

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

Thema:

**Enzalutamid-abhängige Modulation der
Hitzeschockprotein- und Steroidrezeptorexpression
in Prostatakarzinomzellen**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2017

vorgelegt von:

Alexander Abazid

geboren am: 22.10.1991

in: Meißen

Dekan:	Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter:	PD Dr. Dr. Matthias Stope
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. Frank vom Dorp
Ort, Raum:	Greifswald, Hörsaal Süd
Tag der Disputation:	11.06.2020

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	V
II. Abbildungsverzeichnis	VI
III. Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Anatomie und Physiologie der Prostata.....	1
1.2 Ätiologie, Klinik, Therapie und Diagnostik des Prostatakarzinoms (PC)	3
1.3 Enzalutamid	6
1.4 Steroidhormonrezeptoren (AR/ ER) und molekulare Aspekte beim PC	8
1.5 Hitzeschockproteine	9
2. Zielsetzung.....	11
3. Material und Methoden	12
3.1 Material	12
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
3.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen	13
3.1.3 Puffer und Lösungen.....	15
3.1.4 Antikörper.....	16
3.1.5 Zelllinien	17
3.1.6 Zellkultur: Medien und Zusätze	17
3.2 Zellbiologische Methoden	18
3.2.1 Lagerung und Entnahme der Zellen.....	18
3.2.2 Passagieren der Zellen	18
3.2.3 Aussaat/ Ernte der Zellkinetiken und Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter	19
3.2.4 Behandlung mit Enzalutamid	19
3.3 Proteinbiochemische Methoden	20

3.3.1	Protein-Isolierung	20
3.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	20
3.3.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	21
3.3.4	Western Blot.....	23
3.4	Statistische Auswertung	24
4.	Ergebnisse	25
4.1	Halbmaximaler inhibitorischer Effekt von Enzalutamid auf PC-Zellen.....	25
4.2	Proteinanalyse der Expression AR-assoziiierter Hitzeschockproteine	26
4.3	Proteinanalyse der Expression von Co-Chaperonen im AR-Komplex.....	30
4.4	Proteinanalyse der Expression des Apoptosefaktors HSP60.....	33
4.5	Proteinanalyse der Expression des zytoprotektiven und AR-assoziierten HSP27	35
4.6	Proteinanalyse der Expression des Androgen-Rezeptors (AR).....	37
4.7	Proteinanalyse der Expression des Östrogen-Rezeptors α (ER α)	38
4.8	Proteinanalyse der Expression des Östrogen-Rezeptors β 1 (ER β 1)	39
4.9	Proteinanalyse der Expression des Östrogen-Rezeptors β 2 (ER β 2)	41
5.	Diskussion	42
6.	Zusammenfassung.....	50
7.	Anhang	51
8.	Literaturverzeichnis	53

I. Abkürzungsverzeichnis

2D-LP	2D-Lysepuffer	K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
A.bidest	Zweifach destilliertes Wasser	kDA	Kilo-Dalton
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	LNCaP	lymph node carcinoma of the Prostate
AR	Androgenrezeptor	LH	luteinisierendes Hormon
ARE	Androgen-responding elements	mPC	metastasiertes PC
Bax	Bcl-2-associated X protein	mRNA	messenger RNA
BPH	Benigne Prostatahyperplasie	MRT	Magnetresonanztomographie
BSA	Albumin Fraktion V	Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
CRPC	Castration resistant PC	Na_3VO_4	Natriumvanat
CYP17A1	Cytochrom P450 17A1	NaF	Natriumfluorid
DHT	Dihydrotestosteron	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMSO	Dimethylsulfoxid	PC	Prostatakarzinom
DNA	desoxyribonucleic acid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DPBS	phosphate buffered saline	PSA	Prostata-spezifisches Antigen
DRU	digital-rektale Untersuchung	RIPA	Radio-Immuno-precipitation Assay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RNA	ribonucleic acid
EMA	European Medicines Agency	RPE	Radikale Prostatektomie
ER	Oestrogenrezeptor/ en		
FCS	fetal calf serum	RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institut
FDA	U.S. Food and Drug Administration	SD	Standardabweichung
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon	SDS	Sodiumdodecylsulfat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	TBS	tris buffered saline
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon	TEMED	Tetramethylethylendiamin
HOP	HSP70-HSP90-Organizing-Protein	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
H_3PO_4	ortho-Phosphorsäure	TRUS	transrektaler Ultraschall
HSP	Hitzeschockprotein/ e	v/v	Volumen pro Volumen
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration	w/v	Masse pro Volumen

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Steuerung der Prostataproliferation	2
Abbildung 2: Festlegung des Malignitätsgrades anhand histologischer Kriterien	4
Abbildung 3: Wachstumskinetik von LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid.....	25
Abbildung 4: Western Blot Analysen von HSP70 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	27
Abbildung 5: Western Blot Analysen von HSP90 α in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	28
Abbildung 6: Western Blot Analysen von HSP90 β in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	29
Abbildung 7: Western Blot Analysen von HSP40 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	31
Abbildung 8: Western Blot Analysen von HOP in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	32
Abbildung 9: Western Blot Analysen von HSP60 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	34
Abbildung 10: Western Blot Analysen von HSP27 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	36
Abbildung 11: Western Blot Analysen von AR in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	37
Abbildung 12: Western Blot Analysen von ER α in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	38
Abbildung 13: Western Blot Analysen von ER β 1 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	40
Abbildung 14: Western Blot Analysen von ER β 2 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid	41
Abbildung 15: Modell des AR-HSP-Komplexes mit Liganden-Bindung durch Dihydrotestosteron (DHT) modifiziert nach Ischia et al. (2013), Curr Opin Urol.....	47
Abbildung A1: Therapieansatz bei kastrationsrefraktärem PC (nach S3 Leitlinie)....	53

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Altersstandardisierte Normwerte (nach Agudo et al. 2013) (9).....	3
Tabelle 2: Grading nach Gleason	4
Tabelle 3: Pipettierschema zur Bradford Proteinkonzentrationsbestimmung	21
Tabelle 4: Pipettierschema für ein SDS-Gel	22
Tabelle A1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms.....	52

1. Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Prostata

Die Prostata bildet mit Hoden, Nebenhoden und Samenblasen die männlichen Adnexe. Embryologisch entwickelt sich dieses Organ zwischen der 16. und 22. Schwangerschaftswoche aus mesenchymalen Gewebe, welches den Sinus urogenitales umgibt. Aus dem Wolffschen Gang dringen kleine Verzweigungen um das Epithel der späteren Harnröhre und entwickeln sich zunehmend zur Prostata.

Topographisch befindet sich die Prostata retrokranal der Symphyse, dorsal grenzt sie an die Rektumampulle und ist auch von dort tastbar. Als physiologischen palpatorischen Tastbefund bezeichnet man eine kastaniengroße, elastische Prostata mit einem medianen Sulcus, welcher die Drüse in zwei Seitenlappen unterteilt. Sie liegt außerdem kaudal der Harnblase und bereitet dem ca. 2,5 cm langen Bereich der Harnröhre Platz. Um diesen prostatistischen Teil des Ureters ordnen sich zirkulär glatte Muskelfasern an und bilden den M. Sphincter internus, welcher nicht willkürlich innerviert wird. (1) Von dorsal perforieren die Ductus ejaculatorii den Drüsenkörper, sie münden in den Colliculus seminalis. Die Prostata produziert ca. 30% des Ejakulats mit einem pH von 6,4, was den Spermien einen Schutzfaktor im vaginalen Milieu verschafft. (2) Histologisch besteht das Organ aus 30-50 tubuloalveolären Einzeldrüsen, diese sind in Bindegewebe eingebunden. Die Ausführungsgänge der Drüsen vereinigen sich zu 25 Hauptausführungsgängen und münden in die Pars prostatica urethrae, an den Seiten des Colliculus seminalis. Makroskopisch ist die Prostata nach Lowsley et al. in zwei Seitenlappen, einem Vorderlappen, einem Mittellappen und einem Hinterlappen unterteilt. (3) Nach McNeal et al. gliedert sie sich in eine periphere, eine zentrale, eine Transitionalzone, ein anteriores Segment und in eine präprostatistische Sphinkterzone. (4) Mit 75% macht die periphere Zone den größten Anteil der des Drüsengewebes aus, daher entfällt die Entstehung von 70% aller Prostatakarzinome auch auf die periphere Zone. Bei übermäßiger Proliferation des Drüsengewebes bzw. des Stromas im Bereich der periurethralen Drüsen in der Transitional- und Übergangszone kommt es zur Bildung der benignen Prostatahyperplasie (BPH). Im Vergleich dazu ist die zentrale und anteriore Zone selten für Erkrankungen der Prostata verantwortlich. (5) Die Ätiologie der BPH ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch ist der proliferative Wirkmechanismus von

Testosteron als definitiver Fakt zu betrachten. Der hormonelle Regelkreislauf beginnt im Hypothalamus, in der Area praeoptica wird Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) an die Hypophyse freigesetzt. Vom Hypophysenvorderlappen wird luteinisierendes Hormon (LH), follikelstimulierendes Hormon (FSH) und adrenokortikotropes Hormon (ACTH) an die jeweiligen hormonellen Zwischenstationen abgegeben. LH bewirkt die Testosteronbildung der Leydig Zellen im Hoden, dieses wird zu 90% in das wirksamste Androgen Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Zur Feinregulation der Androgen-Produktion existiert ein Feedback-Mechanismus, daher kann die Testosteronproduktion in den Leydig Zellen durch verminderte LH-Freisetzung in der Hypophyse kontrolliert werden (siehe Abbildung 1A). Testosteron zeigt außerdem direkte Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten mit der intrazellulären Umwandlung zu DHT durch 5 α -Reduktase erfolgt die Bindung an den Androgen Rezeptor (AR), da dieser eine wesentlich höhere Bindungsaffinität an DHT hat als an Testosteron. Der AR fungiert nach der Bindung als Transkriptionsfaktor in Samenepithelzellen und Stromazellen, daher gilt Testosteron als Induktor für die Prostataproliferation (siehe Abbildung 1B).

(6)

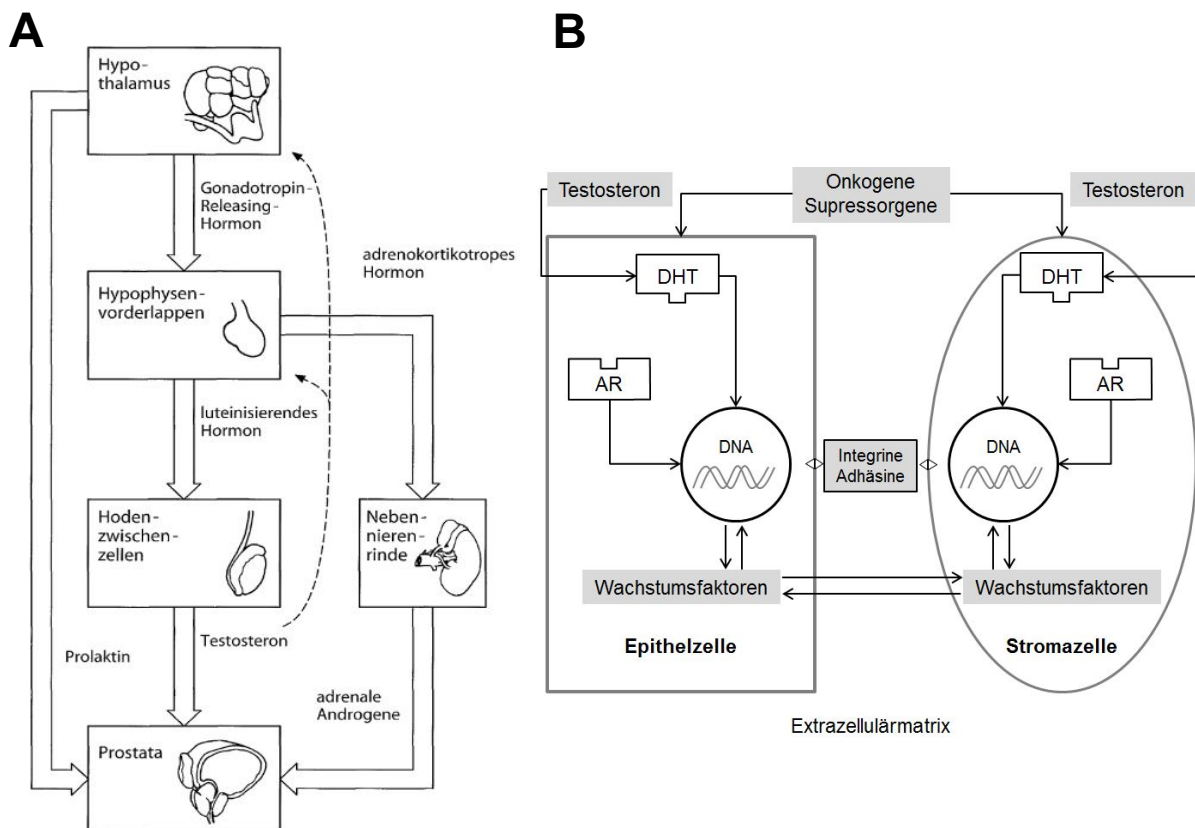


Abbildung 1: Steuerung der Prostataproliferation

A: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse beim Prostatawachstum (6)

B: Einflussgrößen der Prostataproliferation modifiziert nach (6)

1.2 Ätiologie, Klinik, Therapie und Diagnostik des Prostatakarzinoms (PC)

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes in westlichen Industrienationen. Mit Lungen- und Darmkrebs ist es die häufigste Todesursache beim Mann, mit steigendem Alter nimmt die Wahrscheinlichkeit der Erkrankung zu. Es wird davon ausgegangen, dass jeder Mann an einem Prostatakarzinom erkrankt, wenn er alt genug wird, positive Familienanamnesen verstärken die Wahrscheinlichkeit dafür. An den Folgen eines Prostatakarzinoms sterben in Deutschland 12000 Patienten jährlich, der größte Anteil der Risikogruppe liegt dabei zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. (7) Diese Zahlen erklären die Relevanz der Forschung und Früherkennung in diesem Gebiet. Daher gehört zu Früherkennungsuntersuchen ab dem 40. Lebensjahr, mit mehr als 10 Jahren Lebenserwartung, die digital-rektale Untersuchung (DRU). Da der größte Anteil der Tumore in der peripheren Zone der Prostata wächst, sind diese in der DRU tastbar. Die Aussagekraft ist untersuchungsabhängig, das lokale Tumorwachstum und klinische Stadium kann aber durch die DRU bestimmt werden. Eine weitere minimalinvasive Untersuchung der Frühdiagnostik ist die Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA). PSA ist eine Serinprotease, welche nur in Prostatazellen gebildet wird. Aufgrund der Abhängigkeit von Alter und Prostatagröße gibt es altersstandardisierte Normwerte. (5, 7, 8) (Tabelle 1)

Tabelle 1: Altersstandardisierte Normwerte (nach Agudo et al. 2013) (9)

Alter (in Jahren)	PSA-Wert (in ng/ml)
40-49	0,0-2,5
50-59	0,0-3,5
60-69	0,0-4,5
70-79	0,0-6,5

Eine Erhöhung der altersspezifischen Normwerte kann dementsprechend bei PC, BPH, akuter/chronischer Prostatitis oder nach der DRU bzw. Stanzbiopsie auftreten. Nach der Beurteilung des Wertes wird auch das Intervall des PSA-Screenings bestimmt, bei einem PSA > 2 ng/ml ist eine jährliche Kontrolle notwendig. Bei 1-2

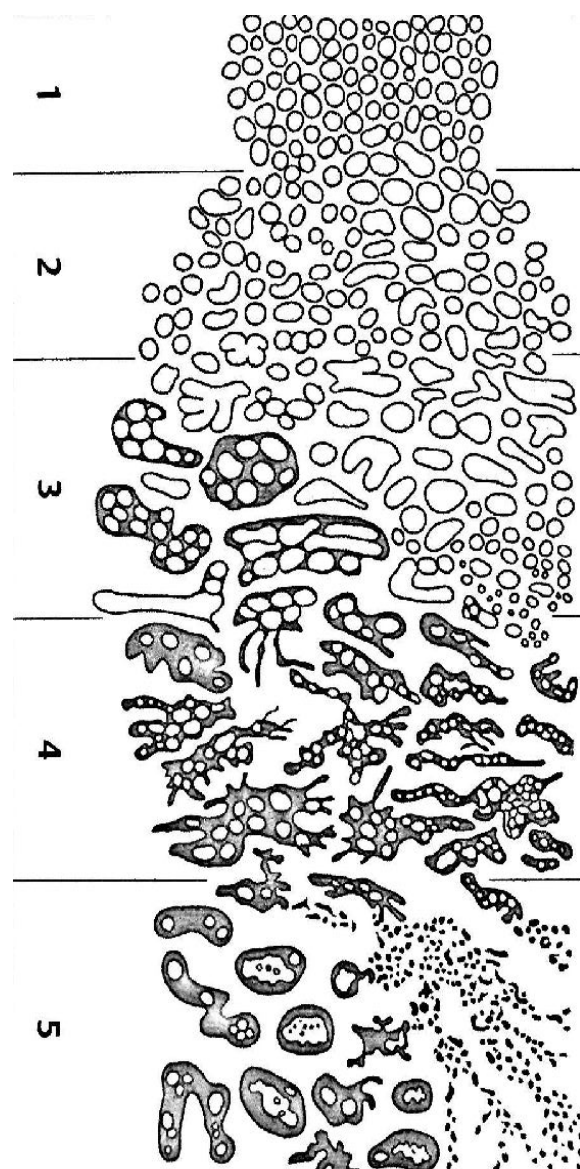
ng/ml ist eine Kontrolle alle zwei Jahre angesetzt und bei einem PSA < 1 ng/ml nur alle 4 Jahre. (7)

Meist entartet die Prostata in Form eines Adenokarzinoms, eine androgene Stimulation erscheint als notwendige Ursache, da der Steroidrezeptornachweis im Karzinomgewebe positiv ist und eine Depression der Androgene zu einer 80%igen Rückbildung des Karzinoms und einer Schrumpfung der Prostata führt. (5) Man muss das PC in seine Manifestationsstadien unterscheiden, ein manifestes PC ist ein Primärtumor, welcher Symptome verursacht oder klinisch diagnostizierbar ist.

Tabelle 2: Grading nach Gleason (10–12)

Gleason 1	Umschriebene Knoten von einheitlichen, einzelnen, enggepackten und glatt begrenzten Drüsen.
Gleason 2	Drüsen eher locker angeordnet, aber immer noch umschrieben. Minimale Ausbreitung der neoplastischen Drüsen in das umgebende Stroma.
Gleason 3	Tumor infiltriert das umgebende Prostatagewebe. Die Drüsen variieren erheblich in Größe und Gestalt, sind aber abgrenzbare Einheiten.
Gleason 4	Die Drüsen sind nicht länger einzeln und abgegrenzt, sondern scheinen verschmolzen mit unregelmäßigen Grenzen.
Gleason 5	Aufhebung der glandulären Differenzierung. Die Tumoren bestehen aus soliden Nestern, Strängen oder Einzelzellen.

