

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Evaluation des Transkriptionsfaktors STAT5 als innovative therapeutische
Zielstruktur in der Überwindung der Enzalutamid-Resistenz
beim Prostatakarzinom**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Julia Bodenbender
aus Marburg

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

3. Gutachter:

Tag der Promotion:

30.03.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Thematische Einführung.....	1
1.2 Problemstellung und Zielsetzung.....	2
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Das Prostatakarzinom	3
2.2 Die Prostata – Anatomische und physiologische Grundlagen	4
2.3 Wachstum und Differenzierung der Prostata: Androgenwirkung und Androgenrezeptorachse	5
2.4 Epidemiologie und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms.....	8
2.5 Früherkennung und Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms	9
2.6 Pathologie und Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms.....	10
2.6.1 Histopathologie und Gleason-Grading	10
2.6.2 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien	11
2.7 Therapie des lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms	13
2.8 Therapie des metastasierten hormonsensitiven Prostatakarzinoms.....	15
2.9 Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms	16
2.10 Das Zweitgenerations-Antiandrogen Enzalutamid	17
2.11 Enzalutamid-Resistenz.....	19
2.11.1 AR-Spleißvarianten.....	20
2.11.2 Mutationen und Amplifikation des Androgenrezeptors	21
2.11.3 Tumoreigene Androgensynthese	22
2.11.4 Neuroendokrine Transdifferenzierung.....	22
2.11.5 Überexpression des Glukokortikoidrezeptors	23
2.11.6 Modulation intrazellulärer Signalwege.....	24
2.11.7 Biomarker für die Enzalutamid-Behandlung und -Resistenz.....	25
2.12 Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5)	26
2.13 Der Januskinase 2/STAT5-Signalweg	27
2.14 Die Rolle von STAT5 in Neoplasien.....	29
2.15 Die Rolle von STAT5 beim Prostatakarzinom	31
2.16 Die STAT5-Inhibition als Möglichkeit der zielgerichteten Krebstherapie.....	34
3 Material.....	36
3.1 Laborgeräte und Gerätezubehör.....	36
3.2 Verbrauchsmaterial	38
3.3 Chemikalien.....	40

3.4	SDS-PAGE Standard	42
3.5	Zelllinien	43
3.5.1	Verwendete Zelllinien	43
3.5.2	LNCaP	43
3.5.3	C4-2	44
3.5.4	MR49F	44
3.5.5	LAPC4 und LAPC4-EnzaR	44
3.5.6	PC-3	45
3.6	Kultivierungsmedien und Zusätze	45
3.6.1	Medien und Zusätze	45
3.6.2	Kultivierungsmedien	46
3.7	Antikörper	47
3.7.1	Primäre Antikörper	47
3.7.2	Sekundäre Antikörper	47
3.8	Small interfering RNAs	48
3.9	Transfektionsreagenz	48
3.10	PCR-Primer	49
3.11	Kits	49
3.12	Puffer und Lösungen	50
3.12.1	Puffer für die Proteinextraktion und -bestimmung	50
3.12.2	Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE	51
3.12.3	Puffer für den Western Blot	52
3.12.4	Lösungen und Puffer für den MTT-Assay	53
3.12.5	Lösungen für die Zellzyklusanalyse	53
3.12.6	Stammlösungen der Medikamente	54
3.13	Software	54
4	Methoden	55
4.1	Zellbiologische Methoden	55
4.1.1	Kryokonservierung von Zellen	55
4.1.2	Auftauen von Zellen	55
4.1.3	Zellkultivierung	55
4.1.4	Passagieren der Zellkulturen	55
4.1.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	56
4.1.6	Aussaat von Zellen in Well-Platten	56
4.1.7	Behandlung von Zellen mit Enzalutamid und Pimozid	56
4.1.8	Transfektion mit siRNA	57
4.1.9	Messung der Zellviabilität	58
4.2	Western Blot	59
4.2.1	Proteinisolation aus Zellen	59
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	59
4.2.3	Herstellung von Polyacrylamid-Gelen für die SDS-PAGE	59
4.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
4.2.5	Elektrophoretischer Proteintransfer	60

4.2.6	Blockierung der PVDF-Membran	61
4.2.7	Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper.....	61
4.2.8	Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper	62
4.2.9	Entwicklung und Detektion des Western Blots	62
4.3	Molekularbiologische Methoden	63
4.3.1	RNA-Isolation aus Zellkulturen.....	63
4.3.2	Reverse Transkription – die cDNA-Synthese	64
4.3.3	Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	64
4.4	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	66
4.4.1	Vorbereitung	66
4.4.2	Ernten und Anfärben der Zellen	66
4.4.3	Messung am Durchflusszytometer und Auswertung.....	67
4.5	Statistische Auswertung	68
5	Ergebnisse	69
5.1	Charakterisierung der ausgewählten Zelllinien	69
5.2	Die STAT5-Protein- und mRNA-Expression	71
5.3	Die Zellmorphologie unter Enzalutamid-Behandlung	72
5.4	Die Zellviabilität unter Enzalutamid-Behandlung.....	75
5.5	Ermittlung der IC ₅₀ -Werte durch Dosis-Wirkungs-Analysen	77
5.6	Zellzyklusanalysen unter Enzalutamid-Behandlung	78
5.7	Kombinationsbehandlung mit Enzalutamid und Pimozid.....	79
5.8	STAT5-Knockdown durch siRNA.....	84
5.9	Der Einfluss des STAT5 A/B Knockdowns auf die Zellviabilität.....	86
5.10	Die Zellviabilität nach STAT5-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung	88
5.11	Die Androgenrezeptor-Aktivität nach STAT5-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung	89
6	Diskussion	91
7	Zusammenfassung.....	100
8	Literaturverzeichnis	101
9	Veröffentlichungen.....	126
10	Danksagung.....	127
11	Tabellarischer Lebenslauf.....	128

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
γGT	γ-Glutamyltransferase
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
ADT	Androgendeprivationstherapie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	<i>Androgen Response Elements</i>
BET	Bromodomäne und extraterminale Domäne
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2-Gen
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Bovines Serumalbumin
CC	Coiled Coil Domäne
cDNA	Komplementäre DNA
CgA	Chromogranin A
CML	Chronische myeloische Leukämie
CRPC	Kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CT	Computertomografie
CTC	<i>Circulating Tumor Cells</i> , Zirkulierende Tumorzellen
DBD	DNA-Bindedomäne
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	Digital-rektale Untersuchung
DTT	Dithiothreitol
EAU	<i>European Association of Urology</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EMA	European Medicines Agency
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FLT3	<i>FMS-linke Tyrosine Kinase</i>
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GAS	<i>Gamma Interferon Activation Site</i>
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i> , Gonadotropin-freisetzendes Hormon
GR	Glukokortikoidrezeptor
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HIFU	Hochintensiver fokussierter Ultraschall
HSP	Hitzeschock-Protein
HSPC	Hormonsensitives Prostatakarzinom
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i> Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i> Internationale Gesellschaft für Uropathologie
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KLK3	<i>Kallikrein-related Peptidase 3</i>
LBD	Ligandenbindedomäne
LH	Luteinisierendes Hormon
MAO-A	Monoaminoxidase A
mCRPC	Metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
MGF	<i>Mammary Gland Factor</i>
mHSPC	Metastasiertes hormonsensitives Prostatakarzinom
min	Minute(n)
miR	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRT	Magnetresonanztomografie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEPC	<i>Neuroendocrine Prostate Cancer</i> , Neuroendokrines Prostatakarzinom
NFκB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-Cells</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol
nmCRPC	Nicht-metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OS	<i>Overall Survival</i> , Gesamtüberleben
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PFS	<i>Progression-free Survival</i> , Progressionsfreies Überleben
PI	Propidiumiodid
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>
PRL	Prolaktin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
PTHrP	<i>Parathormon-related Protein</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PY	Phosphorylierungsdomäne
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signalling</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	<i>Tris-Buffered Saline + Tween 20</i>
TF4	Transkriptionsfaktor 4
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMPRSS2	<i>Transmembrane Protease Serine Subtype 2</i>
TNM	TNM-Klassifikation: Tumor, Nodus, Metastase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-amonimethan
TRUS	Transrektaler Ultraschall
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VTP	Vaskulär-gezielte photodynamische Therapie
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das männliche Becken im Sagittalschnitt	4
Abbildung 2: Die Makroanatomie der Prostata	5
Abbildung 3: Der humane Androgenrezeptor.....	6
Abbildung 4: Ligandenabhängiger und -unabhängiger Androgenrezeptor-Signalweg.....	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Drüsenmuster nach D.F. Gleason.....	10
Abbildung 6: Risikostratifizierung des lokal begrenzten PCa nach D'Amico.....	13
Abbildung 7: Therapieoptionen für das hormonsensitive Prostatakarzinom gemäß S3-Leitlinie 2021	14
Abbildung 8: Therapieoptionen für das kastrationsresistente Prostatakarzinom gemäß S3-Leitlinie 2021	17
Abbildung 9: Der Wirkmechanismus von Enzalutamid im Androgen-Signalweg	18
Abbildung 10: Verschiedene Mechanismen der Enzalutamidresistenz	20
Abbildung 11: Die strukturellen und funktionellen Domänen der humanen STAT5-Proteine	27
Abbildung 12: Überblick über die Januskinase/STAT-Signalachse.....	28
Abbildung 13: Interaktion von AR und STAT5	33
Abbildung 14: In der SDS-PAGE verwendeter Größenstandard	42
Abbildung 15: Schematische Anordnung des Blot-Sandwiches.....	61
Abbildung 16: Die AR- und PSA-Proteinexpression in Enzalutamid-sensitiven und -resistenten Zelllinien.	70
Abbildung 17: Die STAT5-Proteinexpression in Enzalutamid-resistenten Zellmodellen.	71
Abbildung 18: Die mRNA-Expression von STAT5A und STAT5B in Enzalutamid-resistenten Zelllinien.	72
Abbildung 19: Zellmorphologie der LNCaP-Zellen.....	73
Abbildung 20: Zellmorphologie der C4-2 Zellen.....	73
Abbildung 21: Zellmorphologie der MR49F-Zellen.....	74
Abbildung 22: Zellmorphologie der PC3-Zellen	74
Abbildung 23: Zeit- und dosisabhängige Zellviabilität nach Enzalutamid-Behandlung	76
Abbildung 24: Statistische Auswertung der zeit- und dosisabhängigen Zellviabilität.	76
Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurven und hieraus ermittelte IC ₅₀ -Werte nach Enzalutamid-Behandlung über 72 h.	77
Abbildung 26: Verschiebung der Zellzyklusphasen unter Enzalutamid-Exposition.....	78
Abbildung 27: Die Wirkung von Pimozid auf die Expression relevanter STAT5-Zielgene in STAT5-positiven Zelllinien.....	79
Abbildung 28: Die Wirkung des STAT5-Inhibitors Pimozid auf die Zellviabilität.	80
Abbildung 29: Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Enzalutamid (ENZA) und Pimozid (PIMO).	82
Abbildung 30: Darstellung der Kombinationsindices (CI) der Kombinationsbehandlungen ...	83
Abbildung 31: Bestätigung des STAT5A/B-Knockdowns mittels qPCR.....	84

Abbildung 32: Repräsentativer Western Blot zur Validierung des STAT5-Knockdowns.....	85
Abbildung 33: Zellviabilität nach STAT5A/B-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung.....	87
Abbildung 34: Dosisabhängige Wirkung von Enzalutamid auf die Zellviabilität nach STAT5-Knockdown.....	88
Abbildung 35: Analyse der relativen Androgenrezeptor (AR)-Aktivität nach STAT5- Knockdown.....	89
Abbildung 36: Androgenrezeptor (AR)-Aktivität nach STAT5B-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation und Stadien des PCa nach UICC	11
Tabelle 2:	Laborgeräte und Gerätezubehör	36
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterial	38
Tabelle 4:	Chemikalien	40
Tabelle 5:	SDS-PAGE-Standard	42
Tabelle 6:	Verwendete Zelllinien	43
Tabelle 7:	Kultivierungsmedien und Zusätze	45
Tabelle 8:	Primäre Antikörper	47
Tabelle 9:	Sekundäre Antikörper	47
Tabelle 10:	Small interfering RNAs	48
Tabelle 11:	Transfektionsreagenz	48
Tabelle 12:	PCR-Primer	49
Tabelle 13:	Verwendete Kits	49
Tabelle 14:	Software	54
Tabelle 15:	Kombinationsbehandlungsansatz für den Isobologrammversuch	57
Tabelle 16:	Isobologramm-Analyse	81

1 Einleitung

1.1 Thematische Einführung

Mit etwa 61.000 geschätzten Neuerkrankungen im Jahr 2020 ist das Prostatakarzinom (PCa) die häufigste Krebserkrankung des Mannes in Deutschland (1). Stehen für lokalisierte Stadien noch die chirurgische Entfernung oder Bestrahlung als kurative therapeutische Optionen zur Verfügung, so kommen für fortgeschrittene und metastasierte Tumore insbesondere systemische Therapien wie die Androgendeprivation und Chemotherapie mit palliativer Intention infrage (2). Hierzu zählt auch das Antiandrogen Enzalutamid, welches in den vergangenen Jahren an enormer Bedeutung in der Therapie des PCa gewonnen hat. Es inhibiert den Signalweg des Androgenrezeptors (AR) durch Hemmung der Bindung von Dihydrotestosteron (DHT) an den AR sowie durch Hemmung der AR-Translokation in den Zellkern und dessen Bindung an die DNA. Enzalutamid kommt bei Männern mit nichtmetastasiertem kastrationsresistenten PCa sowie im metastasierten hormonsensitiven und kastrationsresistenten Stadium zum Einsatz (3-8). Jedoch sprechen einige Patienten primär nicht auf das Medikament an oder entwickeln nach initialem Ansprechen eine Resistenz mit Wirkverlust des Präparats (3, 5). Therapieresistenzen, die unter antiandrogener Behandlung auftreten, stellen eine erhebliche Herausforderung in der Behandlung des fortgeschrittenen PCa dar. Die Mechanismen, die zur Progression des Tumors unter Androgenentzug führen, sind vielfältig und Gegenstand großen wissenschaftlichen Interesses. Hierzu zählen Mutationen und Spleißvarianten des AR, die zu einem konstitutiv aktiven Signalweg führen, sowie die Steigerung der intratumoralen Androgensynthese (9-13). Zudem gewinnen Mechanismen wie die neuroendokrine Transdifferenzierung und die Hochregulation von Proteinen und intrazellulären Signalwegen, welche der Tumorzelle Überlebensvorteile schaffen und mit Resistenzentwicklung einhergehen, an Bedeutung in der Entwicklung neuer Behandlungsoptionen (14-17). Die Überwindung von Resistenzen als Möglichkeit zur Resensitivierung und folgender Therapieoptimierung stellt ein zentrales Anliegen der translationalen uroonkologischen Forschung im Bereich des PCa dar. Zu den untersuchten Zielstrukturen hinsichtlich der Resistenzentwicklung unter Androgendeprivation bzw. Enzalutamid-Therapie gehört auch der Transkriptionsfaktor *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* (STAT5). Zahlreiche Arbeiten haben STAT5 und seinen Signalweg bereits als wichtigen Modulator für Tumorwachstum und -progress beim PCa identifiziert (18-22). Nach erfolgter Androgendeprivationstherapie konnte eine erhöhte STAT5-Expression beschrieben werden, ebenso findet sich eine Assoziation der STAT5-Expression mit einem hohen Gleason-Score (23-25). Zudem gelang durch den gezielten STAT5-Knockdown die Verzögerung der Progression kastrationsresistenter Tumore *in vivo* (23), was die Relevanz von STAT5 als therapeutische Zielstruktur stützt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine

Kommunikation von STAT5 mit dem AR vorliegt, welche zu einer starken synergistischen Interaktion beider Proteine führt und zur Entwicklung einer Therapieresistenz beitragen könnte (24). Auch für den Fall der Enzalutamid-Resistenz war bereits eine Hochregulation von STAT5 nachweisbar (26). So könnte es durch die Überexpression von STAT5 und den AR-Synergismus zu einer Aufhebung der Enzalutamid-vermittelten Hemmung der AR-Translokation und durch STAT5-vermittelte Expression der Zielgene *BCL2L1* und *CCND1* zur direkten Aktivierung des Zellzyklus kommen, was zum Wirkverlust und damit zur Resistenzentwicklung gegenüber Enzalutamid führt.

1.2 Problemstellung und Zielsetzung

Vor dem Hintergrund der bereits erlangten Erkenntnisse zur Rolle des STAT5-Proteins in der (Patho-) Physiologie des PCa, der aufgeführten Überlegungen und der klinisch drängenden Problematik der Enzalutamid-Resistenz widmet sich diese Arbeit der Frage nach der Möglichkeit der Überwindung der Enzalutamid-Resistenz durch einen gezielten STAT5-Knockdown. Ziel dieser Arbeit ist es, *in vitro* den Stellenwert des Transkriptionsfaktors STAT5 in der Enzalutamid-Resistenz zu untersuchen. Hierzu soll die Expression von STAT5 in hormonsensitiven, kastrationsresistenten und Enzalutamid-resistenten Zelllinien untersucht werden. Zudem sollen die Auswirkungen einer siRNA- und pharmakologisch-vermittelten STAT5-Inhibition mit dem STAT5-Inhibitor Pimozid auf die antitumoröse Wirkung von Enzalutamid in Enzalutamid-sensitiven und -resistenten Zellen beurteilt werden. Dabei ist von besonderem Interesse, ob eine Resensitivierung Enzalutamid-resistenter Zellen durch die STAT5-Inhibition erreicht werden kann.

Durch die vorliegende Arbeit soll so ein Beitrag zum tieferen Verständnis der klinisch hoch relevanten Enzalutamid-Resistenz und ihrer Überwindung geleistet werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Prostatakarzinom

Das PCa ist die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung in Deutschland und die zweithäufigste Krebstodesursache des Mannes (1). Es handelt sich um eine in der Prostata entstehende maligne Neoplasie. In über 90 % der Fälle liegt aus histologischer Sicht ein Adenokarzinom vor, das vom Drüsengewebe der peripheren Zone der Prostata ausgeht. Seltenerer Formen stellen unter anderem neuroendokrine Tumore oder Urothelkarzinome dar (27). Das Lebenszeitrisiko eines Mannes, an einem PCa zu erkranken, beträgt etwa 11 %. Durch verbesserte Diagnostik sowie Vorsorge wird das PCa in ca. 2/3 der Fälle in frühen Stadien diagnostiziert, welche äußerst günstige 5-Jahres-Überlebensraten aufweisen (1). Die zur Entstehung des PCa beitragenden Faktoren sind weitestgehend ungeklärt. Zusätzlich zu genetischer Prädisposition, Umwelteinflüssen und molekularen Veränderungen nehmen Androgene und die Modulation des Androgensignalweges eine wichtige Rolle in der Progression des PCa ein (28). Bereits im Jahr 1941 gelangten Charles Huggins und Clarence Hodges zu der wegweisenden Erkenntnis, dass das Wachstum von PCa-Zellen hormonabhängig ist und durch Androgenentzug inhibiert werden kann (29). Für die Therapie des PCa kommen zahlreiche kurative und palliative Behandlungskonzepte infrage. Diese reichen von aktiver Überwachung, radikaler Prostatektomie sowie Bestrahlung über Androgendeprivationstherapie bis hin zu taxanbasierter Chemotherapie (2). Zur Auswahl eines geeigneten Therapieverfahrens werden neben dem klinischen Tumorstadium und der histologischen Einstufung auch der Gesundheitszustand sowie der individuelle Therapiewunsch des Patienten berücksichtigt. Die ökonomischen Folgekosten variieren je nach Behandlungskonzept stark (30). Insgesamt beliefen sich die Krankheitskosten für das PCa im Jahr 2015 nach Angaben des Statistischen Bundesamtes auf 1.850 Mio. Euro und die für die USA prognostizierten Kosten für das Jahr 2020 auf 18.53 Mrd. US-Dollar (31, 32). Diese Faktoren sowie die Tatsache, dass es sich in einem Großteil der Fälle um einen langsam wachsenden Tumor handelt, der nicht obligatorisch die Lebenserwartung der erkrankten Männer einschränkt, machen das PCa zu einer Erkrankung, die das Leben und die Lebensqualität vieler Männer nach Diagnosestellung über einen großen Zeitraum hinweg betrifft und beeinflusst.

2.2 Die Prostata – Anatomische und physiologische Grundlagen

Die Prostata, auch Vorsteherdrüse, gehört ebenso wie die paarig angelegten Bulbourethraldrüsen und die Samenblasen sowie die Samenblasenampulle zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes (Abbildung 1). Die Prostata grenzt mit ihrer apikalen Basis an den Fundus der Harnblase und umschließt die Harnröhre. Nach kaudal hin liegt sie dem Beckenboden, speziell dem *Diaphragma urogenitale*, auf. Ventral wird sie durch die Symphyse begrenzt, dorsal durch den Mastdarm. An dem etwa kastaniengroßen Organ lassen sich zwei Seitenlappen (*Lobus dexter et sinister*) sowie ein Mittellappen (*Lobus medius*) und der Isthmus (*Isthmus prostatae*) abgrenzen (33). Umgeben ist die Prostata von einer bindegewebigen Kapsel sowie einem Venen- und Nervengeflecht, bei dem es sich um den für die Erektion wichtigen autonomen *Plexus prostaticus* handelt.

