LNCaP Zellen zur Induktion von p53 und P-p53 geführt hatte, wurde der Effekt des Chemotherapeutikums auf die Expression des Proteins Bax in allen drei involvierten PCa-Zelllinien untersucht. Bax als proapoptotisches Protein wird durch das aktivierte p53 induziert und destabilisiert durch mehrere mögliche Mechanismen unter anderem die Membranintegrität der Mitochondrien, wodurch die weitere Apoptosekaskade in Gang gesetzt wird [62].

Die AR-positiven PCa-Zellen LNCaP zeigten unter Inkubation mit Enzalutamid eine mit der Zeit zunehmende gesteigerte Expression des Bax Proteins (Abb. 11 A+B). Diese fiel sowohl für die Untersuchung nach 4 als auch nach 10 h statistisch signifikant aus mit p≤0,05, nach 24 h mit p≤0,001 (Abb. 11 A). Der Effekt war also über den Verlauf der Zeit zunehmend.

Auch in PC3 Zellen konnte eine Steigerung der Expression beobachtet werden nach Inkubation für alle drei gemessenen Zeitpunkte (Abb. 11 C+D). Für die Inkubation von 4 und 10 h zeigte sich diese Erhöhung des zellulären Proteins statistisch signifikant mit p≤0,01, nach 24 h mit p≤0,05 (Abb. 11 C). Dies bildete eine Steigerung des Effektes in den ersten Stunden der Inkubation ab und eine geminderte, aber dennoch vorhandene Sichtbarkeit einer Erhöhung nach 24 h.

In den zusätzlich untersuchten PC-3-AR Zellen zeigte sich auch eine grundsätzliche Expressionselevation des besagten Proteins zu allen drei gemessenen Zeitpunkten auf einer stabilen Ebene mit je p≤0,05 (Abb. 11 E+F). Somit war in dieser Zelllinie eine konstante Erhöhung von Bax messbar.

#### Ergebnisse













# Abbildung 11. Western Blot Analyse von Bax in LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen nach Enzalutamid-Inkubation für 4, 10 und 24 h

Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert ±StAbw der relativen Expression (A+C+E). Sowohl Behandlung als auch Kontrolle wurden zunächst gegen die interne Kontrolle GAPDH relativiert und die Behandlung danach auf die Kontrolle normiert (Ko=1,0) mit p≤0,05 (\*), p≤0,01 (\*\*) und p≤0,001 (\*\*\*). Gezeigt ist jeweils ein für drei unabhängige Experimente repräsentativer Blot als auch das jeweilige Schema der Probenauftragung und die Dauer der Inkubation (B+D+F).

# 4.7 Analyse der Expression des Apoptose-Proteins Bcl-2 in LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen unter Enzalutamid-Behandlung

Nach der vorangegangenen Bestimmung des Proteins Bax in den mit Enzalutamid inkubierten PCa-Zellen wurde die Änderung der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 durch das Agens untersucht. Bcl-2 ist der Prototyp der gesamten Proteinfamilie, die in der Apoptose-Regulation involviert sind und zu der auch das zuvor untersuchte Bax Protein gehört. Dabei erfüllt Bcl-2 eine Bax entgegengesetzte Wirkung indem es die Integrität der mitochondrialen Membran stärkt und so die Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol verhindert [62].

Bei der Untersuchung des Effekts von Enzalutamid auf die Bcl-2 Expression der LNCaP Zellen zeigte sich eine Reduktion für alle drei Zeitpunkte der Inkubation (Abb. 12 A+B). Diese war statistisch signifikant mit p≤0,01 bei 4 und 24 h und mit p≤0,05 bei 10 h. Auch bei der Behandlung der PC3 Zellen (Abb. 12 C+D) ergab sich ein solches Bild mit einer erniedrigten Bcl-2-Expression zu allen drei Zeitpunkten (4 h und 10 h p≤0,05; 24 h p≤0,01). Dieser Trend konnte auch in der zuletzt untersuchten PC3-AR Zelllinie beobachtet werden (Abb. 12 E+F). Auch hier war der Spiegel des nachweisbaren Proteins im Verlauf konstant reduziert (4 h und 24 h p≤0,05; 10 h p≤0,01).

Zusammenfassend ergab die Untersuchung also in den drei untersuchten PCa-Zelllinien jeweils eine relevante Reduktion des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2, wohingegen das Niveau des zuvor in 4.6 untersuchten pro-apoptotischen Proteins Bax nach Inkubation mit Enzalutamid stets erhöht war.



Enzalutamid

0.

4

10

Inkubation [h]

### Abbildung 12. Western Blot Analyse von Bcl-2 in LNCaP, PC3 und PC3-AR Zellen nach Enzalutamid-Inkubation für 4, 10 und 24 h

Dargestellt sind die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert ±StAbw der relativen Expression (A+C+E). Sowohl Behandlung als auch Kontrolle wurden zunächst gegen die interne Kontrolle GAPDH relativiert und die Behandlung danach auf die Kontrolle normiert (Ko=1,0) mit p≤0,05 (\*), p≤0,01 (\*\*) und p≤0,001 (\*\*\*). Gezeigt ist jeweils ein für drei unabhängige Experimente repräsentativer Blot als auch das jeweilige Schema der Probenauftragung und die Dauer der Inkubation (B+D+F).

#### 5. Diskussion

Neben den initial verfügbaren kurativen Ansätzen mittels radikaler Operation oder Radiatio stand bei Progress des PCa bis vor wenigen Jahren hauptsächlich die medikamentöse Kastration mittels klassischer Antiandrogene im Vordergrund. Hierunter zeigt der Krebs nach initialem Rückgang jedoch meist nach mehreren Monaten bis Jahren einen erneuten Progress, er wird zum CRPC [31]. In den letzten gut zehn Jahren hat sich das Feld therapeutischer Optionen beim CRPC jedoch revolutioniert. Neben der Anwendung klassischer Cytostatika wie Docetaxel oder Cabazitaxel finden auch neue Wirkstoffe Anwendung, die mit höherer Effizienz die AR behindern. Funktion des Zusätzlich zu Abirateron. welches den Testosteronspiegel effektiv durch CYP-17-Inhibition senkt, wurden neuartige Antiandrogene entwickelt. Zu diesen gehören neben Darolutamid und Apalutamid auch das in dieser Arbeit untersuchte Enzalutamid [29]. Das Medikament ist auf dem europäischen Markt sowohl für die Therapie des nichtmetastasierten als auch des metastasierten CRPC zugelassen. Sein Wirkmechanismus beruht auf einer laut Herstellerangaben im Vergleich zu klassischen Antiandrogenen überlegenen Affinität zum AR, welche eine Bindung von Testosteron sowie die nachgeschaltete Signalkaskade effektiv behindert [41]. Letztlich löst Enzalutamid durch Entzug des Wachstumsstimulus in den Krebszellen Apoptose aus und erreicht hierdurch u.a. die signifikante Verbesserung des medianen Überlebens [71].