Abbildung 2: Festlegung des Malignitätsgrades anhand histologischer Kriterien (12, 13)



Bei einem okkulten PC werden Metastasen symptomatisch und klinisch diagnostizierbar, im Vergleich zum inzidentellen PC, welches ein Zufallsbefund bei transurethraler Resektion der Prostata darstellt. Ein latentes PC ist dagegen ein Zufallsbefund während der Obduktion. (14) Histologisch wird das PC nach dem Gleason-Score beurteilt, hierbei erfolgt eine Addition der Werte des primären und sekundären Differenzierungsmusters. Kleinzellige und undifferenzierte Karzinome werden als Grad 3 bis 4 eingestuft, übrige seltene Karzinome werden im Grading nicht beachtet. Der Gleason-Score ergibt sich aufgrund der verschiedenen Differenzierungsstufen, die bei einem PC meist nebeneinander auftreten. Daher kann sich der Gleason-Score zwischen 2 und 10 befinden, ab 7 ist ein maligner Verlauf zu erwarten. (12, 15) (siehe Tabelle 2 und Abbildung 2)

Als zusätzliches Beurteilungskriterium für eventuelle Therapieansätze gilt die TNM-Klassifikation. Dabei erfolgt die T-Stadium-Bestimmung durch die DRU, den transrektalen Ultraschall (TRUS) und die Tumorstanzbiopsie. Bei einem hohen Gleason-Score (≥ 8) und/ oder einem T3/ 4-Befund, ist ein MRT des Beckens und bei einem PSA ≥ 10 ng/ml ein Knochenszintigramm empfohlen, um Metastasen auszuschließen. Die Therapie des PC richtet sich je nach Stadieneinteilung, Gleason-Score und PSA-Wert. Grundsätzlich wird unterschieden in aktive Überwachung, Watchful Waiting, radikale Prostatektomie (RPE), perkutane Strahlentherapie oder die interstitielle Brachytherapie (High Dose Rate, Low Dose Rate). Bei einer aktiven Überwachung (active Surveillance) sollte die PSA-Bestimmung und DRU alle drei Monate in den ersten zwei Jahren durchgeführt werden. Stabile PSA-Werte erlauben ein höheres Intervall aller sechs Monate. Die Indikationen für eine aktive Überwachung sind ein PSA-Wert ≤ 10 ng/ml, Gleason-Score ≤ 6 , weniger als 50% Tumor pro Stanze und bei einem TNM-Status von cT1c und cT2a. Das Watchful Waiting wird bei älteren Männern mit einer Lebenserwartung unter 10 Jahren durchgeführt, hier wird erst behandelt nach Symptomauftritt und dann meist durch Hormontherapie. Vordergründig wird in die Stadien-adaptierte Therapie gegliedert, welche sich nach der TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms richtet. (siehe Anhang Tabelle A1) (7, 16) Bei dem Stadium cT1-4 cN1 cM0 wäre beispielsweise eine RPE \pm Hormontherapie oder Strahlentherapie \pm Hormontherapie oder nur Hormontherapie angebracht. Bei metastasiertem PC (mPC) wird auf der Grundlage verschieden angesetzter Hormontherapien in hormonsensitiv, kastrationsresistent oder hormonresistent unterschieden. Im hormonsensitiven

Stadium erfolgt eine Therapie mit LHRH-Analoga/-Antagonisten oder Antiandrogenen. Im kastrationsresistenten Stadium ist die antihormonelle Therapie mit Abirateron oder Enzalutamid Mittel der Wahl, oder es wird eine zytotoxische Therapie (Docetaxel, Cabazitaxel) oder die Therapie mit Sipuleucel-T durchgeführt. Lokale Bestrahlung oder systemische Radionuklidtherapie wäre bei schmerzhaften Knochenmetastasen ein adäquater Therapieansatz. Hormontherapie ist allgemein indiziert adjuvant nach RPE, begleitend zur Strahlentherapie oder optional beim asymptomatischen mPC und obligat beim symptomatischen mPC. mPC ist eine Diagnose, bei der keine endgültige Heilung möglich ist. Die Hormontherapie eignet sich daher als Mittel der Lebensverlängerung. Der Hormonentzug kann chirurgisch, durch eine Orchiektomie oder medikamentös erfolgen. In der medikamentösen antihormonellen Therapie stehen GnRH-Analoga (Goserelin, Leuprorelin, Buserelin) und GnRH-Antagonisten (Abarelix, Degarelix) zur Verfügung, diese bewirken eine Hemmung der Ausschüttung von LH aus der Hypophyse und damit eine Minderung der Testosteronproduktion in den Hoden. Weiterhin gibt es steroidale Antiandrogene (Cyproteronacetat, Medroxypronacetat) diese haben einen Effekt auf die Gonadotropine, woraus ein Absinken des Serum-Testosterons folgt und nicht steroidale Antiandrogene, wie Flutamid, Bicalutamid und Nilutamid. (7, 8, 11) Der Großteil der Tumore entwickelt sich über die Therapiezeit von einem hormonsensitiven zu einem kastrationsresistenten PC (CRPC), welches innerhalb von einem Jahr zum Tod führen kann. (17)

1.3 Enzalutamid

Enzalutamid wurde unter dem Namen MDV3100 von der Firma Medivation entwickelt und ab 2009 mit der Firma Astellas weiterentwickelt und vermarktet. (18) Im selben Jahr startete auch die Phase III-Studie (AFFIRM), hierbei wurden 1199 Patienten mit CRPC und vorrangegangener Docetaxel-Chemotherapie untersucht. 800 Teilnehmer wurden einer Enzalutamid Therapie unterzogen, 399 zählten zur Placebogruppe. 2011 wurde die Studie durch das Data Monitoring Comitee vorzeitig beendet. Es zeigte sich anhand verschiedener Kontrollpunkte ein positiver Effekt von Enzalutamid, denn Patienten, die mit dem Wirkstoff behandelt wurden, zeigten ein 4,8 Monate längeres Gesamtüberleben. Der PSA-Wert senkte sich bei über der Hälfte der Patienten im Vergleich zum Beginn der Studie und 43% der behandelten Patienten berichteten von einer gesteigerten Lebensqualität. (19, 20) Enzalutamid

wurde so 2012 in den USA und 2013 in der Europäischen Union zugelassen. (21, 22) Indiziert ist es bei chemo-naivem, asymptomatischem oder gering symptomatischem mCRPC, bei welchem noch keine Indikation für eine Chemotherapie besteht (PREVAIL-Studie). (23) Ebenso wird es nach oder während Docetaxel-Chemotherapie verabreicht (AFFIRM-Studie). Es hemmt die Bindung von DHT an den AR und dessen Translokation in den Zellkern. Die Standarddosierung liegt bei 4x40mg täglich, wobei es zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie Krampfanfällen, Kopfschmerzen und Hitzewallungen kommen kann. (20) Außerdem kann bei Einnahme von Enzalutamid das Wirkspektrum von Schmerzmitteln, Betablockern und Antibiotika beeinträchtigt werden. (7, 24)

Das CRPC zeichnet sich durch seine Resistenz gegenüber der Hormontherapie aus, denn die Androgenkonzentration befindet sich unterhalb des Kastrationspiegels, was Chemotherapeutika erforderlich macht. Bis 2011 war Docetaxel das einzige effektive Zytostatikum bezüglich der Verlängerung der Überlebensdauer. (25) Zusätzlich zu Mitoxantron, was zur Schmerzreduktion eingesetzt wurde, war Docetaxel das Mittel der Wahl. In den letzten Jahren kam es zu zahlreichen Neuzulassungen für die Therapie des mPC, vor allem von hormonablativen Wirkstoffen der zweiten Generation, wie Abirateron, Enzalutamid oder dem Alphastrahler Alpharadin und dem Taxan Cabazitaxel. Die CHARTED-Studie bewies bei metastasiertem hormonnaivem PC 2014, dass zusätzlich zur Hormontherapie eine Docetaxel-Chemotherapie in 6 Zyklen alle drei Wochen einer ausgedehnten Metastasierung Einhalt gebietet. Dieser Therapie ist eine adäquate Organfunktion vorausgesetzt und ermöglicht eine Zunahme der Überlebenszeit von ca. 14 Monaten. (26) Die hormonablativen Wirkstoffe, wie Abirateron und Enzalutamid wirken auch dann, wenn der Tumor trotz niedriger Testosteronwerte weiter proliferiert. Daher werden sie weiterhin bei hormonrefraktärem PC eingesetzt, nach den aktuellen S3-Leitlinien orientiert sich die Therapiemethodik nachfolgend der Docetaxel-Chemotherapie am Status der Metastasen und dem Vorhandensein von Symptomen. (siehe Anhang Abbildung A1) (24)

1.4 Steroidhormonrezeptoren (AR/ ER) und molekulare Aspekte beim PC

Der AR ist als essenzieller Transkriptionsfaktor entscheidend für die Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane, der männlichen Verhaltensweisen und des Erscheinungsbildes. Für die physiologische Funktionsleistung der Prostata ist der AR unerlässlich, beim Menschen ist er auf dem X-Chromosom lokalisiert. (27) Durch die Bindung von DHT bzw. Testosteron tritt der AR von seinem inaktiven in den aktiven Zustand über. In diesem aktiven Zustand hat er Einfluss auf die Transkription AR-abhängiger Gene und damit auch auf die Proliferation der Prostata. (28) In inaktiver Konformation befindet sich der AR in einem Hitzeschockprotein (HSP)-Komplex aus HSP40, HSP70, HSP90 α/β und dem HSP70/90-organizing-protein (HOP), dieser Proteinkomplex ist im Cytosol lokalisiert und hat einen schützenden und stabilisierenden Einfluss auf den AR, da er so vor dem proteolytischen Abbau geschützt wird. (29) Der AR ist entscheidend an der Entstehung und Proliferation des PC beteiligt, denn mit der Aktivierung, mittels Phosphorylierung, durch ein Steroid wird die Dimerisierung mit einem zweiten AR-Protein initiiert. Laut Ischia et. al erfolgt die Translokation des AR-Dimers in den Zellkern mit der Hilfe von HSP27. Durch den Transport in den Nucleus kann der AR an Androgen-responding-elements (ARE) binden und hier mittels Transkription die Expression der AR-abhängigen Gene beeinflussen. (30–33) Eines dieser AR-regulierten Gene ist das PSA, daher wird es auch bei PC und BPH übermäßig exprimiert und dient als Indikator und Therapieparameter. (34) Aufgrund dieses Prozesses wird der Androgenspiegel in der PC-Therapie so niedrig wie möglich gehalten, im Falle des CRPC wächst der Tumor trotz dieser Therapie. Daher ist die Wirkweise von second-line Therapeutika, wie Enzalutamid von Interesse, denn ein Angriffspunkt von Enzalutamid ist die Blockung des Steroidrezeptors für DHT oder Testosteron.

Laut Literatur spricht der mutierte AR auch auf Östrogene und Antiandrogene an, was die Therapie des PC zusätzlich erschwert. (35) Jedoch zeigen aktuelle Studien, dass nicht nur der AR, sondern auch der Östrogenrezeptor (ER) in seinen verschiedenen Isoformen in PC-Zellen exprimiert wird. (36) Nach jetzigen Erkenntnissen soll ER α eine onkogene Rolle und ER β eine eher antiproliferative Funktion haben, wobei es mehrere Isoformen von ER β gibt, die in ihren einzelnen Aufgabenbereichen nicht klar definiert sind. (37, 38) Der ER zählt ebenso als

Transkriptionsfaktor, welcher die Induktion oder Suppression seiner Zielgene moduliert. (39) Die beiden prominenten ER Isoformen α und β haben tendenzielle favorisierte Bindungspartner; für ER α : Raloxifen und Östron; für ER β : Genistein und Östriol. Östradiol ist dagegen ein sehr affiner Bindungspartner für beide Isoformen. (40) Aufgrund der entscheidenden Rolle des ER in anderen Krebsarten ist eine intensivere Betrachtung des ER an der Pathogenese des PC erforderlich. (41) In Brustkrebsfallstudien zeigte sich z.B., dass Frauen mit einem positiven mRNA-Nachweis für ER β eine bessere Prognose haben, als jene mit einem positiven ER α -mRNA-Nachweis. (42)

1.5 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (HSP) sind Faktoren, die bei zellulärem Stress von der Zelle exprimiert werden. Sie dienen der korrekten Faltung, der Stabilisierung und dem Schutz anderer Proteine in der Zelle. Bei nicht mehr funktionsfähigen Proteinen beschleunigen HSP den Abbau oder schützen jene davor. HSP werden nach ihrer molekularen Masse in kleine HSP (z.B. HSP17, HSP40, HSP60) und größere HSP (z.B. HSP70, HSP90 α/β , HSP100) unterteilt. Verschiedene HSP haben auch verschiedene Funktionen im Zellgeschehen. (43, 44) HSP sind in Tumorzellen oftmals überexprimiert, dies liegt an ihrem starken Einfluss auf Proliferation, Differenzierung, Zelltod und Metastasierung. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen in der Tumorgenese dienen HSP als Tumormarker in verschiedenen Gewebetypen. (45) HSP27 gilt als ein onkogenes HSP, es dient dem Zellschutz und der Proliferation der Tumorzellen, daher kann in Folge einer Resistenz gegen antiproliferative Maßnahmen die HSP27-Expression zunehmen. (46) Dies sind Schutzmechanismen, durch welche Tumorzellen ihre Vitalität und Proliferation aufrecht erhalten können. (47, 48) Eine weitere Funktion von HSP27 mit Cytochrom C gegen den Zellstress ist die Unterbrechung der Caspase-Aktivierung und damit der Apoptose. Im PC nimmt HSP27 eine besondere Rolle für den AR ein, als Hilfsprotein für den Transport des AR in den Nucleus ist es in Folge von Hormonablation, Chemotherapie oder Radiotherapie oftmals überexprimiert. (46, 49, 50) Außerdem erleichtert HSP27 die Funktion des AR bei der Transkription, damit ist es eine essenzielle Einflussgröße für das Tumorüberleben. (51) Auch HSP 60 nimmt Einfluss auf die Apoptose, eine definitive Aussage über eine pro-oder anti-apoptotische Funktion ist nicht endgültig erwiesen. Als Chaperon im Mitochondrium und

endoplasmatischen Retikulum hat es Einfluss auf Transport und Faltung verschiedener Proteine, die apoptotische Relevanz haben. (52) Im Magen stellte sich HSP60 dagegen als signifikanter Indikator für histopathologische Grade des Tumors heraus, dies zeigt die Variabilität der Funktionalität gleicher HSP in unterschiedlichen Geweben. (53)

Im Falle des CRPC nehmen HSP90 α/β , HSP70, HOP und HSP40 eine besondere Position ein. Diese HSP bilden einen Multi-Chaperonkomplex welcher den AR schützt und Stabilität und Funktionalität des Rezeptors aufrechterhält. Diese Abhängigkeit des AR von HSP, zeigt die Bedeutsamkeit des Therapieansatzes der Suppression oder Induktion von HSP, je nach zellulärer Aufgabe. Das HSP90 Dimer ist an der Komplexbildung des AR beteiligt, durch ATP-Bindung an der Nukleotid-Bindungsstelle beteiligt sich HSP90 ATP-abhängig an der Stabilisierung des AR und ist auch an der Translokation in den Nukleus beteiligt. (54–56) Speziell im PC inhibiert HSP90 auch apoptotische Vorgänge. (57, 58) HSP90 zeigt außerdem eine erhöhte Immunreaktivität in Epithel- und Stromazellen, welche mit dem Gleason Grading und Metastasen-Staging korrelieren. (59) Auch durch ATP aktivierbar ist HSP70, dies ist ebenso an der Aufrechterhaltung des AR-Komplexes beteiligt. Seine Relevanz an der PC-Progression ist unklar, es konnte kein Zusammenhang zwischen erhöhten HSP70 Proteinspiegeln und einer Prognose bei PC ermittelt werden. (60–62) Es zeigte sich aber im Leberkarzinom eine erhöhte Expression von HSP70 und auch im Ovarialkarzinom wurde eine Progression des Tumors bei erhöhtem HSP70-Spiegel nachgewiesen. (63, 64)

Für die Funktion von HSP70, als Stabilisator des Steroidhormon-Komplexes, ist HSP40 unerlässlich. HSP40 ermöglicht die Hydrolyse von ATP, welche für HSP70 notwendig ist um an den AR-Komplex binden zu können. Dieser Vorgang der ATP-Spaltung und Bindung von HSP70 erfolgt im frühen Stadium der Anordnung des Multi-Chaperonkomplexes um den AR. (65, 66) Im weiteren Stadium der Komplexbildung bilden HSP70 und die HSP90-Dimere eine funktionelle Einheit. Um diese Verbindung herstellen zu können benötigt es HSP70/HSP90-organizing-protein (HOP). (67, 68) HOP blockiert die ATP-Bindungsstelle von HSP90, welche erforderlich ist um mit Proteinen wie p23, CyP40, FKBP51 und FKBP52 Einfluss auf die Apoptose oder stressinduzierte Signalkaskaden zu nehmen. Somit ist HOP nicht nur Bindeglied zwischen HSP70 und HSP90, sondern auch Aktivator des HSP90-Dimers. (69, 70)

2. Zielsetzung

Enzalutamid ist ein etablierter Bestandteil der Medikation nach Docetaxel-Therapie bei CRPC als second-line-Medikament. Die häufige Anwendung von Enzalutamid ist durch den hohen Therapieerfolg begründet. Um zu verstehen, wie die Wirkweise von Enzalutamid so effektiv sein kann muss man die molekularen Wirkmechanismen des Medikamentes untersuchen. Ebenso ob eventuelle Nebenwirkungen existieren, welche in dem kurzen Zeitraum wo das Medikament auf dem Markt ist, noch nicht in Erfahrung gebracht werden konnten. Wissenschaftliche Feststellungen im Bereich der Molekular- und Zellbiologie können Aufschluss über Resistenzen oder ähnliche Effekte des Medikaments bringen. Auch andere proliferative Faktoren von PC-Zellen können untersucht und auf ihre Relevanz in der CRPC-Therapie geprüft werden.

In dieser Arbeit wird am Zellmodell AR-positiver LNCaP- und AR-negativer PC-3 Zellen die Wirkung von Enzalutamid analysiert. Beide Zelllinien spiegeln verschiedene Progressionsstadien des CRPC wieder. Nach Inkubationsversuchen mit dem Wirkstoff zur Ermittlung der Konzentration des halbmaximalen inhibitorischen Effektes werden molekulare Analysen durchgeführt. Für die folgenden Analysen werden Faktoren untersucht, die für das Fortschreiten von CRPC relevant sind und mögliche Ansatzpunkte des Wirkens von Enzalutamid darstellen. Diese Einflussgrößen sind der AR als wichtiger Proliferationsfaktor, der ER als weiterer Steroidhormonrezeptor und AR-assoziierte HSP, wie HSP40, HSP70, HSP90 α/β und HOP. Ebenso wie HSP27, als zytoprotektiver Faktor und HSP60, als eventuell apoptotischer Faktor. Die Analyse der Enzalutamid-abhängigen Regulation erfolgt mittels Western-Blot.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
15ml Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
50ml Falcon BD	Biosciences (Heidelberg)
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Absaugvorrichtung VACUSIP Integra	Biosciences (Zizers, Schweiz)
Brutschrank function line	Heraeus Instruments (Hanau)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories (München)
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN® Tetrasystem	Bio-Rad Laboratories (München)
Enzalutamid	Astellas Pharma GmbH (München)
Feinwaage ABS 120-4	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Filterpapier	Whatman (Dassel)
Filterspitzen SafeSeal Tips Professional	VWR (Leuven, Belgien)
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Heizblock QBT 1	CLF Laborgeräte (Emersacker)
Inkubator Nuair TM	US Autoflow NuAire (Plymouth, USA)
Invertierer	VWR International (Darmstadt)
Kapillarspitze MultiFlex Round Tip	BioScience (Salt Lake City, USA)
Magnetrührer IKA RH basic 2	VWR International (Darmstadt)
Mikroskop IT400+	VWR International (Darmstadt)
Mikrozentrifuge-Rotilabo®	Carl Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Sucofin® (Zeven)
Miniwippe-Schüttler MR1	BioSan (Riga, Lettland)
Nitrilhandschuhe Micro-Touch® Nitra-Tex®	Ansell Healthcare (Brüssel, Belgien)
Nitrozellulose-Membran PROTEAN®	Whatman (Dassel)
PCR-96-Well TW-MT-Platte weiß	Biozym (Wien, Österreich)
pH-Meter FiveEasy TM FE20	Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)
Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Biohit, Proline (Göttingen)
Pipettensatz, 0,5-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagiergefäß 2ml, SafeSeal	Sarstedt (Nümbrecht)

Reagiergefäß 0,5ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettierhilfe	peqMATE Peqlab (Erlangen) Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, (Eberstadt)
PowerPack™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories (München)
Rollmischer RS-TR 5	Phoenix Instruments (Garbsen)
Schutzhandschuhe Sterling Nitrile KC300	Kimberly-Clark (Roswell, USA)
SDS-PAGE Zubehör Mini-PROTEAN® System	Bio-Rad Laboratories (München)
Serologische Pipette 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilbank HERA safe Sterilbank safe 2020	Heraeus Instruments (Hanau) Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Tecan readers with i-control microplate reader software / infinite M200 Pro	Tecan Group Ltd, Männedorf (Schweiz)
Überkopfschüttler Multi Bio RS-24	BioSan (Riga, Lettland)
Ultraschallgerät Transsonic 460/H	Elma (Singen)
Vortex Mixer peqTWIST	Peqlab (Erlangen)
Vortex Mixer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen)
Waage EMB 2000-2	KERN & Sohn (Balingen-Frommern)
Wasserbad W14	Grant Instruments (Cambridge, Großbritannien)
Wippschüttler UNITWIST-RT	Armin Baack (Schwerin)
Zellkulturplatte CELL + 6 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatte CELL + 24 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Mikro 120	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)

3.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth (Karlsruhe)
1-Bromo-3-Chloropropan	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallies KG (Sebnitz)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)

Complete™ Mini, EDTA-frei	Roche Diagnostics (Mannheim)
Coomassie® Brilliant Blue G 250	Fluka (Buchs, Schweiz)
D(+)-Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe)
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe)
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Guanidinhydrochlorid	AppliChem (Darmstadt)
Harnstoff	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe)
Parafilm M®	Bemis (Wisconsin, USA)
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ponceau-S	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Thioharnstoff	Merck (Darmstadt)
Trichloressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton® X-100	Ferak (Berlin)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin, Sequencing Grade	Promega (Madison, USA)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth (Karlsruhe)

kommerzielle Lösung	Hersteller
10x Rotiblock-Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Rotiphorese Gel 30(37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal™ West Dura	Thermo Scientific (Rockford, USA)

3.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Herstellung
10% SDS	10% w/v SDS-Pellets
10x Laufpufferstocklösung	192 mM Glycin; 24,8 mM Tris; pH 8,3
1x SDS-Laufpuffer	10% v/v 10x Laufpuffer; 0,1% v/v 10% SDS
10x DPBS	1,37 M NaCl; 26,8 mM KCl; 101,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 17,6 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
1x Roti Blockierlösung	10% v/v 10x Rotiblock-Konzentrat
10x TBS	0,2 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,6
1x TBS-T	10% v/v 10x TBS; 0,1% v/v Tween 20
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 Bromphenolblau
Antikörperlösung	5% w/v BSA; 10% v/v 10x TBS; 0,001% v/v Tween 20
Bradford-Reagenz	10% w/v Coomassie® Brilliant Blue G 250; 5% v/v Ethanol; 8,5% v/v H ₃ PO ₄
BSA-Standard	in 2D-Lysepuffer 100% w/v BSA in 2D-Lysepuffer
BSA-Standard in A.bidest	100% w/v BSA in A.bidest
CASY ton	154 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; in A.bidest
ECL-Lösung A	25% w/v Luminol Natriumsalz; in 0,1 M Tris; pH 8,6
ECL-Lösung B	110% w/v para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
Elutionspuffer	200 mM Glycin; 0,2% w/v SDS; 0,1% v/v Tween 20; in 100 mM Tris-HCl; pH 6,8
Home-Made Solution	90,99% v/v ECL-Lösung A, 0,027% v/v 30% H ₂ O ₂ , 9,088% v/v ECL-Lösung B
Milch-Block	5 ml 1xTBST; 5g Magermilchpulver
Poly-L-Lysin Solution	0,01% w/v Poly-L-Lysin in sterilem Wasser
Ponceau-S	0,2% w/v Ponceau S; 3% v/v Trichloressigsäure
RIPA-Lysepuffer-Gebrauchslösung	67% v/v Lysepuffer-Stammlösung; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 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

Sammelgelpuffer	8,0); 150 mM NaCl; 10 mM K ₂ HPO ₄ ; 10% v/v Glycerol; 1% v/v Triton X-100; 0,05% v/v SDS
Transferpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8 20% v/v Methanol; 10% v/v 10x Laufpufferstocklösung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8

3.1.4 Antikörper

Primärantikörper	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Anti-AR-XP™ rabbit	1:10000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-ERα rabbit	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-ERβ1 mouse	1:1000	Abcam plc. (Cambridge, UK)
Anti-ERβ2 rabbit	1:3000	Biorbyt Ltd. (Cambridge, UK)
Anti-GAPDH rabbit	1:10000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-HOP rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-HSP27 mouse	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-HSP40 rabbit	1:3000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-HSP60 rabbit	1:15000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-HSP70 rat	1:3000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-HSP90α rabbit	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-HSP90β rabbit	1:3000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Sekundärer Antikörper	Gebrauchsverdünnung	Hersteller
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

Anti-rat IgG, HRP-linked 1:5000
Antibody

Cell Signaling Technology,
Inc. (Danvers, USA)

3.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
LNCaP	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
PC-3	American Type Culture Collection (Manassas, USA)

3.1.6 Zellkultur: Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller/ Herstellung
10x Trypsin-EDTA 0,5/0,2 % in DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
2x Trypsin DPBS	20% v/v 10x Trypsin-EDTA in DPBS PAN Biotech (Aidenbach)
Einfriermedium	70% v/v RPMI 1640 mit Phenolrot 20% v/v FCS 10% v/v DMSO
Fetales Rinderserum (FCS)	Invitrogen (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin	PAN Biotech (Aidenbach)
Pyruvat	PAN Biotech (Aidenbach)
Medium RPMI 1640 mit Phenolrot Vollmedium (RPMI+ / + / +)	PAN Biotech (Aidenbach) RPMI 1640 mit Phenolrot 1% Penicillin/Streptomycin 1% Pyruvat 10% FCS (hitzeinaktiviert)

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Lagerung und Entnahme der Zellen

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien LNCaP und PC-3 Zellen wurden bei -140 °C eingefroren, dabei wurden 3×10^6 Zellen in niedriger Passage pro Kryokultur in Isopropanol gelagert. Um die Zellen zu konservieren, wurden diese mittels Trypsin vorbehandelt und aus der T75 Zellkulturflasche gelöst. Die Zellsuspension wurde in Vollmedium resuspendiert und anschließend bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Zellüberstand verworfen und das Pellet mit 3 ml Einfriermedium erneut resuspendiert. Anhand des CASY TT Cell Counters konnte dann die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf die Kryo-Röhrchen verteilt werden.