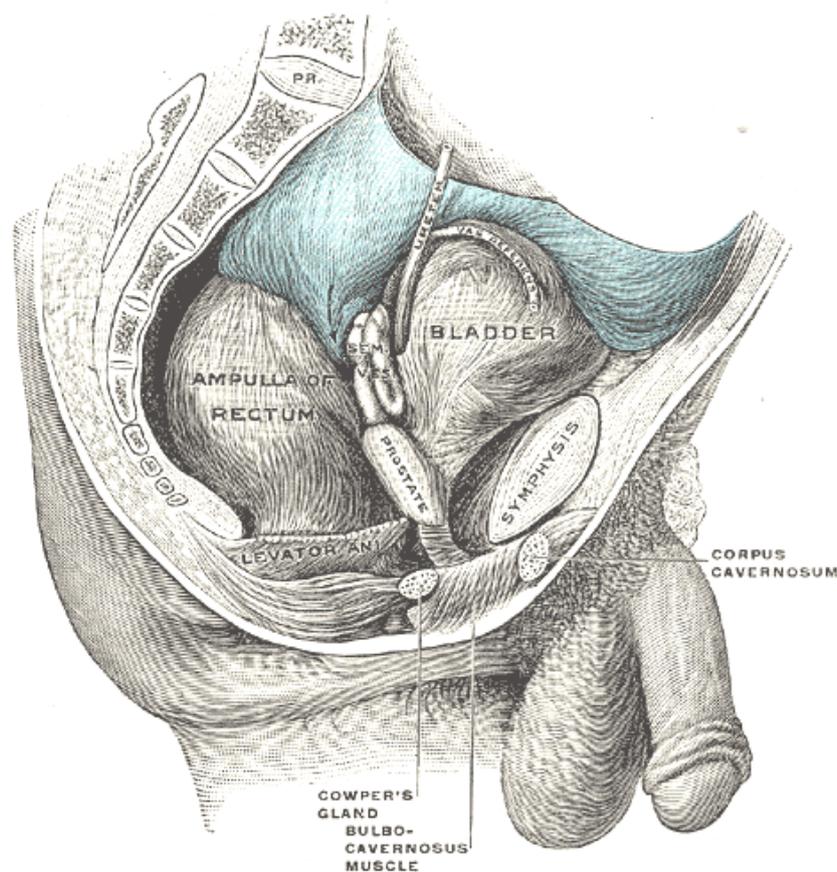


Abbildung 1: Das männliche Becken im Sagittalschnitt (Gray 1918, Fig. 1136 (34))

Die Prostata besteht feingeweblich aus Drüsengewebe, Bindegewebe und Muskulatur. Es finden sich 30 bis 50 tubuloalveolären Drüsen, die über ca. 20 Ausführungsgänge in die *Pars prostatica* der Harnröhre münden (33). Die Prostata wird in eine periphere Zone (ca. 70 % des Prostatagewebes), eine transitionale Zone zu beiden Seiten der Urethra (ca. 5 % des

Prostatagewebes) und eine zentrale Zone (ca. 25 % des Prostatagewebes), die von den Spritzkanälchen (*Ductus ejaculatorii*) durchzogen wird, eingeteilt (Abbildung 2) (35). Das ventrale Prostatagewebe besteht aus fibromuskulärem drüsenfreiem Stroma. Die Drüsen in allen weiteren Bereichen der Prostata produzieren ein leicht säuerliches Sekret mit einem pH-Wert von 6,4. Dieses macht etwa 30 % des Ejakulats aus. Es enthält das Prostata-spezifische Antigen (PSA), ein Enzym zur Verflüssigung der Samenflüssigkeit, und Spermin, ein Polyamin, welches stabilisierend auf die DNA der Spermatozoen wirkt (33). Außerdem enthält das Prostatasekret Proteasen, insbesondere saure Phosphatasen, die der Verflüssigung des Sekrets dienen (33). Zusammen mit dem Sekret der Samenblasen und der Bulbourethraldrüsen sowie der Spermien aus dem Hoden bildet dieses Sekret das Sperma.

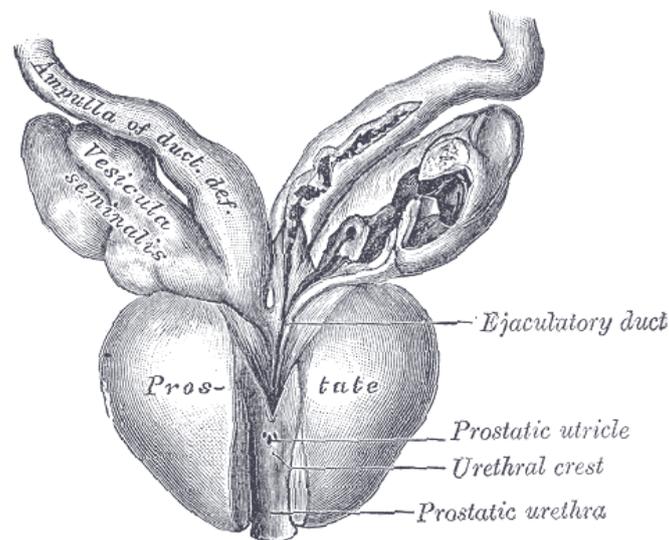


Abbildung 2: Die Makroanatomie der Prostata (Gray 1918, Fig. 1153 (34))

2.3 Wachstum und Differenzierung der Prostata: Androgenwirkung und Androgenrezeptorachse

Wachstum und Differenzierung der Prostata werden maßgeblich durch Androgene stimuliert (29). Es handelt sich dabei um Steroidhormone, zu denen Testosteron, Dihydrotestosteron, Dehydroepiandrosteron, Androstendion, Androstendiol und Androsteron zählen. Sie werden bei Männern zum überwiegenden Teil in den Leydig-Zellen des Hodens und in geringem Maß in der Nebennierenrinde produziert. Sie sind von großer Bedeutung für die Ausbildung des männlichen Phänotyps während der Embryonalentwicklung, die Spermatogenese, die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale und die männliche Fortpflanzung. Auch in anderen Geweben, wie z.B. Muskel- oder Knochengewebe, nehmen Androgene eine wichtige Rolle für Zellwachstum und -differenzierung ein (36). Für Differenzierung und Wachstum der Prostata stellen Testosteron und DHT die wichtigsten Androgene dar (37). Bei DHT handelt

es sich um das potentere Androgen, das durch das Enzym 5 α -Reduktase aus Testosteron metabolisiert wird und im Vergleich zu Testosteron eine höhere Affinität zum AR aufweist (38, 39). Ein komplexer Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Hoden liegt der Bildung von Testosteron zugrunde. Im Hypothalamus erfolgt die Bildung des Gonadotropin-freisetzenden Hormons (*Gonadotropin Releasing Hormone*, GnRH), welches im Hypophysenvorderlappen die Freisetzung der Gonadotropine FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und LH (Luteinisierendes Hormon) induziert. Während LH die Testosteronbildung in den Leydigzellen stimuliert, fördert FSH die Spermatogenese. Zur Verhinderung einer überschießenden hormonellen Produktion existiert ein negativer Rückkopplungsmechanismus, welcher bei steigendem Testosteronspiegel die weitere Freisetzung der Steuerhormone aus Hypothalamus und Hypophyse hemmt und auf diese Weise die Testosteronproduktion negativ reguliert. Das gebildete Testosteron liegt im Blut zum größten Teil gebunden an Sexualhormon-bindendes Globulin vor, lediglich ein geringer Teil des in der Blutbahn zirkulierenden Testosterons liegt ungebunden vor. Im Zytoplasma der Prostatazelle wird Testosteron durch die 5 α -Reduktase enzymatisch in DHT umgewandelt, welches dort als Ligand am AR binden kann (Abbildung 4) (38).

Bei dem AR handelt es sich um einen ligandenabhängigen Transkriptionsfaktor, der zu der Familie der Steroidhormonrezeptoren gehört. Das AR-codierende Gen ist beim Menschen auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq12) lokalisiert (Abbildung 3) (40, 41). Dieses besteht aus acht Exons, welche die vier funktionellen Domänen des AR-Proteins verschlüsseln. Das AR-Protein, zusammengesetzt aus 919 Aminosäuren, besitzt ein Molekulargewicht von 110 bis 112 kDa und besteht als nukleärer Rezeptor aus vier funktionellen Domänen, die durch acht Exons verschlüsselt werden (Abbildung 3).

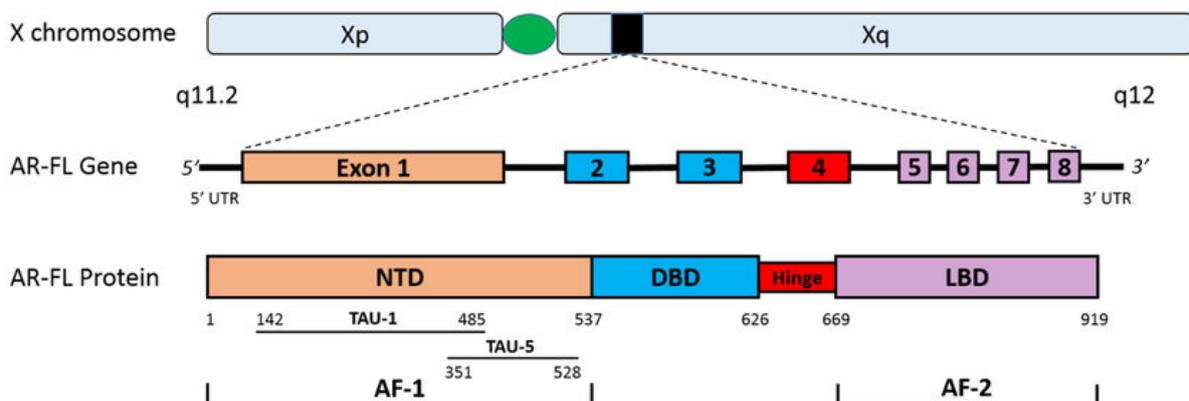


Abbildung 3: Der humane Androgenrezeptor (nach Crona *et al.* 2017 (42)). Schematische Darstellung der strukturellen Organisation des AR-Gens sowie -proteins mit den vier funktionellen Domänen. AF-1: *Activation Function 1*, AF-2: *Activation Function 2*, AR-FL: *Androgen Receptor Full Length*, DBD: *DNA-Binding Domain*, LBD: *Ligand-Binding Domain*, NTD: *N-Terminal Transactivation Domain*, TAU-1: *Transactivation Unit 1*; TAU-5: *Transactivation Unit 5*, UTR: *Untranslated Region*.

Vor Androgenbindung stabilisieren Hitzeschockproteine (HSP) den im Zytoplasma befindlichen AR (43, 44). Als Folge der Androgenbindung dissoziieren die HSP vom AR und es kommt zu einer Konformationsänderung sowie zu Phosphorylierungen des Rezeptors, der nun in der Lage ist, ein Homodimer mit einem weiteren AR auszubilden (Abbildung 4) (45, 46). In der Folge transloziert das Homodimer in den Nukleus, wo der Rezeptor an sogenannte *Androgen Response Elements* (ARE) der DNA sowie koregulatorische Proteine bindet und als Transkriptionsfaktor die Transkription androgener Zielgene regulieren kann (Abbildung 4) (47, 48). Neben dieser ligandenabhängigen Aktivierung kommt es zu einer Transaktivierung im Rahmen der Signaltransduktion unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Zytokine (49, 50). Beteiligt sind hier beispielsweise die Interleukine 6 und 8 (IL-6, IL-8), der Epidermale Wachstumsfaktor (*Epidermal Growth Factor*, EGF) und der insulinähnliche Wachstumsfaktor (*Insulin-like Growth Factor*, IGF-1) (Abbildung 4).

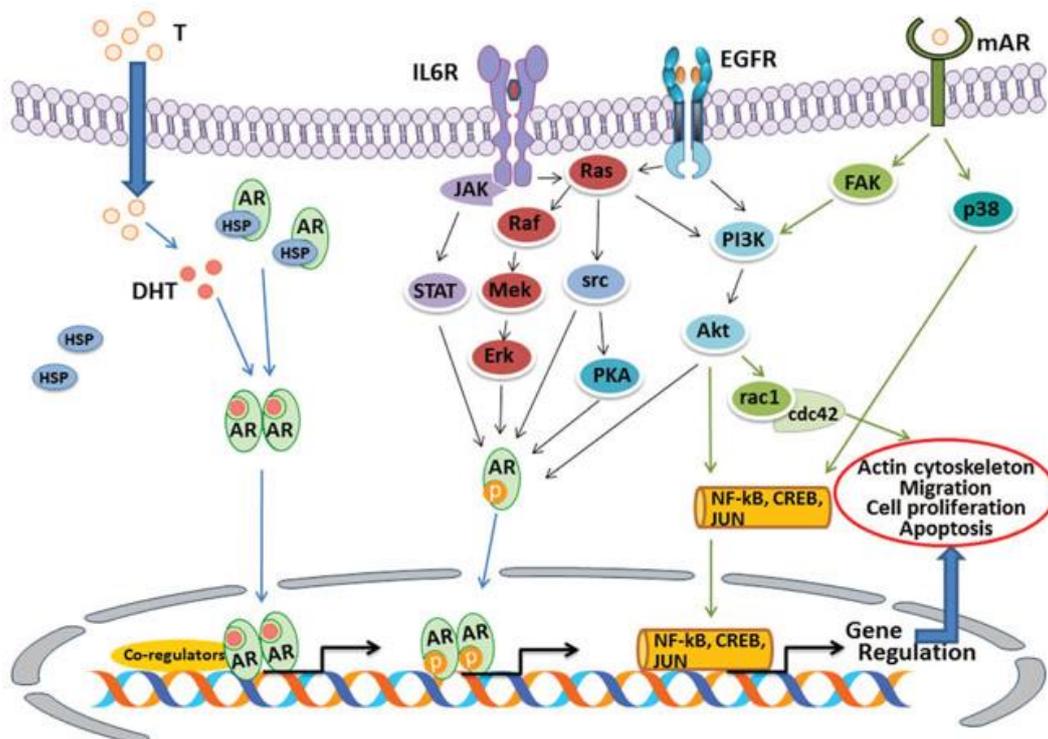


Abbildung 4: Ligandenabhängiger und -unabhängiger Androgenrezeptor-Signalweg (nach Pelekanou *et al.* 2013 (51)). T: Testosteron, DHT: Dihydrotestosteron, IL6R: Interleukin 6-Rezeptor, EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*, mAR: *membrane Androgen Receptor*, HSP: Hitzeschockprotein, JAK: Januskinase, STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*, PKA: *Protein Kinase A*, FAK: *Focal Adhesion Kinase*, PI3K: *Phosphoinositid-3 Kinase*, cdc42: *Cell Division Control Protein 42 Homolog*, NF-κB: *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-Cells*, CREB: *cAMP Response Element-binding Protein*, Mek: *Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*, Ras: *Rat Sarcoma Protooncogen*, Raf: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Protein*, Erk: *Extracellular Signal-regulated Kinases*, rac1: *Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*.

2.4 Epidemiologie und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms

Mit etwa 23 % aller diagnostizierten Krebsneuerkrankungen ist das PCa die häufigste Krebsneuerkrankung des Mannes in Deutschland. Das Deutsche Krebsregister schätzt die Zahl der im Jahr 2020 am PCa neu erkrankten Männer auf 61.200 und die Zahl der Sterbefälle auf 14.318 (1). Weltweit hat das PCa den Daten der GLOBOCAN-Studie zufolge mit 13,5 % die zweithöchste Inzidenz aller Krebserkrankungen und steht mit 6,7 % auf dem fünften Platz der Krebstodesfälle bei Männern (52). Dabei ist das PCa in 105 Ländern die am häufigsten diagnostizierte Tumorerkrankung. Für das Jahr 2018 wurden weltweit 359.000 PCa-assoziierte Todesfälle geschätzt. In der überwiegenden Zahl der Länder in West- und Nordeuropa sowie Nordamerika sinkt die Mortalität des PCa in den vergangenen Jahren stetig (53), was auf frühere Detektion der Krankheit durch das Screening des PSA-Werts im Rahmen der Vorsorge und verbesserte Behandlungsoptionen zurückzuführen sein könnte. Trotz der sinkenden Mortalität in westlich geprägten Ländern nimmt die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation, WHO*) dennoch an, dass sich die Mortalität des PCa innerhalb der kommenden 20 Jahre bis zum Jahr 2040 verdoppeln und insbesondere mit einer steigenden Lebenserwartung in afrikanischen und asiatischen Ländern zunehmen wird (54). Ausschlaggebend hierfür ist der mitunter bedeutendste Risikofaktor, das Alter. Das PCa ist die am häufigsten diagnostizierte Krebsentität des alten Mannes (52). So zeigen Daten des Robert-Koch-Institutes (RKI) von 2015/2016, dass insbesondere Männer ab dem 45. Lebensjahr am PCa erkranken. Dabei steigt das 10-Jahres-Erkrankungsrisiko ab dem 50. Lebensjahr deutlich an und liegt bei einem 75-jährigen Mann bei ca. 5 % (1). Autopsiestudien zur Prävalenz des PCa verdeutlichen diesen Trend. So kommt eine Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2015 zu dem Schluss, dass die Prävalenz von inzidentellem Prostatakrebs in der Altersgruppe der unter 30-jährigen Männern bei 5 % liegt, jedoch bei der Gruppe der über 79-jährigen Männer auf 59 % steigt (55). Aufgrund des demografischen Wandels ist davon auszugehen, dass Inzidenz und Prävalenz in den kommenden Jahren weiter ansteigen. Weiterhin ist eine familiäre Häufung als Risikofaktor belegt. Das Erkrankungsrisiko von Männern, deren Vater oder Bruder an einem PCa erkrankt ist, ist doppelt so hoch wie das Risiko der Männer ohne erkrankte erstgradige Verwandte (56). Ebenso konnte gezeigt werden, dass das Risiko, an einem PCa zu erkranken, mit der Anzahl der betroffenen Familienmitglieder steigt (56). Diverse Untersuchungen verweisen auch auf eine ethnische und genetische Komponente in der Ätiologie des PCa. Afro-amerikanische Männer weisen weltweit die höchste Inzidenz auf und erkranken früher als andere ethnische Gruppen an diesem Karzinom (57). Bei der Einordnung dieser Daten müssen der Einfluss unterschiedlich ausgeprägter Falldokumentationen und Früherkennungsprogramme sowie ein ungleicher Zugang zum Gesundheitssystem berücksichtigt werden (58). Neben dem Alter, der Ethnizität und der genetischen Prädisposition werden umweltassoziierte Faktoren diskutiert. Studien, die

die Inzidenz unter Männern untersuchten, die von Entwicklungsländern in industrialisierte Länder immigrierten, verweisen auf die Bedeutung eines westlich geprägten Lebensstils in der Entwicklung des PCa. So konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz unter afro-amerikanischen Männern in den USA etwa 40-fach höher ist als von im afrikanischen Herkunftsland lebenden Männern (59). Auch Daten über die Inzidenzen von in die USA immigrierten japanischen und chinesischen Männern im Vergleich zu nichtimmigrierten Männern berichten eine bis zu 43-fach erhöhte Neuerkrankungsrate nach Immigration (60). Außerdem scheint die Ernährung eine Rolle zu spielen. Hier stehen vor allem eine phytoöstrogenhaltige Kost, beispielsweise durch den Konsum von Soja-Produkten, sowie eine lycopenenreiche Ernährung, wie sie durch den Verzehr von Tomaten erreicht werden kann, im Verdacht, eine protektive Wirkung zu entfalten (61, 62).

2.5 Früherkennung und Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms

Die Identifikation aggressiver Prostatatumore bei asymptomatischen Männern mit einer Lebenserwartung von mehr als zehn Jahren ist Ziel der Früherkennungsmaßnahmen. Die empfohlene Krebsfrüherkennungsuntersuchung der gesetzlichen Krankenkassen, welche ab dem 45. Lebensjahr empfohlen wird, umfasst als Leistungen neben der Abfrage von Beschwerden die digital-rektale Tastuntersuchung der Prostata (DRU) und die Untersuchung der äußeren Geschlechtsorgane. Die aktuelle S3-Leitlinie zum PCa (2021) empfiehlt zudem die Bestimmung des PSA-Wertes zur Früherkennung des PCa bei Männern ab dem 45. Lebensjahr, sofern die Patienten über Nutzen der Bestimmung sowie Risiken einer Übertherapie aufgeklärt wurden (2). Zudem soll bereits ab dem 40. Lebensjahr die Bestimmung des PSA-Wertes bei Männern mit einem erhöhten Risiko für ein PCa erfolgen. Die europäische Gesellschaft für Urologie (*European Association of Urology*, EAU) empfiehlt die Bestimmung eines Ausgangs-PSA-Wertes bei Männern im Alter zwischen 40 und 45 Jahren zur Einleitung einer individualisierten, risikoadaptierten Weiterbetreuung mit dem Ziel, die Inzidenz fortgeschrittener Tumorstadien und die krebsspezifische Mortalität des PCa zu senken (63). Gemäß S3-Leitlinienempfehlung sollen erhöhte PSA-Werte ≥ 4 ng/ml in einem Intervall von sechs bis acht Wochen verlaufskontrolliert werden (2). Bei Vorliegen eines kontrollierten PSA-Wertes ≥ 4 ng/ml, eines karzinomverdächtigen Befundes der DRU oder eines auffällig schnell ansteigendem PSA-Wertes wird zur Diagnosesicherung und histologischen Subtypisierung das Prostatagewebe klassischerweise mittels Stanzbiopsie gewonnen. Auch die multiparametrische Magnetresonanztomografie (MRT) und der transrektale Ultraschall (TRUS) kommen in der Primärdiagnostik zum Einsatz. Zur weiteren Bestimmung des Tumorausmaßes (Staging) können in der Diagnostik je nach Stadium zusätzlich die Computertomografie (CT) sowie die Skelettszintigrafie zum Einsatz kommen.

2.6 Pathologie und Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms

2.6.1 Histopathologie und Gleason-Grading

Bei der überwiegenden Mehrheit der Prostatatumore handelt es sich histologisch um aus den azinären Drüsen der Prostata entstandene Adenokarzinome. Weitere seltenere Formen stellen u.a. duktale Adenokarzinome, aus der Harnblase infiltrierende Urothelkarzinome, neuroendokrine Tumore und Sarkome dar (27). Zur Beurteilung des Differenzierungsgrades der Adenokarzinome hat sich das 1966 von D. F. Gleason entwickelte und zuletzt 2014 von der Internationalen Gesellschaft für Urothologie (*International Society of Urological Pathology*, ISUP) modifizierte Gleason-Grading etabliert (64-67). Dieses definiert fünf Drüsenmuster, welche sich in Struktur und Architektur von nicht-tumorösem Gewebe unterscheiden (Abbildung 5).

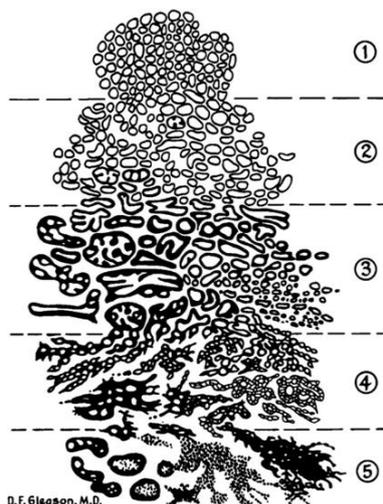


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Drüsenmuster nach D.F. Gleason (nach Humphrey 2004 (68)). Dargestellt sind die fünf Differenzierungsmuster der Drüsen von Grad 1-5. Grad 1: Sehr gut differenziert. Grad 5: sehr schlecht differenziert, Verlust der Drüsenstruktur.

Nach Prostatektomie wird der Gleason-Score durch Addition der beiden am häufigsten vorkommenden Drüsenmuster des Resektats bestimmt. Bei einem Stanzbiopsat wird der Gleason-Score durch Addition des am häufigsten vorliegenden Drüsenmusters und des am schlechtesten differenzierten Drüsenmusters ermittelt. Basierend auf dem Gleason-Score erfolgt die Zuordnung zu einer prognoserelevanten Graduierungsgruppe (67). Dabei entspricht nach aktueller ISUP-Empfehlung ein Gleasonscore von 6 der Graduierungsgruppe 1, der Gleasonscore 7a (3+4) der Graduierungsgruppe 2, der Gleason-Score 7b (4+3) der Graduierungsgruppe 3, ein Gleason-Score von 8 der Graduierungsgruppe 4 und ein Score von 9-10 der Graduierungsgruppe 5 (67). Karzinome mit einem Gleason-Score von ≤ 6 gelten hinsichtlich ihrer Prognose als gut. Für die Gleason-Scores 7a (3+4) und 7b (4+3) konnte ein

deutlicher Unterschied im rezidivfreien Überleben identifiziert werden, weshalb diese mittlerweile durch die ISUP-Gruppierung differenzierter eingeordnet werden (ISUP-Gruppe 2 bzw. 3) (69-71). Karzinome ab einem Gleason-Score von 8 gelten als Hochrisikokarzinome mit schlechter Prognose, wobei auch hier gezeigt werden konnte, dass das Vorliegen des Drüsenmusters 5 (Gleason-Scores 9/10) mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist als das alleinige Vorliegen des Drüsenmusters 4 (Gleason-Score 8, 4+4) und eine genauere Subgruppenstratifizierung im Sinne der ISUP-Graduierungsgruppen nötig und sinnvoll ist (71-73). Diese wurden im Jahr 2016 von der WHO übernommen und gelten somit als globaler Standard (74).