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirkung von Enzalutamid in Prostatakrebszellen mit unterschiedlichem Status der AR-Expression sowie der möglicherweise folgenden Apoptose. Hierbei konnte initial eine Inhibition des Wachstums in allen drei untersuchten Zelllinien nach Behandlung mit Enzalutamid nachgewiesen werden. Es ergab sich für die Zelllinien PC-3- und PC-3-AR eine höhere IC<sub>50</sub> für Enzalutamid als bei LNCaP (30 µM vs. 10 µM). Generell zeigten in der Vergangenheit auch andere nicht auf den AR abzielende Wirkstoffe wie Etoposid, Paclitaxel oder Vinblastin eine im Schnitt ca. 3fach höhere IC<sub>50</sub> in der Anwendung bei PC-3 verglichen zu LNCaP [74]. Dies ist neben des AR-Status auch durch den unterschiedlichen Progressionsstatus des PCa erklärbar, welcher durch die Zelllinien repräsentiert wird. Während LNCaP eine hormon-sensitive und AR-positive Variante darstellt, muss PC-3 als hormon-insensitive (AR-negativ), entdifferenzierte Form des PCa betrachtet werden [66,67]. Hierdurch ist mit PC-3

eine im Vergleich deutlich robustere Form der PCa-Zellen in Hinblick auf Wachstumsverhalten und Reaktion auf externe Noxen untersucht worden. Vergleichbare Studien der Anwendung von Enzalutamid auf AR-negativen PC-3-Zellen sind bisher kaum vorhanden. So konnte in einer Arbeit die IC<sub>50</sub> von 10 μM Enzalutamid bei LNCaP bestätigt werden, unter derselben Konzentration zeigte sich bei PC-3 jedoch keine ausreichende Wirkung [75]. Dies bestätigt die hier vorliegenden Ergebnisse. In einer weiteren Studie wurde eine IC<sub>50</sub> von 25 μM für Enzalutamid bei 22Rv1-Zellen ermittelt; 22Rv1 Zellen stellen genauso wie PC-3 eine hormon-insensitive Form dar, sind dabei jedoch AR-positiv, was die Resultate nur bedingt übertragbar macht [76]. Interessanterweise konnte auch für Abirateron eine wachstumsinhibierende Wirkung auf PC-3 trotz AR-negativem Status nachgewiesen werden. Die hierbei ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentrationen des Wirkstoffs waren für LNCaP und PC-3 deckungsgleich mit den gezeigten Werten für Enzalutamid [77,78].

Neben der generell fortgeschrittenen Entdifferenzierung von PC-3 steht jedoch insbesondere der AR-Status der Zelllinie im Vordergrund. So reagiert folgerichtig nur LNCaP auf externe Zugabe von Testosteron mit einem Anstieg der Proliferation, PC-3 nicht [79]. Weiterhin hat sich in einer Untersuchung der Zellkulturmethoden für die auch in dieser Arbeit verwendeten Medien unter Zugabe von 10% FCS ein Testosteronspiegel signifikant unter dem physiologischer Spiegel im Körper gezeigt [80]. Somit ist von einer Kultur der Zellen unter kastrationsähnlichen Umständen auszugehen. Ein möglicher Grund für die trotz niedriger Testosteronkonzentrationen erfolgreiche Zellkultur von LNCaP scheint zumindest teilweise in einer Punktmutation des AR-Gens begründet zu sein, welche eine weniger selektive Bindung auch von Östrogenen und Progesteron ermöglicht [81]. Vor dem genannten Hintergrund erscheint die beobachtete Wachstumsinhibition durch Enzalutamid in LNCaP in Übereinstimmung mit der gängigen Literatur. Im Vergleich zu LNCaP ist in PC-3 das AR-Gen zwar in physiologischer Form vorhanden, das Protein wird jedoch nicht exprimiert [69,79]. Weiterhin ist die Proliferation von PC-3 nicht mit AR-assoziierten Mechanismen verbunden und somit DHT-unabhängig, die Zellen exprimieren zudem ein anderes Set an potentiell AR-co-regulatorischen Proteinen als LNCaP [79,82]. Somit ist die beobachtete Wirkung von Enzalutamid auf PC-3 nicht durch den ursprünglichen Wirkmechanismus per AR-Blockade erklärlich.

Bezüglich der für PC-3-AR ermittelten und mit PC-3 deckungsgleichen IC<sub>50</sub> sowie damit verbundenen Wachstumsinhibition der Zellen ist eine differenziertere

Betrachtung vonnöten. So konnte bereits gezeigt werden, dass der in PC-3-AR durch Transfektion eingebrachte AR an die DNA bindet und nachgeschaltete Genexpression bewirkt [69]. Beispielsweise zeigte PC-3-AR unter DHT-Behandlung die Expression von PSA, einem Signalprotein für die AR-vermittelte Genexpression: ein ähnlicher Effekt blieb bei AR-negativen PC-3 aus [83]. Weiterhin ergab die Untersuchung des Metabolismus nach Transfektion mit dem AR den Nachweis typischer sowie atypischer Androgen-assoziierter Reaktionen der Zellen [84]. Die Zugabe von DHT während der Zellkultur von PC-3-AR zeigte widersprüchliche Ergebnisse. Während frühe Arbeiten von einer durch Transfektion des AR entstandenen DHT-Abhängigkeit der Zellen und einem durch Zugabe des Hormons bedingten Proliferationsschub berichten, zeigen neuere Studien ein adverses Verhalten [69,85]. In Zusammenschau bleibt der genaue Einfluss des transfizierten AR auf den Stoffwechsel und insbesondere den androgenabhängigen Signalweg unklar; Rolle AR von einer untergeordneten des unter normalen Wachstumsbedingungen in den Zellen ist jedoch auszugehen. Es ist also anzunehmen, dass der im Rahmen der Arbeit beobachtete wachstumsinhibierende Effekt von Enzalutamid auf PC-3-AR-Zellen weniger auf die Blockade des AR, sondern wahrscheinlicher auf unbekannte Mechanismen ähnlich bzw. gleich derer in PC-3 zurückzuführen ist. Vor diesem Hintergrund scheint die ermittelte wertgleiche IC<sub>50</sub> für PC-3 und PC-3-AR nachvollziehbar.

Neben der bloßen Wachstumsinhibition konnten in der Arbeit für die ermittelten IC50-Werte in allen drei Zelllinien deutliche Hinweise auf die Auslösung der Apoptose unter Behandlung mit Enzalutamid gefunden werden. Der TUNEL-Assay stellt hierbei ein gängiges Nachweismittel dar und beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis der Apoptose-assoziierten Chromatinfragmentierung [86]. Für die untersuchten Zeitpunkte zeigte sich ein jeweils schwächerer, jedoch weiterhin signifikanter Effekt des Medikaments nach 48 h, so dass in zukünftigen Untersuchungen gegebenenfalls neben 24 h ein noch früherer Zeitpunkt untersucht werden sollte, um mögliche frühere und gegebenenfalls sogar stärkere apoptotische Chromatinfragmentierung zu erfassen. In einer weiteren Versuchsreihe wurden mögliche Apoptose-assoziierte Veränderungen der Kernmorphologie unter Inkubation mit Enzalutamid fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Im Rahmen der Apoptose kommt es durch die Abbauprozesse neben der Fragmentierung des Chromatins gezielten zur Kondensierung und damit einhergehend Schrumpfung des Zellkerns, bevor dieser in

multiple Kompartimente fragmentiert wird [59,60]. Neben der Kernfläche stellen auch Kernumfang sowie Helligkeit der analysierten Kerne etablierte Parameter zum Nachweis apoptotischer Vorgänge in den Zellen dar [72,87]. Für den gewählten Zeitpunkt von 24 h nach Zugabe von Enzalutamid ergab sich für alle drei untersuchten Zelllinien sowohl subjektiv, anhand der fluoreszenzmikroskopischen Bilder, als auch objektiv nach entsprechender Bildanalyse ein signifikanter Effekt auf die Kernmorphologie (Kernfläche, Kernumfang und Helligkeit). Ein ähnlicher Effekt auf die Zellreihen LNCaP und PC-3 konnte bereits für die Behandlung mit kaltem atmosphärischen Plasma belegt werden [88]. Die bei der Methode hohe Zahl an untersuchten Zellkernen von 800-1200 pro Ansatz sorgt dabei für eine gute statistische Aussagekraft; der während der Analyse gewählte Ansatz, die größten sowie kleinsten 5% der ausgemessenen Kerne auszuschließen, um Kernfragmente und Zellhaufen nicht zu erfassen, könnte jedoch bei weiteren Experimenten verfeinert werden. Zudem sind weitere Parameter bekannt, die den apoptotischen Vorgang dokumentieren, z.B. abnehmende Rundheit des Zellkerns oder Veränderung des maximalen und minimalen Durchmessers [89]. Die Beurteilung derselben könnte in zukünftigen Experimenten die Aussagekraft weiter verstärken. Weiterhin ist analog zu der Untersuchung mittels TUNEL-Assay die Beobachtung eines früheren Zeitpunkts zu bedenken.