Das Auftauen der Zellen erfolgte langsam bei 37 °C. Mit 3 ml Vollmedium wurden die Zellen wieder resuspendiert, anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min. Der entstehende Zellüberstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 3 ml Vollmedium versetzt. Diese 3 ml wurden resuspendiert und zur weiteren Verwendung 17 ml Vollmedium zugeführt. Die Zellsuspension wurde bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in einer T75 Zellkulturflasche gelagert und lichtmikroskopisch auf Konfluenz kontrolliert. Bei 80 %iger Konfluenz erfolgte die Passagierung mit frischem Medium und die Einbringung in den Versuchsablauf.

3.2.2 Passagieren der Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte zweimal wöchentlich, dabei wurde vorerst die Konfluenz in der T75 Zellkulturflasche lichtmikroskopisch beurteilt. Bei 80 – 90 %iger Konfluenz der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt. Nach dem Waschen mit 10 ml DPBS, um nicht anhaftende Zellreste zu entfernen, wurde 1 ml 2xTrypsin zugegeben. Die Zellen inkubierten 3 Minuten bei 37°C in 2xTrypsin, nach Inkubation erfolgte das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden, mittels Medium konnten Zellreste von der Flasche gelöst und der Zellsuspension zugeführt werden. Bei androgensensitiven LNCaP Zellen wurde diese Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert, der Zellüberstand wurde abgesaugt und das Pellet anschließend, nach dem entsprechendem Umsetzungsverhältnis, mit neuem Medium versetzt. Von der entsprechenden Zellsuspension wurde 1 ml in eine neue T75 Zellkulturflasche überführt, in welcher bereits 19 ml Zellkulturmedium vorgelegt

waren. Bei PC-3 Zellen erfolgte das gleiche Verfahren aber ohne Zentrifugation, diese Zellen wurden im Verhältnis 1:4 bis 1:10 umgesetzt, für LNCaP Zellen lag das Verhältnis bei 1:3 bis 1:6. Für die Versuche wurden die Passagen 6 bis 30 verwendet.

3.2.3 Aussaat/ Ernte der Zellkinetiken und Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter

Für verschiedene Zellversuche wurden unterschiedliche Zellkulturgefäße verwendet, dabei wurden für Zellkinetiken 24-Well-Platten verwendet, welche mit Poly-L-Lysin Solution beschichtet waren. Im Falle von LNCaP wurden 10000 Zellen und bei PC-3 5000 Zellen am ersten Tag in je ein Well ausgesät. Die Ernte erfolgte alle 24h, dabei wurden die Zellen mit 500 µl 2xTrypsin für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurden diese 500µl in ein Eppendorf Reagiergefäß überführt, es erfolgte danach ein zweimaliges Waschen mit jeweils 500µl DPBS, welche ebenfalls dem Reagiergefäß zugeführt wurden, jeder Schritt enthielt fünfmaliges Resuspendieren. Von der entstandenen Zellsuspension, 1,5ml, wurden 100µl in 10ml CASYton gelöst und 10mal resuspendiert, vor der Zellzählung wurde das jeweilige CASY Cup dann 10mal invertiert. Die Zellzählung durch den CASY TT Cell Counter bezieht sich auf vitale Zellen, dabei wurde das Gerät auf die jeweiligen Zelllinien geeicht. Die ausreichende Resuspension erzielte die Vereinzelnung der Zellen, um vitale von toten Zellen zu unterscheiden. Es erfolgten durch das Gerät drei Messungen von welchen der Mittelwert bestimmt wurde, dieser wurde aufgrund des Suspensionsverhältnisses mit dem Faktor 1,5 multipliziert.

3.2.4 Behandlung mit Enzalutamid

24h nach der Aussaat der Zellsuspension in die jeweiligen beschichteten 24-Well oder 6-Well-Platten wird ein Mediumswechsel durchgeführt. Das Medium ist mit DMSO oder Enzalutamid versetzt und wird, den bis dahin an das Zellkulturgefäß angehafteten Zellen, zugeführt. Enzalutamid wurde dabei in DMSO, als Lösungsmittel, gelöst und für die verschiedenen Versuche weiterverdünnt. Die Ernte erfolgte alle 24h, die 24-Well Kinetiken wurden mit einer Inkubationsdauer von bis zu 144h untersucht. Die verwendete Wirkstoffkonzentration lag bei den LNCaP Zellen

bei 10µM und für PC-3 Zellen bei 30µM, je nach Zelllinie wurde auch die DMSO-Konzentration danach angepasst. Anhand der Zellzählung konnte dann mittels Excel eine statistische Auswertung und ein sigmoidaler Kurvenverlauf beobachtet werden. Es wurde also eine ausreichende Zellzahl für das Zellkulturgefäß ausgewählt, die nicht zu groß war, dass es aufgrund von eventuellem Nährstoffverlust oder Platzmangel zu Wachstumsverlusten kam.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Protein-Isolierung

Für das Verfahren der Proteinisolierung wurden 6-Well-Platten als Zellkulturgefäße verwendet. Pro Well wurden für PC-3 150000 Zellen und für LNCaP 300000 Zellen ausgesät. Nach 24h erfolgte die Zugabe von Enzalutamid oder DMSO-Lösungsmittel, worin die Zellen über 72h inkubierten. Die Ernte erfolgte jeweils nach 24h, nach Absaugen des Mediums lösten die PC-Zellen sich mittels 500 µl 2xTrypsin vom Boden. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl DPBS und Überführung in Eppendorf Reagiergefäße, wurde die Zellsuspension bei 5000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 30-50µl RIPA-Lysepuffer, je nach Pelletgröße und Zelllinie, resuspendiert. Das Zelllysate wurde anschließend mit 20 Ultraschallstößen bei 0,5 Cycle und einer Amplitude von 55% behandelt und dann bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung für das jeweilige Lysat dient der Standardisierung, um im Western Blot eine Vergleichbarkeit der Proteinmengen zu gewährleisten. Voraussetzung der Proteinkonzentrationsbestimmung ist die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant blue G250 an verschiedene Aminosäurereste der Proteine, dadurch erfolgt eine Änderung des Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben wurde immer eine Doppelbestimmung mit 2 µl Lysat, 18 µl zweifach destilliertes Wasser und 300 µl Bradford Reagenz in je ein Well der verwendeten 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und davon der Mittelwert bestimmt.

Als Referenz wurde eine Eichreihe durch Verdünnung eines definierten BSA-Standards hergestellt. Zur Erstellung der Standardgeraden wurde das BSA mit dem zweifach destillierten Wasser anteilig zu je 300 µl Bradford Reagenz pipettiert. (Tabelle 3) Nach einer 15 minütigen Inkubation im Dunkeln wurde die Extinktion bei 595nm durch den Tecan reader ausgelesen, dabei wurde die Referenzwellenlänge auf 360nm festgelegt. Nach der Messung konnten die Ergebnisse der Proben und der Eichgerade durch die entsprechende Software (i-control microplate reader) in ein Verhältnis gesetzt werden.

Tabelle 3: Pipettierschema zur Bradford Proteinkonzentrationsbestimmung

µg BSA	BSA (0,2µg/µl) in H₂O gelöst (µl)	Aqua bidest. (µl)	Bradford Reagenz (µl)
0	0	20	300
0,4	2	18	300
0,8	4	16	300
1,2	6	14	300
1,6	8	12	300
2,0	10	10	300
2,4	12	8	300
2,8	14	6	300
3,6	18	2	300

3.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wird ein Gelsystem aus einem 5% Sammelgel und einem 10% Trenngel verwendet. Zur Herstellung dieser Gele wurde eine Apparatur der Bio-Rad Gel Systems verwendet, hierbei wurden vorerst die Gele nach Pipettierschema angefertigt (siehe Tabelle 4), anschließend wurde erst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten mit einem dazwischen liegenden Abstandshalter einpipettiert. Direkt danach wurde, um den Einschluss von Luftblasen und ungerade Gelformen zu vermeiden, Aqua bidest. auf das Trenngel gegeben. Nach Polymerisation des Trenngels, war es mittels Filterpapier möglich das Wasser vom ausgehärteten Trenngel zu entfernen und das angefertigte Sammelgel über dem Trenngel zu verteilen. Um eine Taschenbildung für die Zugabe der Proben zu ermöglichen, wurde

ein Kamm mit zehn Taschen in das Sammelgel vor der Polymerisation eingefügt. Nach der Herstellung wurde das Polyacrylamidgel direkt verwendet oder in feuchtem Zellstoff bei 4 °C gelagert. Zur Gelelektrophorese wurden die Glasplatten, in welchen sich die Gele befinden, in Elektrophorese-Systeme eingespannt und mit kaltem 1x Laufpuffer in beide Kammern befüllt. Die SDS-PAGE macht es möglich die Proteine nach ihrem Gewicht und ihrer Ladung aufzutrennen. Das Polyacrylamid-Gel besitzt eine porenartige Struktur, daher können kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern und sind dementsprechend im unteren Bereich nachweisbar. (71) Durch Sodiumdodecylsulfat (SDS), welches im Ladepuffer enthalten ist, erhalten alle Proteine eine negative Ladung aufgrund von Wechselwirkungen mit Aminosäureketten. Damit wird der mögliche Einfluss von Protein-Eigenladung bei dem Lauf durch das Gel verhindert und die Proteine wandern in Richtung Anode der Gelapparatur.

Vor der Zugabe der Proben in die jeweiligen Taschen, werden diese mit 5x Ladepuffer versetzt, dieser enthält β -Mercaptoethanol, dann für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert, anschließend kurz abzentrifugiert und auf Eis abgekühlt. All diese Maßnahmen dienen der zusätzlichen Auftrennung des Proteins. Eine Tasche wurde dann mit 4 μ l Größenstandard (Page-Ruler) und 16 μ l 1x Ladepuffer aufgefüllt. Die anderen Taschen wurden mit 20-25 μ l der jeweiligen Probe bestückt und freie Taschen ebenfalls mit 20-25 μ l 1x Ladepuffer. Mit diesem Modell konnte das beste Laufverhalten der Proteine im Gel erzielt werden. Nachdem alle Taschen befüllt waren lief die Probe für 15 Minuten bei 80 V in das Sammelgel, anschließend erfolgte die Auftrennung bei 130 V für 100 Minuten im Trenngel bis das Gelende erreicht war.

Tabelle 4: Pipettierschema für ein SDS-Gel

	5% Sammelgel	10% Trenngel
Aqua bidest.	2,1 ml	2,4 ml
Sammelgelpuffer	0,375 ml	-
Trenngelpuffer	-	1,5 ml
30% Acrylamid	0,5 ml	2 ml
10% SDS	30 μ l	60 μ l
10% APS	30 μ l	60 μ l
TEMED	3 μ l	6 μ l

3.3.4 Western Blot

Beim Western Blotting werden die aufgeschlüsselten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dafür werden Nitrozellulosemembran, Filterpapiere und Polyacrylamidgel in Transferpuffer überführt. Anschließend wurden diese Bestandteile auf einer Glasscheibe in folgender Reihenfolge übereinander platziert: vier Filterpapiere, eine Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel und wieder vier Filterpapiere. Mit einem Falcon-Röhrchen wurden dann Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten herausgerollt. Mit 0,06 A wurde nachfolgend der Blot über eine Stunde, im sogenannten Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Nach 60 Minuten konnte direkt eine Übertragung des Größenmarkers festgestellt werden, zum Nachweis der Proteinspuren wurden die Nitrozellulosemembranen für 2-3 Minuten in einer Blotschale in einer roten Ponceau-S-Färbelösung geschüttelt. Mittels hydrophober Wechselwirkungen können die Proteine an die Nitrozellulosemembran binden, daher konnte das Polyacrylamidgel und die Filterpapiere verworfen werden. Nach dem der Proteintransfer durch die Färbung nachgewiesen wurde, konnte die Membran zweimal mit Aqua bidest. gewaschen und zur letzten Entfärbung mit 1xTBST gewaschen werden. Um eine ausreichende Blockierung zu gewährleisten, wurde die Membran für eine Stunde in einem Milchblock aus 0,5 g Magermilchpulver und 5 ml 1xTBST bei 4 °C auf einem Rollmischer invertiert. Anschließend erfolgte ein kurzes Waschen mit 1xTBST und die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung in Antikörperlösung. Diese Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für fünf Minuten in 1xTBST gewaschen, somit war der primäre Antikörper abgenommen. Der primäre Antikörper bleibt jedoch aufgrund der Antigen-Antikörperreaktion an die jeweilige Region auf der Nitrozellulosemembran gebunden, entsprechend dem nachzuweisenden Protein. Je nach dem welcher sekundäre Antikörper benötigt wurde, erfolgte eine 1:5000 Verdünnung für mouse, rabbit oder rat in 500 µl 1xRoti-Block und 4,5 ml destilliertem Wasser. Die Membran inkubierte eine Stunde in dieser sekundären Antikörperlösung, welche danach verworfen wurde. Es folgte ein nochmaliges Waschen in 1xTBST dreimal für fünf Minuten. Im Falle des Nachweises von ERβ1 und ERβ2 wurde vor Inkubation mit dem sekundären Antikörper eine nochmalige Blockierung mittels Milch-Block für 30-45 Minuten durchgeführt. Ziel dieser zusätzlichen Blockierung war ein klares und genaues Signal bei der Detektion der Proteinbanden. Für die Detektion wurde die

kommerzielle Detektionslösung SuperSignal™ West Dura verwendet, welche sich aus Solution A und Solution B zusammensetzt. Die Inkubationszeit mit dieser Lösung betrug je nach nachzuweisendem Antikörper 3-5 Minuten, es wurden von jedem der beiden Teilkomponenten zwischen 100-300 µl kombiniert und auf die Membran aufgetragen. Der enzymgebundene Sekundärantikörper, welcher mit seiner Fab-Region an die Fc-Region des primären Antikörpers gebunden hat, kann nun durch eine biochemische Reaktion der Detektionslösung nachgewiesen werden. (71) Bei dieser Reaktion erfolgt eine Oxidation des Luminols, welches in Solution B ist und somit kann ein Signal mittels Chemilumineszenz detektiert werden. Diese Reaktion wird durch Peroxidase ausgelöst, welche sich am sekundären Antikörper befindet. Nach der Zugabe der Detektionslösung, Solution A, erfolgt die Detektion über Densitometrie. Mittels ChemiDoc XRS+ wurde Signalnachweis und Dokumentation der einzelnen Antikörper ermöglicht, die Quantifizierung erfolgte durch die dazugehörige Software Image Lab™ Software Version 3.0. Vor einer erneuten Verwendung der Nitrozellulosemembran für Antikörpernachweise, wurde diese einmal kurz in 1xTBST gewaschen und für eine Stunde erneut im Milch-Block blockiert. Nach dieser Blockierung erfolgte ein erneutes Waschen in 1xTBST und die Zugabe des nächsten primären Antikörpers. Bei allen Nitrozellulosemembranen wurde abschließend Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) in seiner Proteinexpression detektiert. Dieses House-Keeping-Protein galt als Referenz und Ladungskontrolle aller durchgeführten Western Blots, es wurden nie mehr als drei verschiedene Proteine auf einer Membran detektiert.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Analyse der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel 2010, ebenso die Erstellung der Diagramme. Alle Daten verstehen sich als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD), diese Mittelwerte wurden auf die jeweilige Kontrolle normiert und nach mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Experiment ausgewertet. Der statistischen Auswertung diente der studentische T-Test, wobei die Signifikanzen wie folgt festgelegt wurden: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

4. Ergebnisse

4.1 Halbmaximaler inhibitorischer Effekt von Enzalutamid auf PC-Zellen

Die IC_{50} beschreibt in der Pharmakologie den halbmaximalen Effekt eines Wirkstoffs und damit die Wirkstärke. (72) Entsprechend der Wirkung ergibt sich das halbmaximale Wachstum der Zellen, wobei das Wachstum behandelter und nicht behandelter Zellen verglichen wird.

Für LNCaP Zellen zeigte sich ab 72h Inkubation mit einer Enzalutamid-Konzentration von $10\mu\text{M}$ ein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,001$) zu den mit DMSO-Lösungsmittel behandelten Zellen, welche als Kontrolle dienten (Abb. 3A). Eine antiproliferative Wirkung von $10\mu\text{M}$ Enzalutamid auf AR-positive LNCaP Zellen war aufgrund der antagonistischen Wirkung am AR zu erwarten.

AR-negative PC-3 Zellen zeigten ebenfalls von 72h bis 144h eine signifikante Wachstumshemmung, hier ergab sich eine etwas höhere IC_{50} von $30\mu\text{M}$ (Abb. 3B). Dieses Ergebnis weist auf eine AR-unabhängige Wirkweise von Enzalutamid hin.

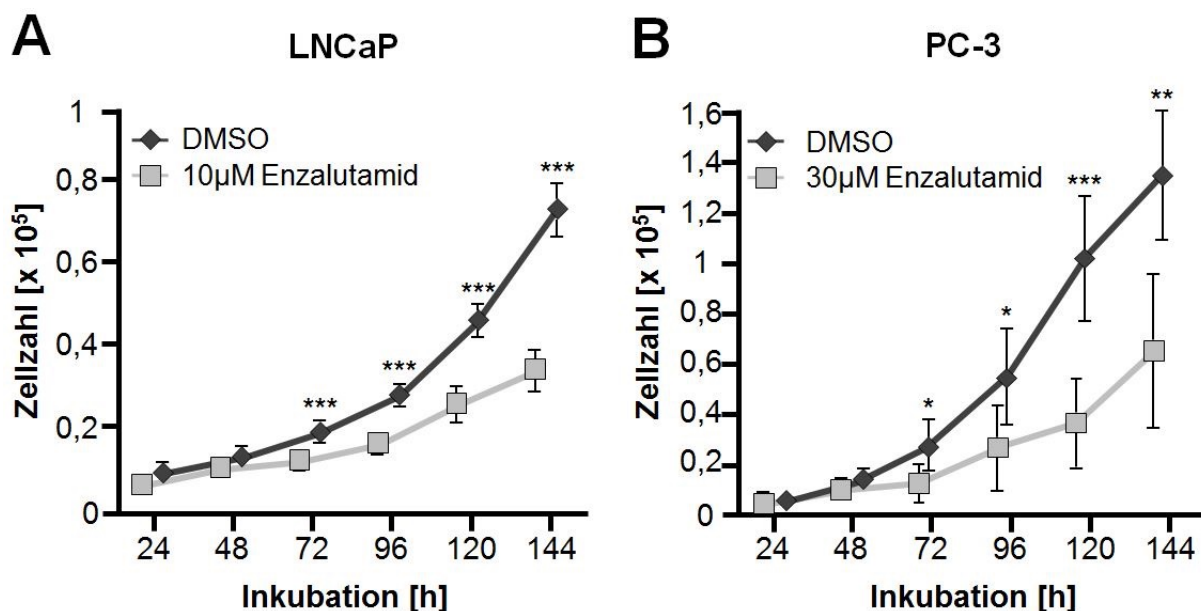


Abbildung 3: Wachstumskinetik von LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

Inhibition von LNCaP (A) und PC-3 (B) Zellen in Anwesenheit von $10\mu\text{M}$ (LNCaP) und $30\mu\text{M}$ (PC-3) Enzalutamid. Inkubationen mit dem Lösungsmittel DMSO dienten als Kontrolle. Die Zellzahlen wurden über einen Zeitraum von 144h bestimmt. Die Ergebnisse stammen aus mindestens sechs unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).*

4.2 Proteinanalyse der Expression AR-assoziierter Hitzeschockproteine

Die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 liegen in PC-Zellen in einem Komplex mit dem AR vor. Dieser Proteinkomplex ist verantwortlich für AR-Turnover und Aktivität, somit wird der vorzeitige Abbau des AR im Zytosol verhindert. (33) An dem Proteinkomplex aus HSP70 und HSP90 α/β sind zudem die Co-Chaperone HSP40 und HOP gebunden. (73) Durch die Bindung von Steroidhormonen, wie Testosteron oder DHT, wird der AR aus dem Komplex herausgelöst und dimerisiert. Es folgt die Translokation in den Nukleus, wo AR als Transkriptionsfaktor, über Zinkfinger-elemente an die DNA bindet und an Androgen-respondering-elements wirkt. (74, 75) Nachfolgend werden die Proteinanalysen der AR-assozierten Hitzeschockproteine HSP70, HSP90 α und HSP90 β in Anwesenheit von Enzalutamid über einen Zeitraum von 72h dargestellt.