2.6.2 TNM-Klassifikation und UICC-Stadien

Bei der TNM-Klassifikation handelt es sich um eine internationale Klassifikation zur Stadieneinteilung von malignen soliden Tumoren. Die TNM-Klassifikation dient zur Bestimmung der anatomischen Tumorausbreitung anhand der Größe und Ausdehnung des Tumors (T), der Lymphknotenbeteiligung (N) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Zur Stadieneinteilung des PCa dient die Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* (UICC) (Tabelle 1) (75).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und Stadien des PCa nach UICC (Wittekind 2017)

Stadium	Tumorausbreitung
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
T1	Klinisch unauffälliger, nicht tastbarer Tumor
T1a	Inzidenteller Tumor, höchstens 5 % des Gewebes betroffen
T1b	Inzidenteller Tumor, mehr als 5 % des Gewebes betroffen
T1c	Tumornachweis durch Nadelbiopsie
T2	Tastbarer Tumor, auf die Prostata beschränkt
T2a	Maximal 50 % eines Prostatalappens betroffen
T2b	Mehr als 50 % eines Prostatalappens betroffen
T2c	Beide Prostatalappen betroffen
T3	Ausdehnung des Tumors über die Prostatakapsel hinaus
T3a	Tumorausbreitung über die Prostatakapsel hinaus, Samenblasen tumorfrei
T3b	Ausbreitung bis in die Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder hat sich auf benachbarte Strukturen ausgebreitet
NX	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N1	Regionale Lymphknotenmetastasen nachweisbar

Stadium	Tumorausbreitung
M0	Keine Fernmetastasierung nachweisbar
M1	Fernmetastasierung nachweisbar
M1a	Nichtregionale Lymphknoten betroffen
M1b	Knochenmetastasen nachweisbar
M1c	Andere Organe betroffen
UICC-Stadium	TNM
I	Bis T2a
II	T2b, T2c
III	T3
IV	T4 oder N1 oder M1

Als lokal begrenztes PCa gilt die lokal begrenzte Ausbreitung ohne Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen (T1-2 N0 M0). Die organüberschreitenden Stadien T3-4 N0 M0 werden als lokal fortgeschrittenes Stadium zusammengefasst. Bei Lymphknotenbefall oder Fernmetastasierung handelt es sich um ein fortgeschrittenes bzw. metastasiertes Stadium (T1-4 N1 und/oder M1) (2). Zur Stratifizierung des Rezidivrisikos lokal begrenzter Tumore wird nach D'Amico neben dem klinischen T-Stadium auch der Gleason-Score sowie der PSA-Wert herangezogen und in drei Risikogruppen eingeteilt (Abbildung 6) (76). Bei den Niedrigrisiko-Tumoren handelt es sich um Tumore mit einem PSA-Werte ≤ 10 ng/ml und einem Gleason Score von 6 sowie einem T-Stadium 1c/2a. Als Tumore mit intermediärem Risiko gelten alle Tumore mit einem PSA-Wert von 11-20 ng/ml oder einem Gleason-Score von 7 oder einem T-Stadium 2b. Als Hochrisikotumore werden alle Tumore mit einem PSA-Wert > 20 ng/ml oder einem Gleason-Score ab 8 oder einem T-Stadium 2c eingestuft, außerdem alle Tumore im fortgeschrittenen und metastasierten Stadium. Zusätzlich zu dieser Risikostratifizierung erfolgte die Definition der sogenannten Epstein-Kriterien für potenziell nicht-signifikante Tumore. Dazu zählen ein T1c-Stadium, eine PSA-Dichte von $\leq 0,15$ ng/ml/cm³, ein Gleason Score ≤ 6 , maximal eine positive Biopsie sowie weniger als 50 % Tumorgewebe in der Stanzbiopsie (77, 78). Diese Klassifizierung erfolgt zur Identifizierung klinisch unbedeutender Karzinome, für die therapeutisch eine aktive Überwachung infrage kommt.

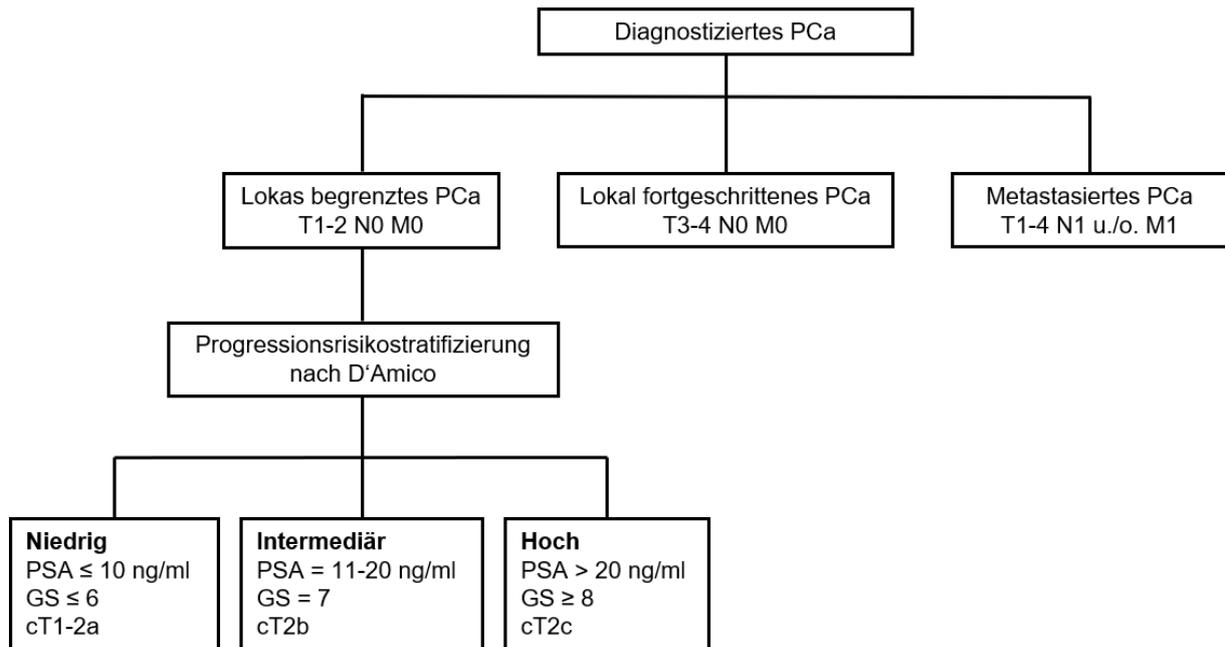


Abbildung 6: Risikostratifizierung des lokal begrenzten PCa nach D'Amico (76)

2.7 Therapie des lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms

Für das lokal begrenzte PCa stehen eine Vielzahl an kurativen Therapieoptionen zur Verfügung. Dabei orientiert sich die Wahl der Therapie an der Lebenserwartung des Patienten, seinem Gesundheitszustand sowie individuellen Komorbiditäten, Risiken und Wünschen. Kurativ intendierte Therapieoptionen kommen dabei für alle Männer mit einer Lebenserwartung von mehr als zehn Jahren sowie einem guten Gesundheitszustand infrage (2).

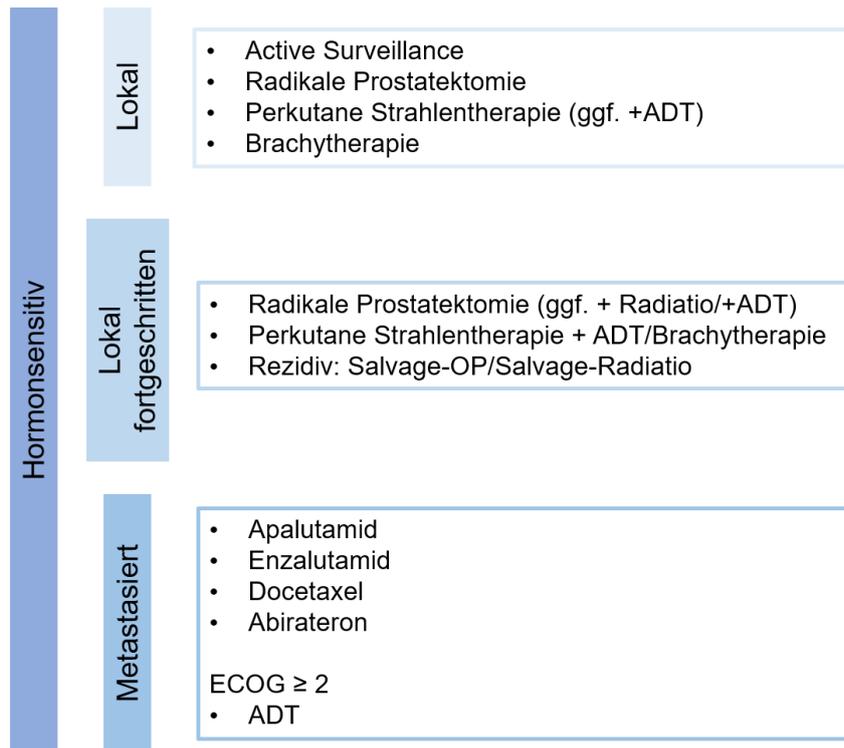


Abbildung 7: Therapieoptionen für das hormonsensitive Prostatakarzinom gemäß S3-Leitlinie 2021 (2)

Im Falle einer Niedrigrisiko-Konstellation mit einem PSA-Wert \leq 10 ng/ml, einem Gleason-Score \leq 6, dem klinischen T-Stadium cT1 und cT2a, Tumorgewebe in maximal zwei Stenzen sowie maximal 50 % Tumorgewebe pro Stanze ist gemäß aktueller Leitlinie in Anlehnung an die Epstein-Kriterien die Möglichkeit zur Aktiven Überwachung gegeben (2, 79). Engmaschige Verlaufskontrollen dienen der Hinauszögerung definitiver Therapien mit dem Ziel der Vermeidung von Übertherapien. Gleichzeitig soll die Identifizierung desjenigen Zeitpunktes gewährleistet werden, an dem sich eine Krankheitsprogression feststellen lässt und eine kurative Therapie initiiert werden muss. Für alle Risikogruppen kommen gemäß S3-Leitlinie die radikale Prostatektomie sowie die perkutane Strahlentherapie zum Einsatz, letztere ab mittlerem Risikoprofil in Kombination mit adjuvanter hormonablativer Androgendeprivationstherapie (ADT) (Abbildung 7) (2). Neben der bilateralen Orchiektomie ist eine hormonablative Therapie durch den Einsatz von GnRH-Analoga, GnRH-Antagonisten sowie steroidal und nicht-steroidal Antiandrogenen realisierbar. Zudem stellt die Brachytherapie ein weiteres mögliches strahlentherapeutisches Verfahren für Karzinome mit niedrigem Risikoprofil dar. Sofern eine Standardtherapie oder die aktive Überwachung abgelehnt werden, kann Patienten mit einem unilateralem und lokal begrenzten Tumor eine fokale Therapie angeboten werden. Beispielsweise kommt eine Studie zur fokalen, vaskulär-gezielten photodynamischen Therapie (VTP) zu dem Ergebnis, dass bei gutem Potenz- und Kontinenserhalt eine radikale Therapie seltener notwendig wird im Vergleich zur aktiven

Überwachung (80). Auch der fokal-therapeutische hochintensive fokussierte Ultraschall (HIFU) wird im Rahmen prospektiver randomisiert kontrollierter Studien durchgeführt. Im lokal fortgeschrittenen Stadium kommt als therapeutische Option neben der radikalen Prostatektomie die perkutane Strahlentherapie in Kombination mit einer hormonablativen Therapie oder in Kombination mit einer Brachytherapie infrage, im letzten Fall für Karzinome der klinischen Ausbreitung T3, jedoch nicht T4 (2). Als palliatives Therapiekonzept steht im Fall einer geringen Lebenserwartung oder relevanter Komorbiditäten das *Watchful Waiting* zur Verfügung, eine Beobachtungsstrategie mit verzögerter symptomorientierter Therapie. Weiterhin kann eine palliativ intendierte primäre ADT eingeleitet werden. Für diese konnte im lokal fortgeschrittenen Stadium eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (PFS) identifiziert werden, was sich für das lokal begrenzte Stadium jedoch nicht generell bestätigte (81, 82). Lediglich Patienten mit aggressiv wachsendem Tumor profitierten in diesem Stadium von einer frühen ADT (83). Für Lokalrezidive mit entsprechendem PSA-Anstieg nach radikaler Prostatektomie bzw. Bestrahlung steht das jeweils andere Verfahren als sog. *Salvage*-Therapieoption (Rettungsoption) zur Verfügung. Die ADT stellt in diesem Fall kein Standardtherapieverfahren dar (2).

2.8 Therapie des metastasierten hormonsensitiven Prostatakarzinoms

In Deutschland liegt bei Erstdiagnose in ca. 20 % der PCa-Fälle eine metastasierte Erkrankung vor, die im Vergleich zum lokalisierten Stadium mit einer ungefähr halbierten 5-Jahres-Überlebensrate assoziiert ist (1). Die Therapie des metastasierten hormonsensitiven Prostatakarzinoms (mHSPC), das durch das Vorliegen mindestens einer Fernmetastase definiert ist, hat in den vergangenen Jahren durch umfangreiche prospektive Studien eine bedeutende Veränderung erfahren. War in der Vergangenheit die alleinige ADT primäre Therapieoption, so stehen nun mit dem Taxan Docetaxel, dem CYP17A1-Inhibitor Abirateron in Kombination mit einem Kortikosteroid zum Nebenwirkungsmanagement sowie dem nicht-steroidalem Antiandrogen Apalutamid in Kombination mit dem bisherigen Goldstandard ADT weitere Wirkstoffe zu Verfügung, die sowohl das PFS als auch das Gesamtüberleben (OS) verlängern können (84-89). Auch für den nichtsteroidalen AR-Antagonisten Enzalutamid in Kombination mit einer ADT fand sich im Rahmen der ENZAMET- und der ARCHES-Studie Evidenz für die Verlängerung des PFS sowie OS, sodass Enzalutamid im Jahr 2021 von der EMA für diese Indikation zugelassen wurde und in der jüngst aktualisierten S3-Leitlinie aus dem Jahr 2021 als Therapieoption für das metastasierte hormonsensitive PCa aufgeführt wird (2, 7, 8). Weiterhin werden derzeit Nutzen und Risiken von Mehrfachtherapien, bestehend aus ADT, Chemotherapie und antiandrogener Therapie, sowie der Effekt einer lokalen Therapie im primär metastasierten Stadium untersucht (90, 91).

2.9 Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms

Trotz eines initial häufig sehr guten klinischen Ansprechens auf die ADT kommt es bei nahezu allen Männern unter ADT zu einem Therapieversagen im Sinne des Fortschreitens der Erkrankung. Das kastrationsresistente Prostatakarzinom (CRPC) ist durch ein biochemisches Rezidiv oder den klinischen Progress der Erkrankung trotz niedrigem Serum-Testosteronspiegel (< 50 ng/dl) gekennzeichnet (92). Im nicht-metastasierten kastrationsresistenten Stadium (nmCRPC) stehen neben der alleinigen ADT mit den nicht-steroidalen Antiandrogenen Enzalutamid, Apalutamid und Darolutamid wichtige Substanzen zur Verfügung, die bei Männern mit einem hohen Metastasierungsrisiko das Metastasen-freie Überleben signifikant reduzieren konnten (Abbildung 8) (6, 93, 94). Auch für Abirateron (+ Kortikosteroid) konnte in der nmCRPC-Situation eine signifikante Verringerung der PSA-Level gezeigt werden (95). Für die Erstlinientherapie des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (mCRPC) stehen für Patienten mit asymptomatischer oder gering symptomatischer Erkrankung Docetaxel, Abirateron und Enzalutamid zur Verfügung (Abbildung 8). Für symptomatische Patienten mit ossärer Metastasierung kann zudem der Alphastrahler Radium-223 zum Einsatz kommen. Für alle Substanzen konnten deutliche Überlebensvorteile identifiziert werden (3, 96-98). Differenziert betrachtet wird nach aktueller S3-Leitlinie die Gruppe der Patienten mit einem reduzierten Gesamtzustand (ECOG Performance Status ≥ 2 , (99)). Hier steht eine symptombezogene Therapie im Vordergrund (Abbildung 8) (2). Die Identifizierung einer optimalen Sequenztherapie für Zweit- und Drittlinie nach Tumorprogress und Therapieversagen ist von hohem wissenschaftlichem Interesse. Für die Sequenztherapie mit androgengerichteter Behandlung konnte ein Vorteil des sequenziellen Einsatzes von Abirateron gefolgt von Enzalutamid gegenüber Enzalutamid gefolgt von Abirateron gefunden werden (100, 101). Nach einer taxanbasierten Chemotherapie stehen leitliniengemäß Abirateron plus Prednisolon, Enzalutamid, Radium-223 sowie Cabazitaxel zur Verfügung (Abbildung 8) (5, 102, 103). Hier konnte im Zuge der CARD-Studie der hohe Stellenwert von Cabazitaxel in der Therapiesequenz des mCRPC nach Docetaxel und antiandrogener Therapie (Enzalutamid oder Abirateron) herausgestellt werden (104). Auch die Wirksamkeit und Sicherheit einer Kombinationstherapie bestehend aus Cabazitaxel und Enzalutamid wird derzeit in einer Phase 1/2-Studie überprüft (105). Neben den bereits genannten Substanzen werden in einer Vielzahl von Studien weitere mögliche therapeutische Optionen für das mCRPC untersucht, so unter anderem Inhibitoren der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP-Inhibitoren) (106-108), aus deren Gruppe der Wirkstoff Olaparib nach Zulassungen für das Pankreas-, Ovarial- und Mamakarzinom erst kürzlich die Zulassung zur Behandlung des mCRPC nach vorangegangener antihormoneller Therapie und nachgewiesener Mutation der Gene BRCA1 und/oder BRCA2 erhielt und somit für die zielgerichtete Therapie des PCa zur Verfügung steht

(107). Weiterhin zu nennen sind an dieser Stelle die Radioligandentherapie mit ¹⁷⁷Lutetium-PSMA-617 (109, 110) oder immuntherapeutische Ansätze, beispielsweise mit dem PD-1-Inhibitor Pembrolizumab (111-113). Zudem zeigte eine Interimsanalyse der klinischen Phase 1b-Studie COSMIC-021 einen antitumorösen Effekt sowie eine gute Verträglichkeit der Kombinationstherapie bestehend aus dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab und dem Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Cabozantinib bei Patienten mit einem mCRPC (114). Die Kombination beider Wirkstoffe wird in einer Phase 3-Studie bei mCRPC-Patienten als Zweitlinientherapie nach bereits erfolgter antiandrogener Behandlung evaluiert (115). Derartiger Kombinationsregime sowie der Identifizierung günstiger Sequenztherapien gilt das aktuelle Augenmerk der klinischen Untersuchungen zum PCa.

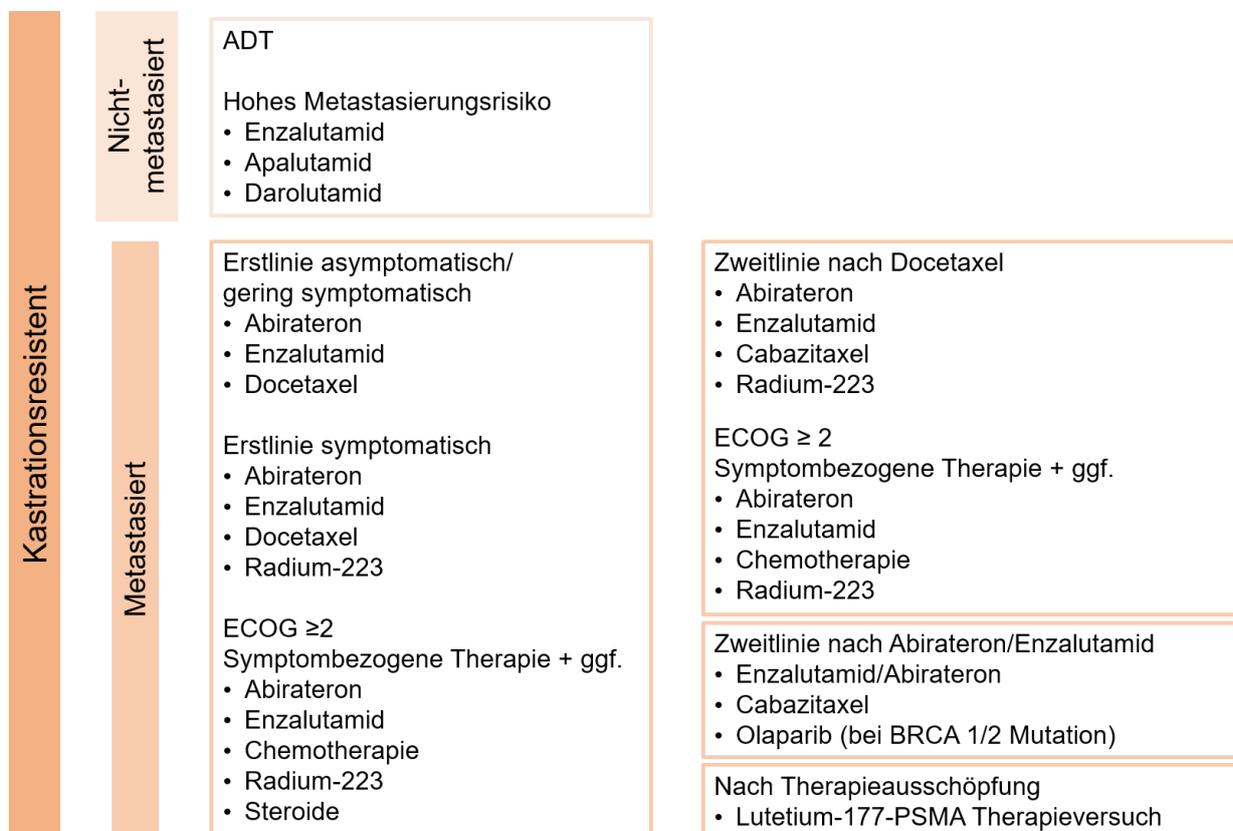


Abbildung 8: Therapieoptionen für das kastrationsresistente Prostatakarzinom gemäß S3-Leitlinie 2021 (2)

2.10 Das Zweitgenerations-Antiandrogen Enzalutamid

Bei dem nicht-steroidalen Antiandrogen Enzalutamid handelt es sich um ein Therapeutikum, welches seit seiner Erstzulassung durch die FDA im Jahr 2012 eine elementare Bedeutung in der Therapie des PCa eingenommen hat (vgl. 2.8, 2.9, 2.10). Es wird als Zweitgenerations-Antiandrogen bezeichnet und weist im Vergleich zu den Antiandrogenen der ersten Generation (z.B. Bicalutamid, Flutamid) verbesserte pharmakologische Eigenschaften auf (116). Sein

Wirkmechanismus besteht aus der Inhibition der Androgenbindung an den AR, der Translokation des AR in den Nukleus sowie der AR-Bindung an die DNA und Rekrutierung von Koaktivatoren (Abbildung 9). Es ist in einer täglichen Dosis von 160 mg oral applizierbar und zeichnet sich durch eine höhere AR-Bindungsaffinität als das Erstgenerations-Antiandrogen Bicalutamid sowie fehlende agonistische Aktivität am AR aus (117).