Zusätzlich erfolgte die Analyse der Expression Apoptose-assoziierter Proteine in den drei Zelllinien. So zeigte sich in der Analyse von p53 und seiner aktivierten, phosphorylierten Form P-p53 in LNCaP eine signifikante Induktion mit Maximum nach 10 h Inkubation unter Enzalutamid. Das Protein p53 gilt als Tumorsuppressor und ist essenzieller Bestandteil des intrinsischen, mitochondrialen Apoptose-Signalwegs; bei Schädigung der DNA aktiviert P-p53 die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Familie (z. B. Bax), während anti-apoptotische Mitglieder wie Bcl-2 gehemmt werden [90]. Die Untersuchung von p53 in PC-3 und auch PC-3-AR wurde nicht durchgeführt, da die Zelllinie aufgrund eines vorzeitigen Stopp-Codons im p-53-Gen kein p-53-Protein exprimiert [73]. Im Gegensatz hierzu finden sich Bax und Bcl-2 in allen drei untersuchten Zellreihen [91,92]. Zusätzlich ist für den Progress des PCa eine anti-apoptotisch wirkende verstärkte Expression von Bcl-2 beschrieben worden [93]. Zu den untersuchten Zeitpunkten nach 4, 10 und 24 h konnte jeweils eine signifikante Induktion von Bax sowie Suppression von Bcl-2 in LNCaP, PC-3 und PC-3-AR im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Dieses Muster der

Proteinexpression ist spezifisch für den intrinsischen Apoptose-Signalweg [62,94]. Die erfolgte Expressionsanalyse ist insgesamt als Nachweis der molekularen Umstellung der behandelten Zellen in Richtung des geregelten Zelltods zu werten und rückblickend gegebenenfalls durch eine Erhöhung der Anzahl durchgeführter Experimente zu untermauern. Diese Erkenntnis ergänzt sich mit der beschriebenen Zellwachstums nach Zugabe Suppression des von Enzalutamid in den Wachstumskinetiken sowie den vorangegangenen Apoptose-Assays. Um die Aussagekraft der dargelegten Arbeit weiter zu verbessern, wäre die Durchführung weiterer Apoptose-nachweisender Versuche denkbar. Hierzu könnte zum Beispiel ein Annexin-V-Assay oder immunhistochemische Nachweis der Aktivität von Caspase-3 durchgeführt werden - etablierte und aussagekräftige Methoden zum Nachweis der zellulären Apoptose in der aktuellen Forschung [95]. Zusammenfassend finden sich für LNCaP, PC-3 und PC-3-AR unter Therapie mit Enzalutamid eindeutige Hinweise für die Induktion der zellulären Apoptose.

Wie aber kann Enzalutamid in AR-negativen Zellen wirken und die Apoptose initiieren? Und wie kann der klassische Weg der intrinsischen Apoptose in PC-3 sowie PC-3-AR-Zellen mit p53-negativem Status ausgelöst werden? Letzteres ist bereits in mehreren Forschungsprojekten untersucht worden. So induzierte Rapamycin in PC-3 unabhängig von p53 die Apoptose durch Expression von p21 mit anschließendem Arrest des Zellzyklus und zeigte eine Hyperphosphorylierung des Retinoblastom-Proteins [96]. In einer weiteren Studie konnte Cisplatin in PC-3 p53-unabhängig den apoptotischen Zelltod auslösen, wofür unter anderem der Einbezug des Signalwegs des nuklearen Faktor kappa-B (NF-kB) verantwortlich gemacht werden konnte [97]. Auch für LNCaP konnte der Nachweis einer p53-unabhängigen Apoptose durch Behandlung mit pflanzlichen Phenolen nach molekularer Suppression des physiologischen p53-Moleküls nachgewiesen werden [98]. Eine Umgehung des klassischen, durch p53 getriggerten intrinsischen Signalwegs der Apoptose scheint somit in den untersuchten Zellreihen über diverse zellbiologische Wege erklärbar.

Wie jedoch kann Enzalutamid Apoptose in AR-negativen Zellreihen auslösen? Ein neuer junger Trend der modernen Medizin befasst sich mit dem Phänomen der Polypharmakologie. Hierunter versteht man die Promiskuität, also Freizügigkeit, von Medikamenten als auch zellulärer Targets in der Auswahl des Bindungspartners.

Während die klassische Medikamentenentwicklung oftmals auf die Suche nach möglichst selektiven Wirkstoffen (ein Wirkstoff – ein Ziel) fokussiert war, zeigen sich in neuen Untersuchungen heute bei vielen bereits zugelassenen Medikamenten weitere zelluläre Bindungspartner [99]. Neben der damit einhergehenden möglichen Erklärung für unerwünschte Nebenwirkungen von Medikamenten wird dies jedoch auch als große Chance gesehen, um multifaktoriellen Erkrankungen wie Krebs mit an mehreren Wirkorten effektive Therapien bindenden Molekülen entgegenzusetzen [100]. So wurde beispielsweise bei Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) anfangs von einer spezifischen Bindung an eine Subklasse von Kinasen ausgegangen. Mittlerweile zeigt sich der deutliche Effekt der Behandlung mancher Tumoren durch TKI jedoch durch weitere zelluläre Bindungspartner des Medikaments, wie zum Beispiel strukturell fremde Carboanhydrasen, begründet [101]. Für einen prominenten Vertreter, Sunitinib, konnten zuletzt Targets in alternativen zellulären Signalkaskaden nachgewiesen werden, welche das Behandlungsspektrum des Medikaments deutlich erweitern könnten [102]. Auch Inhibitoren der poly(ADP-Ribose) Polymerasen (PARP) zeigen polypharmakologische Effekte bei Ihren Bindungspartnern und eröffnen hierdurch aktuell weitere Anwendungsgebiete [103]. Darüber hinaus befinden sich nach aktuellem Stand keine beim PCa angewandten Pharmazeutika in der Diskussion über polypharmakologische Effekte.

Auch für Enzalutamid, entwickelt und vermarktet als spezifischer Blocker des AR in humanen Zellen, sind polypharmakologische Effekte vor dem Hintergrund ARunabhängig ausgelöster Apoptose grundsätzlich denkbar. Aus einer Vielzahl möglicher Ansatzpunkte des Medikaments sollen hier insbesondere drei naheliegende dargestellt werden.

NF-kB ist der essenzielle Bestandteil des NF-kB-Signalwegs und umfasst eine Familie von 5 Transkriptionsfaktoren, welche physiologisch inaktiviert im Cytoplasma lokalisiert sind. Nach Aktivierung durch Lösen des hemmenden IkB-Proteins akkumuliert NF-kB im Nukleus, bindet an Target-DNA-Sequenzen und reguliert die Expression von Genen der Immunantwort, Zellwachstumskontrolle sowie des Zellüberlebens [104]. Die Aktivierung des Signalwegs verläuft dabei über mehrere mögliche Pfade [105]. Für NF-kB konnte in der Vergangenheit eine deutliche Verbindung zu Onkogenese und Tumorprogression bei Überaktivierung des Signalwegs gezeigt werden; Medikamente, die auf den NF-kB-Signalweg abzielen

sind Bestandteil der aktuellen Krebsforschung [104,106]. Bezüglich Apoptose stellt der NF-kB-Signalweg ein zweischneidiges Schwert dar und kann den Zelltod in Abhängigkeit des Stimulus inhibieren oder induzieren [107]. Interessanterweise wird Bcl-2 (und andere anti-apoptotische Signale) direkt durch NF-kB positiv reguliert ohne Einbezug von p53 – eine weitere potentielle Erklärung der Bcl-2-Suppression in PC-3-Zellen nach Enzalutamidbehandlung [108]. Passenderweise findet sich in PC-3-Zellen ein konstitutiv aktivierter, das zelluläre Überleben sichernder NF-kB-Signalweg; in LNCaP zeigt sich NF-kB unterhalb der physiologischen Werte [65]. Auch andere Wirkstoffe konnten in der Vergangenheit in PC-3 durch NF-kB-Suppression den intrinsischen Signalweg und nachfolgend die Apoptose auslösen, teilweise mit Nachweis der Bcl-2-Suppression sowie Bax-Induktion [109-112]. Begleitend konnte in LNCaP durch Inhibition von NF-kB die Suppression des AR und nachfolgend des Tumorwachstums gezeigt werden [113,114]. Effekte weiterer voroder nachgeschalteter Moleküle des NF-kB-Signalwegs wie der Tumornekrosefaktoralpha (TNF- $\alpha$ ) oder ROS stehen bei der Untersuchung der Apoptoseinduktion in Krebs zudem im Fokus [115,116]. Insgesamt scheint der NF-kB-Signalweg als möglicher zusätzlicher polpharmakologischer, AR-unabhängiger Wirkungsort von Enzalutamid naheliegend.