Hitzeschockprotein HSP70

In AR-positiven LNCaP Zellen zeigte sich kein großer Effekt, bis auf eine geringe aber signifikante Induktion der HSP70-Expression nach 72h Behandlung mit Enzalutamid zur DMSO-Kontrolle (72h: $1,19 \pm 0,11$, $p=0,0381$) (Abb. 4A+B). In den AR-negativen PC-3 Zellen zeigte sich ebenfalls keine signifikante Beeinflussung durch Enzalutamid (Abb. 4C+D).

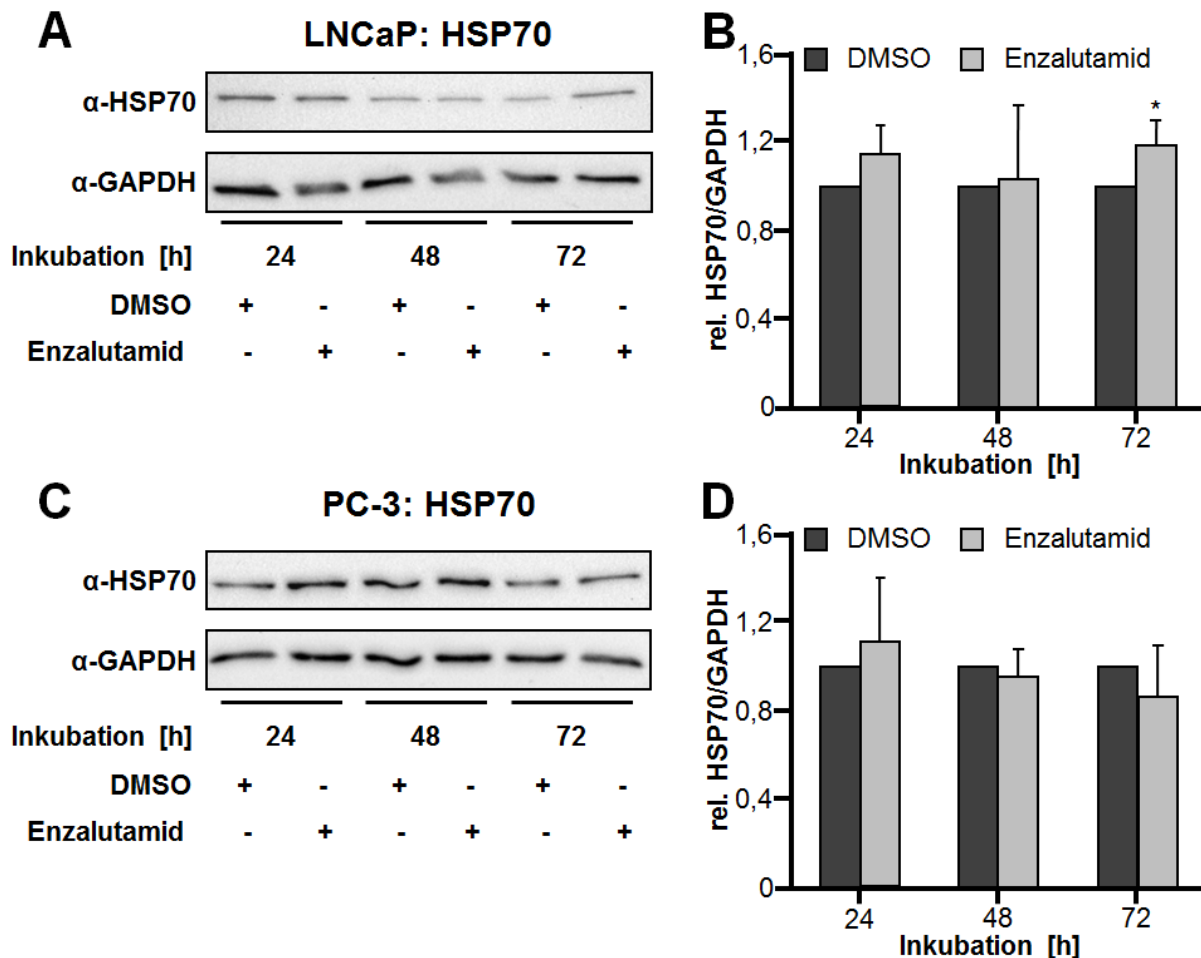


Abbildung 4: Western Blot Analysen von HSP70 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C+D) inkubiert mit $10\mu\text{M}$ (LNCaP) und $30\mu\text{M}$ (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's *t*-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)

Hitzeschockprotein HSP90 α

Hitzeschockproteine beeinflussen Proliferation, Motilität und Apoptose der Zelle. In der Tumorthherapie spielen sie daher eine herausragende Rolle, insbesondere HSP90 hat hierbei einen hohen Stellenwert. (76) HSP90 α , als Bestandteil des Multi-Chaperonkomplexes, zeigte in beiden untersuchten Zelllinien in der Proteinanalyse keine signifikante Veränderung der Expression nach 72-stündiger Inkubation mit Enzalutamid (Abb. 5A-D).

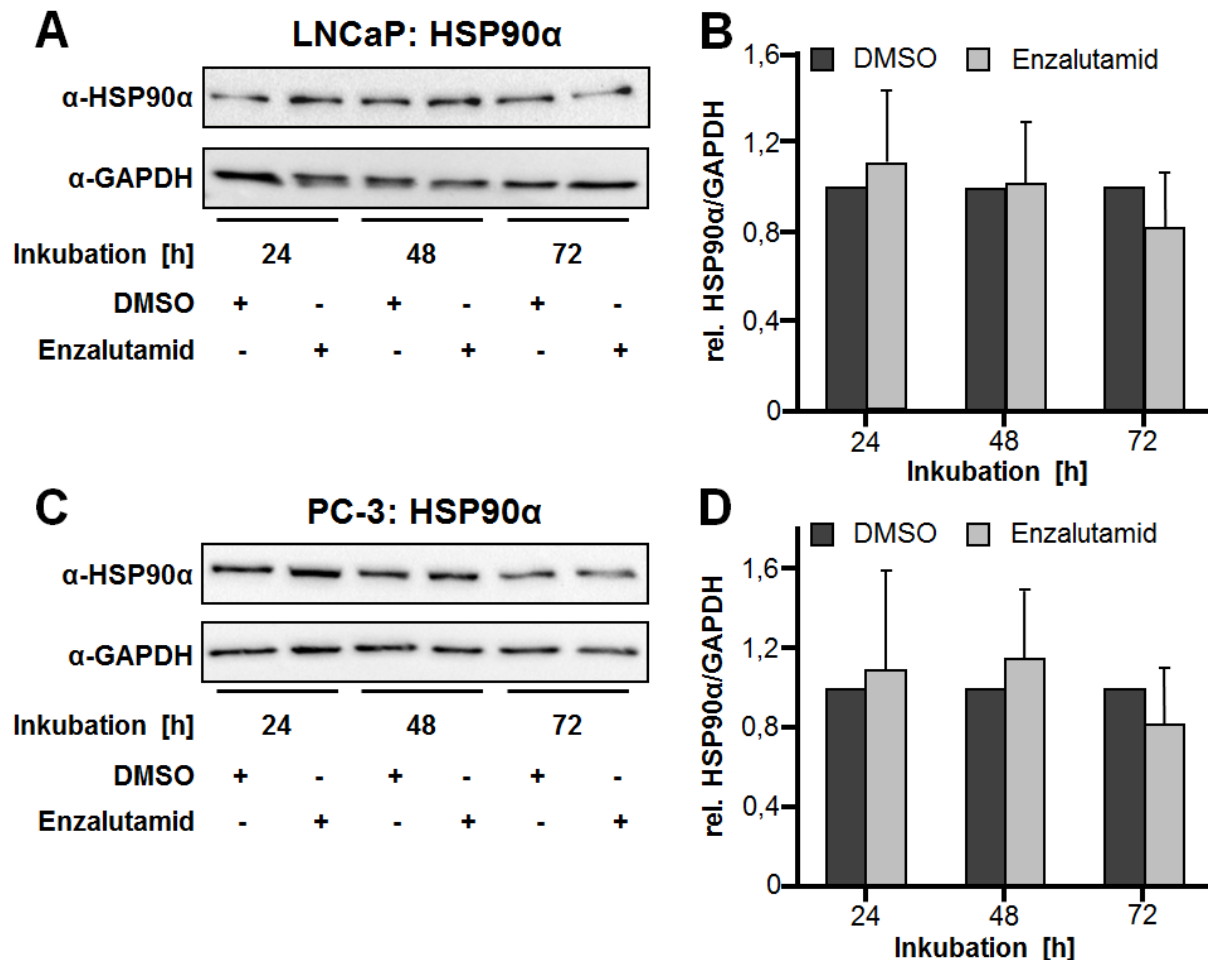


Abbildung 5: Western Blot Analysen von HSP90 α in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C+D) inkubiert mit 10 μ M (LNCaP) und 30 μ M (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens vier unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

Hitzeschockprotein HSP90 β

Die verschiedenen Isoformen von HSP90 sind zu 86% homolog. (77, 78) Die Proteinanalyse der verschiedenen Isoformen zeigte unter Enzalutamid-Inkubation unterschiedliche Ergebnisse, was auf unterschiedliche Funktionen hinweist. Die HSP90 β -Expression AR-positiver LNCaP Zellen (Abb. 6A+B) zeigte im Verlauf der Enzalutamid-Inkubation eine tendenziell abnehmende, aber signifikante Suppression. (24h: $0,49 \pm 0,28$, $p=0,0002$; 48h: $0,68 \pm 0,24$, $p=0,0176$; 72h: $0,84 \pm 0,13$, $p=0,0126$).

In AR-negativen PC-3 Zellen (Abb. 6C+D) bestätigte sich der supprimierende Effekt unter Enzalutamid, auch hier nahm die Suppression von HSP90 β im zeitlichen Verlauf ab, blieb aber signifikant (24h: $0,41 \pm 0,24$, $p=0,0005$; 48h: $0,54 \pm 0,24$, $p=0,0028$; 72h: $0,65 \pm 0,33$, $p=0,0439$).

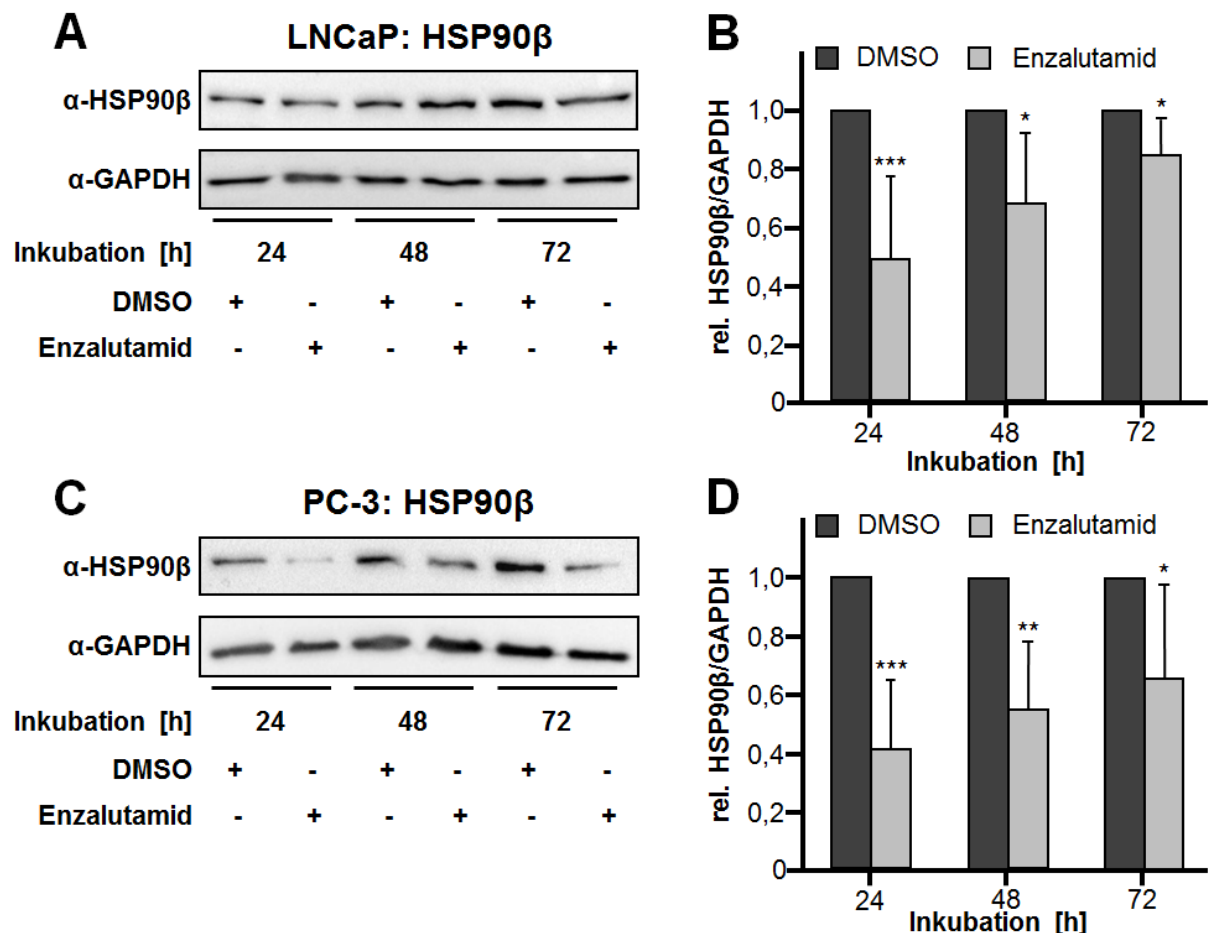


Abbildung 6: Western Blot Analysen von HSP90 β in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C+D) inkubiert mit 10 μ M (LNCaP) und 30 μ M (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

4.3 Proteinanalyse der Expression von Co-Chaperonen im AR-Komplex

Als Co-Chaperone nehmen HSP40 und HOP unterstützende und organisierende Funktionen im Zusammenspiel mit HSP70 und den Isoformen von HSP90 ein. HSP40, als Co-Chaperon von HSP70, wirkt der Ansammlung fehlgefalteter Proteine entgegen. (79) Es bindet direkt an HSP70 und reguliert die ATPase-Aktivität dieses Proteins. HSP70 ermöglicht den Transport fehlgefalteter Proteine zum HSP90-Komplex, dieser Transport erfolgt mittels HOP. (80) HOP hat zur Aufgabe, die Bindung zwischen HSP70 und HSP90 herzustellen, weiterhin spielt es eine wichtige Rolle bei der effektiven Faltung weiterer HSP90-assoziiierter Proteine. HOP ist in einer Vielzahl von Signalkaskaden eingebunden, welche die Stabilisierung des AR und des betreffenden Multi-Protein-Komplexes sicherstellen. (81, 82)

Als Bestandteil der im AR-Komplex vorkommenden Proteine, wurden nach HSP 70 und HSP90 α/β , die Co-Chaperone HSP40 und HOP mittels Proteinanalyse untersucht.

Hitzeschockprotein HSP40

Das Co-Chaperon HSP40 ist in seiner Funktion essentiell für die Aktivität von HSP70, daher ist die stressinduzierte Expression von HSP40 in der Tumorumgebung hoch. (83) Im Rahmen der Untersuchung von PC-Zellen wurde sowohl in PC-3 Zellen, als auch in LNCaP Zellen eine signifikante Suppression von HSP40 nach Enzalutamid-Behandlung nachgewiesen (Abb. 7A-D). Dies bestätigt die Konstellation der Co-Chaperone am AR und die Wirkung von Enzalutamid am AR-Komplex. In beiden Zelllinien zeigte sich mit Zunahme der Enzalutamid-Inkubation eine zunehmende Suppression der HSP40-Expression (in LNCaP Zellen: 24h: $0,54 \pm 0,23$, $p=0,0260$; 48h: $0,41 \pm 0,26$, $p=0,0036$; 72h: $0,43 \pm 0,17$, $p=0,0000$; in PC-3 Zellen: 24h: $0,39 \pm 0,17$, $p=0,0003$; 48h: $0,30 \pm 0,15$, $p=0,0000$; 72h: $0,20 \pm 0,05$, $p=0,0000$).

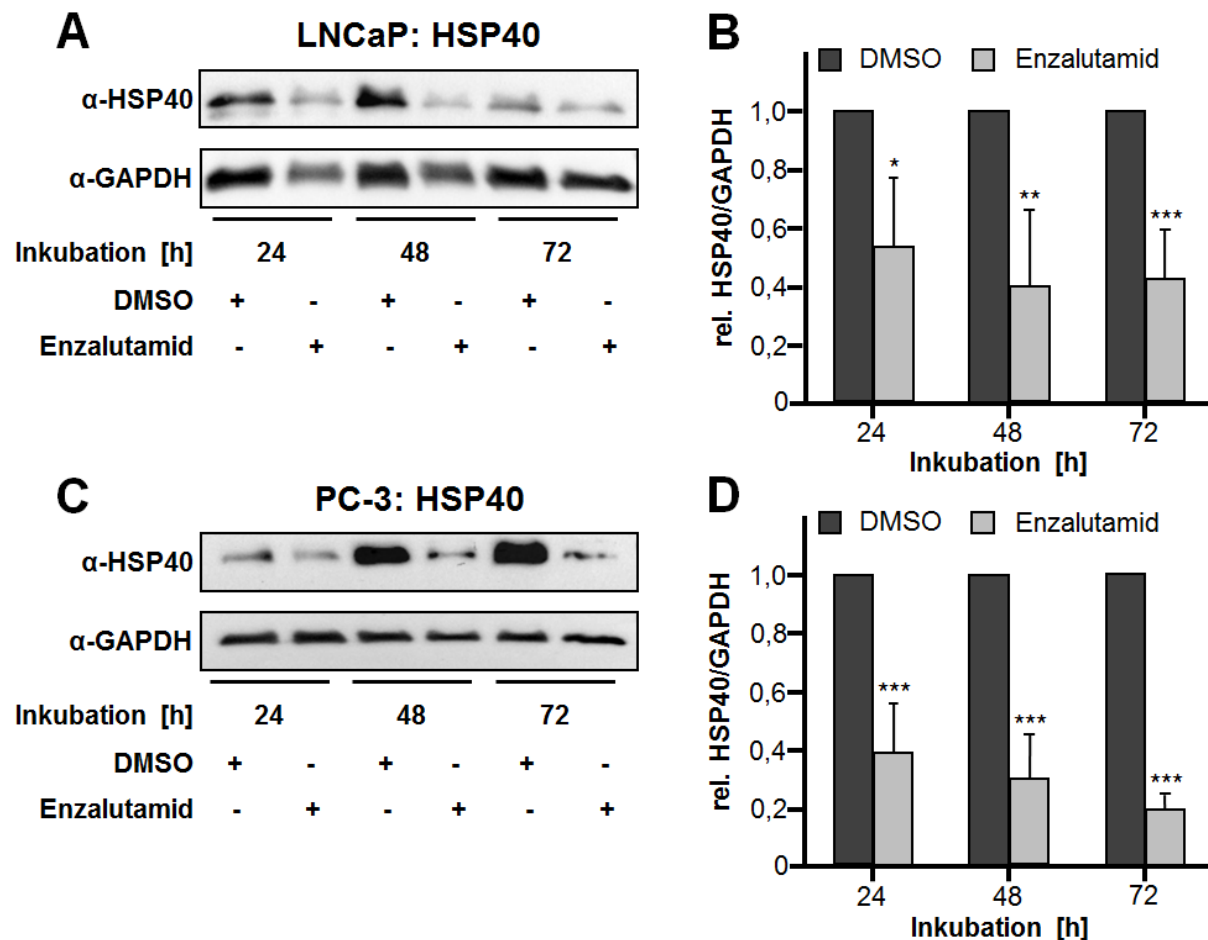


Abbildung 7: Western Blot Analysen von HSP40 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C+D) inkubiert mit $10\mu\text{M}$ (LNCaP) und $30\mu\text{M}$ (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

HSP70/HSP90-organising-protein (HOP)

Die Proteinanalyse der HOP-Expression ergab sehr unterschiedliche Ergebnisse nach Behandlung mit Enzalutamid. In AR-positiven LNCaP-Zellen zeigte sich nach 24h und 72h eine signifikante Suppression (24h: $0,70 \pm 0,29$, $p=0,0301$; 72h: $0,63 \pm 0,09$, $p=0,0000$), auch nach 48h war tendenziell ein supprimierender Effekt erkennbar (48h: $0,81 \pm 0,30$, $p=0,2012$) (Abb. 8A+B). AR-negative PC-3 Zellen zeigten im Vergleich dazu keine signifikante Veränderung der Proteinexpression von HOP (Abb. 8C+D).