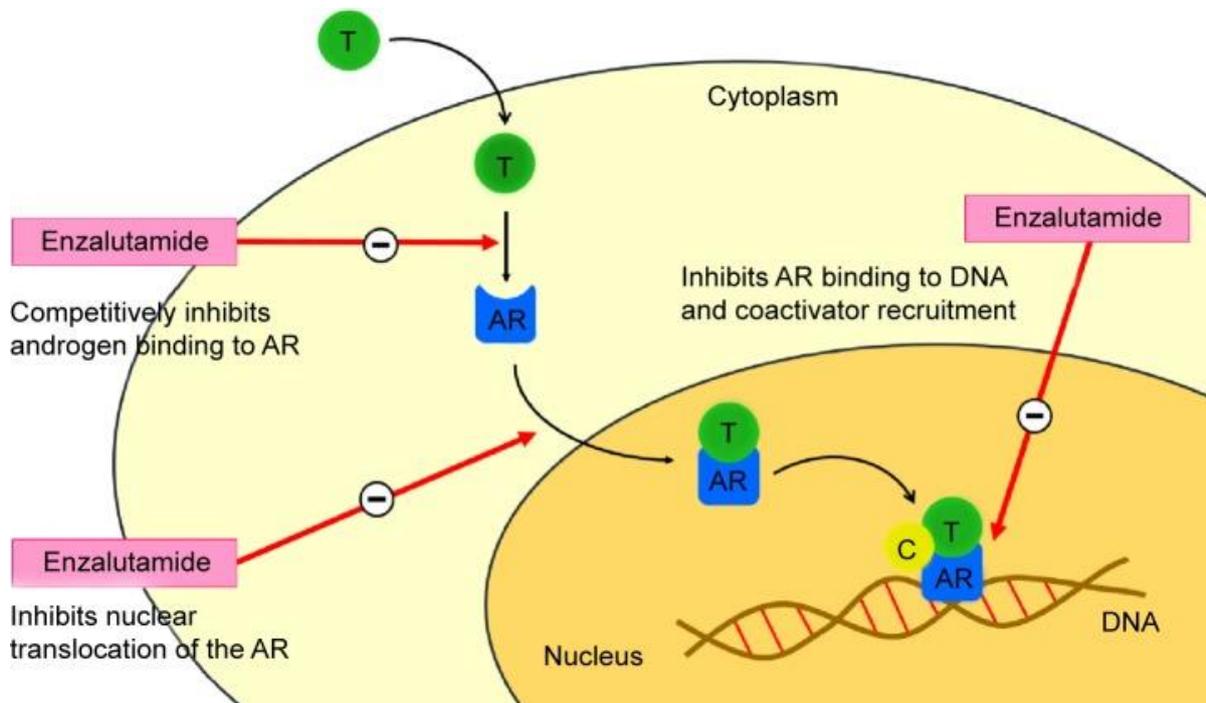


Abbildung 9: Der Wirkmechanismus von Enzalutamid im Androgen-Signalweg (nach Rodriguez-Vida *et al.* 2015 (118)). Enzalutamid inhibiert die Androgenbindung an den AR, dessen Translokation in den Nukleus sowie die Bindung des ARs an die DNA und die Rekrutierung von Koaktivatoren. T: (Dihydro-)Testosteron, AR: Androgenrezeptor, C: Koaktivatoren.

In der Zulassungsstudie für den Enzalutamid-Einsatz nach bereits erfolgter Docetaxeltherapie zeigten sich als häufige Nebenwirkungen in der Interventions-Gruppe vor allem Fatigue, Diarrhoe, Hitzewallungen sowie muskuloskelettaler Schmerz, Kopfschmerz und Frakturen (5). Zudem trat bei 0,6 % der Patienten im Enzalutamid-Arm ein Krampfanfall auf (5). Die konvulsive Wirkung von Enzalutamid konnte sowohl im Tiermodell als auch in der Phase 1/2-Studie als dosisabhängig identifiziert werden, wobei dieser Effekt ab einer täglichen Dosis von mehr als 360 mg auftrat (4, 119). Die Behandlung von Patienten mit einem bekannten Krampfleiden oder für einen Krampfanfall prädisponierenden Nebenerkrankungen bedarf daher einer individuellen Risiko-Nutzen-Abwägung (5). Neben dem Einsatz beim PC zeigte sich Enzalutamid ebenfalls beim fortgeschrittenen, dreifach-negativen, AR-positiven Mammakarzinom als wirksam (120). Für das fortgeschrittene hepatozelluläre Karzinom (HCC), bei dem eine hohe AR-Expression bekannt ist, liegt eine heterogene Datenlage vor. Während in einer Phase 1b-Studie kein antitumoraler Effekt von Enzalutamid gefunden werden konnte

(121), kam eine andere Studie zu dem Schluss, dass Enzalutamid in Kombination mit Olaparib sowohl *in vitro* als auch *in vivo* synergistische hemmende Effekte auf das Wachstum von hepatozellulären Karzinomen aufweist (122).

2.11 Enzalutamid-Resistenz

Trotz seines hohen Stellenwertes in der Therapie des PCa ist die Wirkung von Enzalutamid durch therapieassoziierte oder primäre Resistenzen limitiert. So erlitten in der PREVAIL-Studie zur Zulassung in der Chemotherapie-naiven Situation etwas weniger als 10 % der Patienten bereits innerhalb der ersten drei Behandlungsmonate mit Enzalutamid einen radiografischen Progress (3), in der AFFIRM-Studie mit vorangegangener Chemotherapie sogar mehr als 20 % (5). Bei diesen Subgruppen mit sehr frühem Krankheitsprogress kann von einer primären Enzalutamid-Resistenz ausgegangen werden (123). Wird ein nicht erfolgter PSA-Abfall von ≥ 50 % als Kriterium der primären Enzalutamid-Resistenz gewählt, so fanden sich in der AFFIRM-Studie 46 % bzw. in der PREVAIL-Studie 22 % der Patienten mit primärer Resistenz (3, 5). Bei den Patienten mit einem initialen PSA-Ansprechen kam es innerhalb einer medianen Zeit von 8,3 (AFFIRM) respektive 11,2 Monaten (PREVAIL) zu einem erneuten PSA-Anstieg und einem damit verbundenen beginnenden Wirkverlust von Enzalutamid (3, 5, 124). Die molekularen Mechanismen der Enzalutamid-Resistenz sind vielfältig und hinsichtlich ihrer Komplexität und Gesamtheit zum derzeitigen Zeitpunkt nicht vollständig verstanden. Zu ihnen zählen sowohl AR-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen, wie AR-Spleißvarianten, Mutationen des AR, neuroendokrine Transdifferenzierung, die tumoreigene Androgensynthese, die Überexpression des Glukokortikoidrezeptors (GR) und die Modulation intrazellulärer Signalwege (Abbildung 10).

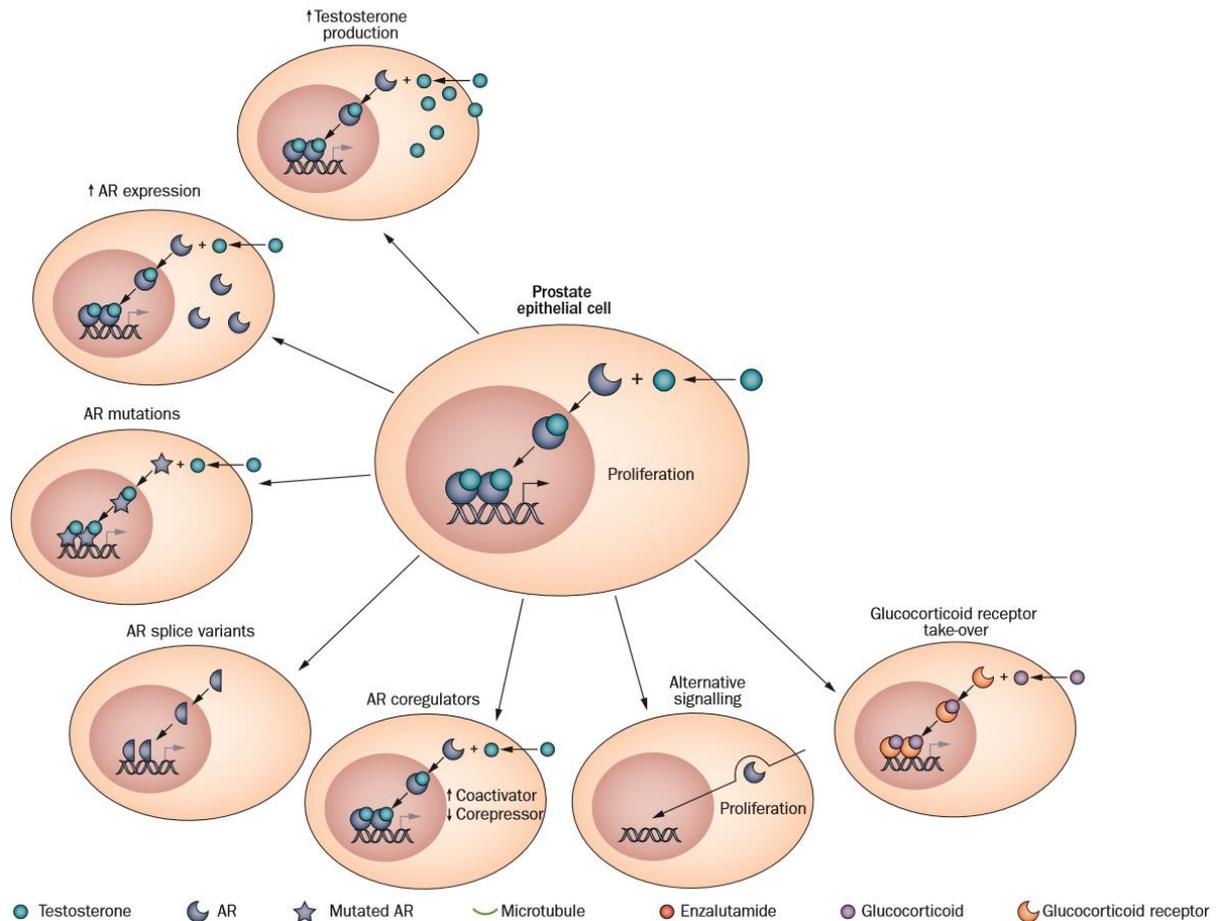


Abbildung 10: Verschiedene Mechanismen der Enzalutamidresistenz (nach Claessens *et al.* 2014 (125)). Im Verlauf der Erkrankung oder bereits zu Therapiebeginn ist es der Tumorzelle durch verschiedene Mechanismen möglich, eine Enzalutamid-Resistenz auszubilden. Dies geschieht u.a. durch intratumorale Androgenproduktion, eine gesteigerte Androgenrezeptor (AR)-Expression, die Ausbildung konstitutiv-aktiver AR-Spleißvarianten sowie AR-Mutationen. Weiterhin spielen AR-Koaktivatoren, der Glukokortikoidrezeptor (GR) sowie die Aktivierung alternativer Signalwege eine Rolle in der Entstehung der Enzalutamid-Resistenz.

2.11.1 AR-Spleißvarianten

Ein bereits intensiv untersuchter Resistenzmechanismus ist die Bildung der AR-Spleißvariante AR-V7, bei der es sich um einen verkürzten AR ohne C-terminale Ligandenbindedomäne handelt (126, 127). Hieraus resultieren eine konstitutive Aktivität des Rezeptors sowie ein fehlendes Ansprechen von Inhibitoren der Ligandenbindedomäne, wie z.B. von Enzalutamid. Eine Assoziation von AR-V7-positiven zirkulierenden Tumorzellen (*Circulating Tumor Cells*, CTC) und einer Enzalutamidresistenz wurde bereits identifiziert. So zeigten AR-V7-positive Patienten ein kürzeres PFS unter Enzalutamid-Therapie als AR-V7-negative Patienten (9). Molekular kommt so der Spleißvariante AR-V7 eine hohe Bedeutung zu. Sie kann beispielsweise durch den Einsatz des antihelminthischen Wirkstoffs Niclosamid gezielt inhibiert werden (128). Für Niclosamid konnte *in vitro* eine Überwindung der Enzalutamid-

Resistenz gezeigt werden (128, 129). In einer klinischen Phase 1-Studie kam es jedoch nicht zu einem PSA-Abfall. Aufgrund der eingeschränkten oralen Bioverfügbarkeit konnten keine Plasmawirkstoffkonzentrationen erreicht werden, die den therapeutisch wirksamen präklinisch untersuchten Spiegeln entsprachen (130). Das zunächst vielversprechende AR-V7 abbauende Galeterone erreichte in einer Phase 3-Studie seinen primären Endpunkt nicht, sodass die Weiterentwicklung dieses Wirkstoffes eingestellt wurde (131). Weiterhin von Interesse sind Antagonisten der N-terminalen Domäne des AR, wie z.B. der *Small-molecule* Inhibitor Ralanitenacetat (EPI-002) bzw. sein Metabolit Ralaniten (EPI-506) (132). Auch dieser Wirkstoff wurde aufgrund seiner hohen Metabolisierungsrate im Rahmen der Phase 1/2-Studie nicht weiterentwickelt. Aktuell erfolgt die Suche nach alternativen Substanzen dieser Wirkstoffklasse (133). Einen weiteren Ansatz zur gezielten AR-V7-Therapie stellen die Inhibitoren der Bromodomäne und extraterminalen Domäne (BET-Inhibitoren) dar. Diese inhibieren insbesondere das BET-Protein BRD4, welches als epigenetischer Regulator für die Onkogen-Expression von z.B. *MYC* verantwortlich ist und mit dem N-Terminus des AR interagiert (134). Hier konnte präklinisch eine Wirksamkeit in Kombination mit Enzalutamid zur Resistenzüberwindung und in Kombination mit Chemotherapie identifiziert werden (135, 136). Die Ergebnisse der Phase 1/2-Studien mit den BET-Inhibitoren ZEN-3694 und GS-5829, welche zusätzlich in Kombination mit Enzalutamid untersucht werden, sind aktuell ausstehend (137, 138). Eine weitere Studie konnte erst kürzlich die Wirksamkeit von Inhibitoren der Monoaminoxidase A (MAO-A) als Ansatzpunkt einer zielgerichteten Therapie AR-V7-bedingter Enzalutamidresistenz demonstrieren (139). Die Autoren vermuten als Folge einer durch Enzalutamid induzierten erhöhten AR-V7-Expression eine gesteigerte Expression der MAO-A, welche ihrerseits einen Enzalutamid-Resistenzerwerb durch eine Involvierung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 α (HIF 1 α) begünstigt. *In vitro* führte die Gabe von MAO-A-Inhibitoren zu einer Enzalutamid-Resensitivierung Enzalutamid-resistenter Zellen (139). Die Vielfältigkeit der therapeutischen Ansätze in der Überwindung der AR-V7-medierten Enzalutamidresistenz wird durch eine Studie verdeutlicht, die *in vitro* eine Herunterregulation der AR-V7-Expression und eine Resensitivierung Enzalutamid-resistenter Zellen durch Rhizochalinin feststellen konnte, eine halbsynthetische Verbindung ausgehend von Rhizochalin (140). Dabei handelt es sich um eine bioaktive Substanz, die ursprünglich aus marinen Schwämmen (*Rhizochalina incrustata*) isoliert wurde (140).

2.11.2 Mutationen und Amplifikation des Androgenrezeptors

Weiterhin kommen Mutationen des AR als Resistenzmechanismen in Frage. So konnte die Missense-Mutation F877L bzw. F876L in zellfreier DNA von CRPC-Patienten isoliert werden, welche nach Enzalutamid-Behandlung einen Krankheitsprogress vorwiesen (141). Im Rahmen dieser Mutation kommt es zu einer agonistische Aktivität von sowohl Enzalutamid als auch

Apalutamid (141). Insbesondere in Kombination mit der T878A-Mutation (F877L/T878A-Doppelmutation) konnte eine starke agonistische Enzalutamid-, Apalutamid- und Flutamid-Aktivität gefunden werden, jedoch ebenfalls eine effektive antagonistische Aktivität von Bicalutamid (10, 142). Der *Small-molecule* Inhibitor Darolutamid, der sich in seiner chemischen Struktur von anderen Antiandrogenen unterscheidet, konnte als Inhibitor der transkriptionellen Aktivität verschiedener AR-Mutanten, darunter F877L und F877L/T878A, identifiziert werden (143). Ebenso stellt die Amplifikation und resultierende Überexpression des AR, welche in Enzalutamid-resistenten Zelllinien nachgewiesen werden konnte, einen möglichen Resistenzmechanismus dar (144, 145). Zudem wurde durch Untersuchung zirkulierender zellfreier Tumor-DNA eine Assoziation von AR-Amplifikation und primärer Resistenz sowie schlechterem Outcome unter Enzalutamid-Therapie gefunden werden (11). Auch im Rahmen einer multizentrischen Biomarkerstudie zeigten Patienten mit AR-amplifizierten Tumoren ein schlechteres Ansprechen auf eine Enzalutamid-Behandlung mit kürzerem OS sowie PFS (146).

2.11.3 Tumoreigene Androgensynthese

Die intratumorale Androgensynthese und folgende Reaktivierung des AR wurde bereits als Resistenzmechanismus nach ADT identifiziert (12, 13). In Enzalutamid-resistenten Zelllinien wurde eine Überexpression des in die Androgenbiosynthese involvierten Enzyms AKR1C3 und eine hieraus resultierende intratumorale Androgensynthese als Enzalutamid-Resistenzmechanismus beschrieben (147). Die Inhibition dieses Enzyms mittels Indometacin, einem nicht-steroidalen antirheumatischen Wirkstoffes, und Kombinationsbehandlung mit Enzalutamid resultierte in einer Wachstumshemmung Enzalutamid-resistenter Tumore (147). Dieser Effekt konnte ebenso mit dem Antiandrogen Abirateron gezeigt werden (148). Eine klinische Phase 1/2-Studie evaluiert auf Grundlage dieser Daten die Kombinationsbehandlung von Enzalutamid und Indometacin (149).

2.11.4 Neuroendokrine Transdifferenzierung

Obwohl es sich bei neuroendokrinen Karzinome der Prostata (NEPC) um seltene Tumore handelt, konnte in den vergangenen Jahren eine deutliche Zunahme verzeichnet werden, was sich in einem Anstieg der Inzidenz um ca. 7 % pro Jahr widerspiegelt (150). Diese sind mit Metastasierung und einem schlechteren Überleben assoziiert (151). Die neuroendokrine Differenzierung kennzeichnet sich u.a. immunhistochemisch durch die Expression neuroendokriner Marker, wie die neuronenspezifische Enolase (NSE) oder Chromogranin A (CgA). Initial konnte bereits Ende der 1990er Jahre im Zellmodell gezeigt werden, dass ein andauernder Hormonentzug in LNCaP-Zellen zu einer neuroendokrinen Differenzierung der

Zellen führt und diese im Umkehrschluss durch erneute Hormongabe unterdrückt werden kann (152). Weiterhin wurde eine Assoziation mit einer verminderten AR-Expression und -Aktivität gefunden (153). Während lediglich ein sehr geringer Teil der PCa-Patienten bereits bei Diagnosestellung neuroendokrine Tumoranteile vorweist (< 1 %), entwickelt der Großteil der betroffenen Patienten diese erst im Verlauf unter anti-hormoneller Therapie (154). So konnten Aggarwal *et al.* bei etwa jedem fünften Patienten mit mCRPC neuroendokrin differenzierte Tumore in Biopsien feststellen (151). Klinisch fanden sich bei Patienten mit erhöhten CgA-Leveln ein signifikant kürzeres PFS sowie OS (155). Die Bestimmung der NSE oder von CgA finden derzeit allerdings keinen routinemäßigen Einsatz als Biomarker in der klinischen Praxis. *In vitro* Studien konnten eine Assoziation von neuroendokriner Differenzierung und Enzalutamidresistenz finden. So zeigten Dang *et al.* die Zunahme neuroendokriner Differenzierung unter Enzalutamid-Behandlung durch Involvierung von eingewanderten Mastzellen und der nicht-kodierenden microRNA (miR) miR32 (14). Die Ergebnisse einer weiteren kürzlich veröffentlichten Studie legen die neuroendokrine Differenzierung als Mechanismus der Enzalutamidresistenz, mediiert durch den Transkriptionsfaktor 4 (TF4), nahe (15). Auch konnte im Rahmen der Studie das Parathormon-related Protein (PTHrP), ein weiterer neuroendokriner Marker, als assoziiert mit einer Enzalutamid-Resistenz identifiziert werden. Die Autoren konnten in der Folge eine Enzalutamid-Resensitivierung durch Blockade von PTHrP sowie TF4 erzielen (15). Tiefere Untersuchungen zum Verständnis der neuroendokrinen Differenzierung als Mechanismus der Enzalutamid-Resistenz sind jedoch ausstehend.

2.11.5 Überexpression des Glukokortikoidrezeptors

Als ein androgenunabhängiger, mit Enzalutamid-Resistenz assoziierter Mechanismus wurde die Überexpression des GR in Enzalutamid-resistenten Zelllinien, in Enzalutamid-resistenten Tumoren und in Metastasenbiopsaten von Patienten unter Enzalutamid-Therapie identifiziert (156). Zudem werden AR-Zielgene wie *PSA* und die *Transmembrane Protease Serine Subtype 2 (TMPRSS2)* durch den GR reguliert (17). Die Inhibition des GR mit dem Progesteron- und GR-Antagonisten Mifepriston führte in Enzalutamid-resistenten Zelllinien zu einer reduzierten Zellproliferation sowie einer verminderten Zellzahl (156). Die therapeutische Bedeutung einer Inhibition des GR wird derzeit im Rahmen klinischer Studien untersucht, so unter anderem die Kombination von Enzalutamid und Mifepriston bei Patienten mit mCRPC (157). Hinsichtlich dieser Fragestellung konnten präklinische Daten allerdings keine ausreichende Effektivität von Mifepriston in Kombination mit Enzalutamid aufzeigen, möglicherweise zu erklären durch den partiellen Agonismus von Mifepriston am AR (158, 159). Eine andere Phase 1/2-Studie evaluiert Sicherheit und Wirksamkeit einer

Kombinationstherapie von Enzalutamid und dem selektiven GR-Antagonisten CORT125281 (160).