Ein weiteres mögliches Target von Enzalutamid stellt die Familie der HSP dar. Physiologisch erfüllen HSP wichtige Funktionen in Zellzykluskontrolle, Reaktion auf externe Noxen wie Wärme durch korrekte Faltung und Stabilisierung von Proteinen; in Prostatazellen wird der AR von einem HSP-Komplex (HSP40, HSP 70, HSP 90  $\alpha/\beta$  sowie HOP) umgeben und in der inaktiven Form vor Abbau geschützt [50]. Für mehrere HSP konnte bereits eine wichtige Rolle in Apoptose-Kontrolle und Behandlungsresistenz in PCa nachgewiesen werden [117]. In einem Folgeprojekt dieser Arbeit wurde die Wirkung von Enzalutamid auf die Expression verschiedener HSP in LNCaP sowie PC-3 untersucht, hierbei ergab sich eine signifikante hemmende, AR-unabhängige Beeinflussung von HSP27, HSP40 sowie HSP90ß [118]. Neben den AR-assoziierten HSP40 sowie HSP90ß ist HSP27 als antiapoptotischer Faktor bekannt, eine Suppression kann den Zelltod somit begünstigen [119]. Ob als direktes Target von Enzalutamid oder nachgeschaltete Reaktion anderer Signalwege, HSP scheinen in der AR-unabhängigen Induktion von Apoptose in PCa eine wichtige Rolle zu spielen und bieten über Hemmung ihrer Funktion als Stabilisator des AR in AR-positivem CRPC eventuell ein doppelt lohnendes Ziel.

Eine mögliche polypharmakologische Rolle in der Antwort auf Enzalutamid in PCa fällt zudem anderen Vertretern der Steroidrezeptor-Familie zu. Neben dem AR finden sich mit dem GR, dem Mineralocorticoidrezeptor, dem Östrogenrezeptor (ER) sowie dem Progesteronrezeptor weitere Rezeptoren, die für eine hohe strukturelle Ähnlichkeit sowie teilweise gleiche Ziel-Gene in der Transkription bekannt sind. Man spricht hierbei von oxo-steroiden Rezeptoren. Crosstalk in der Behandlung Steroidrezeptor-gerichteter Therapien ist bereits mehrfach nachgewiesen worden [120,121]. Weiterhin stehen die AR-verwandten Rezeptoren unter Verdacht, den Progress des PCa mit zu verantworten [122]. Auch der GR ist hierbei Teil aktueller Forschung. LNCaP ist GR-negativ, in PC-3 wird der Rezeptor exprimiert; die Rolle für die Zellproliferation ist jedoch nicht eindeutig geklärt [67,123]. So konnte in CRPC eine verstärkte Expression des GR unter Enzalutamid-Behandlung mit nachfolgender Aktivierung typischer AR-transkribierter Gene gezeigt werden; weiterhin konnte das verstärkte GR-Signaling eine Abnahme der Effizienz antiandrogener Therapie im PCa nachweisen [55,124]. Der spezifische Einfluss des GR auf die Proliferation von PC-3-Zellen ist jedoch weniger eindeutig. Entgegen initial beschriebener ausbleibender metabolischer Reaktion ergab eine Behandlung mit Dexamethason in neueren Studien einen antiproliferativen Effekt, so z.B. auch über Suppression des NF-kB-Signalweges [125,126]. Dennoch wäre der mögliche Effekt von Enzalutamid auf die GR-Expression in PC-3-Zellen eine interessante Erweiterung der hier dargestellten Experimente.

Neben dem GR scheint vor allem der ER, insbesondere die Unterform ER<sup>β</sup>1, eine Funktion im Tumorprogress des PCa innezuhaben. Die genaue Rolle bleibt hierbei jedoch wie auch bei GR unklar, es wurden sowohl zunehmende wie abnehmende Tumoraggressivität in Korrelation mit der Expression von ER<sup>β1</sup> beschrieben [127,128]. Neben der Expression von HSPs wurde in dem Folgeprojekt dieser Arbeit auch die der ER in LNCaP sowie PC-3 unter Enzalutamidbehandlung untersucht. Hierbei ergab sich für ERβ1 eine signifikante Suppression, die Detektion von ERβ2 gelang technisch nicht [118]. Die Funktion der ER unter Enzalutamidtherapie bleibt damit weiterhin unklar, stellt jedoch einen wichtigen Ansatz für die zukünftige Forschung dar. Interessanterweise konnte in weiteren Zellkulturversuchen auch für Zellreihen aus gynäkologischen Tumoren wie Endometriumkarzinom und Mammakarzinom wachstumshemmende Effekte durch Anwendung von Enzalutamid in vergleichbaren Konzentrationen beobachtet werden. Hierbei zeigten sich

Hormonrezeptor-triple-positive Mammakarzinom-Zellen anfälliger für die Behandlung als die triple-negativen Zellen [118]. Dies kann als analoges Geschehen zu der hier beschriebenen Differenz zwischen LNCaP und PC-3 angesehen werden. Insgesamt scheint auch eine Verbindung der Enzalutamid-Wirkung auf HSPs sowie Steroidrezeptoren aufgrund der physiologischen funktionellen Paarung wahrscheinlich. Eine andere mögliche Verbindung beschriebenen der Molekülfamilien und Signalwege ergibt sich über HSP90 und den NF-kB-Signalweg. So zeigt sich in anderen Tumorentitäten durch Inhibition von HSP90 eine reduzierte NF-kB-Aktivität, eine Untersuchung desselben möglichen Effekts in PCa-Zellen scheint vor diesem Hintergrund interessant [129].

Neben den genannten drei möglichen Wegen, auf denen Enzalutamid im Sinne der Polpharmakologie auch AR-unabhängig eine Wirkung entfalten könnte, gibt es zudem eine Vielzahl weiterer denkbarer molekularer Ansatzstellen. Hierzu gehören neben den Caspasen als Effektormoleküle der Apoptose auch der Akt-Signalweg mit der vorgeschalteten PI3K-Kinase, für welchen eine Vernetzung mit dem NF-kB-Signalweg vorbekannt ist [65]. Die Bandbreite möglicher beeinflusster zellulärer Prozesse ist hierbei insgesamt groß.

Abschließend betrachtet hat die hier vorgelegte Arbeit in den verwendeten PCa-Zelllinien LNCaP, PC-3 sowie PC-3-AR eine vom AR unabhängige Inhibition des Zellwachstums als auch Induktion der Apoptose durch Anwendung von Enzalutamid gezeigt. Während mehrere plausible alternative Targets des Medikaments in Frage kommen, ist der Nachweis entsprechender Interaktionen noch zu erbringen. Eine für weitere Arbeiten interessante Frage ist zudem die Untersuchung der kürzlich zugelassenen neuartigen Antiandrogene Apalutamid und Darolutamid und möglicher ähnlicher AR-unabhängiger Effekte in PCa sowie anderen Tumorentitäten.