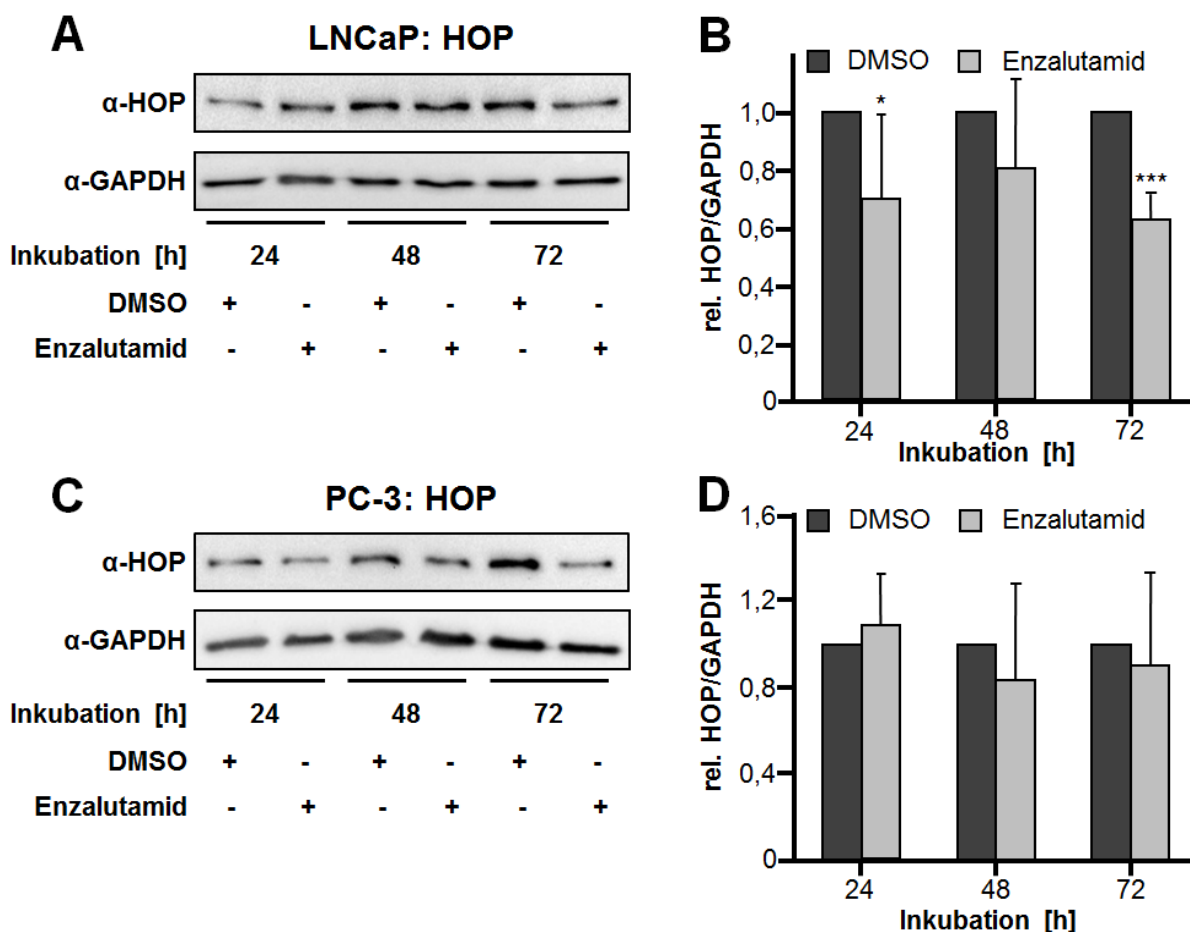


Abbildung 8: Western Blot Analysen von HOP in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C+D) inkubiert mit $10\mu\text{M}$ (LNCaP) und $30\mu\text{M}$ (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

4.4 Proteinanalyse der Expression des Apoptosefaktors HSP60

HSP60 ist ein apoptotischer Faktor, kommt in eukaryotischen Zellen im Mitochondrium und im Endoplasmatischen Retikulum vor und wird auch von PC-Zellen exprimiert. (84, 85) In vitro und in vivo wurden sowohl pro-apoptotische, als auch zytoprotektive Effekte maligner Zellen verschiedener Entitäten beobachtet, somit zeigten sich auch anti-apoptotische Effekte. (52, 86, 87) HSP60 ist ein molekulares Chaperon, welches als Apoptoseindikator gilt, es ist mit dem Zellzyklusregulator und Apoptose-Inhibitor Survivin assoziiert, daher ist von einer anti-apoptotischen Wirkung auszugehen. (88)

Die Behandlung von LNCaP Zellen mit Enzalutamid zeigte keine signifikante Veränderung der Expression von HSP60 über einen Zeitraum bis zu 72h (Abb. 9A+B). Im Gegenteil dazu wurde nach 24-stündiger Inkubation von PC-3 Zellen eine signifikante Suppression festgestellt (24h: $0,54 \pm 0,28$; $p=0,0068$), im weiteren Verlauf der Messungen war jedoch keine weitere Suppression feststellbar (Abb. 9C+D).

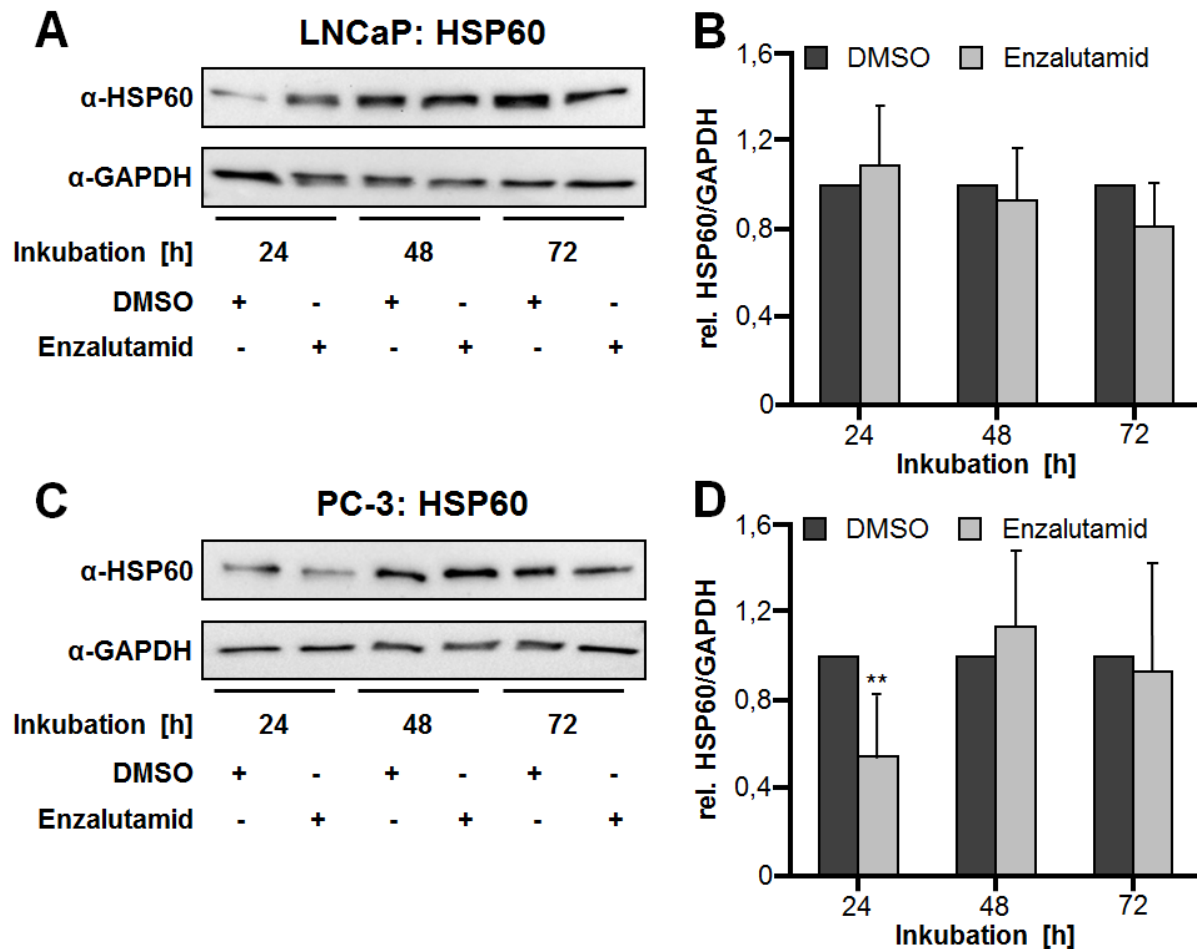


Abbildung 9: Western Blot Analysen von HSP60 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C+D) inkubiert mit 10 μ M (LNCaP) und 30 μ M (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)

4.5 Proteinanalyse der Expression des zytoprotektiven und AR-assoziierten HSP27

HSP27 ist maßgeblich an der Translokation des AR in den Nukleus beteiligt. Mittels Phosphorylierung von HSP27 durch MAP-Kinase 38 und PRKD1 kann der Transport des AR-Liganden-Komplexes erfolgen. (74, 75, 89) Dieses Hitzeschockprotein ist für den Zellschutz verantwortlich, mittels Taxan-Behandlung wurde eine Induktion von HSP27 in vorherigen Teilprojekten in PC-Zellen belegt. (90, 91)

Unter Enzalutamid zeigte sich in AR-sensitiven LNCaP Zellen (Abb. 10A+B) nach 24h ebenfalls eine signifikante Induktion von HSP27 (24h: $1,45 \pm 0,31$, $p=0,0109$), jedoch wurde die Expression im weiteren zeitlichen Verlauf der Inkubation nach 48h: $0,62 \pm 0,35$, $p=0,0145$ und 72h: $0,50 \pm 0,20$, $p=0,0000$ signifikant supprimiert. In AR-negativen PC-3 Zellen zeigte sich zu allen drei Zeitpunkten (24h: $0,39 \pm 0,25$, $p=0,0006$; 48h: $0,26 \pm 0,12$, $p=0,0000$; 72h: $0,14 \pm 0,08$, $p=0,0000$) eine zunehmende und signifikante Suppression von HSP27 unter Enzalutamid (Abb. 10C+D).

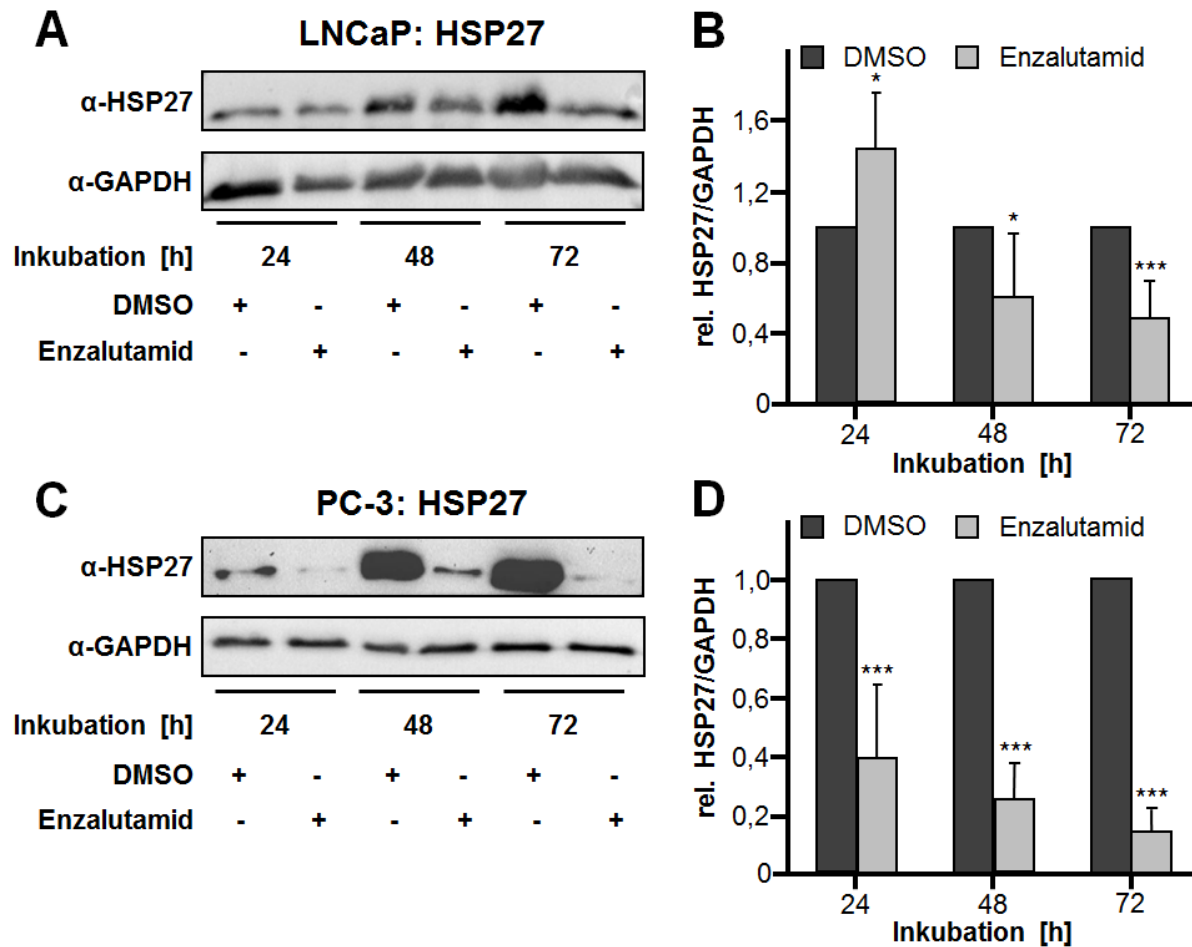


Abbildung 10: Western Blot Analysen von HSP27 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C+D) inkubiert mit 10 μ M (LNCaP) und 30 μ M (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

4.6 Proteinanalyse der Expression des Androgen-Rezeptors (AR)

Die Proteinanalyse des AR hatte einen besonderen Stellenwert in diesem Projekt. Zum einen ist der AR ein entscheidender Faktor für die Proliferation von PC-Zellen und hat große Bedeutung für die Entwicklung von Resistenzmechanismen. Zum anderen ist der AR in den Wirkmechanismus von Enzalutamid eingebunden. Es wirkt am AR, indem es die Bindungsstelle der Steroidhormone Testosteron und Dihydrotestosteron blockiert, weiterhin wird der Transport in den Nukleus, sowie die Bindung an die DNA, als Transkriptionsfaktor, gehemmt. (92)

Zum Nachweis des AR unter Enzalutamid eigneten sich die AR-positiven LNCaP Zellen (93). Mit der Behandlung von Enzalutamid wurde die Proteinexpression des AR zu allen drei untersuchten Zeitpunkten signifikant supprimiert (Abb. 11A+B) 24h: $0,46 \pm 0,39$, $p=0,0319$; 48h: $0,41 \pm 0,43$ $p=0,0152$; 72h: $0,33 \pm 0,22$, $p=0,0000$.

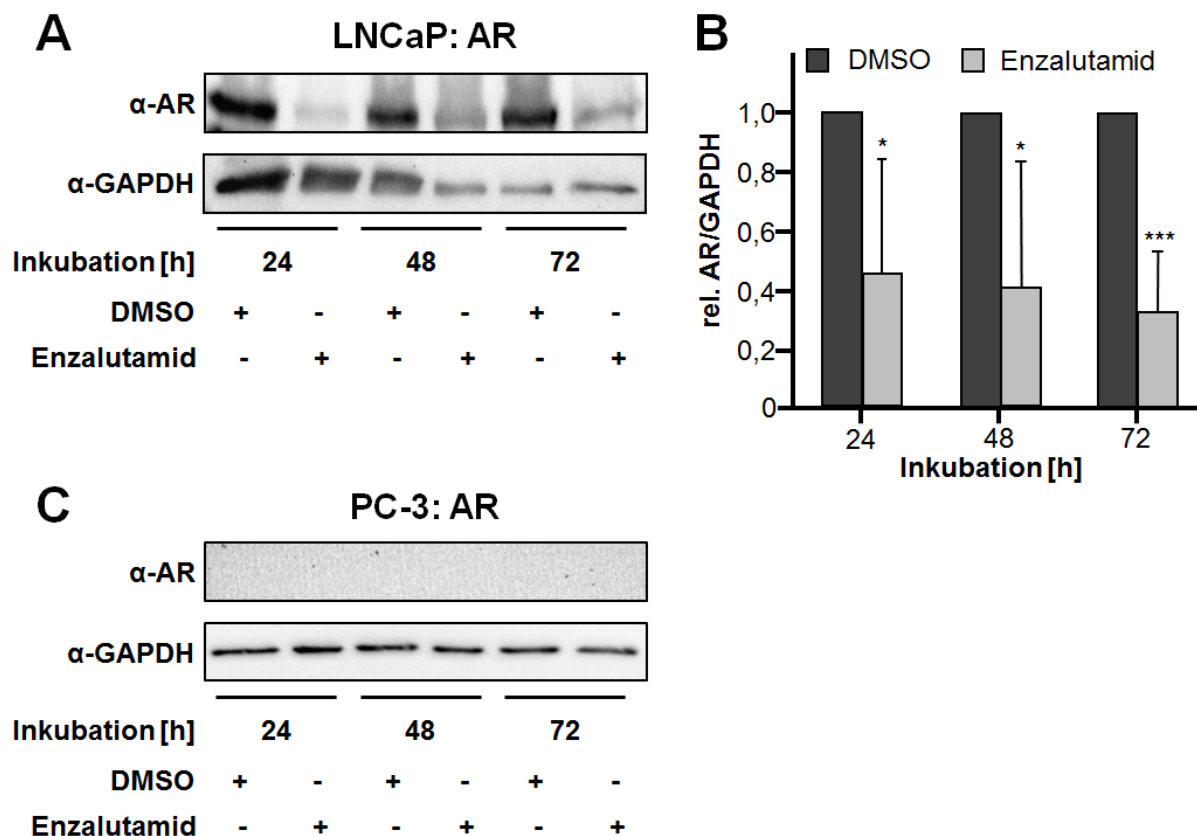


Abbildung 11: Western Blot Analysen von AR in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C) inkubiert mit $10\mu\text{M}$ (LNCaP) und $30\mu\text{M}$ (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B) von mindestens vier unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***).

4.7 Proteinanalyse der Expression des Östrogen-Rezeptors α (ER α)

Die Funktion des ER α in PC-Zellen ist nach Stand der heutigen Forschung noch nicht endgültig geklärt. Mit einer Größe zwischen 65 bis 70kDa lässt sich der Rezeptor mittels Proteinanalyse nachweisen und kommt in benignen und malignen humanen Prostata vor. (94, 95) Studien haben gezeigt, dass PC-assoziierte Lungenmetastasen und osteoblastische Knochenformationen durch ER α vermittelt sind. In diesen Versuchen wurde ebenfalls gezeigt, dass in LNCaP Zellen im Vergleich zu PC-3 Zellen der ER α -Proteinnachweis positiv ist, ER α mRNA wurde dagegen in allen getesteten Zellen nachgewiesen. (96) Die durchgeführten Proteinanalysen bestätigten diese Ergebnisse. In PC-3 Zellen war kein Nachweis von ER α möglich (Abb. 12C) und in LNCaP Zellen zeigte sich unter Behandlung von Enzalutamid keine signifikante Beeinflussung der Expression von ER α (Abb. 12A+B).

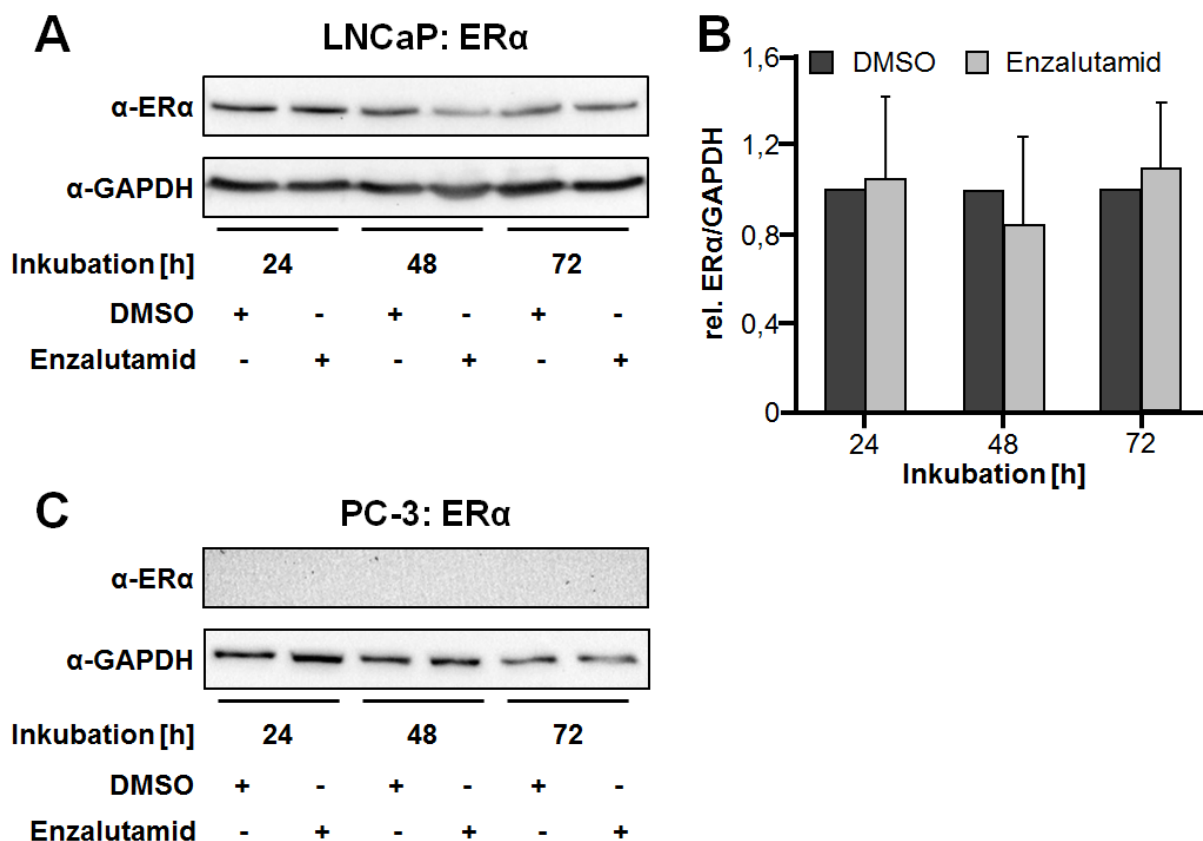


Abbildung 12: Western Blot Analysen von ER α in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C) inkubiert mit 10 μ M (LNCaP) und 30 μ M (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B) von mindestens sechs unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert \pm SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)

4.8 Proteinanalyse der Expression des Östrogen-Rezeptors β 1 (ER β 1)

ER β liegt in benignen und malignen humanen Prostaten sowohl im Stroma, als auch im Epithel vor. (95) ER β ist in mehrere Isoformen zu unterscheiden, in diesem Projekt wurden ER β 1 und ER β 2 untersucht. In benignen hyperplastischen Prostatazellen und PC-Zellen gilt ER β 1 in seiner Wirkung als antiproliferativ, tumorsuppressiv und Apoptose-induzierend. (97, 98)

Im Vergleich zu ER α konnte in beiden untersuchten Zelllinien Proteinexpression nachgewiesen werden. In LNCaP Zellen (Abb. 13A+B) zeigt sich zu 48h: $0,78 \pm 0,23$, $p=0,0205$ und 72h: $0,75 \pm 0,23$, $p=0,0036$ jeweils eine signifikante Suppression der Expression von ER β 1. In PC-3 (Abb. 13C+D) konnte dies zu allen drei untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden 24h: $0,66 \pm 0,22$, $p=0,0046$; 48h: $0,54 \pm 0,32$, $p=0,0059$; 72h: $0,70 \pm 0,29$, $p=0,0286$.