2.11.6 Modulation intrazellulärer Signalwege

Veränderungen intrazellulärer Signalkaskaden und des Zellmetabolismus stellen weitere AR-unabhängige Resistenzmechanismen dar. So konnte ein Zusammenhang zwischen Enzalutamid-Resistenz und einem erhöhten Glukosestoffwechsel, vermittelt durch p52, ein Protein der Familie der *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-Cells*-Transkriptionsfaktoren (NF- κ B), ermittelt werden (16). Durch Behandlung mit dem Glukose-Analogon 2-Desoxy-D-glukose zeigten p52-überexprimierende, Enzalutamid-resistente Zelllinien ein wiederhergestelltes Therapieansprechen auf Enzalutamid, welches in Kombinationsbehandlung mit dem Glukose-Analogon synergistische hemmende Effekte auf das Zellwachstum zeigte (16). Weiterhin verweisen *in vitro* Daten auf die Verknüpfung von Autophagie und Enzalutamid-Resistenz. Beispielsweise wird der Autophagie-Modulator Metformin in Kombination mit Enzalutamid klinisch evaluiert, nachdem diese Kombination bereits *in vitro* und *in vivo* zu reduziertem Tumorwachstum führte (161). Klinisch wurde bereits eine gute Verträglichkeit der Kombination von Metformin und Enzalutamid bestätigt (162). Eine Studie, die die Kombination beider Wirkstoffe im Vergleich zu einer alleinigen Enzalutamid-Therapie untersucht, befindet sich im Status der Rekrutierung (163). Ebenso scheinen der Wnt/ β -Catenin-Signalweg und β -Catenin-Mutationen in die Enzalutamid-Resistenz involviert. Diese konnten zu einem hohen Anteil in Enzalutamid-resistenten Patienten detektiert werden und waren mit einem verringerten OS assoziiert (164).

Auch das proinflammatorische Zytokin Interleukin 6 (IL-6) und der IL-6/STAT3-Signalweg (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) zählen zu den in die Enzalutamid-Resistenz involvierten Signalwegen. Es wurde bereits eine Assoziation von IL-6 und der Progression und Metastasierung sowie der Entwicklung von Kastrationsresistenz beim PCa beschrieben (165, 166). Zudem wurde IL-6 als Marker von prognostischem Wert für das PCa identifiziert (167). Die *in vitro* Inhibition von STAT3 mittels siRNA in Enzalutamid-resistenten PCa-Zelllinien führte zur Überwindung der Resistenzsituation (168). Der spezifische STAT3-Inhibitor Galiellalactone konnte das Tumorwachstum in einem PCa-Xenograftmodell verringern (169) und die AR-Aktivität in PCa-Gewebe senken (170). In Enzalutamid-resistenten Tumoren konnte Galiellalactone *in vivo* das Tumolvolumen und die PSA-Level senken sowie in Kombinationsbehandlung mit Enzalutamid additive Effekte auf die AR-Aktivität und Zellproliferation vorweisen (171). Auf Grundlage dieser Daten könnte eine zielgerichtete Therapie der IL-6/STAT3-Signalachse mit dem Inhibitor Galiellalactone eine Möglichkeit zur Überwindung der Enzalutamidresistenz darstellen. Auch das bereits erwähnte

Biguanid Metformin, eingesetzt zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2, scheint durch Beeinflussung der STAT3-Signalachse in der Lage zu sein, ein Enzalutamid-Ansprechen im Enzalutamid-resistenten Xenograft-Mausmodell zu bewirken (172).

Einen Regulator des Zytokin-Signals stellt die Proteinfamilie der *Protein Inhibitors of Activated Signal Transducers and Activators of Transcription* (PIAS) dar (173). Insbesondere für das PIAS1-Protein wurde eine erhöhte Expression in PCa-Gewebe gefunden und ein proliferationsfördernder Effekt in PCa-Zelllinien nachgewiesen (174). Die Herunterregulation von PIAS1 resultierte in einer Verstärkung der Enzalutamid-Wirkung (175). Auch für ein weiteres in die IL-6/STAT3-Achse involviertes Protein, das *Suppressor of Cytokine Signaling 3*-Protein (SOCS3), konnte in PCa-Zelllinien ein modulierender Effekt auf die Wirkung der Antiandrogene Bicalutamid und Enzalutamid und damit eine mögliche Involvierung in die Enzalutamid-Resistenz gefunden werden (176).

2.11.7 Biomarker für die Enzalutamid-Behandlung und -Resistenz

Die Identifizierung neuer Biomarker für die Behandlung mit Enzalutamid und für das Auftreten einer Resistenz sind von hoher Relevanz. Hierbei stehen insbesondere die Isolation zirkulierender Tumorzellen und zellfreier DNA aus dem Bereich der sogenannten *Liquid Biopsies* (Blut- und Urinproben) sowie die Untersuchung von Keimbahnmutationen im Fokus. So konnten AR-Veränderungen in zellfreier DNA, wie die AR-Amplifizierung und AR-Mutationen, als prädiktive Marker für das Enzalutamid-Ansprechen und als assoziiert mit Enzalutamid-Resistenz identifiziert werden (11, 177). Eine multizentrische Biomarkerstudie evaluierte den prädiktiven Wert einer hohen AR-Kopienzahl in zellfreier DNA. Die Daten zeigen, dass Tumore mit einer hohen AR-Kopienzahl ein schlechteres Ansprechen auf eine Enzalutamid-Behandlung und dass Patienten ein kürzeres OS sowie PFS aufweisen (146). Ergänzend dazu konnte bei Enzalutamid-behandelten Patienten ein gesteigertes PFS im Falle fehlender AR-Amplifikation festgestellt werden. Ebenso wurden hier niedrige Testosteron-Level als prognoserelevant für das PFS sowie OS beschrieben (178). Außerdem konnte AR-V7-positiven CTCs im Blut von PCa-Patienten ein prädiktiver Wert für die Beurteilung des Enzalutamid- oder Abirateron-Ansprechens und den Verlauf der Krankheit beigemessen werden (179). Antonarakis *et al.* untersuchten den prognostischen Wert von CTCs und dem AR-V7-Status auf das PFS und OS und konnten zeigen, dass CTC-negative Patienten das günstigste PFS/OS unter Enzalutamid- bzw. Abirateron-Therapie aufwiesen. Eine ungünstigere Prognose, insbesondere hinsichtlich des PFS, wurde bei CTC-positiven, aber AR-V7-negativen Patienten ermittelt. Die ungünstigste Prognose hatten CTC-positive/AR-V7-positive Patienten (180). Daten einer umfangreichen prospektive Studie von Armstrong und Kollegen identifizierten das Vorliegen AR-V7-positiver CTCs als assoziiert mit kürzerem OS

sowie PFS unter Enzalutamid- und Abirateron-Therapie und bestätigen diese Ergebnisse (181). Weiterhin wurden die microRNAs miR-3687 und miR-375 als prognoserelevant für das progressionsfreie Überleben von Enzalutamid-behandelten mCRPC-Patienten beschrieben (182). Ein weiterer untersuchter Marker ist die Serum- γ -Glutamyltransferase (γ GT). Hier wurde von Takemura *et al.* der prognostische Wert der Erhöhung der γ GT-Werte auf >40 U/l hinsichtlich eines kürzeren OS identifiziert (183). Zum jetzigen Zeitpunkt konnte aufgrund der eingeschränkten Datenlage allerdings keiner der untersuchten Marker in die Anwendung in der klinischen Routine implementiert werden.

2.12 Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5)

Auch der Transkriptionsfaktor *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* (STAT5) wurde als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt in der Behandlung des PCa beschrieben. Die Familie der STAT-Proteine umfasst die sieben Proteine STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6. Diese vermitteln als Transkriptionsfaktoren die Signaltransduktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren und sind so an wesentlichen biologischen Vorgängen, wie der Zellwachstumsregulation, der Gewebeerneuerung und der Immunantwort, beteiligt (184). STAT5 und seine Involvierung in die Vermittlung der Prolaktinwirkung wurde zunächst bei laktierenden Schafen, Rindern und Nagern als *Mammary Gland Factor* (MGF) nachgewiesen und erst im Anschluss der Familie der STAT-Proteine zugeordnet (185-187). Der Begriff *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* umfasst die beiden Proteinisoformen STAT5A und STAT5B, welche beim Menschen durch zwei nahezu homologe Gene auf dem langen Arm von Chromosom 17 kodiert werden (188-190). Die Identifizierung des *STAT5B*-Gens und -Proteins erfolgte kurze Zeit nach der Identifizierung des MGF, welcher daraufhin in STAT5A-Protein umbenannt wurde (188, 191). Das STAT3-Protein wird ebenso wie die STAT5-Proteine auf Chromosom 17 kodiert, wohingegen die für die übrigen STAT-Proteine kodierenden Gene auf den Chromosomen 2 (*STAT1*, *STAT4*) und 12 (*STAT2*, *STAT6*) zu finden sind (192-194). STAT5A besteht aus 794 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 94 kDa, wohingegen sich STAT5B aus 787 Aminosäuren zusammensetzt und ein molekulares Gewicht von 92 kDa besitzt (190). Wie allen STAT-Proteinen ist STAT5A/B der strukturelle Aufbau aus sieben hoch konservierten Domänen gemeinsam, die der Transduktion des Liganden-induzierten Signals dienen (Abbildung 11) (195).

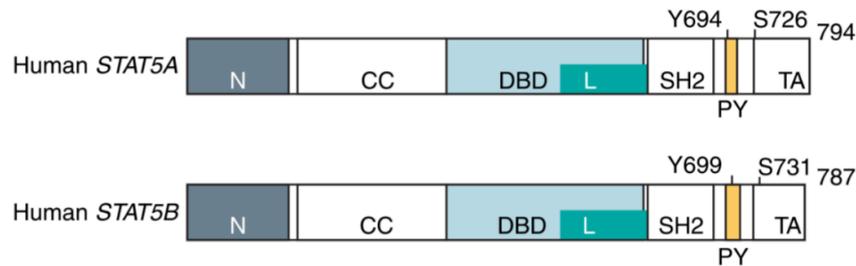


Abbildung 11: Die strukturellen und funktionellen Domänen der humanen STAT5-Proteine (nach Tan & Nevalainen 2008 (22)). Beide Proteine besitzen einen gemeinsamen strukturellen Aufbau und bestehen aus einer N-terminalen Domäne (N), einer Coiled-Coil-Domäne (CC), einer DNA-Bindedomäne (DBD), einer Linkerdomäne (L), einer SH2-Domäne (SH2), einem Phosphotyrosylsegment (PY) sowie einer Transaktivierungsdomäne (TA) am C-Terminus.

Dabei vermittelt die N-terminale Domäne die Kommunikation zweier STAT-Dimere, die Coiled-Coil-Domäne (CC) den nukleären Import- und Export, die DNA-Bindedomäne (DBD) sowie die Linkerdomäne die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA und die SH2-Domäne die STAT-Rekrutierung und -Homodimerisation. Bei der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) handelt es sich um die variabelste Domäne, hier unterscheiden sich beide STAT5-Proteine in ihrer Aminosäuresequenz. Diese Domäne dient der Interaktion mit Koaktivatoren wie beispielsweise p300/CBP, p100 oder Oct-1 (22). Die essentielle Bedeutung dieser Domäne konnte in Studien mit C-terminalen STAT5-Deletionsmutanten mit fehlender TAD nachgewiesen werden (196). Infolge der Deletion kam es trotz Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA nicht zu einer Expression von STAT5-Zielgenen.

2.13 Der Januskinase 2/STAT5-Signalweg

Das STAT5-Signal wird durch eine Vielzahl von Liganden induziert. Hierzu zählen Prolaktin (PRL), die Interleukine 2, 3, 5 und 7, der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor, Insulin, Erythropoetin, Thrombopoetin sowie Somatotropin (22). Nach Ligandenbindung an den membranständigen Rezeptor und Rezeptordimerisation kommt es durch die Nähe zweier Januskinasen vom Typ 2 (JAK2) zu einer gegenseitigen Phosphorylierung von Tyrosinresten (Abbildung 12). Diese Phosphorylierung bewirkt die Rekrutierung von STAT5, welche über die SH2-Domäne vermittelt wird (185). In der Folge kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung von STAT5A am Tyrosinrest 694 bzw. von STAT5B am Tyrosinrest 699 im Bereich der Phosphorylierungsdomäne (PY) des Proteins (190). Im Rahmen der Tyrosinphosphorylierungen erfolgt die Homo- oder Heterodimerisation von STAT5 bzw. eine Ausbildung von STAT5-Tetrameren (Abbildung 12).

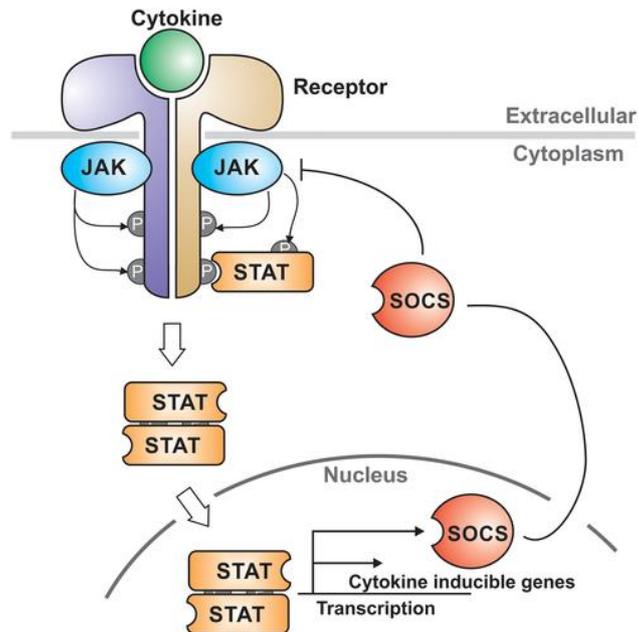


Abbildung 12: Überblick über die Januskinase/STAT-Signalachse (nach Morris *et al.* 2018 (197))
 Durch Zytokinbindung kommt es zur Rezeptordimerisation und -phosphorylierung der Januskinase (JAK). Nach Phosphorylierung eines STAT-Proteins homo- oder heterodimerisiert bzw. tetramerisiert dieses und transloziert in den Kern. Hier erfolgt die Zielgenexpression. Durch SOCS-Proteine wird diese Signalkette moduliert.

Durch verschiedene Kinasen erfolgen weitere Phosphorylierungen an Serinresten zur Unterstützung der Transaktivierung (198). Das STAT5-Dimer ist nun in der Lage, durch ein insbesondere DBD-vermitteltes nukleäres Lokalisationssignal unter Ausbildung eines Importin-Komplexes in den Nukleus zu translozieren (Abbildung 12) (199). Dort bindet es an sogenannte GAS-Elemente (*Gamma Interferon Activation Site*), DNA-Elemente mit dem pallindromischen Motiv $TTC(T/C)N(G/A)GAA$ in der Promotorregion der entsprechenden Zielgene. Hier initiiert es unter dem Einfluss TAD-bedingter Rekrutierung von Coaktivatoren sowie -repressoren die Genexpression (200, 201). Negative Regulatoren dieser Signalachse stellen die bereits beschriebenen Proteine PIAS und SOCS dar. Ein weiterer Mechanismus der Regulation dieses Signalweges ist die Inaktivierung von STAT-Proteinen durch Phosphorylasen-bedingte Dephosphorylierung (202).

Die Expression der STAT5-Zielgene erfolgt zelltypspezifisch variierend. Insbesondere in Zellen der Brustdrüse, der Prostata, in Blut- und Knochenmarkszellen sowie Leber- und Fettzellen konnten durch Expressionsanalysen und Knockoutmodelle zahlreiche relevante Zielgene und maßgebliche Funktionen von STAT5 identifiziert werden (203-210). Bei diesen handelt es sich unter anderem um *CSN2*, *BCL2L1*, *MYC*, *CCND 1-3*, *SOCS 1-3*, *CIS*, *FOXP3*, *OSM*, *IL-2R α* , *EGFR* und *PLRP* (203-210). Die Gene regulieren essenzielle Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Zellzyklus und Apoptose sowie den Zellmetabolismus. Dabei werden einige Gene zelltypübergreifend exprimiert, wohingegen über Interaktion mit

zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren die Regulation zelltypspezifischer Gene stattfindet (208). Im Gewebe wird durch STAT5 u.a. die Mammogenese und die Differenzierung der Prostata adressiert. So waren STAT5A-defiziente weibliche Mäuse nicht fähig zur physiologischen Entwicklung der Brustdrüse und männliche Mäuse bildeten ein irreguläres Prostataepithel aus (211, 212). Auch konnte im Rahmen von Knockout-Studien die Relevanz von STAT5 für die Hämatopoese, die Entwicklung des lymphatischen Gewebes und die Immunreaktion herausgestellt werden (213-215). Im hepatischen Gewebe ist die Somatotropin-vermittelte STAT5-Aktivierung beteiligt an der Progression der hepatischen Steatose sowie der Entwicklung des HCC (216).

2.14 Die Rolle von STAT5 in Neoplasien

Aberrante bzw. onkogene STAT5-Aktivität konnte in einer Vielzahl von hämatologischen und soliden Neoplasien beschrieben werden (217-222). Besonders im Bereich der hämatoonkologischen Erkrankungen ist STAT5 Gegenstand zahlreicher intensiver Untersuchungen. Bereits kurz nach der Entdeckung von STAT5 und der erfolgreichen Klonierung konnte im Jahr 1996 die Expression von konstitutiv aktivem STAT5 bei Patienten festgestellt werden, die an akuter myeloischer (AML) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) litten (217). In der Folge wurde der Zusammenhang gesteigerter STAT5-Aktivität mit einer durch das Fusionsprotein Bcr-Abl ausgelösten chronisch myeloischen Leukämie (CML) identifiziert (218, 219). Das *BCR-ABL*-Fusionsgen, nach dem Ort seiner Erstbeschreibung *Philadelphia-Chromosom* genannt, entsteht durch die Translokation der Chromosomen 9 und 22 und kodiert das Bcr-Abl-Protein, eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase (223). Es findet sich bei über 90 % der CML-Patienten und ca. 30 % der Patienten mit ALL (223, 224). Die konstitutive Aktivierung von STAT5-Proteinen hat ihrerseits die dauerhafte Genexpression der STAT5-Zielgene wie *MYC*, *CCND1* und *BCL2L1* zur Folge. Auch Mutationen einer weiteren Tyrosinkinase, der FLT3-Rezeptortyrosinkinase (*FMS-like Tyrosine Kinase 3*), welche die häufigste Mutation unter Patienten mit AML darstellt, führen zu ligandenunabhängiger Aktivierung und in der Folge zur Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine wie STAT5 (225). Weiterhin fand sich durch *Gain-of-function*-Mutationen hyperaktiviertes STAT5B im Zusammenhang mit vor allem aggressiven reifen T-Zell-Leukämien sowie -Lymphomen (220, 221). Eine erhöhte STAT5-Expression konnte bei CML in Zusammenhang mit einer Resistenz gegen Imatinib, einen Tyrosinkinaseinhibitor gegen Bcr-Abl, gebracht werden (222).

Unter Kenntnis der essentiellen Bedeutung von STAT5 für die Entwicklung der Brustdrüse und die Fähigkeit zur Laktation scheint es kaum verwunderlich, dass dieses Protein auch in Zusammenhang mit der Tumorgenese der Brust steht (212). So konnten Knockout-Studien in Mausmodellen zeigen, dass ein STAT5A-Verlust mit einer verzögerten Brustkrebsentstehung und -progression einhergeht (226, 227). Außerdem konnten Shan *et al.* in immunhistochemischen Untersuchungen von Brusttumoren bei Ratten eine Korrelation zwischen aktiviertem STAT5 und fortgeschrittener Tumorentdifferenzierung feststellen (228). Schließlich führte die STAT5-Überexpression zur Ausbildung von Mammakarzinom in einem Zeitraum von 8-12 Monaten (229). Für das humane Mammakarzinom konnte interessanterweise eine vorteilhafte Rolle von STAT5 identifiziert werden, da dieses die Differenzierung des Drüsenepithels fördert und eine hohe Expression mit einer günstigeren Prognose einhergeht (230). So zeigte eine Studie, dass das Vorliegen von STAT5 in Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs mit einem verbesserten Überleben und verbesserten Ansprechen auf die antiöstrogene Therapie assoziiert ist (231). Peck *et al.* beschreiben niedrige Level von nukleär lokalisiertem, phosphorylierten STAT5 als Biomarker für ein schlechteres klinisches Outcome und höheres Risiko für ein Versagen der Hormontherapie mit dem Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen (232).

Auch für solide Tumoren konnte eine Assoziation mit aktiviertem STAT5 nachgewiesen werden (233-238). Für Plattenepithelkarzinome des Kopfes und Halses wurde die konstitutive STAT5-Aktivierung als günstig für das Tumorwachstum und die Tumorzellinvasion sowie mitverantwortlich für eine Resistenz gegenüber Inhibitoren des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) beschrieben (233). Ebenso wurde eine STAT5B-Aktivierung in Zusammenhang mit einer aggressiveren Form von hepatozellulären Karzinomen gebracht, verursacht durch die Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps (234). Durch STAT5-Inhibition konnte hier, ebenso wie auch beim kolorektalen Karzinom, eine Wachstumsinhibition erzielt werden (235, 236). Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnte eine Korrelation zwischen erhöhtem STAT5-Level sowie der Proteinexpression des durch das Zielgens *BCL2L1* kodierten Bcl-xL-Proteins mit einer schlechten histologischen Differenzierung gefunden werden (237). Interessanterweise scheint beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom eine PRL-Erhöhung nach erfolgter Therapie mit dem Checkpoint-Inhibitor Nivolumab einen Marker für einen ungünstigeren Krankheitsverlauf darzustellen (239) und mit gesteigerter Tumoraggressivität assoziiert zu sein (240). Zu klären ist, ob es sich hierbei möglicherweise um Effekte einer Aktivierung des JAK2-STAT5-Signalweges handelt. Eine gesteigerte Bcl-xL-Expression wurde zudem beim Ovarialkarzinom als Resistenzmechanismus gegenüber einer Carboplatin-Therapie ausgemacht, zudem resensitivierte ein STAT5-Knockdown Carboplatin-resistente Ovarialkarzinomzellen für Carboplatin (238).

2.15 Die Rolle von STAT5 beim Prostatakarzinom

STAT-Proteine und der JAK-STAT-Signalweg wurden im Bereich des PCa intensiv untersucht. Während eine erhöhte STAT1-Expression eher protektive Effekte auf das Überleben aufzuweisen scheint (241), wurde STAT3 als konstitutiv aktiv und erhöht exprimiert in fortgeschrittenen und metastasierenden Tumoren nachgewiesen (242, 243). Weiterhin ist die STAT3-Expression mit neuroendokriner Differenzierung und einer schlechteren Prognose das Überleben betreffend assoziiert (244, 245). Zudem konnte eine Involvierung von STAT3 in die Therapieresistenz gegenüber Antiandrogenen und dem Chemotherapeutikum Docetaxel identifiziert werden (168, 246). Durch die Inhibition von STAT3 *in vitro* wurde so die Enzalutamid-Resistenz überwunden (168, 172).