### 6. Zusammenfassung

Enzalutamid ist ein neuartiges Antiandrogen und wird nach Versagen der klassischen Androgenentzugstherapie beim metastasierten sowie nichtmetastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom seit seiner Zulassung 2012 erfolgreich eingesetzt. Der Wirkmechanismus beruht hierbei laut Hersteller auf einer überlegenen Affinität des Wirkstoffs zum Androgenrezeptor (AR), welcher somit in der Bindung von Androgenen, der nachfolgenden Translokation in den Nukleus und der Transkription AR-assoziierter Gene gehindert wird. Letztlich erfolgt hierdurch die Induktion der Apoptose in den Zellen des Prostatakarzinoms.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Enzalutamid auf Prostatakarzinomzellen mit unterschiedlichem AR-Status auf zellulärer und molekularer Ebene in vitro untersucht. Initial erfolgte die Bestimmung der IC<sub>50</sub> von Enzalutamid für AR-positive LNCaP- und PC-3-AR-Zellen sowie AR-negative PC-3-Zellen, wobei eine wachstumsinhibierende Wirkung für alle untersuchten Zelllinien durch das Medikament festgestellt werden konnte. In anschließenden Experimenten konnten apoptotische Chromatinfragmentierung mittels TUNEL-Assay, typische Zellkernveränderungen mittels DAPI-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie sowie Apoptose-assoziierte Veränderung der Protein-Expressionsniveaus von p53, Bcl-2 und Bax per Western Blot in den genannten Zelllinien unter Enzalutamid festgestellt werden. In Zusammenschau wurden die Resultate als eindeutiger Nachweis des programmierten Zelltods gewertet.

Die Ergebnisse konnten somit eine potente Wirkung von Enzalutamid in der Anwendung über die bloße AR-Blockade hinaus zeigen und auf alternative zelluläre Targets des Medikaments im Rahmen einer möglichen Polypharmakologie hinweisen (e.g. NF-kB-Signalweg, HSP oder andere Steroidrezeptoren). Somit ist zukünftig potenziell auch eine Anwendung von Enzalutamid und möglicherweise anderen neuartigen Antiandrogenen in weiteren Tumorentitäten denkbar und sollte in zukünftigen Studien fortgesetzt eruiert werden.

## 7. Anhang

TNM	Ausdehnung	Klinische Einteilung
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor: Weder tast-	
	noch sichtbar	
	- T1a: PCa in <5% des untersuchten	
	Präparats (z.B. Resektionsspäne)	
	- T1b: PCa in >5% des untersuchten	
	Präparats	Lokal bograpztas PCa
	- T1c: Prostatakarzinom in Stanzbiopsie	Lokal begrenzies r Ga
T2	Auf die Prostata beschränkt, Prostatakapsel	
	intakt	
	- T2a: befall von <50% eines Seitenlappens	
	- T2b: Befall von >50% eines Seitenlappens	
	- T2c: Befall beider Seitenlappen	
ТЗ	Extraprostatisches Wachstum, Tumor	
	durchbricht die Kapsel	
	- T3a: Extrakapsuläre Ausbreitung	Lokal fortgeschrittenes
	- T3b: Infiltration der Samenblasen	Prostatakarzinom
T4	Infiltration von Nachbarorganen außer	
	Samenblasen: Harnblase, Rektum,	
	Schließmuskel oder Beckenwand	
N1	Regionärer Lymphknotenbefall	
M1	Fernmetastasen	
	- M1a: Extraregionäre	Fortgeschrittenes bzw.
	Lymphknotenmetastasen	metastasiertes Prostatakarzinom
	- M1b: Knochenmetastasen	
	- M1c: Andere Fernmetastasen	

Anhangstabelle 1: TNM-Klassifikation des PCa nach UICC [20]

BSA-Lösung (0,2 μg/μl) in μl	A.bidest (μl)	Bradford-Reagens (µl)
0	20	300
2	18	300
4	16	300
6	14	300
8	12	300
10	10	300
12	8	300
14	6	300
18	2	300

Anhangstabelle 2: Pipettierschema der Eichreihe beim Bradford-Assay

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

Anhangstabelle 3: Pipettierschema für die SDS-PAGE

### 8. Literaturverzeichnis

- 1. R. Lüllmann-Rauch: *Taschenlehrbuch Histologie: Männliche Geschlechtsorgane Die Prostata.* 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009, 482-484.
- 2. R. Hautmann, H. Huland: *Urologie: Entwicklung der Prostata*. 3. Auflage. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2006, 1-11.
- 3. McNeal JE: The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate* 1981, 2:35-49.
- 4. R. Tauber, C. Jung: *Urologie in Frage und Antwort*. 3. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer; 2015, 12-14.
- 5. Imperato-McGinley J, Gautier T, Zirinsky K, Hom T, Palomo O, Stein E, Vaughan ED, Markisz JA, Ramirez de Arellano E, Kazam E: Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 alpha-reductase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1992, 75:1022-1026.
- 6. C. Cotic, C. Hammes, T. Lingenfelder, E. Heinrich: *BASICS Urologie*. 4. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer; 2019, 21-24.
- 7. Drudge-Coates L: GnRH blockers: a changing paradigm in the management of prostate cancer. *International Journal of Urological Nursing* 2009, 3:85-92.
- Robert Koch Institut (RKI) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID): Krebs in Deutschland f
  ür 2013/2014. 11th edition. Berlin: RKI; 2017.
- 9. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, La Roza G de: The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *The Canadian journal of urology* 2008, 15:3866-3871.
- 10. Johns LE, Houlston RS: A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU international* 2003, 91:789-794.
- 11. Kushi LH, Byers T, Doyle C, Bandera EV, McCullough M, McTiernan A, Gansler T, Andrews KS, Thun MJ: American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA: a cancer journal for clinicians* 2006, 56:254-81; quiz 313-4.
- 12. Wilt TJ, Thompson IM: Clinically localised prostate cancer. *BMJ (Clinical research ed.)* 2006, 333:1102-1106.
- 13. Lilja H, Cronin AM, Dahlin A, Manjer J, Nilsson PM, Eastham JA, Bjartell AS, Scardino PT, Ulmert D, Vickers AJ: Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50. *Cancer* 2011, 117:1210-1219.
- 14. Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M, Dahm P: Screening for prostate cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013:CD004720.
- 15. Qaseem A, Barry MJ, Denberg TD, Owens DK, Shekelle P: Screening for prostate cancer: a guidance statement from the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Annals of internal medicine* 2013, 158:761-769.
- 16. A. Heidenreich, et al.: *EAU guidelines on prostate cancer.* Arnhem: EAU; 2007.
- Fütterer JJ, Briganti A, Visschere P de, Emberton M, Giannarini G, Kirkham A, Taneja SS, Thoeny H, Villeirs G, Villers A: Can Clinically Significant Prostate Cancer Be Detected with Multiparametric Magnetic Resonance Imaging? A Systematic Review of the Literature. *European urology* 2015, 68:1045-1053.

- Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA: The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology* 2016, 40:244-252.
- 19. Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA: Pathology of carcinoma of the prostate. *Cancer* 1992, 70:235-253.
- 20. C. Wittekind, M. Klimpfinger, L.H. Sobin: *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 8th edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2017.
- 21. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A: Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 1998, 280:969-974.
- 22. Wirth et al.: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. 5th edition: Deutsche Gesellschaft für Urologie (DGU); 2019.
- 23. Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS, D'Amico AV, Dmochowski RR, Eton DT, Forman JD, Goldenberg SL, Hernandez J, Higano CS, Kraus SR, Moul JW, Tangen CM: Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *The Journal of urology* 2007, 177:2106-2131.
- Bastian PJ, Carter BH, Bjartell A, Seitz M, Stanislaus P, Montorsi F, Stief CG, Schröder F: Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *European urology* 2009, 55:1321-1330.
- 25. Parker C: The Scandinavian Prostate Cancer Group Study: the case for conservative management. *BJU international* 2005, 96:952-953.
- 26. Akakura K, Suzuki H, Ichikawa T, Fujimoto H, Maeda O, Usami M, Hirano D, Takimoto Y, Kamoto T, Ogawa O, Sumiyoshi Y, Shimazaki J, Kakizoe T: A randomized trial comparing radical prostatectomy plus endocrine therapy versus external beam radiotherapy plus endocrine therapy for locally advanced prostate cancer: results at median follow-up of 102 months. *Japanese journal of clinical oncology* 2006, 36:789-793.
- 27. Nguyen PL, D'Amico AV, Lee AK, Suh WW: Patient selection, cancer control, and complications after salvage local therapy for postradiation prostate-specific antigen failure: a systematic review of the literature. *Cancer* 2007, 110:1417-1428.
- 28. Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, Partin AW: Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA* 2005, 294:433-439.
- 29. Kretschmer A, Todenhöfer T: Systemische Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms. *Der Urologe. Ausg. A* 2020, 59:1565-1576.
- 30. Kretschmer A, Todenhöfer T: Are There Still Patients with Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer Who Should Be Treated with Androgen Deprivation Monotherapy? *European urology focus* 2019, 5:114-116.
- 31. Labrie F: GnRH agonists and the rapidly increasing use of combined androgen blockade in prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 2014, 21:R301-17.
- 32. Thomas C, Ohlmann C-H: Kombinierte Systemtherapie beim metastasierten hormonsensitiven Prostatakarzinom: Was? Wann? Bei wem? *Der Urologe. Ausg. A* 2020, 59:665-672.