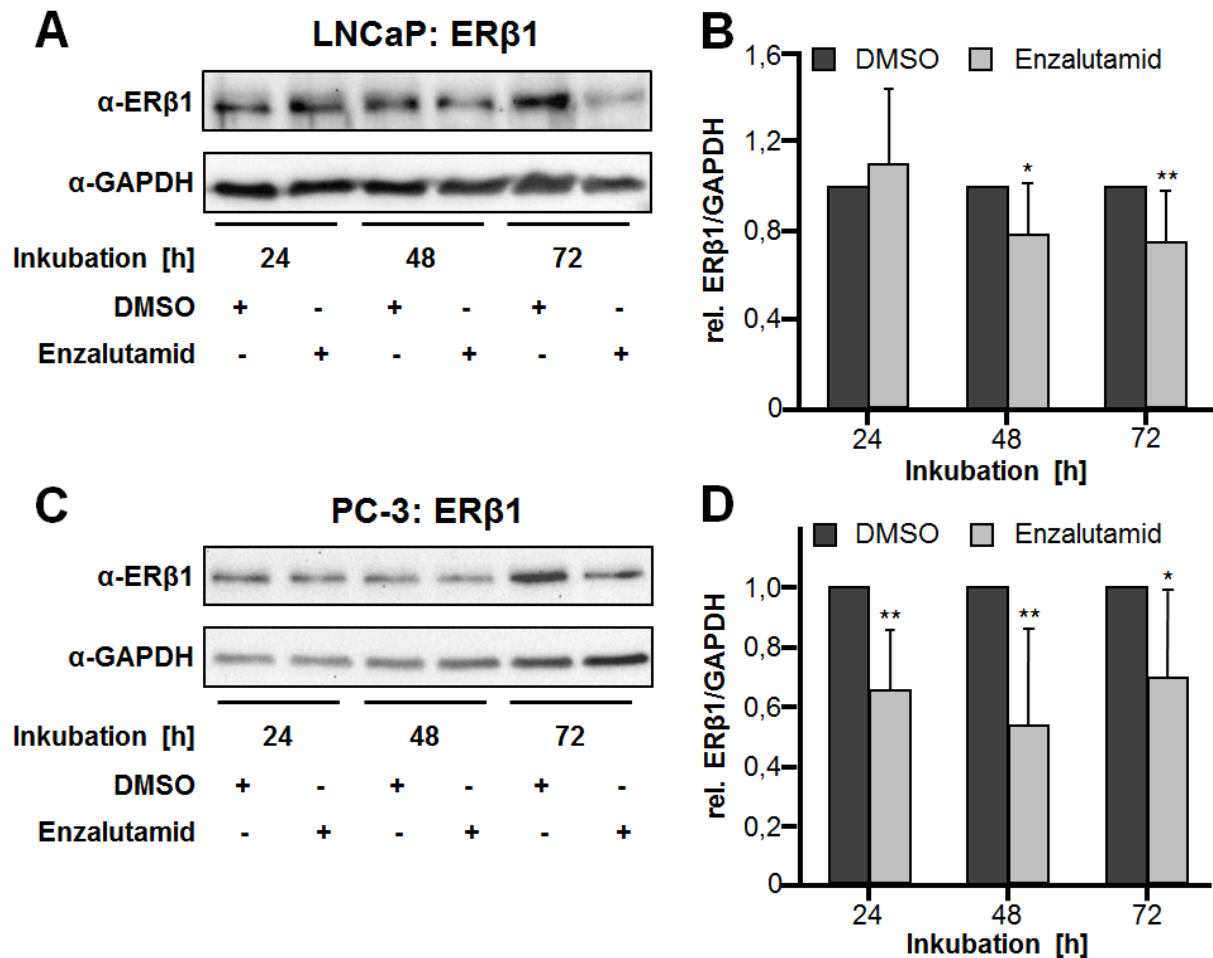


Abbildung 13: Western Blot Analysen von ERβ1 in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A+B) und PC-3 Zellen (C+D) inkubiert mit 10μM (LNCaP) und 30μM (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+C) und Quantifizierung (B+D) von mindestens fünf unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind Mittelwert ±SD der relativen Expression, normiert auf die Kontrolle DMSO=1,0. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test statistisch ausgewertet mit $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) und $p \leq 0,001$ (***)

4.9 Proteinanalyse der Expression des Östrogen-Rezeptors $\beta 2$ (ER $\beta 2$)

ER $\beta 2$ unterscheidet sich in seiner Funktion von ER $\beta 1$ insofern, dass es onkogene Eigenschaften hat und an der Proliferation osteolytischer Knochenmetastasen nach PC beteiligt ist. (99) Die Proteinanalyse erbrachte in keiner der beiden untersuchten Zelllinien einen Nachweis von ER $\beta 2$ -Expression (Abb. 14A+B).

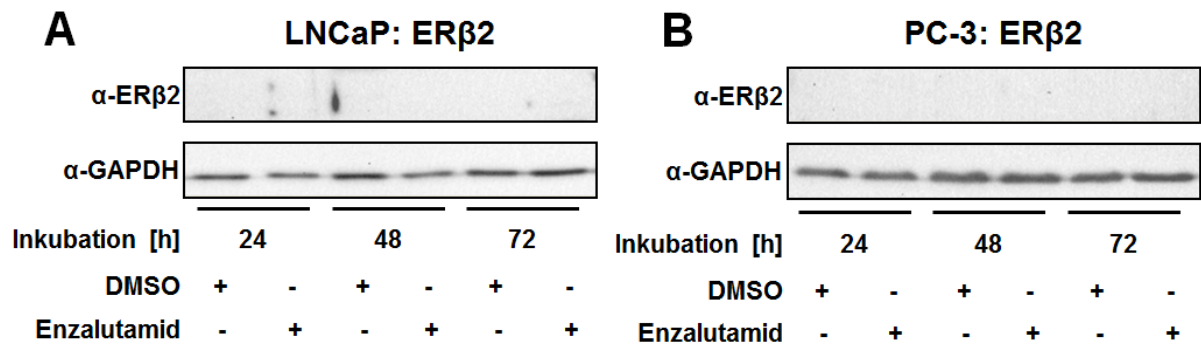


Abbildung 14: Western Blot Analysen von ER $\beta 2$ in LNCaP und PC-3 Zellen unter Enzalutamid

LNCaP Zellen (A) und PC-3 Zellen (B) inkubiert mit 10 μ M (LNCaP) und 30 μ M (PC-3) Enzalutamid über 72h. Western Blot Analyse (A+B).

5. Diskussion

In den letzten Jahren wurden neue Wirkstoffe entwickelt, welche die Überlebensrate der Patienten mit CRPC oder mCRPC signifikant verlängern. Bis 2010 war Docetaxel der einzige Wirkstoff, der die Überlebensrate der Betroffenen verbessert hat. Aufgrund Resistenzen konnte die Tumorprogression bei CRPC durch Docetaxel jedoch nicht dauerhaft unterbunden werden. In der Folge wurden weitere Taxane, wie Cabazitaxel getestet. (20, 100) Strahlentherapie oder Injektion intravenöser Radionukleotide (Radium-223) stellen ebenfalls eine Therapieoption dar. Beide Verfahren sind bei schmerzhaften Knochenmetastasen indiziert. Eine weitere Behandlungsmöglichkeit ist die autologe zelluläre Immuntherapie mittels Sipuleucel-T. Die chemotherapeutische Behandlung in Kombination mit einer Androgen-
unterdrückenden Therapie, zeigte dabei den größten Nutzen für den Patienten. (101) In der Hormontherapie sind Abirateron und Enzalutamid die Mittel der Wahl und stellen die neue Generation der CRPC-Therapeutika dar. (101) Abirateron als CYP17A1-Inhibitor verhindert die Androgen- und Glukokortikoidsynthese, womit weniger Steroidhormone vorhanden sind, die den AR aktivieren können. (102) Der Wirkstoff Enzalutamid (Handelsname: Xtandi) ist seit August 2012 von der FDA in den USA und seit Juni 2013 von der EMA in der Europäischen Union zur Behandlung von CRPC und mCRPC zugelassen. (21, 22) Enzalutamid ist im Rahmen der Hormontherapie im Falle einer Therapieresistenz nach Behandlung mit Docetaxel indiziert. Enzalutamid ist ebenfalls Mittel der Wahl, wenn klassische Hormontherapien, mit Medikamenten der alten Generation (Cyproteronacetat, Flutamid, Bicalutamid), nicht anschlagen oder bei chemotherapienaiven, symptomatischen und asymptomatischen Patienten. (101) Sowohl Abirateron, als auch Enzalutamid agieren in ihrer Wirkweise in der AR-Signalkaskade, in Kombination haben die Wirkstoffe nur ein begrenztes Wirkspektrum aufgrund von Kreuzresistenzen. (103)

Im Falle von Enzalutamid wird die Bindungsstelle der Steroide blockiert, die Translokation in den Nukleus inhibiert und die Transkription des AR an die DNA verhindert. (92, 104) Die Suppression des Wachstumsverhaltens der mit Enzalutamid-behandelten Zellen konnte in dieser Arbeit signifikant nachgewiesen werden, jedoch scheint der AR-Antagonismus nicht der einzige Wirkmechanismus

des Wirkstoffes auf PC-Zellen zu sein. In dieser Arbeit wurde auch eine signifikante Hemmung des Wachstumsverhaltens von AR-negativen PC-3 Zellen belegt, an denen Enzalutamid keine spezifische antagonistische Wirkung am AR haben kann. (105) In der Promotionsarbeit von B. Martin wurde die apoptotische Wirkung von Enzalutamid auf zellulärer Ebene nachgewiesen. Die Analytikergebnisse zeigten bei den p53 positiven LNCaP Zellen eine Induktion des pro-apoptotischen Faktors p53, sowie des pro-apoptotischen Faktors Bax. Bcl-2, als anti-apoptotischer Faktor, wird unter Enzalutamid supprimiert. In p53 negativen PC-3 Zellen zeigte sich ebenfalls eine Induktion von Bax und eine Suppression von Bcl-2, womit auch der apoptotische Effekt von Enzalutamid auf PC-3 belegt ist, es stellt sich nun die Frage welcher Wirkmechanismus diesem Effekt zugrunde liegt. Der prominenteste proliferative Faktor von PC-Zellen ist der AR. Als bekannt gilt der AR-Antagonismus von Enzalutamid, jedoch waren in dieser Arbeit weitere Angriffspunkte relevant, an denen Enzalutamid wirken könnte. Der AR liegt, geschützt vor vorzeitigem Abbau, in einem Multi-Proteinkomplex von Hitzeschockproteinen. (33) Daher lag es nahe die AR-assoziierten Hitzeschockproteine auf ihre Proteinexpression unter Enzalutamid zu untersuchen. Es zeigte sich eine signifikante Suppression des Hitzeschockproteins HSP90 β . HSP90 ist in zahlreiche onkogenetische Singnalkaskaden eingebunden und deswegen oft Ziel therapeutischer Ansätze auch im Falle von CRPC. (106, 107) Krebszellen haben einen höheren metabolischen Umsatz und sind im Vergleich zu gesunden Zellen einem höheren Stress ausgesetzt. Demzufolge benötigen sie mehr stressinduzierte Hitzeschockproteine, was sich in dem Großteil der Krebszellen in einer Überexpression von HSP90 widerspiegelt. (77, 108) HSP90 ist für onkogene Proteine, wie z.B. Her-2 essentiell. Es ist verantwortlich für Stabilität, Konformation und zelluläre Lokalisation dieser Proteine. (109, 110) Dies ist der Grund für die Bedeutsamkeit von HSP90 in der Tumorthherapie, wird es inhibiert, können die onkogenen Proteine nicht auf die Tumorgenese einwirken. HSP90 wird in die zytosolischen Isoformen HSP90 α und HSP90 β unterteilt, dabei stellt HSP90 α die induzierbare und HSP90 β die konstitutive Domäne dar. Weiterhin existieren Isoformen im endoplasmatischen Retikulum, wie GRP94 und im Mitochondrium, wie TRAP1. (111) HSP90 α nimmt in PC Zellen eine schützende Rolle für den AR ein. Das HSP dient der Aufrechterhaltung der Proteinfaltung und Verhinderung der Aggregation des AR. (112, 113) Unter Enzalutamid wurde in dieser Arbeit in LNCaP und PC-3 Zellen keine Beeinflussung

der Proteinexpression nach 48h Inkubation nachgewiesen. Nach 72h zeigte sich jedoch eine minimale aber nicht signifikante Suppression der HSP90 α -Expression. Die Funktion von HSP90 β in PC-Zellen ist bislang weitgehend unbekannt. In anderen Entitäten ist es für Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose verantwortlich. Nach Wu et. al. zeigte sich in Lungen-Adenokarzinom-Gewebe mit verstärkter HSP90 β -Expression eine signifikante Verschlechterung der Überlebensprognose nach Kaplan-Meyer-Analyse. (114) Aufgrund verstärkter Expression in Lungenkrebszellen konnte HSP90 β auch als potenzieller Serum-Biomarker bei Lungenkrebs identifiziert werden. (115) Unter diesen Gesichtspunkten war eine Betrachtung der Enzalutamid-Behandlung in PC-Zellen indiziert. Die HSP90 β -Expression wurde in LNCaP, sowie in PC-3 Zellen supprimiert, dies deutet auf einen antiproliferativen Effekt von Enzalutamid in PC-Zellen hin. Eine endgültige Aussage kann anhand dieser Arbeit jedoch nicht getroffen werden, da die Bedeutung von HSP90 β in PC-Zellen nach heutigem Stand der Forschung noch unklar ist.

Ein weiteres AR-assoziiertes und den AR-Komplex stabilisierendes Hitzeschockprotein ist HSP40. HSP40 zählt zu einer Proteinfamilie, dessen Funktion hauptsächlich darin besteht, die zelluläre Funktion und Regulation der ATPase-Aktivität von HSP70 zu definieren. (80, 116) Als Co-Chaperon von HSP70 am AR-Komplex konnte in PC-Zellen eine stressinduzierte Expression festgestellt werden. In dieser Arbeit zeigte sich eine Suppression der HSP40-Expression bei LNCaP und PC-3 Zellen, welche mit Enzalutamid behandelt wurden. (83) HSP40 ist auch bekannt als Chaperon DNAJ und hat 49 Isoformen und Splicevarianten, eine davon ist DNAJB8. In anderen Entitäten wurde DNAJB8 bisher umfangreicher untersucht. In Nierenkrebszellen zeigte sich eine signifikante antiproliferative Wirkung von DNAJB8 auf die Krebszellen. Aufgrund der hohen Anzahl an Isoformen und Splicevarianten sind genauen Auswirkungen der HSP40-Suppression in den untersuchten LNCaP und PC-3 Zellen nicht endgültig zu deuten. (80, 117) Als Bestandteil des Multi-Chaperonkomplexes gilt es dieses Hitzeschockprotein nachfolgend besser zu verstehen.

HSP70 ist auch mit anderen HSP assoziiert, beispielsweise mit HSP90 durch das HSP70/HSP90 organising Protein (HOP). HOP gilt als funktionelles Bindeglied zwischen HSP70 und HSP90 und somit als stabilisierender Co-Faktor im Multi-Chaperonkomplex am AR. (81) Unter dem Einfluss von Enzalutamid zeigte sich in AR positiven LNCaP Zellen eine tendenzielle Suppression der HOP-Expression über

72h. Diese Wirkung konnte in PC-3 Zellen nicht signifikant bewiesen werden. Der fehlende AR kann ein Grund für die fehlende supprimierende Wirkung von Enzalutamid auf die HOP-Expression bei PC-3 Zellen sein. HOP hemmt die ATPase-Aktivität, welche notwendig ist um die Funktion des HSP90-Dimers zu aktivieren. Wird HOP in seiner Protein-Expression also supprimiert könnte man von einer Induktion eines oder beider HSP90-Dimere ausgehen, jedoch konnte diese Erkenntnis im Experiment nicht bestätigt werden. (118)

Ein weiteres Hitzeschockprotein, welches bei der Untersuchung der Wirkweise von Enzalutamid betrachtet wurde, war HSP60. HSP60 gilt als Apoptosefaktor mit Lokalisation im Mitochondrium und im Endoplasmatischen Retikulum, laut Literatur werden diesem HSP sowohl pro-, als auch anti-apoptische Wirkung zugeschrieben. (52, 84–88) Als pro-apoptischer Faktor, sollte HSP60 unter Enzalutamid in PC-Zellen induziert werden, wie es auch in anderen Krebszellen bewiesen wurde. (47, 119) LNCaP Zellen zeigten keine signifikante Induktion der HSP60-Expression über dem Grundlevel. PC-3 Zellen dagegen reagierten nach 24h mit einer signifikanten Suppression der HSP60-Expression, was auf eine anfängliche Resistenz oder Apoptose der PC-3 Zellen auf Enzalutamid hindeuten kann. Nach 48h bis 72h entwickelte sich jedoch keine Induktion bzw. Suppression der HSP60-Expression, wie es vermutet wurde. PC-3 Zellen unter Behandlung des Hormontherapeutikums Abirateron zeigten den gleichen Effekt. Sie unterlagen einer leichten Suppression, ein Resistenzmechanismus lag dem jedoch nicht zugrunde, da eine deutliche Induktion von HSP60 in LNCaP Zellen ermittelt wurde. (120) Nach Gosh et al. zeigte sich nach HSP60-Ablation eine Verringerung des Apoptose-Inhibitors Survivin und daraufhin eine Caspase-abhängige Apoptose. (88) Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit ist ebenfalls von einer anti-apoptischen Wirkung von HSP60 auszugehen, welche mittels Enzalutamid unterdrückt wird. Auch nach gentechnischen Untersuchungen zeigte sich die extrem präzise Regulation von HSP60. Sowohl nach Überexpression, als auch nach Knock-Down von HSP60 in LNCaP Zellen, stellte sich nach 48h wieder das Basisniveau ein. (121) Diese Untersuchungen spiegelten sich auch in der Behandlung von PC-3 Zellen unter Enzalutamid wieder.

Die Behandlung von Enzalutamid zeigt Auswirkungen auf die AR-assoziierten Hitzeschockproteine, welche mit ihren unterschiedlichen Funktionen entscheidend für die Wirkweise von Enzalutamid sind. HSP27 nimmt eine besondere Stellung ein,

aufgrund mehrerer ausschlaggebender Eigenschaften auf PC-Zellen. In den betrachteten Zelllinien ist die unterschiedliche Basalexpression von HSP27 zu beachten, wobei hormonsensitive LNCaP Zellen ein höheres Basallevel als hormonresistente PC-3 Zellen besitzen. (89) HSP27 gilt als zytoprotektiver Faktor in humanen PC-Zellen. (90) Als Proonkogen nimmt HSP27 Einfluss auf die Motilität der PC-Zellen. Eine hohe HSP27-Expression geht mit einem hohen Metastasierungsgrad einher. (122) Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch im Gleason-Score wieder, ein hoher Wert in diesem Grading korreliert mit einer hohen HSP27-Expression. (123) Damit der AR als proliferativer Faktor in PC-Zellen wirken kann muss die Translokation in den Nukleus gewährleistet sein, um so als Transkriptionsfaktor fungieren zu können. (124) Dieser Transport erfolgt mit Hilfe von HSP27, was durch MAP-Kinase 38 und PRKD1 phosphoryliert und aktiviert wird. (89, 125) Aufgrund dieser Schlüsselfunktionen wurde die HSP27-Expression unter Einfluss verschiedener Wirkstoffe untersucht. Unter Docetaxel stellte sich ein induzierter Resistenzmechanismus ein, dementsprechend stieg die HSP27-Expression an. (49) Der CYP17A1-Inhibitor, Abirateron, zeigte dagegen eine Suppression der HSP27-Expression im Verlauf der Inkubation sowohl in LNCaP als auch in PC-3 Zellen. (91) Die HSP27-Expression der PC-Zellen, die mit Cabazitaxel behandelt wurden, wurden ebenfalls supprimiert. Nur LNCaP-Zellen zeigten nach 24h eine minimale Induktion. (126) Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei der Behandlung von LNCaP und PC-3 Zellen mit Enzalutamid. Nach einem signifikanten Anstieg der HSP27-Expression bei 24h in LNCaP Zellen, war nachfolgend eine signifikante Suppression zu verzeichnen. In PC-3 Zellen wurde ebenfalls ein supprimierender Effekt von Enzalutamid auf die Proteinexpression von HSP27 belegt. Dieser Nachweis kann eine Erklärung für die Wirkweise von Enzalutamid auf AR negative PC-3 Zellen darstellen. Der Suppression der HSP27-Expression folgen ein verminderter Zellschutz und eine verminderte Motilität der PC-3 Zellen. Die in vitro Ergebnisse bestätigen damit die Anwendung von Enzalutamid im klinischen Alltag. Als Bestandteil der Sekundärtherapie bei CRPC kann mittels Enzalutamid, nach Docetaxel-Behandlung, das reaktiv angestiegene HSP27-Level wieder supprimiert werden. (127) Eine Kombination mit anderen Hormontherapeutika, wie Abirateron, oder HSP27-Inhibitoren wäre aber nicht sinnvoll, da die HSP27-Expression bereits stark unterdrückt wird.