Auch für STAT5 liegen eine Vielzahl an Daten vor, die die bedeutende Rolle dieses Proteins für das Zellüberleben, das Tumorwachstum und die Metastasierung herausstellen. Das STAT5-Signal ist von hoher Bedeutung für die Funktion und Morphologie des Prostataepithels. Insbesondere STAT5A scheint in diesem Kontext ein wichtiger Faktor für die Ausbildung der epithelialen Drüsenstruktur zu sein (211). Die STAT5B-Aktivierung hingegen wurde als relevant für Tumorwachstum und Progression beschrieben. So war die dominant-negative Isoform STAT5 Δ B im Maus-Tumormodell in der Lage, Wachstum und Invasivität von PCa-Zellen zu inhibieren (18). Ahonen *et al.* konnten zeigen, dass PCa-Zellen konstitutiv aktives und nukleär lokalisiertes STAT5 aufweisen und die Inhibition von STAT5 durch Expression einer dominant-negativen STAT5-Mutante zum Zelltod von CWR22Rv- und LNCaP-PCa-Zellen führt (19). Auch durch STAT5A/B-Inhibition mittels siRNA und *Antisense*-Oligonukleotid kam es zum Zelltod in PCa-Zelllinien (20). Zudem konnte die bedeutende Rolle von STAT5 für das Wachstum von humanen Tumoren in Xenograft-Mausmodellen herausgestellt werden, welche nach STAT5-Inhibition einen Wachstumsrückgang zeigten (20). In dieser Studie wurden ebenfalls *CCND1* und *BCL2L1* als STAT5-Zielgene in der menschlichen Prostata identifiziert, diese kodieren die Proteine Cyclin D1 und Bcl-xL (20). Zugleich konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von STAT5A/B beim PCa durch PRL und die JAK2 erfolgt und die auto- bzw. parakrine PRL-Expression einen wichtigen Faktor der PCa-Progression darstellt (247). Erhöhte PRL-Level fanden sich insbesondere in Proben kastrationsresistenter und metastasierter Tumore (21). Hier waren Dagvadorj *et al.* in der Lage, mittels pharmakologischer PRL-Inhibition die STAT5A/B-Aktivierung zu inhibieren und den Zelltod in PCa-Zellen zu induzieren (21). Die STAT5-Aktivierung und -Expression zeigte sich außerdem korrelierend mit einem hohem Gleason-Score (23, 25) und als Prädiktor eines frühes Krankheitsprogresses nach radikaler Prostatektomie (248, 249). Bei etwa 95 % der Tumore im kastrationsresistenten Stadium konnten Tan *et al.* eine STAT5-Aktivierung identifizieren (24). Im Rahmen der Tumorprogression scheint der STAT5A/B-Locus einer Gen-Amplifikation

zu unterliegen, die mit einem hohem Gleason-Score sowie Fernmetastasierung assoziiert ist (250). Zudem konnten Thomas *et al.* eine erhöhte STAT5-Expression sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeit-ADT und ebenfalls im Gewebe von CRPC-Patienten nachweisen (23). Interessanterweise wurde ein starker, auf physikalischer Interaktion beruhender Synergismus zwischen dem AR und STAT5 beobachtet (Abbildung 13) (24). So ist aktiviertes STAT5 in der Lage, die transkriptionelle Aktivität des AR zu erhöhen und *vice versa* der ligandengebundene AR die transkriptionelle Aktivität von STAT5 sowie dessen nukleäre Translokation (Abbildung 13) (24). Nach gezieltem STAT5-Knockdown wurde weiterhin eine aufgehobene AR-Translokation in den Nukleus sowie eine reduzierte Stabilität des AR-Proteins und Zunahme der proteosomalen Degradation des ARs beschrieben (23). Durch STAT5-Knockdown mittels *Antisense*-Oligonukleotid konnte *in vivo* die Progression kastrationsresistenter Tumore verzögert werden (23). Außerdem wurde im Rahmen von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Migration und Invasion von PCa-Zellen die potente Auswirkung von STAT5 auf das Metastasierungsverhalten beschrieben und eine durch STAT5 induzierte epithelial-mesenchymale Transition sowie die Ausbildung hochtumorigener Stammzelleigenschaften beobachtet (251, 252). Maranto *et al.* berichteten zudem die Bedeutung von STAT5 für die Sensitivität von PCa-Zellen für eine Bestrahlung, vermittelt durch die Expression des Rad51-Proteins, das an der DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Der STAT5-Knockdown führte zu einer eingeschränkten DNA-Reparatur und zu einer Sensitivierung gegenüber der durchgeführten Bestrahlung, welche lediglich im Prostatagewebe, nicht aber in dem umgebenden Nachbargewebe gefunden werden konnte (253).

Erst kürzlich veröffentlichten Udhane *et al.* Ergebnisse zur Rolle von STAT5 in der Enzalutamid-Resistenz und griffen die Thematik des AR-STAT5-Synergismus auf (26). So konnten sie demonstrieren, dass der Enzalutamid-gebundene AR die JAK2/STAT5-Phosphorylierung und -Aktivierung beeinflusst und unterstützt, welche sich wiederum als abhängig von der Dimerisierung des PRL-Rezeptors zeigt und durch JAK-2 spezifische Phosphatasen vermittelt scheint. Das aktivierte STAT5 seinerseits induziert die mRNA-Expression von JAK2, wodurch es zu einem sich selbst unterhaltenden und potenzierenden Kreislauf der STAT5-Aktivierung kommt. Unter Enzalutamid-Behandlung konnte eine Zunahme der STAT5-Expression sowie ein fördernder Effekt von STAT5 auf die Viabilität von PCa-Zellen gefunden werden, ebenso zeigte sich immunhistochemisch in Biopsieproben eine höhere STAT5-Expression nach Enzalutamid-Behandlung als vor der Behandlung sowie im Vergleich zur hormon-naiven Situation. Durch die alleinige als auch die einer Enzalutamid-Behandlung folgenden STAT5-Inhibition mit dem *Small-molecule* Inhibitor IST5-002 konnte die Zellviabilität von PCa-Zellen stärker verringert werden als durch alleinige Enzalutamid-Behandlung. Ebenso konnte die Kombination aus Enzalutamid und STAT5-Inhibition das

Wachstum Enzalutamid-resistenter Xenograftumoren *in vivo* als auch explantierter Patiententumore *ex vivo* in erheblicherem Ausmaß als eine alleinige Enzalutamid-Behandlung inhibieren (26).

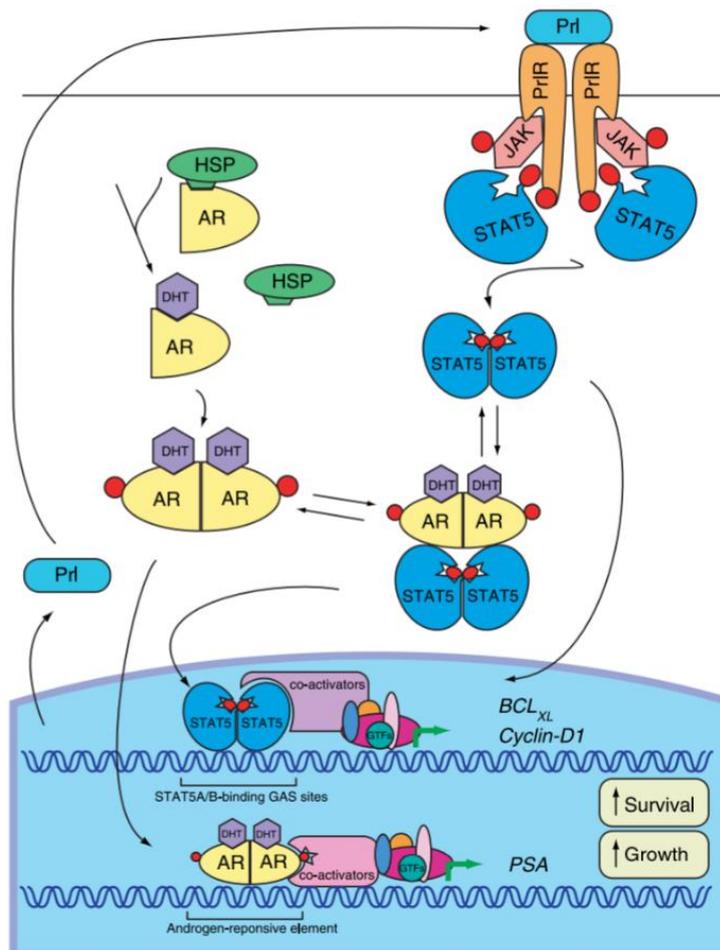


Abbildung 13: Interaktion von AR und STAT5 (nach Tan & Nevalainen 2008 (24)). Nach Testosteronbindung an den AR und STAT5-Aktivierung mit jeweils folgender Dimerisierung beider Proteine besteht ein physikalischer Synergismus, der zur gegenseitigen Steigerung der transkriptionellen Aktivität führt. HSP: Hitzeschockprotein, DHT: Dihydrotestosteron, AR: Androgenrezeptor, JAK: Januskinase, PrIR: Prolaktinrezeptor, PrI: Prolaktin, STAT5: *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*, GAS: *Gamma Interferon Activation Site*.

2.16 Die STAT5-Inhibition als Möglichkeit der zielgerichteten Krebstherapie

Um den STAT5-Signalweg durch direkte Inhibition von STAT5 zu adressieren, wurden in der Vergangenheit bereits einige *Small-molecule* Inhibitoren entwickelt und präklinisch getestet. Unter anderem zeigte der *Inhibitor of STAT5-002* (IST5-002) im präklinischen Modell eine Suppression der nukleären Translokation von STAT5A/B sowie Reduktion der STAT5-DNA-Bindung und -Zielgenexpression und konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Wachstum von PCa- und CML-Zellen inhibieren (254, 255). Ebenso konnte AC-4-130, ein direkter Inhibitor der STAT5-SH2-Domäne, das Wachstum und die Proliferation von AML-Zellen reduzieren (256). Mangelnde Wirksamkeit, hohe Toxizität und ein schneller Abbau stellen große Herausforderungen bei der klinischen Entwicklung direkter Inhibitoren dar (257). Die sich aus der Inhibition der physiologischen STAT5-Funktion im Organismus ergebende Toxizität und ebenso die bisher nicht überzeugende Bioverfügbarkeit könnten durch Antikörper-Inhibitor-Konjugate oder die Einbeziehung von wirkstofftragenden Nanopartikeln zur gezielten Bereitstellung am Wirkort verbessert werden (257). Die Einbeziehung der Inhibition vorgeschalteter Kinasen wie JAK, Bcr-Abl oder FLT3 und Kombination mit direkter STAT5-Inhibition stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Beispielsweise kam es *in vitro* durch Kombination von AC-4-130 mit dem JAK1/2-Inhibitor Ruxolitinib zu einer synergistischen Wirkungsverstärkung des JAK-Inhibitors (256). Die Bcr-Abl-Inhibitoren Bosutinib und Dasatinib, welche als Tyrosinkinase-Inhibitoren ebenfalls zu einer indirekten STAT5-Inhibition führen, sind neben Imatinib für die Behandlung der CML und Philadelphiachromosom-positiven ALL zugelassen (258, 259). Auch der für die FLT3-mutierte AML zugelassene FLT3-Inhibitor Midostaurin stellt eine Möglichkeit der indirekten STAT5-Inhibition dar (257, 260). Weiterhin sind aus dem Bereich der Naturstoffe einige unspezifische STAT5-Inhibitoren bekannt, zu diesen zählen z.B. Curcumin und Sulforaphan (257, 261, 262). Interessanterweise konnte ebenfalls der BET-Inhibitor JQ-1, welcher in präklinischen Modellen in der Lage war, das PCa-Wachstum zu hemmen, über einen unbekanntem Wirkmechanismus STAT5 in T-ALL-Zellen inhibieren (263, 264). Auch das bereits zugelassene antipsychotische Medikament Pimozid, das zur Therapie von Tick-Störungen, dem Tourette-Syndrom und zur Langzeitbehandlung chronischer Psychosen zugelassen ist, konnte als STAT3- und STAT5-Inhibitor Wirkeffekte in der Behandlung der AML und CML vorweisen (265-267). Bei Pimozid handelt es sich um einen D2-Dopamin-Rezeptorantagonisten, der zusätzlich die STAT5- und STAT3-Phosphorylierung reguliert. Es zeigte antitumoröse Aktivität in HCC-Xenograftmodellen und konnte über die Inhibition der STAT3-Aktivierung das Wachstum von PCa-Zellen inhibieren (268, 269).

Aufgrund der Interaktion von STAT5 und dem AR sowie der dringlichen Notwendigkeit zur Identifikation möglicher therapeutischer Optionen im Angesicht der Enzalutamidresistenz ist es Ziel dieser Studie, das STAT5-Protein in der Enzalutamid-resistenten Situation zu untersuchen und zu prüfen, inwiefern eine Inhibition sowohl durch siRNA als auch pharmakologisch durch Pimozid zur Überwindung der Enzalutamidresistenz dienen kann, um so dazu beizutragen, den zahlreichen am PCa erkrankten Männern eine therapeutische Perspektive bieten zu können.

3 Material

3.1 Laborgeräte und Gerätezubehör

Tabelle 2: Laborgeräte und Gerätezubehör

Name	Herstellerfirma	Firmensitz
Absaugsystem VACUSAFE	INTEGRA Biosciences GmbH	Biebertal, Deutschland
Analysenwaage ENTRIS	Sartorius Corporate Administration GmbH	Göttingen, Deutschland
Bruchemaschine ZBE 30-10	ZIEGRA Eismaschinen	Isernhagen, Deutschland
Bunsenbrenner FIREBOY eco	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Heracell™ 240i	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer BD FACSCalibur™	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NY, USA
Einfrierhilfe CoolCell®	Corning, Inc.	Corning, New York, USA
Finnpipette™ F2 0,2 bis 2 µl	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Finnpipette™ F2 1 to 10 µl	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Finnpipette™ F2 10 bis 100 µl	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Finnpipette™ F2 100 bis 1000 µl	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Finnpipette™ F2 2 bis 20 µl	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Finnpipette™ F2 20 bis 200 µl	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
FluorChem E Imaging System	ProteinSimple	San Jose, CA, USA
Gelelektrophoresesystem Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Heizblock für Mikroreaktionsgefäße	Cole-Parmer	Stone, Großbritannien
Kühl-/Schüttelblock ThermoCell Mixing Block	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Laborwaage L2200	Sartorius Corporate Administration GmbH	Göttingen, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte VWR VMS-C7	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland

Material

Name	Herstellerfirma	Firmensitz
MIC Magnetic Induction Cycler for qPCR, 4 Farben	Bio Molecular Systems	Upper Coomera, Australien
Mikroplattenleser Tecan US Inc. Spark 10M	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Mikroskopkamera Axioacam ICM1	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus™ Fresco™ 21	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Mikrozentrifuge Micro Star 17R	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Multichannelpipette Transferpette® S-12 20 bis 200 µl	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Multichannelpipette Transferpette® S-8 10 bis 100 µl	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Multichannelpipette Transferpette® S-8 20 bis 200 µl	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Multichannelpipette Transferpette® S-12 10 bis 100 µl	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
PCR Thermo-Cycler	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd	Hangzhou, China
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Power Supply PowerPac™ HC High-Current	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Reagenzglasschüttler RS-VA 10	Phoenix Instrument	Garbsen, Deutschland
Rollenmischer Stuart SRT9	Cole-Parmer	Stone, Großbritannien
Sicherheitswerkbank Herasafe™ KS	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Spektrophotometer DS-11	DeNovix Inc.	Wilmington, NC, USA
Universalzentrifuge Heraeus™ Megafuge™ 16	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Universalzentrifuge Megafuge® 1.0R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Wasserbad Aqualine AL 18	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland

Name	Herstellerfirma	Firmensitz
Zellzählgerät Automated Cell Counter LUNA™	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich

3.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

Name	Herstellerfirma	Firmensitz
Blotting Paper FN 100 580 x 600 mm, 195 g/m ²	A. Hartenstein	Würzburg, Deutschland
Cell Counting Slides	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich
Eppendorf Tubes® 5 ml mit Schraubdeckel	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Falcon® Round-Bottom Tubes 5 ml mit Schraubdeckel	Corning Inc.	Corning, NY, USA
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar® 75 cm ²	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Kryoröhrchen Nunc® Cryo Tubes®	Thermo Scientific™ Nunc™	Waltham, MA, USA
Mikroreaktionsgefäß Safe-Lock 0,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß Safe-Lock 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß Safe-Lock 2,0 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pasteurpipetten 2 ml 230 mm, Glas, ungestopft	VWR	Radnor, PA, USA
Pasteurpipetten graduiert 3 ml, unsteril, 155 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Petrischale 94/16 mm steril	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitze 10 µl SurPhob® extra lang unsteril	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 10 µl SurPhob® mit Filter steril	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland

Material

Name	Herstellerfirma	Firmensitz
Pipettenspitze 100 µl SurPhob® mit Filter steril	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 1250 µl SurPhob® extra lang unsteril	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 1250 µl SurPhob® mit Filter steril	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 20 µl SurPhob® mit Filter steril	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 200 µl SurPhob® mit Filter steril	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 200 µl SurPhob®extra lang unsteril	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reagenzreservoir 25 ml steril	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Serologische Pipette steril mit Filter 10 ml	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette steril mit Filter 2 ml	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette steril mit Filter 25 ml	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette steril mit Filter 5 ml	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette steril mit Filter 50 ml	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
StarGuard Protect Nitril Handschuhe M	Starlab International GmbH	Hamburg, Deutschland
Sterilfilter 0,45 µm	neoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
Wägebapier	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zellkultur Multiwellplatte, 6 Well, transparent, Flachboden, steril	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 96 Well, transparent, Flachboden, steril	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 25 cm ²	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland

Material

Name	Herstellerfirma	Firmensitz
Zellkulturflasche 75 cm ²	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich

3.3 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Name	Hersteller	Firmensitz
1,4 Dithrothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
4 x Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa Steriles pyrogenfreies Wasser	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, Deutschland
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Coomassie® Blau R 250	Roth Carl GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Enzalutamid (MDV-3100)	Astellas Pharma	München, Deutschland
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Material

Name	Hersteller	Firmensitz
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat 10 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Nuklease-freies Wasser UltraPure Distilled Water (Rnase/Rnase free)	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Phenylmethansulfonyl fluoride solution (PMSF) 100 mM	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (PBS)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Pimozid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Propidium Iodid (PI)	Molecular Probes	Eugene, OR, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Radiance Plus ECL Lösung	Azure Biosystems, Inc.	Dublin, CA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
RNAse A	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel A	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel B	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure HCl 1N	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Schülke Wipes	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
Terralin® protect	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland

Name	Hersteller	Firmensitz
Tris Trizma®base	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Tris-Hydrochlorid 99 %	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA 0,25 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Tween®20	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Western Blot Recycling Stripping Buffer, 50 ml (10X)	Alpha Diagnostic Intl. Inc.	Woodlake Center, TX, USA

3.4 SDS-PAGE Standard

Tabelle 5: SDS-PAGE-Standard

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland

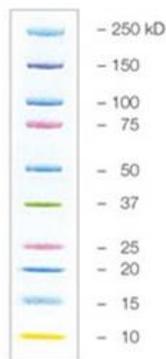


Abbildung 14: In der SDS-PAGE verwendeter Größenstandard © Bio-Rad Laboratories GmbH

3.5 Zelllinien

3.5.1 Verwendete Zelllinien

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft und Eigenschaften	Medium	Quelle
LNCaP	Supraklavikuläre Lymphknotenmetastase, hormonsensitiv, AR-Expression, PSA-Expression, T877A-Mutation des AR	RPMI 1640 + 10 % FCS	American Type Culture Collection
C4-2	LNCaP-Subzelllinie, hormonunabhängig, AR-Expression, PSA-Expression, T877A-Mutation des AR, AR-V7-Expression	DMEM + 10 % FCS	(Universität Bern, Schweiz)
MR49F	Enzalutamid-resistente Zelllinie aus LNCaP-Xenograft-Modell, AR-Expression, PSA-Expression, F877L-Mutation des AR	RPMI 1640 + 10 % FCS + 10 µM Enzalutamid	(Vancouver Prostate Center, Kanada)
LAPC4-CTRL	LAPC4-Zellen behandelt mit Vehikel als Kontroll-Zelllinie zur LAPC4-EnzaR-Zelllinie, AR-Expression (AR Wildtyp), PSA-Expression	IMDM + 10 % FCS	(Medizinische Universität Innsbruck)
LAPC4-EnzaR	Enzalutamid-resistente Zelllinie nach Enzalutamid-Dosisescalation und Langzeitbehandlung <i>in vitro</i> , hormonabhängig, AR-Expression, keine PSA-Expression, AR-V7-Expression	IMDM + 10 % FCS + 10 µM Enzalutamid	(Medizinische Universität Innsbruck)
PC3	Knochenmetastase, keine AR-Expression, keine PSA-Expression	RPMI 1640 + 10 % FCS	American Type Culture Collection

3.5.2 LNCaP

Bei der LNCaP-Zelllinie handelt es sich um eine humane PCa-Zelllinie, die aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen kaukasischen Mannes entnommen wurde, welcher an einem hormonsensitiven, metastasierten Adenokarzinom der Prostata erkrankt war (270). Diese Zellen sind hormonsensitiv und in der Lage zur PSA-Synthese (270). Die LNCaP-Zelllinie trägt die die T877A-Punktmutation im AR (271, 272). Hier

liegt an Position 877 anstelle der Aminosäure Threonin die Aminosäure Alanin vor. Bei dieser Mutation handelt es sich um die häufigste AR-Mutation bei PCa-Patienten (273, 274).

3.5.3 C4-2

Die Zellen der C4-2-Zelllinie stellen eine Subzelllinie der LNCaP-Zellen dar, die aus einem chimären Tumormodell stammen. Hierzu erfolgte eine Co-Injektion von LNCaP-Zellen und knochenfibroblastischen Zellen (MS-Zellen). Die entstandenen chimären Tumore wiesen eine PSA-Sekretion auf. Von kastrierten Mäusen wurde so die C4-Subzelllinie gewonnen. Bei der C4-2-Zelllinie handelt es sich um eine Zweitgenerations-Subzelllinie, für die C4-Zellen erneut gemeinsam mit MS-Zellen in kastrierten Mäusen zusammengebracht wurden. Aus den im Anschluss gebildeten chimären Tumoren erfolgte die Isolation der C4-2-Zelllinie (275). Als LNCaP-Subzelllinie trägt die C4-2-Zelllinie ebenso die T877A-Punktmutation. Außerdem weisen die C4-2-Zellen die Spleißvariante AR-V7 auf (276).