- 33. Dagher R, Li N, Abraham S, Rahman A, Sridhara R, Pazdur R: Approval summary: Docetaxel in combination with prednisone for the treatment of androgen-independent hormone-refractory prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, 10:8147-8151.
- 34. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, Özgüroğlu M, Ye D, Feyerabend S, Protheroe A, Porre P de, Kheoh T, Park YC, Todd MB, Chi KN: Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine* 2017, 377:352-360.
- 35. Fendler WP, Weber M, Iravani A, Hofman MS, Calais J, Czernin J, Ilhan H, Saad F, Small EJ, Smith MR, Perez PM, Hope TA, Rauscher I, Londhe A, Lopez-Gitlitz A, Cheng S, Maurer T, Herrmann K, Eiber M, Hadaschik B: Prostate-Specific Membrane Antigen Ligand Positron Emission Tomography in Men with Nonmetastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019, 25:7448-7454.
- 36. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fosså SD, Chodacki A, Wiechno P, Logue J, Seke M, Widmark A, Johannessen DC, Hoskin P, Bottomley D, James ND, Solberg A, Syndikus I, Kliment J, Wedel S, Boehmer S, Dall'Oglio M, Franzén L, Coleman R, Vogelzang NJ, O'Bryan-Tear CG, Staudacher K, Garcia-Vargas J, Shan M, Bruland ØS, Sartor O: Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *The New England journal of medicine* 2013, 369:213-223.
- Bono JS de, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels J-P, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO: Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *The Lancet* 2010, 376:1147-1154.
- Bono J de, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, Chi KN, Sartor O, Agarwal N, Olmos D, Thiery-Vuillemin A, Twardowski P, Mehra N, Goessl C, Kang J, Burgents J, Wu W, Kohlmann A, Adelman CA, Hussain M: Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine* 2020, 382:2091-2102.
- Heck MM, Tauber R, Schwaiger S, Retz M, D'Alessandria C, Maurer T, Gafita A, Wester H-J, Gschwend JE, Weber WA, Schwaiger M, Knorr K, Eiber M: Treatment Outcome, Toxicity, and Predictive Factors for Radioligand Therapy with 177Lu-PSMA-I&T in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *European urology* 2019, 75:920-926.
- 40. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, Milecki P, Shore N, Rader M, Wang H, Jiang Q, Tadros S, Dansey R, Goessl C: Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *The Lancet* 2011, 377:813-822.
- 41. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V, Wongvipat J, Smith-Jones PM, Yoo D, Kwon A, Wasielewska T, Welsbie D, Chen CD, Higano CS, Beer TM, Hung DT, Scher HI, Jung ME, Sawyers CL: Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science (New York, N.Y.)* 2009, 324:787-790.
- 42. Schalken J, Fitzpatrick JM: Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU international* 2016, 117:215-225.
- Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K, Wit R de, Mulders P, Chi KN, Shore ND, Armstrong AJ, Flaig TW, Fléchon A, Mainwaring P, Fleming M, Hainsworth JD, Hirmand M, Selby B, Seely L, Bono JS de: Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *The New England journal of medicine* 2012, 367:1187-1197.

- 44. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, Iversen P, Bhattacharya S, Carles J, Chowdhury S, Davis ID, Bono JS de, Evans CP, Fizazi K, Joshua AM, Kim C-S, Kimura G, Mainwaring P, Mansbach H, Miller K, Noonberg SB, Perabo F, de Phung, Saad F, Scher HI, Taplin M-E, Venner PM, Tombal B: Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *The New England journal of medicine* 2014, 371:424-433.
- 45. Merseburger AS, Scher HI, Bellmunt J, Miller K, Mulders PFA, Stenzl A, Sternberg CN, Fizazi K, Hirmand M, Franks B, Haas GP, Bono J de, Wit R de: Enzalutamide in European and North American men participating in the AFFIRM trial. *BJU international* 2015, 115:41-49.
- 46. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, Chen Y, Mohammad TA, Chen Y, Fedor HL, Lotan TL, Zheng Q, Marzo AM de, Isaacs JT, Isaacs WB, Nadal R, Paller CJ, Denmeade SR, Carducci MA, Eisenberger MA, Luo J: AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England journal of medicine* 2014, 371:1028-1038.
- 47. Crona DJ, Whang YE: Androgen Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms Involved in Prostate Cancer Therapy Resistance. *Cancers* 2017, 9.
- 48. Gelmann EP: Molecular biology of the androgen receptor. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2002, 20:3001-3015.
- 49. Heinlein CA, Chang C: Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine reviews* 2004, 25:276-308.
- 50. Pratt WB, Toft DO: Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 2003, 228:111-133.
- 51. van Royen ME, van Cappellen WA, Vos C de, Houtsmuller AB, Trapman J: Stepwise androgen receptor dimerization. *Journal of cell science* 2012, 125:1970-1979.
- 52. Edwards J, Krishna NS, Grigor KM, Bartlett JMS: Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *British journal of cancer* 2003, 89:552-556.
- 53. Ware KE, Garcia-Blanco MA, Armstrong AJ, Dehm SM: Biologic and clinical significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer. *Endocrine-related cancer* 2014, 21:T87-T103.
- 54. Liu C, Lou W, Zhu Y, Yang JC, Nadiminty N, Gaikwad NW, Evans CP, Gao AC: Intracrine Androgens and AKR1C3 Activation Confer Resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer research* 2015, 75:1413-1422.
- 55. Isikbay M, Otto K, Kregel S, Kach J, Cai Y, Vander Griend DJ, Conzen SD, Szmulewitz RZ: Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. *Hormones & cancer* 2014, 5:72-89.
- 56. Carver BS: Defining and Targeting the Oncogenic Drivers of Neuroendocrine Prostate Cancer. *Cancer cell* 2016, 29:431-432.
- 57. Elmore S: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 2007, 35:495-516.
- 58. Soengas MS, Alarcón RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW: Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science (New York, N.Y.)* 1999, 284:156-159.
- 59. Nagata S: Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research* 2000, 256:12-18.
- 60. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM: Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry* 2000, 69:217-245.