Betrachtet man die Wirkorte und Wirkweisen von Enzalutamid in PC Zellen die bisher bekannt sind, wird die Bindungsstelle der Steroide am AR blockiert, die Translokation des AR in den Nukleus und die Transkription des AR an die DNA inhibiert. (92, 104) Anhand der Untersuchungen des AR und der HSP in diesem Projekt hat sich zusammenfassend eine deutliche Beeinflussung der Proteinexpression von AR, HSP90 β , HOP, HSP40 und HSP27 gezeigt. Diese Ergebnisse korrelieren mit den bereits bekannten Wirkorten und Wirkweisen von Enzalutamid. Beispiel dafür ist die Blockade der Steroidbindungsstelle, welche mit einer Suppression verschiedener HSP einhergehen könnte. Oder die verminderte HSP27-Expression, welche mit der Inhibition der AR-Translokation in den Nukleus verbunden sein kann. (siehe Abb.15)

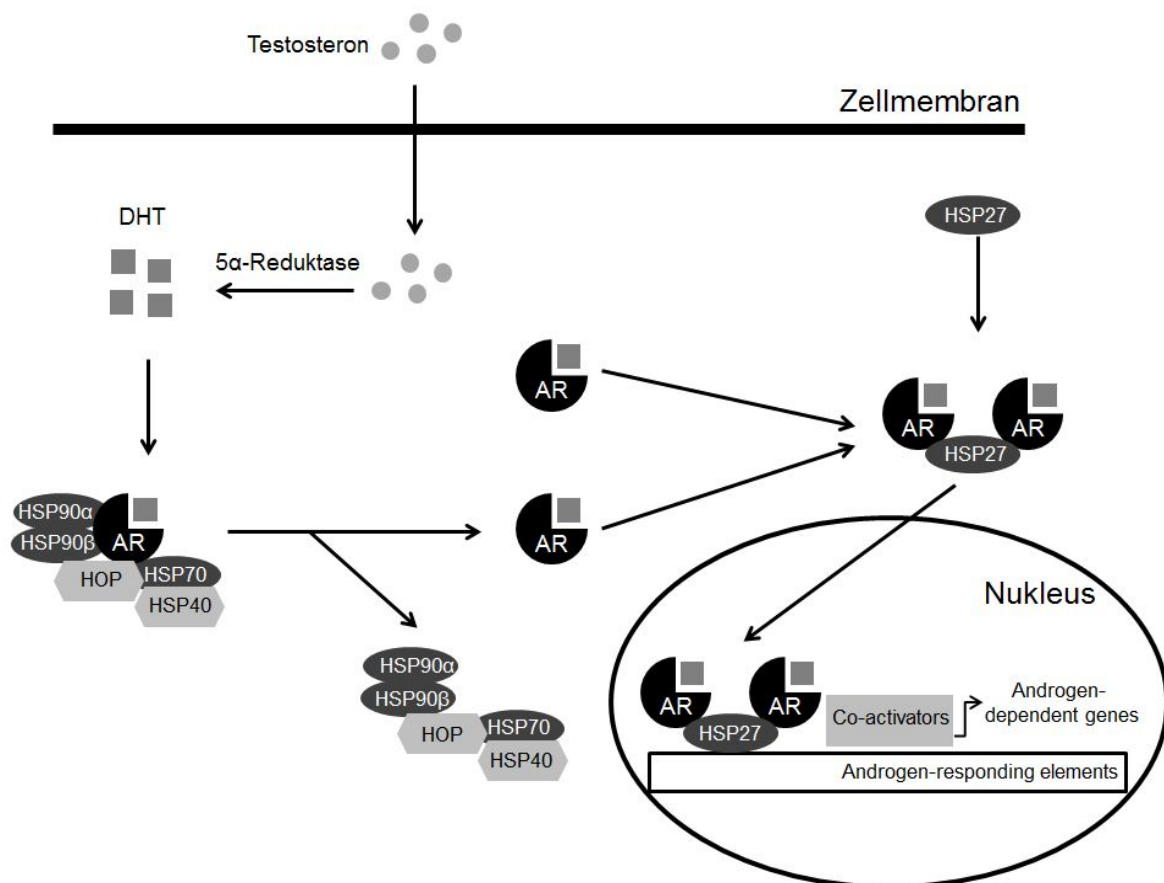


Abbildung 15: Modell des AR-HSP-Komplexes mit Liganden-Bindung durch Dihydrotestosteron (DHT) modifiziert nach Ischia et al. (2013), Curr Opin Urol

Der AR gilt als maßgeblicher Wachstumsfaktor für PC-Zellen. Im Verlauf der Therapie des PC entwickelt sich dieses jedoch meist zum CRPC. Demzufolge nimmt AR-Sensitivität im Verlauf der Behandlung ab; da die PC-Zellen AR-unabhängig werden, wie es im Zellmodell die PC-3 darstellen. (128) Als notwendiger Aktivator

des AR ist Testosteron oder Dihydrotestosteron notwendig. Mit dem Alter des Mannes nimmt auch sein Testosteronspiegel ab, der Östrogenspiegel bleibt im Vergleich dazu konstant. (129) Zusätzlich zeigte Ellem et al. den Zusammenhang von lokalen Aromatasen und der Malignität bei PC. (130) Diese Fakten veranlassten eine genauere Untersuchung der Östrogenrezeptoren in LNCaP und PC-3 Zellen vor allem unter Enzalutamid, da es Grund zur Annahme gibt, dass Östrogene einen stimulierenden Einfluss auf PC-Zellen haben. Von Östrogenrezeptoren sind mehrere Isoformen bekannt, von diesen wurden in dieser Arbeit ER α , ER β 1 und ER β 2 betrachtet. ER α wird vorwiegend im Stroma der Prostata exprimiert, in benignen und malignen Prostatazellen fungiert der Rezeptor unter Östrogeneinfluss proliferativ und inflammatorisch. (131, 132) Bei japanischen und afrikanisch-amerikanischen Männern wurde ein erhöhtes Risiko für PC mit genetischem Polymorphismus im ER α -Gen festgestellt. (133, 134) Unter Behandlung von Enzalutamid zeigte sich in LNCaP Zellen jedoch keine signifikante Veränderung der Proteinexpression von ER α . Der Proteinnachweis war in PC-3 Zellen dagegen nicht möglich (96). Laut Literatur ist in beiden Zelllinien der Nachweis von ER α mRNA möglich, bezüglich des Nachweises der Proteinexpression von ER α existieren widersprüchliche Aussagen. (135, 136) Im Gegenteil dazu fungiert ER β 1 antiproliferativ, tumorsuppressiv und antiinflammatorisch in benignen Prostatazellen und PC-Zellen, dies belegten Untersuchungen am Tiermodell. (137) In erwachsenen humanen Prostaten wird ER β 1 vorwiegend im basalen und luminalen Epithel exprimiert, zellulär betrachtet ist der Rezeptor im Zytoplasma lokalisiert. (138–140) In humanen benignen Prostatazellen hat sich die Funktion von ER β 1 bestätigt, indem durch Methylierung ein Verlust des Rezeptors imitiert wurde. Die Folge war ein unreguliertes Wachstum und fehlende Entdifferenzierung der Zellen. (141) In dieser Arbeit wies die Inkubation von PC-Zellen mit Enzalutamid eine eindeutige Suppression der ER β 1-Expression nach. Die LNCaP Zellen wurden ab 48h und die PC-3 Zellen von 24h an signifikant supprimiert. Horvarth et al. zeigten, dass ein Verlust der ER β -Expression mit einer Progression von normalen Prostataepithel zu PC einhergeht, jedoch ermittelten sie auch, dass Krebsarten mit bestehender ER β -Expression eine höhere Rezidivrate haben. (95) Die vorhandenen Daten machen es schwierig ER β 1 klare Rollen zuzuschreiben, es besteht der Nachweis für eine tumorsuppressive Wirkung, Lai et al. zeigten jedoch, dass Metastasen von Prostatatumoren auch ER β exprimieren. (142) In den bestehenden Quellen wurde keine klare Differenzierung zwischen ER β 1

und ER β 2 getroffen, jedoch konnte ein ER β -AR-Komplex in LNCaP entdeckt werden. (143) Dieser Komplex wurde auch positiv auf funktionelle Zusammenhänge nach Östrogenbehandlung getestet. Diese ER β -AR-Interaktion erklärt den gleichartigen supprimierenden Effekt von Enzalutamid auf die Proteinexpression beider Rezeptoren.

Ein weiteres Isoform der ER-Familie ist ER β 2, dieser Rezeptor ist im Zellkern von PC Zellen lokalisiert. (140) Dem Rezeptor werden unter Einfluss von Östrogen onkogene Eigenschaften zugeschrieben, außerdem ist er an der Proliferation osteolytischer Knochenmetastasen nach PC beteiligt. (99, 144) Der Proteinnachweis mittels Western Blot war in den betrachteten Zelllinien negativ. Laut aktueller Literatur ist der Proteinnachweis von ER β 2 in PC-3 Zellen möglich, jedoch konnte dies in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Bei Betrachtung des verwendeten primären Antikörpers für den in der Quelle verwendeten Rezeptornachweis ist aufgefallen, dass der Hersteller, Proteintech Group, Inc. (Rosemont, IL, USA), diesen nicht mehr führt. Nach eingehender Recherche war kein klarer Nachweis von ER β 2 in PC-3 oder LNCaP Zellen, mittels Western Blot Methodik, vorzufinden. Die Untersuchung der Östrogenrezeptoren ist für die zukünftige Forschung in PC-Zellen sehr relevant. Als möglicher Therapieansatz bei CRPC spielen Östrogene eine entscheidende Rolle. In Brustkrebszellen wurden jüngst funktionelle Interaktionen von ER α und HSP70 ermittelt, dies lässt auf weitere Zusammenhänge von ER und HSP vielleicht auch in PC-Zellen schließen. (145)

6. Zusammenfassung

Enzalutamid ist seit 2012 ein zugelassenes Medikament für die Hormontherapie nach Docetaxel-Behandlung bei CRPC. (21) Als bekannter Wirkmechanismus gilt der Antagonismus am AR und die Verhinderung der Translokation in den Nukleus, sowie die Inhibition der Transkription am AR. (92, 104)

In dieser Arbeit wurde der Wirkmechanismus von Enzalutamid auf zellulärer und molekularer Ebene präzisiert. In der Wachstumskinetik zeigt sich eine Wachstumshemmung sowohl der AR-positiven LNCaP Zellen, als auch der AR-negativen PC-3 Zellen. Zur Untersuchung des antiproliferativen Effektes von Enzalutamid betrachtet diese Arbeit AR-assoziierte Wachstumsfaktoren, den AR selbst und Östrogenrezeptoren. Als Einflussgrößen gelten die AR-assoziierten Proteine, wie HSP27, HSP70, HSP90 α/β und die Co-Chaperone HSP40 und HOP. Hierbei zeigte vor allem HSP27 aber auch HSP90 β eine deutliche Suppression der Protein-Expression in beiden Zelllinien. Die Untersuchung der Proteinexpression der Co-Chaperone, HSP40 in beiden Zelllinien und HOP in LNCaP Zellen, ergab ebenfalls eine deutliche Suppression. Diese Proteine, insbesondere HSP27, haben aufgrund ihrer zellulären Funktion Einfluss auf die Proliferation der PC-Zellen, somit kann ein supprimierender Effekt unter Enzalutamid die Erklärung für das eingeschränkte Wachstum der LNCaP Zellen aber auch der hormonresistenten PC-3 Zellen sein. In LNCaP Zellen konnte der supprimierende Effekt von Enzalutamid auf die AR-Expression bestätigt werden. Als weiteren möglichen Proliferationsfaktor wurde in dieser Arbeit der ER mit seinen Isoformen ER α , ER β 1 und ER β 2 untersucht. Es zeigte sich dabei eine deutliche Suppression des ER β 1, welcher in einem möglichen Zusammenhang mit dem AR stehen kann. (143) Die Suppression der ER β 1-Expression zeigte sich aber auch deutlich in AR-negativen PC-3 Zellen, was auch als antiproliferativer Effekt gewertet werden kann. Die Untersuchung der weiteren ER-Isoformen unter Einwirkung von Enzalutamid zeigten keine Effekte.

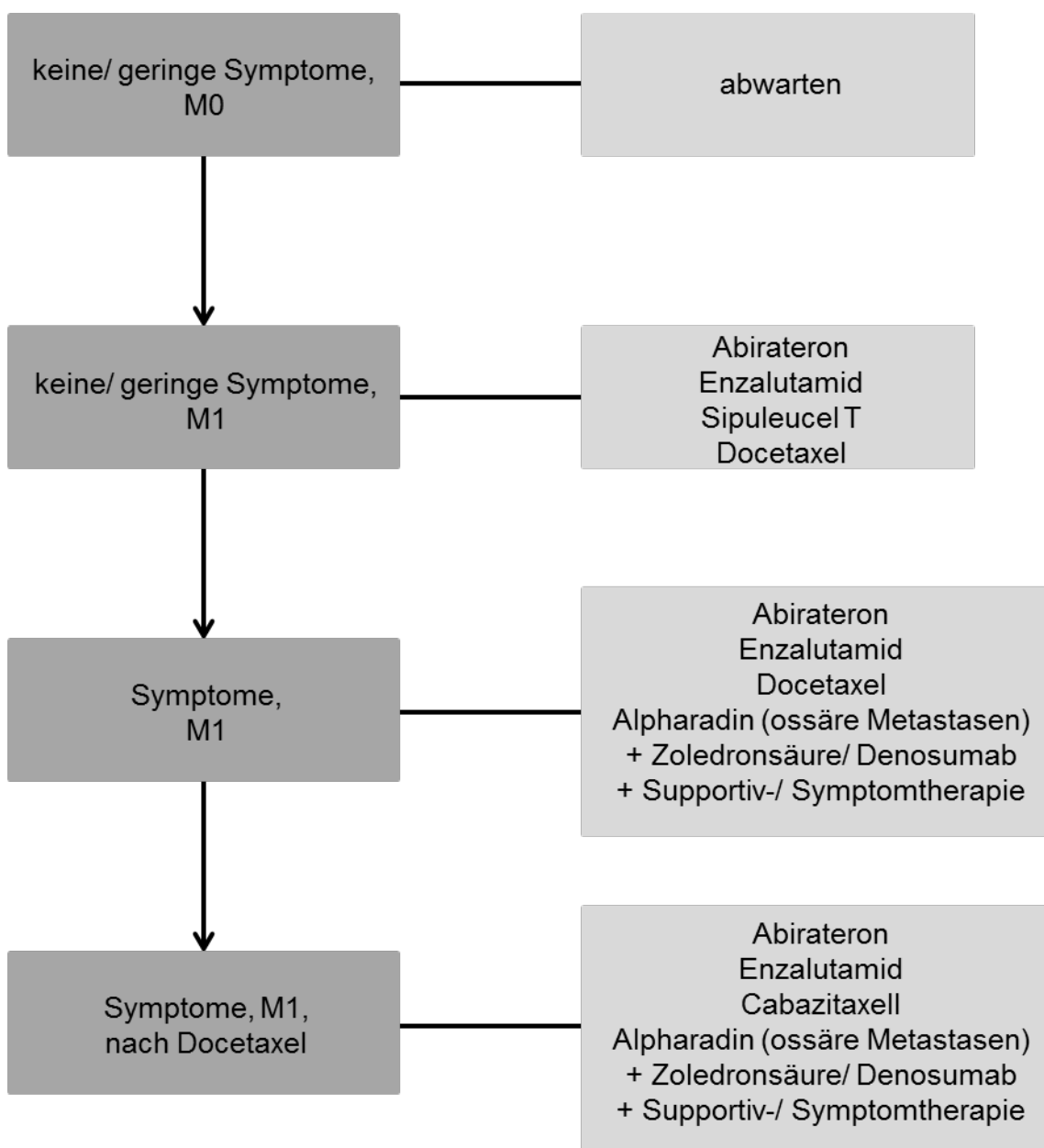
Das Resultat dieser Arbeit ist, dass Enzalutamid nicht nur ein Hormonrezeptorantagonist ist, sondern auch auf AR-unabhängige Signalkaskaden Einfluss hat. Enzalutamid zeigt im Zellmodell einen deutlich antiproliferativen Effekt, was mit seiner effektiven Wirkung bei CRPC korreliert und auch an den in dieser Arbeit betrachteten Faktoren liegen kann.

7. Anhang

Tabelle A1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (7, 16)

Stadium	Befund
T-Stadium	(Primärtumor)
T1	weder tast- noch sichtbar (Zufallsbefund)
T1a	Tumoranteile < 5% des resezierten Gewebes
T1b	Tumoranteile > 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumordiagnose durch Nadelbiopsie (ein oder beide Lappen)
T2	Tumor begrenzt auf die Prostata
T2a	ein Lappen betroffen ≤ 50%
T2b	ein Lappen betroffen > 50%
T2c	beide Lappen betroffen
T3	Tumordurchbruch durch die Prostatakapsel
T3a	uni- oder bilateral
T3b	Tumoreinbruch in Samenblasen
T4	Tumorinfiltration in andere Nachbarstrukturen als Samenblasen: Blasenhals, Sphincter externus, Rektum, Levatormuskel, Beckenwand
N-Stadium	(Lymphknotenmetastasen)
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
M-Stadium	(Fernmetastasen)
M1a	nicht regionäre Lymphknotenmetastasen
M1b	Knochenmetastasen
M1c	andere Organmetastasen

Abbildung A1: Therapieansatz bei kastrationsrefraktärem PC (nach S3 Leitlinie)
(7, 24)



8. Literaturverzeichnis

1. Hautmann R, Huland H. Urologie. 3., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2006. (Springer-Lehrbuch). Available from: URL: <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10144254>.
2. Schiebler TH, editor. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; [Neue Approbationsordnung]. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer Medizin; 2005. (Springer-Lehrbuch).
3. LOWSLEY OS. Surgery of the prostate gland. Rocky Mt Med J 1952; 49(7):590–3.
4. McNeal JE. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. J Urol 1972; 107(6):1008–16.
5. Sökeland J, Schulze H, Rübber H, Helpap B, Alken C-E. Urologie: Verstehen - lernen - anwenden : 46 Tabellen. 13., korr. und aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2004.
6. Zwergel U, Sökeland J. Benigne Prostatahyperplasie: Grundlagen und Therapie. Berlin u.a.: Springer; 1999. (Optimierte Arzneimitteltherapie).
7. Hegele A, Skrobek L, editors. Urologie essentials. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2016. (essentials Intensivkurs zur Weiterbildung).
8. Cotic C, Hammes C, Lingenfelder T, Heinrich E. BASICS Urologie. 2. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2013. (Basics).
9. Agudo A, Bonet C, Travier N, Gonzalez CA, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB et al. Impact of cigarette smoking on cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. J Clin Oncol 2012; 30(36):4550–7.
10. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. Mod Pathol 2004; 17(3):292–306.
11. Jocham D, Miller K, Albers P. [Spezielle Urologie]. 2., überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2003. (Praxis der Urologie in zwei Bänden ; Bd. 2).
12. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol 1992; 23(3):273–9.

13. Hedinger CE, Dhom G. Pathologie des männlichen Genitale: Hoden · Prostata · Samenblasen. Berlin, Heidelberg: Springer; 1991. (Spezielle pathologische Anatomie, Ein Lehr- und Nachschlagewerk; vol 21). Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-51158-5>.
14. Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA. Pathology of carcinoma of the prostate. *Cancer* 1992; 70(S1):235–53.
15. Green GA, Hanlon AL, Al-Saleem T, Hanks GE. A Gleason score of 7 predicts a worse outcome for prostate carcinoma patients treated with radiotherapy. *Cancer* 1998; 83(5):971–6.
16. Wittekind C, editor. TNM: Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl., 4., korr. Nachdr. Weinheim: Wiley-Blackwell; 2012.
17. Hellerstedt BA, Pienta KJ. The Current State of Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2002; 52(3):154–79.
18. Medivation I. Astellas and Medivation Enter Into Worldwide Agreement to Co-Develop and Co-Commercialize MDV3100 for the Treatment of Prostate Cancer 2009 Oct 27 [cited 2016 Sep 8]. Available from: URL: http://files.shareholder.com/downloads/MDV/2444599285x0x326521/3A8E7D97-2E58-43FD-8E13-F0022DCF224D/MDVN_News_2009_10_27_General_Releases.pdf.
19. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 2012; 367(13):1187–97.
20. Bahl A, Masson S, Birtle A, Chowdhury S, Bono J de. Second-line treatment options in metastatic castration-resistant prostate cancer: a comparison of key trials with recently approved agents. *Cancer Treat Rev* 2014; 40(1):170–7.
21. Center for Drug Evaluation and Research. Approved Drugs - Enzalutamide (XTANDI Capsules): Center for Drug Evaluation and Research [cited 2016 Jul 19]. Available from: URL: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm317997.htm>.
22. EPAR. Xtandi, INN-enzalutamide [cited 2016 Jul 19]. Available from: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002639/WC500144999.pdf.

23. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS et al. Enzalutamide in metastatic prostate cancer before chemotherapy. *N Engl J Med* 2014; 371(5):424–33.
24. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen. „Leitlinienprogramm Onkologie“ Prostatakrebs II: - Lokal fortgeschrittenes und metastasiertes Prostatakarzinom Ein evidenzbasierter Patientenratgeber zur S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms (Dritte Auflage, Juni 2015) Stand: 2014 Sep 30 gültig bis 2016 Sep 29 [cited 2016 Sep 8].
25. Eymard J-C, Oudard S, Gravis G, Ferrero J-M, Theodore C, Joly F et al. Docetaxel reintroduction in patients with metastatic castration-resistant docetaxel-sensitive prostate cancer: a retrospective multicentre study. *BJU Int* 2010; 106(7):974–8.
26. Sweeney et al., editor. Impact on overall survival (OS) with chemohormonal therapy versus hormonal therapy for hormone-sensitive newly metastatic prostate cancer (mPrCa): An ECOG-led phase III randomized trial; 2014. (18_suppl).
27. Dehm SM, Tindall DJ. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006; 99(2):333–44.
28. van de Wijngaart DJ, Dubbink HJ, van Royen ME, Trapman J, Jenster G. Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 352(1-2):57–69.
29. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228(2):111–33.
30. Tindall D, Mohler J. Androgen action in prostate cancer. New York: Springer; 2009 [cited 2016 Sep 12].
31. Agoulnik IU, Weigel NL. Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer. *J Cell Biochem* 2006; 99(2):362–72.
32. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(22):1687–97.

33. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. - PubMed - NCBI [cited 2016 Jul 12]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3283939>.
34. Whittemore AS, Lele C, Friedman GD, Stamey T, Vogelmann JH, Orentreich N. Prostate-specific antigen as predictor of prostate cancer in black men and white men. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(5):354–60.
35. Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Trapman J et al. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41(3-8):665–9.
36. Grindstad T, Skjefstad K, Andersen S, Ness N, Nordby Y, Al-Saad S et al. Estrogen receptors alpha and beta and aromatase as independent predictors for prostate cancer outcome. *Sci Rep* 2016; 6:33114.
37. Attia DMA, Ederveen AGH. Opposing roles of ERalpha and ERbeta in the genesis and progression of adenocarcinoma in the rat ventral prostate. *Prostate* 2012; 72(9):1013–22.
38. Ricke WA, McPherson SJ, Bianco JJ, Cunha GR, Wang Y, Risbridger GP. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB J* 2008; 22(5):1512–20.
39. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol* 2005; 19(8):1951–9.
40. Morito K, Aomori T, Hirose T, Kinjo J, Hasegawa J, Ogawa S et al. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β (II). *Biol. Pharm. Bull.* 2002 [cited 2016 Sep 13]; 25(1):48–52. Available from: URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/25/1/25_1_48/_pdf.
41. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; 138(3):863–70.
42. Tan W, Li Q, Chen K, Su F, Song E, Gong C. Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2016; 7(9):10373–85.

43. Singh-Jasuja H, Hilf N, Arnold-Schild D, Schild H. The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol Chem* 2001; 382(4):629–36.
44. Javid B, MacAry PA, Lehner PJ. Structure and Function: Heat Shock Proteins and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* 2007; 179(4):2035–40.
45. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaper* 2005; 10(2):86.
46. Albany C, Hahn NM. Heat shock and other apoptosis-related proteins as therapeutic targets in prostate cancer. *Asian J Androl* 2014; 16(3):359–63.
47. Glaessgen A, Jonmarker S, Lindberg A, Nilsson B, Lewensohn R, Ekman P et al. Heat shock proteins 27, 60 and 70 as prognostic markers of prostate cancer. *APMIS* 2008; 116(10):888–95.
48. Oesterreich S, Weng CN, Qiu M, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Fuqua SA. The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53(19):4443–8.
49. Stope MB, Weiss M, Preuss M, Streitborger A, Ritter CA, Zimmermann U et al. Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2014; 32(6):2380–6.
50. Gibbons NB, Watson RW, Coffey RN, Brady HP, Fitzpatrick JM. Heat-shock proteins inhibit induction of prostate cancer cell apoptosis. *Prostate* 2000; 45(1):58–65.
51. Zoubeidi A, Zardan A, Beraldi E, Fazli L, Sowery R, Rennie P et al. Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer Res* 2007; 67(21):10455–65.
52. Ghosh JC, Siegelin MD, Dohi T, Altieri DC. Heat shock protein 60 regulation of the mitochondrial permeability transition pore in tumor cells. *Cancer Res* 2010; 70(22):8988–93.
53. Giaginis C, Daskalopoulou SS, Vgenopoulou S, Sfiniadakis I, Kouraklis G, Theocharis SE. Heat Shock Protein-27, -60 and -90 expression in gastric cancer:

association with clinicopathological variables and patient survival. *BMC Gastroenterol* 2009; 9:14.

54. Calderwood SK. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment? *Int J Hyperthermia* 2010; 26(7):681–5.

55. Chen CF, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, Lee WH. A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9):4691–9.

56. Mahony D, Parry DA, Lees E. Active cdk6 complexes are predominantly nuclear and represent only a minority of the cdk6 in T cells. *Oncogene* 1998; 16(5):603–11.

57. Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther* 2002; 2(1):3–24.

58. Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 2000; 19(16):4310–22.

59. Cardillo MR, Ippoliti F. IL-6, IL-10 and HSP-90 expression in tissue microarrays from human prostate cancer assessed by computer-assisted image analysis. *Anticancer Res* 2006; 26(5A):3409–16.

60. Shatkina L, Mink S, Rogatsch H, Klocker H, Langer G, Nestl A et al. The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Mol Cell Biol* 2003; 23(20):7189–97.

61. So A, Hadaschik B, Sowery R, Gleave M. The role of stress proteins in prostate cancer. *Curr Genomics* 2007; 8(4):252–61.

62. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M et al. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60(24):7099–105.

63. Chuma M, Saeki N, Yamamoto Y, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S et al. Expression profiling in hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis: identification of high-mobility group I(Y) protein as a molecular marker of hepatocellular carcinoma metastasis. *Keio J Med* 2004; 53(2):90–7.

64. Chang C-L, Tsai Y-C, He L, Wu T-C, Hung C-F. Cancer immunotherapy using irradiated tumor cells secreting heat shock protein 70. *Cancer Res* 2007; 67(20):10047–57.
65. Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD, Pratt WB. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor.hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J Biol Chem* 1998; 273(13):7358–66.
66. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381(6583):571–9.
67. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997; 18(3):306–60.
68. Sullivan W, Stensgard B, Caucutt G, Bartha B, McMahon N, Alnemri ES et al. Nucleotides and two functional states of hsp90. *J Biol Chem* 1997; 272(12):8007–12.
69. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H et al. Structure of TPR Domain–Peptide Complexes. *Cell* 2000; 101(2):199–210.
70. Grenert JP, Sullivan WP, Fadden P, Haystead TA, Clark J, Mimnaugh E et al. The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem* 1997; 272(38):23843–50.
71. Rehm H, Letzel T. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 7., überarbeitete und aktualisierte Aufl. Berlin: Springer Spektrum; 2016. (Experimentator). Available from: URL: <http://www.springer.com/>.
72. Graefe K-H, Lutz W, Bönisch H. *Pharmakologie und Toxikologie: 201 Tabellen*. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011. (Duale Reihe). Available from: URL: <http://ebooks.thieme.de/9783131428615/1>.
73. SAGE Publications. *Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery*; 2003 [cited 2016 Jul 14]. Available from: URL: <http://ebm.sagepub.com/content/228/2/111.long>.
74. Ischia J, Saad F, Gleave M. The promise of heat shock protein inhibitors in the treatment of castration resistant prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2013; 23(3):194–200.

75. Edwards J, Bartlett JMS. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor. *BJU Int* 2005; 95(9):1320–6.
76. Foley C, Mitsiades N. Moving Beyond the Androgen Receptor (AR): Targeting AR-Interacting Proteins to Treat Prostate Cancer. *Horm Cancer* 2016; 7(2):84–103.
77. Jegou G, Hazoume A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2013; 332(2):275–85.
78. Hickey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber LA. Molecular cloning of sequences encoding the human heat-shock proteins and their expression during hyperthermia. *Gene* 1986; 43(1-2):147–54.
79. Murphy ME. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* 2013; 34(6):1181–8.
80. McConnell JR, McAlpine SR. Heat shock proteins 27, 40, and 70 as combinational and dual therapeutic cancer targets. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23(7):1923–8.
81. Baidur-Hudson S, Edkins AL, Blatch GL. Hsp70/Hsp90 organising protein (hop): beyond interactions with chaperones and prion proteins. *Subcell Biochem* 2015; 78:69–90.
82. Daniel S, Bradley G, Longshaw VM, Soti C, Csermely P, Blatch GL. Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(6):1003–14.
83. Tang D, Khaleque MA, Jones EL, Theriault JR, Li C, Hung Wong W et al. Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaper* 2005; 10(1):46.
84. Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M et al. Heat Shock Protein Expression Independently Predicts Clinical Outcome in Prostate Cancer. *Cancer Res* 2000; 60(24):7099–105.
85. Arya RK, Singh A, Yadav NK, Cheruvu SH, Hossain Z, Meena S et al. Anti-breast tumor activity of Eclipta extract in-vitro and in-vivo: novel evidence of endoplasmic reticulum specific localization of Hsp60 during apoptosis. *Sci Rep* 2015; 5:18457.

86. Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J* 1999; 18(8):2040–8.
87. Shan Y. Hsp10 and Hsp60 modulate Bcl-2 family and mitochondria apoptosis signaling induced by doxorubicin in cardiac muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2003; 35(9):1135–43.
88. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, Altieri DC. Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283(8):5188–94.
89. Stope MB, Schubert T, Staar D, Ronnau C, Streitborger A, Kroeger N et al. Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. *World J Urol* 2012; 30(3):327–31.
90. Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L et al. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2004; 64(18):6595–602.
91. Weiss M, Ahrend H, Grossebrummel H, Ziegler P, Brandenburg L-O, Walther R et al. Cytochrome P450 17A1 Inhibitor Abiraterone Acetate Counteracts the Heat Shock Protein 27's Cell Survival Properties in Prostate Cancer Cells. *Urol Int* 2016; 97(1):112–7.
92. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 2009; 324(5928):787–90.
93. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Res* 1983; 43(4):1809–18.
94. Greene G, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986; 231(4742):1150–4.
95. Horvath LG, Henshall SM, Lee C-S, Head DR, Quinn DI, Makela S et al. Frequent Loss of Estrogen Receptor- β Expression in Prostate Cancer. *Cancer Res* 2001; 61(14):5331–5.

96. Mishra S, Tai Q, Gu X, Schmitz J, Poullard A, Fajardo RJ et al. Estrogen and estrogen receptor alpha promotes malignancy and osteoblastic tumorigenesis in prostate cancer. *Oncotarget* 2015; 6(42):44388–402.
97. Mak P, Leav I, Pursell B, Bae D, Yang X, Taglienti CA et al. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer Cell* 2010; 17(4):319–32.
98. McPherson SJ, Hussain S, Balanathan P, Hedwards SL, Niranjana B, Grant M et al. Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(7):3123–8.
99. Dey P, Jonsson P, Hartman J, Williams C, Strom A, Gustafsson J-A. Estrogen receptors beta1 and beta2 have opposing roles in regulating proliferation and bone metastasis genes in the prostate cancer cell line PC3. *Mol Endocrinol* 2012; 26(12):1991–2003.
100. Di Lorenzo G, Buonerba C, Autorino R, Placido S de, Sternberg CN. Castration-resistant prostate cancer: current and emerging treatment strategies. *Drugs* 2010; 70(8):983–1000.
101. Ged Y, Horgan AM. Management of castrate-resistant prostate cancer in older men. *J Geriatr Oncol* 2016; 7(2):57–63.
102. Rehman Y, Rosenberg JE. Abiraterone acetate: oral androgen biosynthesis inhibitor for treatment of castration-resistant prostate cancer. *Drug Des Devel Ther* 2012; 6:13–8.
103. Zhang T, Zhu J, George DJ, Armstrong AJ. Enzalutamide versus abiraterone acetate for the treatment of men with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2015; 16(4):473–85.
104. Guerrero J, Alfaro IE, Gomez F, Protter AA, Bernales S. Enzalutamide, an androgen receptor signaling inhibitor, induces tumor regression in a mouse model of castration-resistant prostate cancer. *Prostate* 2013; 73(12):1291–305.
105. Tilley WD, Wilson CM, Marcelli M, McPhaul MJ. Androgen Receptor Gene Expression in Human Prostate Carcinoma Cell Lines. *Cancer Res* 1990; 50(17):5382–6.

106. He S, Zhang C, Shafi AA, Sequeira M, Acquaviva J, Friedland JC et al. Potent activity of the Hsp90 inhibitor ganetespib in prostate cancer cells irrespective of androgen receptor status or variant receptor expression. *Int J Oncol* 2013; 42(1):35–43.
107. Chen L, Li J, Farah E, Sarkar S, Ahmad N, Gupta S et al. Co-targeting HSP90 and its client proteins for treatment of prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2016.
108. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(3):164–72.
109. Mayer MP, Bukau B. Molecular chaperones: The busy life of Hsp90. *Current Biology* 1999; 9(9):R322-R325.
110. Csermely P, Schnaider T, So"ti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa Molecular Chaperone Family. *Pharmacol Ther* 1998; 79(2):129–68.
111. Ozgur A, Tutar Y. Heat Shock Protein 90 Inhibitors in Oncology. *CP* 2014; 11(1):2–16.
112. Suzuki H, Ueda T, Ichikawa T, Ito H. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10(2):209–16.
113. Seidel C, Schnekenburger M, Mazumder A, Teiten M-H, Kirsch G, Dicato M et al. 4-Hydroxybenzoic acid derivatives as HDAC6-specific inhibitors modulating microtubular structure and HSP90alpha chaperone activity against prostate cancer. *Biochem Pharmacol* 2016; 99:31–52.
114. Wu Y, Huang B, Liu Q, Liu Y. Heat shock protein 90-beta over-expression is associated with poor survival in stage I lung adenocarcinoma patients. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(7):8252–9.
115. Rong B, Zhao C, Liu H, Ming Z, Cai X, Gao W et al. Identification and verification of Hsp90-beta as a potential serum biomarker for lung cancer. *Am J Cancer Res* 2014; 4(6):874–85.
116. Fan C-Y, Lee S, Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8(4):309–16.
117. Yamashita M, Hirohashi Y, Torigoe T, Kusumoto H, Murai A, Imagawa T et al. Dnajb8, a Member of the Heat Shock Protein 40 Family Has a Role in the Tumor

Initiation and Resistance to Docetaxel but Is Dispensable for Stress Response. *PLoS One* 2016; 11(1):e0146501.

118. Cano LQ, Lavery DN, Bevan CL. Mini-review: Foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 369(1-2):52–62.

119. Castilla C, Congregado B, Conde JM, Medina R, Torrubia FJ, Japon MA et al. Immunohistochemical expression of Hsp60 correlates with tumor progression and hormone resistance in prostate cancer. *Urology* 2010; 76(4):1017.e1-6.

120. Grossebrummel H, Peter T, Mandelkow R, Weiss M, Muzzio D, Zimmermann U et al. Cytochrome P450 17A1 inhibitor abiraterone attenuates cellular growth of prostate cancer cells independently from androgen receptor signaling by modulation of oncogenic and apoptotic pathways. *Int J Oncol* 2016; 48(2):793–800.

121. Streitörger A. Regulation und Funktionalität des Hitzeschockproteins HSP60 in Prostatakarzinomzellen. Greifswald: Universität Greifswald, Fakultät Medizin; 2013.

122. Voll EA, Ogden IM, Pavese JM, Huang X, Xu L, Jovanovic BD et al. Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression. *Oncotarget* 2014; 5(9):2648–63.

123. Lee SW, Cho JM, Cho HJ, Kang JY, Kim EK, Yoo TK. Expression levels of heat shock protein 27 and cellular FLICE-like inhibitory protein in prostate cancer correlate with Gleason score sum and pathologic stage. *Korean J Urol* 2015; 56(7):505–14.

124. Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther* 2013; 140(3):223–38.

125. Katsogiannou M, Andrieu C, Rocchi P. Heat shock protein 27 phosphorylation state is associated with cancer progression. *Front Genet* 2014; 5:346.

126. Rottach AM. Zelluläre und molekulare Effekte von Cabazitaxel auf Prostatakarzinomzellen. Greifswald: Universität Greifswald, Fakultät Medizin; 2015.

127. Lee DJ, Cha EK, Dubin JM, Beltran H, Chromecki TF, Fajkovic H et al. Novel therapeutics for the management of castration-resistant prostate cancer (CRPC). *BJU Int* 2012; 109(7):968–85.

128. Parray A, Siddique HR, Nanda S, Konety BR, Saleem M. Castration-resistant prostate cancer: potential targets and therapies. *Biologics* 2012; 6:267–76.

129. Ho S-M, Leung Y-K, Chung I. Estrogens and antiestrogens as etiological factors and therapeutics for prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1089:177–93.
130. Ellem SJ, Schmitt JF, Pedersen JS, Frydenberg M, Risbridger GP. Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5):2434–41.
131. Prins GS, Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids* 2008; 73(3):233–44.
132. Ito T, Tachibana M, Yamamoto S, Nakashima J, Murai M. Expression of estrogen receptor (ER-alpha and ER-beta) mRNA in human prostate cancer. *Eur Urol* 2001; 40(5):557–63.
133. Hernandez J, Balic I, Johnson-Pais TL, Higgins BA, Torkko KC, Thompson IM et al. Association between an estrogen receptor alpha gene polymorphism and the risk of prostate cancer in black men. *J Urol* 2006; 175(2):523–7.
134. Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, Shiina H, Igawa M, Dahiya R. Polymorphisms of estrogen receptor alpha in prostate cancer. *Mol Carcinog* 2003; 37(4):202–8.
135. Pisolato R, Lombardi A, Vicente CM, Lucas T, Lazari M, Porto CS. Expression and regulation of the estrogen receptors in PC-3 human prostate cancer cells. *Steroids* 2016; 107:74–86.
136. Lau KM, LaSpina M, Long J, Ho SM. Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. *Cancer Res* 2000; 60(12):3175–82.
137. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998; 95(26):15677–82.
138. 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. *Prostate* 2003; 54(2):79–87.
139. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogawa S, Ouchi Y, Kitamura T et al. Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal

truncated splice variant ERbetax as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289(3):692–9.

140. Schade GR, Holt SK, Zhang X, Song D, Wright JL, Zhao S et al. Prostate Cancer Expression Profiles of Cytoplasmic ERbeta1 and Nuclear ERbeta2 are Associated with Poor Outcomes following Radical Prostatectomy. *J Urol* 2016; 195(6):1760–6.

141. Cheng J, Lee EJ, Madison LD, Lazennec G. Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Lett* 2004; 566(1-3):169–72.

142. Lai JS, Brown LG, True LD, Hawley SJ, Etzioni RB, Higano CS et al. Metastases of prostate cancer express estrogen receptor-beta. *Urology* 2004; 64(4):814–20.

143. Yang L, Ravindranathan P, Ramanan M, Kapur P, Hammes SR, Hsieh J-T et al. Central role for PELP1 in nonandrogenic activation of the androgen receptor in prostate cancer. *Mol Endocrinol* 2012; 26(4):550–61.

144. Kim H, Datta A, Talwar S, Saleem SN, Mondal D, Abdel-Mageed AB. Estradiol-ERbeta2 signaling axis confers growth and migration of CRPC cells through TMPRSS2-ETV5 gene fusion. *Oncotarget* 2016.

145. Dhamad AE, Zhou Z, Zhou J, Du Y. Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ERalpha) and Biochemical Characterization of the ERalpha-Hsp70 Interaction. *PLoS One* 2016; 11(8):e0160312.

Danksagung

Abschließend möchte ich denjenigen danken, die mir die Möglichkeit eröffneten und mich ebenso dabei unterstützt haben diese Arbeit durchzuführen und fertigzustellen.

Herrn Professor Dr. Martin Burchardt, Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universitätsmedizin Greifswald, danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut im molekular-urologischen Forschungslabor diese experimentelle Doktorarbeit durchzuführen. Die Forschungsseminare gaben mir Anregungen und Hilfestellungen im gesamten Verlauf meiner experimentellen Arbeit.

Mein großer Dank gebührt meinem Betreuer und Laborleiter Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope. Für die uneingeschränkte Unterstützung, egal ob am Werktag oder Wochenende, bei der Durchführung, Planung und der Auswahl des Themas für dieses Projekt. Durch zielführende Diskussionen, aufmunternden Beistand und Geduld half er mir bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Allen Kommilitonen im molekular-urologischem Forschungslabor danke ich für ihren Einsatz, Hilfsbereitschaft und Kameradschaft während unserer gemeinsamen Zeit im Labor.

Auch meinen Freunden und vor allem meiner Familie insbesondere meinen Eltern danke ich für den stetigen Rückhalt, den ihr mir schon immer gegeben habt. Ich bin sehr stolz solche Eltern haben zu dürfen.

Darüber hinaus gilt der größte Dank meiner Frau, Tabea Abazid. Die Kraft, die ich aus deinem Enthusiasmus und deiner Fröhlichkeit schöpfe hat mir während dieser Arbeit und während des Studiums immer geholfen.