3.5.4 MR49F

Bei der MR49F-Zelllinie handelt es sich um eine Enzalutamid-resistente Zelllinie, die aus einem LNCaP-Xenograft-Modell generiert wurde. Hierzu erfolgte die Beimpfung von Mäusen mit LNCaP-Tumorzellen, welche dann nach Tumorwachstum und PSA-Anstieg kastriert wurden. Nachdem es zu wieder ansteigenden PSA-Werten gekommen war, wurden die Mäuse mit Enzalutamid behandelt. Im Verlauf wurden Enzalutamid-resistente LNCaP-Xenografts in kastrierte Mäuse unter Enzalutamid-Behandlung eingebracht. Nachdem die Tumore gewachsen waren, wurden sie wiederum männlichen kastrierten Mäusen unter Enzalutamidtherapie implantiert. Aus den daraufhin gewachsenen Drittgenerations-Tumoren erfolgte die Etablierung der MR49F-Zelllinie, welche durch eine AR- sowie PSA-Expression charakterisiert ist (277). Die MR49F-Zellen weisen die F877L-Mutation in der LBD des AR auf, welche für eine agonistische Enzalutamid-Wirkung auf die AR-Aktivität verantwortlich ist (141, 142, 278). Aus diesem Grund gilt die F877L-Mutation als Enzalutamid-Resistenzmechanismus.

3.5.5 LAPC4 und LAPC4-EnzaR

Zur Etablierung der LAPC4-EnzaR-Zelllinie wurde eine 10-monatige Dosisescalation und Langzeitbehandlung mit Enzalutamid durchgeführt (145). Die LAPC4-Zelllinie ist eine immortalisierte PCa-Zelllinie, die aus der Lymphknotenmetastase eines männlichen Patienten mit kastrationsresistentem, fortgeschrittenen PCa stammt, in ein immundefizientes Mausmodell implantiert und nach erfolgreichem Tumorwachstum wieder entnommen und kultiviert wurde (279). Zur Etablierung dieser Zelllinie wurden LAPC4-Zellen *in vitro* beginnend

mit einer Enzalutamid-Konzentration von 0,2 µM behandelt und einer sukzessiven Dosissteigerung bis zur Zielkonzentration von 8 µM Enzalutamid unterzogen. Bei der LAPC4-CTRL-Zelllinie handelt es sich um die mitgeführten, Vehikel-behandelten Kontrollen (145). Beide Zelllinien weisen eine AR-Expression auf. Die resistenten LAPC4-EnzaR weisen im Vergleich zur sensitiven Kontrolle zwar keine Mutation auf, jedoch findet sich die Proteinexpression der AR-Spleißvariante V7. Außerdem liegt kein PSA-Protein in der Enzalutamid-resistenten Zelllinie im Vergleich zur sensiblen Kontrolle vor (145).

3.5.6 PC-3

Die PC-3-Zelllinie entstammt einer Knochenmetastase eines am PCa erkrankten, 62-jährigen kaukasischen Mannes. Diese Zelllinie ist androgenunabhängig, es liegen weder ein AR-Protein noch eine PSA-Synthese vor (280). Die PC3-Zelllinie ist insbesondere im Vergleich zur LNCaP-Zelllinie durch ein hohes Metastasierungspotenzial sowie die Expression neuroendokriner Marker gekennzeichnet (281, 282). PC3-Xenograftmodelle weisen zudem morphologische sowie immunhistochemische Merkmale eines neuroendokrinen PCa auf (282).

3.6 Kultivierungsmedien und Zusätze

3.6.1 Medien und Zusätze

Tabelle 7: Kultivierungsmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Gibco™ Fötale Kälberserum, charcoal stripped	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Gibco™ Fötale Rinderserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Gibco™ GlutaMAX™ Supplement	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
HEPES (1M) Pufferlösung	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
IMDM Medium	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

3.6.2 Kultivierungsmedien

DMEM-Medium für C4-2-Zellen

10 %	FCS
20 mM	HEPES
1 %	GlutaMAX™
1 %	Antibiotic-Antimycotic (100x)

IMDM-Medium für LAPC4-CTRL-Zellen

10 %	FCS
1 %	GlutaMAX™

IMDM/Enzalutamid-Medium für LAPC4-EnzaR-Zellen

10 %	FCS
1 %	GlutaMAX™
10 µM	Enzalutamid

RPMI-Medium für LNCaP- und PC3-Zellen

10 %	FCS
20 mM	HEPES
1 %	GlutaMAX™
1 %	Antibiotic-Antimycotic (100x)

RPMI/Enzalutamid-Medium für MR49F-Zellen

10 %	FCS
20 mM	HEPES
1 %	GlutaMAX™
1 %	Antibiotic-Antimycotic (100x)
10 µM	Enzalutamid

Die Kulturmedien wurden bei 4°C gelagert und vor Nutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

3.7 Antikörper

3.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 8: Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Firmensitz
STAT5 (C-17)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, TX, USA
AR (441)	1:400	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, TX, USA
PSA/KLK3 (D6B1)	1:2.000	Cell Signaling Technology	Danvers, MA, USA
GAPDH (6C5)	1:50.000	EMD Millipore	Burlington, MA, USA

3.7.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Firmensitz
Dako Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunglobulin	1:2.000	Agilent	Santa Clara, CA, USA
Dako Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit Immunglobulin	1:2.000	Agilent	Santa Clara, CA, USA

3.8 Small interfering RNAs

Tabelle 10: Small interfering RNAs

Oligonukleotid	Detailinformation
ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1	Target Sequence: 3'UGGUUUACAUGUCGACUAA5' 5 nM Nr.: D-001810-01-05, Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
ON-TARGETplus Human STAT5A (6776) siRNA – SMARTpool	Target Sequences: 3'CGGCUGGGAUCCUGGUUGA5', 3'GCGCUUUAGUGACUCAGAA5', 3'GUACUACACUCCUGUGCUG5', 3'GCAAUGAGCUUGUGUCCA5' 5 nM Nr.: L-005169-00-0005, Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
ON-TARGETplus Human STAT5B (6777) siRNA – SMARTpool	Target Sequences: 3'GAAUUUACCAGGACGGAAU5', 3'GGACACAGAGAAUGAGUUA5', 3'GGGCACAGUCGGCGACAGA5', 3'UCUCAAGCCUCAUUGGAAU5' 5 nM Nr.: L-010539-00-0005, Dharmacon (Lafayette, CO, USA)

3.9 Transfektionsreagenz

Tabelle 11: Transfektionsreagenz

Produkt	Hersteller	Firmensitz
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

3.10 PCR-Primer

Tabelle 12: PCR-Primer

Assay	Assay-ID	Hersteller	Firmensitz
TaqMan™ Gene Expression Assay STAT5a	Hs00559637_g1	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
TaqMan™ Gene Expression Assay STAT5b	Hs00560026_m1	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
TaqMan™ Gene Expression Assay PSA	Hs02576345_m1	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
TaqMan™ Gene Expression Assay BCL2L1	Hs00236329_m1	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
TaqMan™ Gene Expression Assay CCND1	Hs01050839_m1	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
TaqMan™ Gene Expression Assay HPRT1	Hs02800695_m1	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA

3.11 Kits

Tabelle 13: Verwendete Kits

Produkt	Hersteller	Firmensitz
RNeasy® Plus Mini Kit	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH	München, Deutschland
Biozym Probe qPCR Mix	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland

3.12 Puffer und Lösungen

Alle gelisteten Puffer wurden, sofern nicht anders aufgeführt, mit destilliertem Wasser (H_2O_d) hergestellt.

3.12.1 Puffer für die Proteinextraktion und -bestimmung

RIPA-Puffer (1x)

150 mM	NaCl
5 mM	EDTA, pH 0,8
50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
0,5 %	Natriumdeoxycholat
0,1 %	SDS
1 %	NP-40 (v/v)

Der Puffer wurde auf 500 ml mit H_2O_d aufgefüllt.

Zellysepuffer (1x) (frisch angesetzt)

940 μl	RIPA-Puffer
10 μl	DTT (100 mM)
10 μl	Protease Inhibitor Cocktail
10 μl	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
20 μl	PMSF (100 mM)
10 μl	Triton-X 100

Bradford-Reagenz (5x)

300 mg	Coomassie Brilliant Blue G250
150 ml	Methanol
150 ml	H_2O_d
300 ml	Phosphorsäure (85 % v/v)

3.12.2 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Ethanol (70 % v/v)

350 ml	Ethanol absolut
150 ml	H ₂ O _d

Trenngelpuffer (pH 8,8)

66,1 g	Tris
--------	------

Tris wurde in 400 ml H₂O_d gelöst, der pH-Wert auf 8,8 mit HCl eingestellt und mit H₂O_d auf 500 ml aufgefüllt.

Lösung für zwei 10 % Trenngele

2,6 ml	H ₂ O _d
100 µl	SDS (10 % w/v)
2,5 ml	Trenngelpuffer
3,2 ml	Rotiphorese® Gel A
1,6 ml	Rotiphorese® Gel B
100 µl	APS (10 % w/v)
10 µl	TEMED

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

66,1 g	Tris
--------	------

Tris wurde in 400 ml H₂O_d gelöst, der pH-Wert auf 6,8 mit HCl eingestellt und mit H₂O_d auf 500 ml aufgefüllt.

Lösung für zwei 6 % Sammelgele

2,7 ml	H ₂ O _d
50 µl	SDS (10 % w/v)
1,25 ml	Sammelgelpuffer
0,65 ml	Rotiphorese® Gel A
0,3 ml	Rotiphorese® Gel B
50 µl	APS (10 % w/v)
10 µl	TEMED

3.12.3 Puffer für den Western Blot

Laemmli-Probenpuffer (4x)

900 µl	4 x Laemmli Sample Buffer
100 µl	β-Mercaptoethanol

SDS-Laufpuffer (1x)

100 ml	Rotiphorese® 10x SDS-PAGE
900 ml	H ₂ O _d

Transferpuffer nach Towbin (283) (10x)

30,3 g	Tris
144 g	Glycin

Der Transferpuffer wurde mit H₂O_d auf ein Gesamtvolumen von 1.000 ml aufgefüllt.

Transferpuffer nach Towbin (283) (1x)

100 ml	Transferpuffer nach Towbin (10x)
100 ml	Methanol
800 ml	H ₂ O _d

Trisgepufferte Saline (TBS) (10x)

26 g	Tris-HCl
4,24 g	Tris
292,7 g	NaCl

Der pH-Wert wurde mit 5N HCl auf 7,4 eingestellt und der Puffer mit H₂O_d auf ein Gesamtvolumen von 1.000 ml aufgefüllt.

Trisgepufferte Saline (TBS) (1x)

100 ml	TBS 10x
900 ml	H ₂ O _d

Trisgepufferte Saline mit Tween® 20 (TBST) (1x)

100 ml	TBS 10x
899 ml	H ₂ O _d
1 ml	Tween® 20

Blockierungslösung

5 g	Magermilchpulver
50 ml	TBS

Antikörperpuffer

0,5 g	Magermilchpulver
50 ml	TBST

3.12.4 Lösungen und Puffer für den MTT-Assay

MTT-Arbeitslösung (0,5 %)

2,5 g	MTT
500 ml	PBS

MTT-Solubilisierungspuffer

10 %	SDS
0,01 N	HCl

3.12.5 Lösungen für die Zellzyklusanalyse

Propidium-Iodid Stammlösung (5 mg/ml)

25 mg	Propidium Iodid
5 ml	PBS

FACS-Puffer

2,5 g	BSA
500 ml	PBS

RNase A (100 µg/ml)

25 mg RNase A
 250 ml H₂O_d

3.12.6 Stammlösungen der Medikamente

Enzalutamid-Stammlösung

100 mM Enzalutamid gelöst in DMSO

Pimozid-Stammlösung

100 mM Pimozid gelöst in DMSO

3.13 Software

Tabelle 14: Software

Name	Version	Firma	Firmensitz
AlphaView SA	3.4.0.	ProteinSimple	Santa Clara, CA, USA
BD CellQuest™ Pro	5.1	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Endnote	X9.3	Thomson Reuters	Toronto, Kanada
FlowJo	10.5.3.	Becton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Prism	7.04.	GraphPad Software, Inc.	San Diego, CA, USA
Magellan	V 2.2	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
ModFit	5.0.9	Verity Software House	Topsham, ME, USA
Office Professional Plus 2010	14.0.7237.5000	Microsoft Corporation	Seattle, WA, USA
Zen	2.3.	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Verfügbarkeit und Verarbeitung wurden die Zellen im jeweils üblichen Passagenverhältnis in 1 ml Einfriermedium (Kultivierungsmedium mit 10 % DMSO-Anteil) gelöst und in ein Kryogefäß überführt. Zur Gewährleistung eines langsamen Herunterkühlens (1°C/min) wurden die Gefäße über Nacht in einer Einfrierhilfe bei -80°C gelagert. Im Anschluss erfolgte die Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff bei -178°C.

4.1.2 Auftauen von Zellen

Zur Reaktivierung der kryokonservierten Zellen wurden diese kurz im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, im Anschluss in 9 ml Medium (s. 3.6.2) aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt. Danach erfolgte die Inkubation bei 5 % CO₂ und 37°C im Brutschrank. Am Folgetag wurde ein Wechsel des Kultivierungsmediums durchgeführt, um die DMSO-Rückstände und Zelldebris zu entfernen.

4.1.3 Zellkultivierung

Die Zelllinien wurden im entsprechenden Medium (s. 3.6.2) bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Es erfolgten regelmäßige lichtmikroskopische Kontrollen. Im Falle der Enzalutamid-resistenten Zelllinien erfolgte ein Mediumwechsel mit 10 µM Enzalutamid an jedem zweiten Tag, um eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration mit entsprechendem Resistenzdruck zu gewährleisten. Das Passagieren der Zellen wurde bei 80 %iger Konfluenz durchgeführt.

4.1.4 Passagieren der Zellkulturen

Zum Zeitpunkt einer 80 %igen Konfluenz wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA in Kurzinkubation abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 4 ml Medium abgestoppt, die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in Medium resuspendiert. In der Regel wurden die PC3-Zellen im Verhältnis 1:5, die übrigen Zelllinien im Verhältnis 1:3 in eine neue Zellkulturflasche passagiert.

4.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte die Ablösung der maximal 80 % konfluenten Zellen wie zuvor beschrieben (s. 4.1.4). Nach Zentrifugation und erneuter Aufnahme in Kulturmedium wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau gefärbt und in eine Zellschälkammer gegeben. Mittels Trypanblau erfolgt eine Färbung aller bereits avitalen Zellen aufgrund der nicht mehr intakten Zellmembranen. Die anschließende Zählung erfolgte automatisiert mit dem LUNA™-Zellzähler.

4.1.6 Aussaat von Zellen in Well-Platten

Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurde jeweils die gewünschte Zellzahl in Abhängigkeit der Zelllinie und der verwendeten Wellgröße durch Verdünnung der Zellsuspension mit Medium eingestellt. Für die Aussaat in der 6-Well-Platte wurde eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen pro Well eingestellt. In der 96-Well-Platte erfolgte bei den Zelllinien LNCaP, C4-2 und MR49F die Aussaat von 1×10^4 Zellen pro Well, bei der PC-3-Zelllinie wurden 5×10^3 Zellen pro Well genutzt.

4.1.7 Behandlung von Zellen mit Enzalutamid und Pimozid

4.1.7.1 Zellviabilität unter Enzalutamid-Behandlung

Zur Evaluation der zellviabilitätsinhibierenden Wirkung von Enzalutamid wurden AR-positive, hormonsensitive LNCaP-Zellen, AR-positive, kastrationsresistente C4-2-Zellen, AR-positive, Enzalutamid-resistente MR49F-Zellen sowie AR-negative PC3-Zellen über einen Zeitraum von 24, 48, 72 und 96 h mit aufsteigenden Dosen von 10^{-1} bis 10^4 nM Enzalutamid behandelt. Hierzu wurde vor der Behandlung ein Mikroreaktionsgefäß der bei -20°C gelagerten Stammlösung aufgetaut.

4.1.7.2 Dosis-Wirkungs-Analysen für Enzalutamid und Pimozid

Für die Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven mit dem MTT-Test (s. 4.1.9) und die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) im gewählten Konzentrationsbereich wurden die Zellen mit Enzalutamid oder Pimozid für einen Zeitraum von . Hierzu wurde vor der Behandlung ein Mikroreaktionsgefäß der bei -20°C gelagerten Stammlösung aufgetaut. Die Behandlung der Zellen erfolgte im Anschluss der Aussaat mit Konzentrationen von 0,01 bis 10 μM Enzalutamid oder 0,01 bis 100 μM Pimozid zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven.

4.1.7.3 Kombinationsbehandlungen mit Enzalutamid und Pimozid

Für die Kombinationsbehandlungen wurden die Zellen in festen Kombinationsverhältnissen beider Wirkstoffe (Enzalutamid : Pimozid und Pimozid : Enzalutamid) von 1:1, 1:2 und 1:5 für 72 h behandelt (284). Dazu wurden vier Behandlungslösungen aus beiden Wirkstoffen in den jeweiligen Verhältnissen angesetzt und logarithmische Verdünnungen mit Endkonzentrationen des jeweils fixen Wirkstoffs von 0,01 bis 100 µM von jeder Behandlungslösung hergestellt. Die Behandlung erfolgte einen Tag nach der Aussaat. Als Kontrollen wurden die Zellen einzeln sowohl mit Enzalutamid als auch mit Pimozid in Wirkkonzentrationen von 0,01 bis 100 µM Enzalutamid bzw. Pimozid behandelt. Die Zellviabilität wurde mit dem MTT-Test (s. 4.1.9) gemessen. Zur Analyse der Kombinationsindices aus den Isobogrammen wurde nach Loewe folgende Formel genutzt (284):

$$CI = \left(\frac{C_{A,X}}{IC_{X,A}} \right) + \left(\frac{C_{B,X}}{IC_{X,B}} \right)$$

Tabelle 15: Kombinationsbehandlungsansatz für den Isobogrammversuch

Kombinationsbehandlungs- verhältnis	1:0	1:1	1:2	1:5
Enzalutamid	100 µM	100 µM	100 µM	100 µM
Pimozid	0 µM	100 µM	200 µM	500 µM

Die Konzentrationen des eingesetzten Enzalutamids zur Bestimmung der Zellviabilität nach STAT5A/B-Knockdown reichten von 0,001 bis 100 µM mit einer Behandlungsdauer von 72 h. Für die Western Blot- und Zellzyklusanalysen sowie die Bestimmung der AR-Aktivität nach STAT5A/B-Knockdown wurden die Experimente in An- oder Abwesenheit von 10 µM Enzalutamid für 72 h durchgeführt. Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Toxizität von DMSO zeigten, dass diese erst signifikant ab einer Konzentration größer als 1 % auftreten, sodass unter Beachtung dieses Grenzwertes auf Toxizitätskontrollen mit DMSO als Vehikel verzichtet wurde.

4.1.8 Transfektion mit siRNA

Für die Transfektion der Zellen wurden 25 nM (Endkonzentration) ON-TARGETplus SMARTpool-siRNA gegen STAT5A und STAT5B sowie eine Kontrolle unter Nutzung des Lipofectamin RNAiMAX-Reagenz nach Herstellerangaben eingesetzt (s. 3.8, Tabelle 10). Zum Ansetzen der Lipofectamin- sowie siRNA-Behandlungslösungen wurde RPMI- bzw. DMEM-

Medium ohne weitere Zusätze genutzt. Dabei erfolgte die Transfektion am Folgetag der Aussaat. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Enzalutamid oder Vehikel behandelt. Zudem wurde bei jedem Versuch eine nicht-transfizierte Kontrolle (MOCK) mitgeführt, um mögliche Effekte der Transfektion detektieren zu können.

4.1.9 Messung der Zellviabilität

Nach entsprechender Behandlungsdauer und Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde die Zellviabilität mittels MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)-Assay erfasst. Dazu wurden die Wells mit 10 µl des Farbstoffs MTT (s. 3.12.4) für 4 h inkubiert, woraufhin 100 µl des Solubilisierungspuffers (s. 3.12.4) aufgetragen wurde. Der Assay basiert auf der Reduktion des gelben Farbstoffes MTT in violette, wasserunlösliches Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen, was die Viabilität der Zellen anzeigt (285). Die photometrische Messung der Absorption (optische Dichte (OD)) wurde 24 h nach Solubilisierung mit dem Tecan SPARK 10M Multiplattenleser und der Software Magellan bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm durchgeführt.

4.2 Western Blot

4.2.1 Proteinisolation aus Zellen

Zur Verhinderung der Proteindegradation wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Zur Gewinnung von Proteinlysate wurde zunächst das Medium der in 6-Well-Platten wachsenden Zellen verworfen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1 ml kaltem PBS und die Ablösung des Zellrasens mittels eines Zellhebers. Die in PBS gelöste Zellsuspension wurden in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und in der Kühlzentrifuge 5 min bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 50 µl Zellysepuffer (s. 3.12.1) resuspendiert. Nach Durchmischung und 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 21.000 g und 4°C für 10 min. Hiernach wurde der die Proteine enthaltene Überstand in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und bis zur anschließenden Proteinbestimmung auf Eis gelagert.

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Sicherstellung gleicher Proteinmengen pro Bande wurde vor der Gelbeladung eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford durchgeführt. Diese basiert auf der Verschiebung des Coomassie® Blau-Absorptionsmaximums von 470 nm auf 595 nm nach der Proteinbindung in saurem Medium (286). Hierzu wurde das Bradford-Reagenz (s. 3.12.1) im Verhältnis 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. 5 µl der Proteinlysate-Probe wurden mit PBS 1:10 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Die Messung erfolgte in Triplets. Zur Kalibrierung mit einem Referenzprotein wurde die Erstellung einer Standardkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) durchgeführt. Hierzu wurde mit BSA (1 mg/ml) und PBS eine Verdünnungsreihe von 0 bis 1 mg/ml in Schritten von 0,2 mg/ml hergestellt und 10 µl jeder Verdünnungsstufe in eine 96-Well-Platte gegeben. Die Messung erfolgte in Triplets. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 300 µl Bradford-Reagenz pro Well. Zur Messung der Absorptionzunahme wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch gemessen. Die Standardkurve wurde mittels linearer Regression berechnet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Umrechnung der Absorptionswerte (OD) unter Zuhilfenahme der zuvor ermittelten Regressionsgleichung.

4.2.3 Herstellung von Polyacrylamid-Gelen für die SDS-PAGE

Zur Durchführung der Proteinauftrennung wurden 10 %ige (Trenngel) und 6 %ige (Sammelgel) Polyacrylamid-Gele hergestellt. Dazu wurde zunächst die Trenngellösung (s. 3.12.2) in die zuvor nach Herstellerprotokoll aufgebaute Gelgieß-Apparatur eingegossen. Diese Lösung wurde im Anschluss mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Gelgrenze

nach der Polymerisation zu erzielen. Nach Polymerisation des Trenngels und der Entfernung des Isopropanols wurde die Sammelgellösung (s. 3.12.2) eingefüllt und ein Gelkamm im Gel platziert. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Glasplatten aus der Apparatur entfernt, der Kamm gezogen und die Taschen vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült. Dann erfolgte die Befestigung in der Elektrophoresekammer, welche mit 1x Laufpuffer bis zur Markierung befüllt wurde.