- 61. Kim J, Lee S, Oh S, Han S, Park H, Yoo M-A, Kang H: Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-Xs and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncol Rep* 2004.
- 62. Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC: ANTIAPOPTOTIC PROTEINS. *Cardiology Clinics* 2001, 19:57-74.
- 63. Rodriguez J, Lazebnik Y: Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & development* 1999, 13:3179-3184.
- 64. M Waibel: Eliminierung apoptotischer Zellen durch professionelle Phagozyten. Generierung, Freisetzung und Erkennung des monozytären Attraktionssognals Lysophosphatidylcholin und Bedeutung von Annexin I als Brückenprotein in der phagozytischen Synapse [https://api.deutsche-digitale-bibliothek.de/binary/76e0cb3e-2d09-4ae5-8cce-ed9066bbdc9f].
- 65. Wang G, Reed E, Li Q: Apoptosis in prostate cancer: Progressive and therapeutic implications (Review). *Int J Mol Med* 2004.
- 66. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP: LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research* 1983, 43:1809-1818.
- 67. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW: Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology* 1979, 17:16-23.
- 68. Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, Cato AC: Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* 1999, 18:6322-6329.
- 69. Heisler LE, Evangelou A, Lew AM, Trachtenberg J, Elsholtz HP, Brown TJ: Androgendependent cell cycle arrest and apoptotic death in PC-3 prostatic cell cultures expressing a full-length human androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1997, 126:59-73.
- 70. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto jr. GJ, Stryer L: *Stryer Biochemie*. 8th edition. Berlin: Springer Spektrum; 2018 [*Lehrbuch*].
- 71. Guerrero J, Alfaro IE, Gómez F, Protter AA, Bernales S: Enzalutamide, an androgen receptor signaling inhibitor, induces tumor regression in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *The Prostate* 2013, 73:1291-1305.
- 72. Eidet JR, Pasovic L, Maria R, Jackson CJ, Utheim TP: Objective assessment of changes in nuclear morphology and cell distribution following induction of apoptosis. *Diagnostic Pathology* 2014, 9:92.
- 73. 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. *The Prostate* 2003, 57:205-225.
- 74. Lin H-P, Lin C-Y, Hsiao P-H, Wang H-D, Jiang SS, Hsu J-M, Jim W-T, Chen M, Kung H-J, Chuu C-P: Difference in protein expression profile and chemotherapy drugs response of different progression stages of LNCaP sublines and other human prostate cancer cells. *PloS one* 2013, 8:e82625.
- 75. Barrado M, Blanco-Luquin I, Navarrete PA, Visus I, Guerrero-Setas D, Escors D, Kochan G, Arias F: Radiopotentiation of enzalutamide over human prostate cancer cells as assessed by real-time cell monitoring. *Reports of practical oncology and radiotherapy: journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology* 2019, 24:221-226.

- Verma K, Gupta N, Zang T, Wangtrakluldee P, Srivastava SK, Penning TM, Trippier PC: AKR1C3 Inhibitor KV-37 Exhibits Antineoplastic Effects and Potentiates Enzalutamide in Combination Therapy in Prostate Adenocarcinoma Cells. *Molecular cancer therapeutics* 2018, 17:1833-1845.
- 77. Grossebrummel H, Peter T, Mandelkow R, Weiss M, Muzzio D, Zimmermann U, Walther R, Jensen F, Knabbe C, Zygmunt M, Burchardt M, Stope MB: Cytochrome P450 17A1 inhibitor abiraterone attenuates cellular growth of prostate cancer cells independently from androgen receptor signaling by modulation of oncogenic and apoptotic pathways. *International journal of oncology* 2016, 48:793-800.
- 78. Weiss M, Ahrend H, Grossebrummel H, Ziegler P, Brandenburg L-O, Walther R, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB: Cytochrome P450 17A1 Inhibitor Abiraterone Acetate Counteracts the Heat Shock Protein 27's Cell Survival Properties in Prostate Cancer Cells. Urologia internationalis 2016, 97:112-117.
- 79. Kim H-J, Park Y in, Dong M-S: Comparison of prostate cancer cell lines for androgen receptor-mediated reporter gene assays. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* 2006, 20:1159-1167.
- 80. Sedelaar JPM, Isaacs JT: Tissue culture media supplemented with 10% fetal calf serum contains a castrate level of testosterone. *The Prostate* 2009, 69:1724-1729.
- 81. Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, van Rooij HC, 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. *Biochemical and biophysical research communications* 1990, 173:534-540.
- 82. Nessler-Menardi C, Jotova I, Culig Z, Eder IE, Putz T, Bartsch G, Klocker H: Expression of androgen receptor coregulatory proteins in prostate cancer and stromal-cell culture models. *The Prostate* 2000, 45:124-131.
- 83. Kollara A, Diamandis EP, Brown TJ: Secretion of endogenous kallikreins 2 and 3 by androgen receptor-transfected PC-3 prostate cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2003, 84:493-502.
- 84. Dai JL, Maiorino CA, Gkonos PJ, Burnstein KL: Androgenic up-regulation of androgen receptor cDNA expression in androgen-independent prostate cancer cells. *Steroids* 1996, 61:531-539.
- 85. Yuan S, Trachtenberg J, Mills GB, Brown TJ, Xu F, Keating A: Androgen-induced inhibition of cell proliferation in an androgen-insensitive prostate cancer cell line (PC-3) transfected with a human androgen receptor complementary DNA. *Cancer research* 1993, 53:1304-1311.
- 86. Majtnerová P, Roušar T: An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular biology reports* 2018, 45:1469-1478.
- 87. Kortenhorst MSQ, Isharwal S, van Diest PJ, Chowdhury WH, Marlow C, Carducci MA, Rodriguez R, Veltri RW: Valproic acid causes dose- and time-dependent changes in nuclear structure in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 2009, 8:802-808.
- Weiss M, Gümbel D, Hanschmann E-M, Mandelkow R, Gelbrich N, Zimmermann U, Walther R, Ekkernkamp A, Sckell A, Kramer A, Burchardt M, Lillig CH, Stope MB: Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. *PloS one* 2015, 10:e0130350.

- Yamauchi K, Yang M, Jiang P, Yamamoto N, Xu M, Amoh Y, Tsuji K, Bouvet M, Tsuchiya H, Tomita K, Moossa AR, Hoffman RM: Real-time in vivo dual-color imaging of intracapillary cancer cell and nucleus deformation and migration. *Cancer research* 2005, 65:4246-4252.
- 90. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)* 1998, 281:1674-1677.
- 91. Liu YB, Gao X, Deeb D, Brigolin C, Zhang Y, Shaw J, Pindolia K, Gautam SC: Ubiquitinproteasomal degradation of antiapoptotic survivin facilitates induction of apoptosis in prostate cancer cells by pristimerin. *International journal of oncology* 2014, 45:1735-1741.
- 92. Shukla S, Fu P, Gupta S: Apigenin induces apoptosis by targeting inhibitor of apoptosis proteins and Ku70-Bax interaction in prostate cancer. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* 2014, 19:883-894.
- 93. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC: Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *The American journal of pathology* 1996, 148:1567-1576.
- 94. van Delft MF, Huang DCS: How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell research* 2006, 16:203-213.
- 95. Kabakov AE, Gabai VL: Cell Death and Survival Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2018, 1709:107-127.
- 96. Ahn C, Hwang M, Ramsamooj P, Lee S, Jung M: Rapamycin-induced apoptosis is p53independent in human prostate carcinoma PC-3 cells. *International journal of oncology* 1997, 11:1115-1118.
- 97. Chiang K-C, Tsui K-H, Chung L-C, Yeh C-N, Feng T-H, Chen W-T, Chang P-L, Chiang H-Y, Juang H-H: Cisplatin modulates B-cell translocation gene 2 to attenuate cell proliferation of prostate carcinoma cells in both p53-dependent and p53-independent pathways. *Scientific reports* 2014, 4:5511.
- 98. 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.
- 99. Cerisier N, Petitjean M, Regad L, Bayard Q, Réau M, Badel A, Camproux A-C: High Impact: The Role of Promiscuous Binding Sites in Polypharmacology. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2019, 24.
- 100. Anighoro A, Bajorath J, Rastelli G: Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery. *Journal of medicinal chemistry* 2014, 57:7874-7887.
- 101. Antolin AA, Workman P, Mestres J, Al-Lazikani B: Polypharmacology in Precision Oncology: Current Applications and Future Prospects. *Current pharmaceutical design* 2016, 22:6935-6945.
- 102. Di Desidero T, Fioravanti A, Orlandi P, Canu B, Giannini R, Borrelli N, Man S, Xu P, Fontanini G, Basolo F, Kerbel RS, Francia G, Danesi R, Bocci G: Antiproliferative and proapoptotic activity of sunitinib on endothelial and anaplastic thyroid cancer cells via inhibition of Akt and ERK1/2 phosphorylation and by down-regulation of cyclin-D1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013, 98:E1465-73.
- 103. Ekblad T, Camaioni E, Schüler H, Macchiarulo A: PARP inhibitors: polypharmacology versus selective inhibition. *The FEBS journal* 2013, 280:3563-3575.
- 104. Bassères DS, Baldwin AS: Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 2006, 25:6817-6830.

- 105. Napetschnig J, Wu H: Molecular basis of NF-κB signaling. *Annual review of biophysics* 2013, 42:443-468.
- 106. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W: NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews. Cancer* 2002, 2:301-310.
- 107. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Dröge W, Schmitz ML: The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *European journal of biochemistry* 2000, 267:3828-3835.
- 108. Burstein E, Duckett CS: Dying for NF-kappaB? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. *Current opinion in cell biology* 2003, 15:732-737.
- 109. Acuña UM, Mo S, Zi J, Orjala J, Blanco EJC de: Hapalindole H Induces Apoptosis as an Inhibitor of NF-κB and Affects the Intrinsic Mitochondrial Pathway in PC-3 Androgeninsensitive Prostate Cancer Cells. *Anticancer research* 2018, 38:3299-3307.
- 110. Huang H, Li L-J, Zhang H-B, Wei A-Y: Papaverine selectively inhibits human prostate cancer cell (PC-3) growth by inducing mitochondrial mediated apoptosis, cell cycle arrest and downregulation of NF-κB/PI3K/Akt signalling pathway. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology* 2017, 22:112-118.
- 111. Wei X, Zhou D, Wang H, Ding N, Cui X-X, Wang H, Verano M, Zhang K, Conney AH, Zheng X, DU Z-Y: Effects of pyridine analogs of curcumin on growth, apoptosis and NFκB activity in prostate cancer PC-3 cells. *Anticancer research* 2013, 33:1343-1350.
- 112. Shukla S, Gupta S: Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, 10:3169-3178.
- 113. Zhang L, Altuwaijri S, Deng F, Chen L, Lal P, Bhanot UK, Korets R, Wenske S, Lilja HG, Chang C, Scher HI, Gerald WL: NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *The American journal of pathology* 2009, 175:489-499.
- 114. Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ: Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology* 2001, 142:4795-4805.
- 115. Yin Y, Chen X, Shu Y: Gene expression of the invasive phenotype of TNF-alpha-treated MCF-7 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2009, 63:421-428.
- 116. Gumulec J, Balvan J, Sztalmachova M, Raudenska M, Dvorakova V, Knopfova L, Polanska H, Hudcova K, Ruttkay-Nedecky B, Babula P, Adam V, Kizek R, Stiborova M, Masarik M: Cisplatin-resistant prostate cancer model: Differences in antioxidant system, apoptosis and cell cycle. *International journal of oncology* 2014, 44:923-933.
- 117. Stope MB, Sauermann A, Rönnau C, Zimmermann U, Walther R, Burchardt M: Androgen receptor and heat shock proteins in progression of prostate cancer cells. International journal of clinical pharmacology and therapeutics 2012, 50:65-67.
- 118. Abazid A, Martin B, Choinowski A, McNeill RV, Brandenburg L-O, Ziegler P, Zimmermann U, Burchardt M, Erb H, Stope MB: The androgen receptor antagonist enzalutamide induces apoptosis, dysregulates the heat shock protein system, and diminishes the androgen receptor and estrogen receptor β1 expression in prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry* 2019, 120:16711-16722.
- 119. 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 research* 2004, 64:6595-6602.
- 120. Nordqvist A, O'Mahony G, Fridén-Saxin M, Fredenwall M, Hogner A, Granberg KL, Aagaard A, Bäckström S, Gunnarsson A, Kaminski T, Xue Y, Dellsén A, Hansson E, Hansson P, Ivarsson I, Karlsson U, Bamberg K, Hermansson M, Georgsson J, Lindmark B, Edman K: Structure-Based Drug Design of Mineralocorticoid Receptor Antagonists to Explore Oxosteroid Receptor Selectivity. *ChemMedChem* 2017, 12:50-65.
- 121. Petit-Topin I, Fay M, Resche-Rigon M, Ulmann A, Gainer E, Rafestin-Oblin M-E, Fagart J: Molecular determinants of the recognition of ulipristal acetate by oxo-steroid receptors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2014, 144 Pt B:427-435.
- 122. Kroon J, Kooijman S, Cho N-J, Storm G, van der Pluijm G: Improving Taxane-Based Chemotherapy in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Trends in pharmacological sciences* 2016, 37:451-462.
- 123. Berns EM, Boer W de, Mulder E: Androgen-dependent growth regulation of and release of specific protein(s) by the androgen receptor containing human prostate tumor cell line LNCaP. *The Prostate* 1986, 9:247-259.
- 124. Arora VK, Schenkein E, Murali R, Subudhi SK, Wongvipat J, Balbas MD, Shah N, Cai L, Efstathiou E, Logothetis C, Zheng D, Sawyers CL: Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell* 2013, 155:1309-1322.
- 125. Li Z, Chen Y, Cao D, Wang Y, Chen G, Zhang S, Lu J: Glucocorticoid up-regulates transforming growth factor-beta (TGF-beta) type II receptor and enhances TGF-beta signaling in human prostate cancer PC-3 cells. *Endocrinology* 2006, 147:5259-5267.
- 126. Reyes-Moreno C, Frenette G, Boulanger J, Lavergne E, Govindan MV, Koutsilieris M: Mediation of glucocorticoid receptor function by transforming growth factor beta I expression in human PC-3 prostate cancer cells. *The Prostate* 1995, 26:260-269.
- 127. Horvath LG, Henshall SM, Lee CS, Head DR, Quinn DI, Makela S, Delprado W, Golovsky D, Brenner PC, O'Neill G, Kooner R, Stricker PD, Grygiel JJ, Gustafsson JA, Sutherland RL: Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer. *Cancer research* 2001, 61:5331-5335.
- 128. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H: Differential expression of the estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma. *The Prostate* 2003, 54:79-87.
- 129. Thangjam GS, Dimitropoulou C, Joshi AD, Barabutis N, Shaw MC, Kovalenkov Y, Wallace CM, Fulton DJ, Patel V, Catravas JD: Novel mechanism of attenuation of LPSinduced NF-κB activation by the heat shock protein 90 inhibitor, 17-N-allylamino-17demethoxygeldanamycin, in human lung microvascular endothelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2014, 50:942-952.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Martin Burchardt, Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universitätsmedizin Greifswald, möchte ich für die Möglichkeit danken im urologischen Forschungslabor der Klinik meine experimentelle Doktorarbeit durchführen zu dürfen. Weiterhin danke ich für die fortwährende Unterstützung als Doktorvater im Promotionsprozess, die wissenschaftlichen Debatten im Rahmen der Forschungsseminare sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope für jederzeit uneingeschränkte Unterstützung, fachliches Know-How, geschätzten wissenschaftlichen Input und einen nie reißen wollenden Geduldsfaden sowie die kritische Korrektur der vorgelegten Arbeit. Der initiale Gedanke, bei der Wahl der Promotionsstelle priorisiert auf einen engagierten Betreuer zu setzen, hat sich mehr als ausgezahlt.

Auch dem gesamten urologischen Forschungslabor mit allen Mitarbeitern sowie der benachbarten experimentellen Gynäkologie möchte ich meinen Dank ausdrücken die gemeinsame Zeit mit langen Laborabenden, prolongiertem Troubleshooting und phasenweise frustraner Datenerhebung durch Gemeinschaftssinn, Hilfsbereitschaft und Humor unvergesslich gemacht zu haben.

Auch meiner Familie und meinen Freunden bin ich für den Zuspruch und Beistand in jeder Phase des Promotionsprozesses zutiefst verbunden. Insbesondere meinen Eltern, Gerlinde und Erhard Martin, gilt der Dank für fortwährendes Verständnis, unerschöpflichen Zuspruch und Geduld in meiner gesamten Zeit als Doktorand und die engagierte Korrektur des Manuskripts.