4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zur Auftrennung von Proteinen, das von Laemmli bereits 1970 entwickelt wurde (287). Das Verfahren beruht auf der Wanderung geladener Teilchen, in diesem Fall durch SDS negative geladene Proteine, zum Pol mit der entgegengesetzten Ladung. Durch Nutzung eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels werden die Proteine bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurden 20 bis 30 µg Proteinlysate mit 4x Laemmli-Probenpuffer (s. 3.12.3) versetzt und die Proteine durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Im Anschluss wurde das Gel mit den Proben beladen. Für jedes Gel wurden zusätzlich 5 µl Größenstandard (s. 3.4) zur späteren Bestimmung des Molekulargewichtes eingesetzt. Nun folgte der Anschluss der Laufkammer an das Netzteil. Zunächst wurde eine konstante Spannung von 80 V angelegt, bis die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Zum Durchlaufen des Trenngels wurde eine konstante Spannung von 150 V am geregelten Netzteil gewählt. Nach Erreichen des unteren Trenngelbereichs wurde die Spannung entfernt und das Gel aus der Laufapparatur entnommen.

4.2.5 Elektrophoretischer Proteintransfer

Die Aktivierung der für den Proteintransfer genutzten PVDF-Membran erfolgte in Methanol bis zur Transparenz der Membran nach ca. 10 Minuten, dann folgte ein Waschschrift mittels 1x Transferpuffer für 10 min. Weiterhin wurden vier zugeschnittene Filterpapiere in einem Gesamtvolumen von 50 ml mit 1x Transferpuffer (s. 3.12.3) befeuchtet. Für den Transfer der Proteine wurde folgende Anordnung der Schichten gewählt und auf die schwarze Fläche der Blothalterung aufgelegt (Abbildung 15).

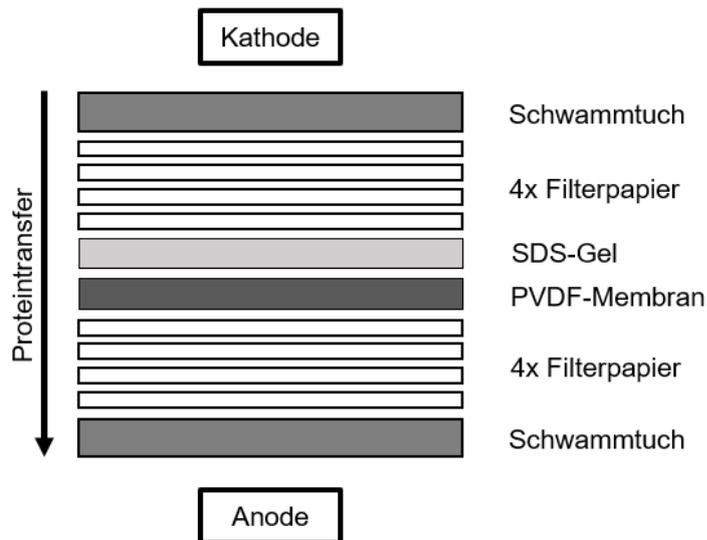


Abbildung 15: Schematische Anordnung des Blot-Sandwiches. Von oben nach unten: Kathode, Schwammtuch (grün), Filterpapiere (4x, weiß), SDS-Gel (blau), PVDF-Membran (orange), Filterpapiere (4x, weiß), Schwammtuch (grün).

Luftblasen wurden mit dem Blotroller durch Rollbewegungen von der Mitte zum Rand hin entfernt. Im Anschluss wurde die Blothalterung in die Blotkammer eingesetzt, welche mit 1x Transferpuffer aufgefüllt, mit Kühlakkus bestückt und für 1 h an eine Spannungsquelle mit konstanter Spannung von 100 V mit variabler Stromstärke angeschlossen wurde.

4.2.6 Blockierung der PVDF-Membran

Nach Beendigung des Blotvorgangs erfolgte die Blockierung der unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran und der darauf befindlichen Proteine. Die PVDF-Membran wurden aus der Blotapparatur entnommen, beschriftet und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Stehrand überführt, in dem die Membran fortan bis zur Detektion verblieb. Nun folgte auf einen ersten Waschschrift mit 10 ml 1x TBS für 10 min die Inkubation der Membran mit 10 ml der Blockierungslösung (s. 3.12.3) für 60 min bei RT auf dem Rollenmischer.

4.2.7 Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper

Der Primärantikörper (Tabelle 8) wurde je nach etablierter Antikörperverdünnung unter Nutzung des Antikörperpuffers (s. 3.12.3) verdünnt. Nach dem Verwerfen der Blockierungslösung folgte die Zugabe von 2 ml des den Primärantikörper enthaltenden Antikörperpuffers, welcher über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert wurde. Am Folgetag beendeten drei Waschschriffe mit 10 ml 1x TBST (s. 3.12.3) mit einer Dauer von 10 min unter kontinuierlicher Rollenmischung bei RT die Primärantikörperinkubation.

4.2.8 Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper

Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde zunächst die Antikörperlösung mit dem Antikörperpuffer (s. 3.12.3) und dem jeweils zu nutzenden Sekundärantikörper (Tabelle 9) in einer Verdünnung von 1:1.000 hergestellt und 2 ml dieser Lösung in das Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h folgten auch bei diesem Schritt drei Waschintervalle von je 10 min bei RT auf dem Rollenmischer, zwei davon mit 10 ml 1x TBST und anschließend ein Waschschrift mit 10 ml 1x TBS. Im Anschluss wurde ein letzter Waschschrift mit H_2O_d für maximal 5 min durchgeführt.

4.2.9 Entwicklung und Detektion des Western Blots

Nach Beendigung der Antikörperinkubation wurde die Membran mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen, in eine Petrischale überführt und für eine Minute mit 1 ml einer ECL-Reaktionslösung (Tabelle 4) benetzt, welche unmittelbar vor diesem Schritt nach Herstellerprotokoll angesetzt worden war. Nach der ECL-Inkubation wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Folien platziert und die Chemilumineszenz mit dem FluorChem E Imaging System detektiert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 RNA-Isolation aus Zellkulturen

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Plus Mini Kit (Tabelle 13) genutzt. Sämtliche Schritte wurden bei RT durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgegossen und der Zellrasen mit 350 µl des RLT Plus-Puffers benetzt, dem zuvor gemäß Herstellerprotokoll β-Mercaptoethanol hinzugesetzt worden war. Dieser Puffer enthält Guanidiniumthiocyanat und dient sowohl der Zelllyse als auch der Inaktivierung von RNasen und anderen Enzymen. Mit einem Zellheber wurden die Zellen gelöst und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Eine ausreichende Homogenisation wurde durch Durchmischen für 1 min sichergestellt. Nach sorgfältiger Resuspension wurde das Lysat auf die gDNA-eliminierende Säule, welche in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß platziert war, gegeben. Es erfolgte nun ein Zentrifugationsschritt mit 21.000 g für 30 s. In diesem Schritt wird genomische DNA an der Säule gebunden und aus dem Lysat entfernt. Die Säule wurde verworfen und die abzentrifugierte Flüssigkeit weiterverwendet. Nun wurden dem Lysat 350 µl 70 % Ethanol (v/v in H₂O_d) hinzugefügt. Nach sorgfältiger Durchmischung wurde die Lösung auf eine RNeasy spin Säule gegeben, welche wiederum in einem 2 ml Mikroreaktionsgefäß platziert war. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 21.000 g für 15 s. Bei diesem Schritt bindet die Gesamt-RNA an die RNeasy spin Säule. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule zurückgesetzt. Nun folgte die Zugabe von 700 µl des RW1-Puffers auf die Säule und ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 21.000 g für 15 s, um die Säulenmembran zu waschen und so unspezifisch gebundene Biomoleküle zu entfernen. Auch hier wurde der Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben, im Anschluss erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 21.000 g für 15 s sowie das erneute Verwerfen des Durchflusses. Bei dem RPE-Puffer handelt es sich um einen ethanolhaltigen Waschpuffer, der insbesondere die Salzrückstände der membrangebundenen RNA entfernt. Nochmals wurden 500 µl des RPE-Puffers auf die Säule gegeben und im Anschluss für 2 min bei 21.000 g zentrifugiert. Die Säule mit der nun getrockneten, ethanolfreien Membran wurde in ein frisches 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 21.000 g zentrifugiert. Nun folgte die Platzierung der Säule in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß sowie die Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser auf die Säule. Unter Zentrifugation bei 21.000 g für 1 min wurde die RNA von der Säule in das Mikroreaktionsgefäß eluiert. Die Konzentration der eluierten RNA wurde mittels NanoDrop™-Spektralphotometer ermittelt.

4.3.2 Reverse Transkription – die cDNA-Synthese

Zur Durchführung der folgenden Polymerasekettenreaktion ist ein DNA-Strang als Substrat der DNA-Polymerase nötig, welcher in diesem Arbeitsschritt aus RNA durch die reverse Transkriptase gewonnen wird. Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurden pro Probe 500 ng RNA eingesetzt. Unter sterilen Arbeitsbedingungen an der UV-Werkbank wurde das benötigte Volumen der RNA-Elution in einem 0,5 ml-Mikroreaktionsgefäß mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 4 µl 5x iScript-Puffer und 1 µl reverse Transkriptase aus dem iScript™-cDNA-Synthesekit (Tabelle 13). Die Synthese der cDNA wurde nun mit dem Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- (1) 25°C für 5 min
- (2) 46°C für 20 min
- (3) 95°C für 1 min

4.3.3 Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion werden unter Einsatz geeigneter Primer spezifische Sequenzen an genetischem Material durch das Enzym DNA-Polymerase amplifiziert. Hierbei erfolgt die Amplifikation durch das Enzym im Rahmen sich wiederholender Zyklen unterschiedlicher Temperaturen, die der Denaturierung der DNA, der Primerhybridisierung und der Elongation der Amplifikate dienen. Durch eine Fluoreszenzreaktion ist es bei der quantitativen PCR möglich, die exponentielle Vervielfältigung eines Templates während eines PCR-Zyklus zu messen. Für die vorliegende Arbeit wurde das auf fluorogenen Sonden basierende TaqMan®-System genutzt. Hierbei werden Sonden genutzt, welche am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem nicht fluorogenen Quencher markiert sind. Im Normalzustand der Sonde wird die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors nach Anregung durch den Quencher basierend auf dem Prinzip der strahlungsfreien Energieübertragung gehemmt. Sobald die Taq-Polymerase nach DNA-Hybridisierung der Sonde aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleasenaktivität das 5'-Ende der Sonde abbaut, wird der Reporter freigesetzt, der Energietransfer auf den Quencher unterbunden und die Emission von Licht durch den Reporterfarbstoff ermöglicht. So kann in jedem PCR-Zyklus eine steigende Reporter-Fluoreszenz detektiert (288, 289) werden. Die Erhöhung des Fluoreszenzsignals verhält sich hierbei proportional zur Menge des vervielfältigten Amplifikates. Zur Quantifizierung wird der sogenannte *Threshold Cycle* (Ct-Wert) ermittelt. Bei diesem Wert handelt es sich um den Zyklus der PCR, bei dem der Schwellenwert für unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz überschritten wird und somit ein eindeutiges

Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Er stellt den Anfang der exponentiellen Phase der PCR dar.

Für ein zu untersuchendes Zielgen (*Gene of interest*, GOI) wurde in einem qPCR-Reaktionsgefäß folgender Mastermix angesetzt:

0,5 µl	Zielgen-Primer (<i>STAT5A</i> , <i>STAT5B</i> , <i>PSA</i> , <i>BCL2L1</i> , <i>CCND1</i>) (Tabelle 12)
0,5 µl	Haushaltsgen-Primer (Housekeeper, HK: <i>HPRT1</i>) (Tabelle 12)
3 µl	H ₂ O _d
5 µl	Probe qPCR Kit (Tabelle 13)

Diesem Mix wurde 1 µl der zuvor hergestellten cDNA hinzugefügt. Pro Probe wurden zwei Ansätze für die PCR eingesetzt. Die quantitative PCR erfolgte nun mit dem magnetischen Induktionscycler. Die Werte der Schwellenwertzyklen (Ct-Werte) wurden mittels micPCR-Software erfasst und zur Normierung die Differenz der Ct-Werte von Zielgen und Haushaltsgen anhand folgender Formel berechnet:

$$\Delta Ct = Ct_{GOI} - Ct_{HK}$$

Die mRNA-Expression wurde als $2^{-\Delta Ct}$ dargestellt.

4.4 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Zur Identifizierung des Zellzyklus-Profiles von Zellen und Auswirkungen eines Wirkstoffs auf den Zellzyklus kann die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie genutzt werden. Die Analyse des Zellzyklus beruht auf der Identifikation der unterschiedlichen DNA-Mengen in den verschiedenen Zellzyklusphasen durch Anfärben mit dem fluoreszierenden, DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) und fluoreszenz-basierter Quantifizierung im Durchflusszytometer (290). In der G₀/G₁-Phase liegt in der ruhenden Zelle ein einfacher Chromosomensatz vor. Nach der Synthesephase (S-Phase) liegt die DNA in der G₂/M-Phase verdoppelt in Form von vier Schwesterchromatiden vor, im Anschluss erfolgt die mitotische Teilung. Die in der G₂/M-Phase doppelt so hohe DNA-Menge wird durch die DNA-Färbung in der Zellzyklusanalyse als doppelt so intensives Signal detektiert, da sich die Signalintensität proportional zur DNA-Menge verhält.

4.4.1 Vorbereitung

Zur Vorbereitung wurde zunächst Ethanol absolut bei -20°C gekühlt. Weiterhin wurde die PI-Arbeitslösung hergestellt, indem die Stammlösung (s. 3.12.5) mit PBS im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde. Die benutzten Zentrifugen wurden auf 4°C heruntergekühlt und die RNase A (s. 3.12.5) auf Eis aufgetaut.

4.4.2 Ernten und Anfärben der Zellen

Die für 72 h mit 10 µM Enzalutamid behandelten Zellen und unbehandelte Kontrollen wurden zunächst mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA bis zur Ablösung des Zellrasens. Nun wurden die Zellen in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4°C und 500 g. Ab diesem Zeitpunkt wurde bei 4°C bzw. auf Eis gearbeitet. Zunächst wurde der Überstand restlos entfernt. Das Pellet wurde in 300 µl kaltem PBS aufgenommen und die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die tropfenweise Zugabe von 700 µl eisgekühltem Ethanol absolut und die Inkubation bei 4°C für 30 min auf dem Thermoschüttler zur Permeabilisierung der Zellmembran. Nun wurde die Suspension bei 1.000 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Dies dient der Entfernung von Ethanolresten, da sie den RNA-Verdau behindern. Die Zellpellets wurden im Anschluss in 1 ml kaltem PBS aufgenommen, gut durchmischt und erneut für 5 min bei 4°C und 1.000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in 100 µl RNase A aufgenommen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation folgte die Zugabe von 200 µl PI-Arbeitslösung (50 µg/ml) im

abgedunkelten Umfeld. Die Färbung erfolgte für 10 min bei RT. Im Anschluss wurden die Proben in mit Folie abgedunkelte FACS-Röhrchen überführt, auf Eis gestellt und mit der Messung fortgefahren.

4.4.3 Messung am Durchflusszytometer und Auswertung

Die Messung am Durchflusszytometer erfolgte im FL-2-Farbkanal (Gelb, 585 nm) mit der Software BD CellQuest. Pro Messprobe wurden 10.000 Zellen gemessen. Die Auswertung wurde mit der Modfit- und FlowJo-Software durchgeführt.

4.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde die Prism 8.3 Software genutzt. Zur Darstellung kamen die Mittelwerte $\pm SEM$ der Versuchsergebnisse, wobei jeder Versuch mindestens als biologisches Triplikat durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der durchgeführten Western Blots wurden als Mittelwerte $\pm SD$ angegeben. Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen wurden mit dem Student's *t*-Test ermittelt. Als statistisch signifikant wurden *p*-Werte von $\leq 0,05$ angenommen. Die Signifikanz wurde mittels Sternchensymbol (*) gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Die Kurvenanpassung der Dosis-Wirkungskurven erfolgte mittels nicht-linearer Regression.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der ausgewählten Zelllinien

Zur näheren Subgruppierung der verwendeten Enzalutamid-sensitiven (C4-2, LAPC4-CTRL) und Enzalutamid-resistenten (MR49F, LAPC4-EnzaR) Zelllinien wurden diese auf ihre AR- sowie PSA-Proteinexpression hin untersucht, da es sich bei letzterer um das klinisch bedeutsamste Surrogat der AR-Funktion handelt und so im Rahmen dieser Studie die AR-Aktivität anhand der PSA-Expression ermittelt werden sollte.

Hier finden sich im Vergleich der C4-2- und MR49F-Zellen etwa um die Hälfte erniedrigte AR-Proteinlevel und eine nahezu unveränderte PSA-Proteinexpression (Abbildung 16 A+B) in der Enzalutamid-resistenten Zelllinie MR49F. Die Enzalutamid-resistente Zelllinie LAPC4-EnzaR zeigt im Vergleich zu ihrer sensitiven Kontrolle einen deutlichen Abfall des AR-Proteinlevels etwa um den Faktor 10 (Abbildung 16 A+B). Die sensitiven LAPC4-CTRL-Zellen weisen eine schwache PSA-Expression auf, welche in der resistenten Zelllinie nicht zu finden ist. Die in der Literatur als AR-, PSA- und STAT5-negativ beschriebenen PC3-Zellen wurden als Negativkontrollen untersucht und zeigen sich sowohl AR- als auch PSA-negativ (Abbildung 16 C, Abbildung 17 A+B) (280, 291).

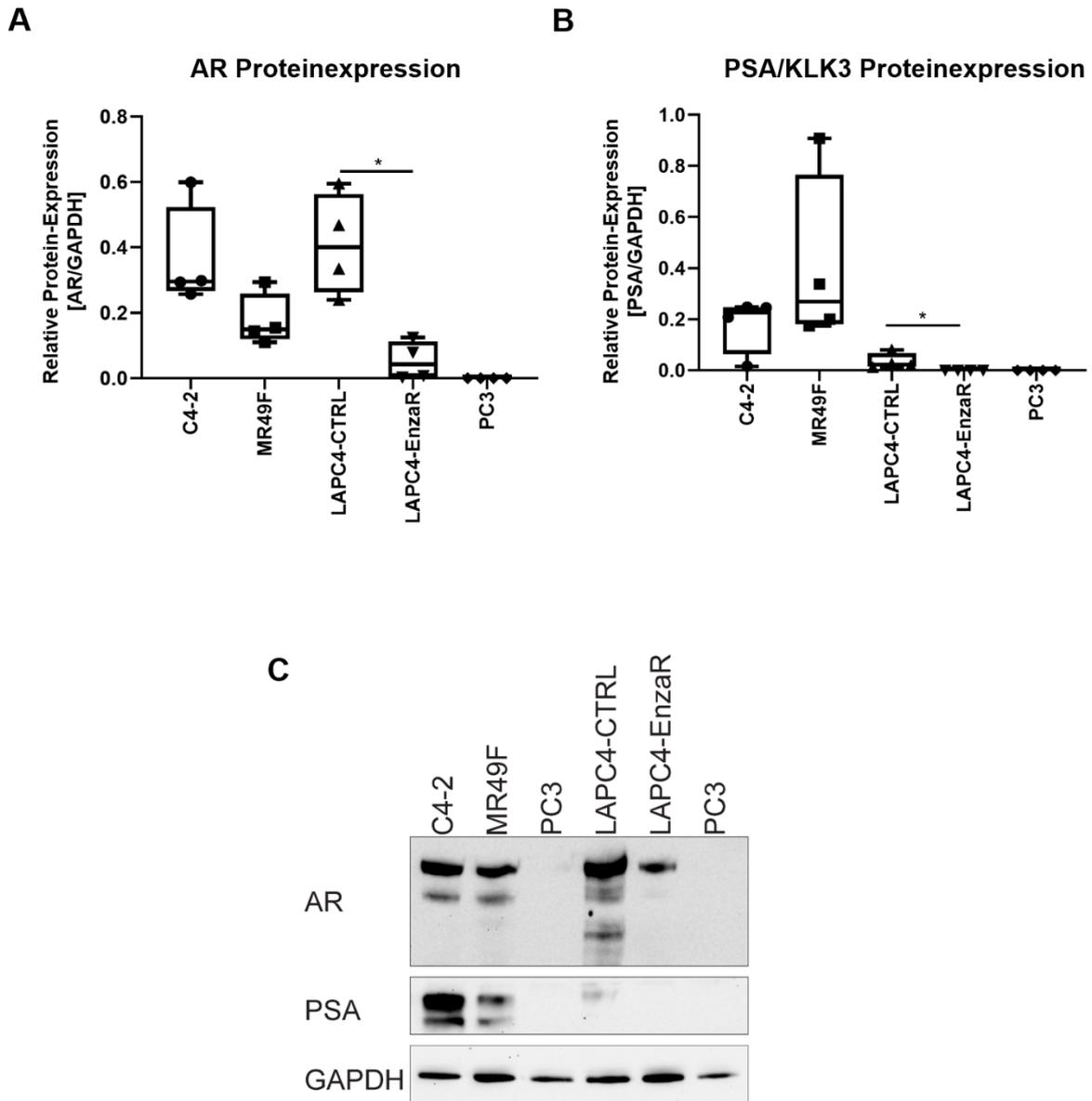


Abbildung 16: Die AR- und PSA-Proteinexpression in Enzalutamid-sensitiven und -resistenten Zelllinien. (A) Densitometrische Analyse der AR-Proteinexpression relativ zu GAPDH. (B) Densitometrische Analyse der PSA/KLK3-Proteinexpression relativ zu GAPDH. Box Plots mit Antennen (Min./Max.). $*p \leq 0,05$. $n = 3$. (C) Repräsentativer Western Blot der AR-, PSA- und GAPDH-Proteinexpression der untersuchten Zelllinien aus $n = 3$.

5.2 Die STAT5-Protein- und mRNA-Expression

Weil verschiedene Studien eine bedeutende Rolle von STAT5 und dessen Hochregulation in der Progression des PCa und der Entwicklung einer Kastrationsresistenz berichten, wurde die STAT5-Proteinexpression in Enzalutamid-sensiblen und Enzalutamid-resistenten Zellmodellen mittels Western Blot evaluiert (23, 25, 248). Hier zeigt sich, dass die STAT5-Proteinexpression in MR49F-Zellen verglichen mit C4-2 Zellen signifikant erhöht und nahezu verdoppelt ist. Die PSA-negative LAPC4-EnzaR-Zelllinie weist ähnliche STAT5-Proteinexpressionslevel wie ihre sensible Kontrolle LAPC4-CTRL auf (Abbildung 17 A). STAT5-negative PC3-Zellen stellen die Negativkontrolle dar (Abbildung 17 A+B).

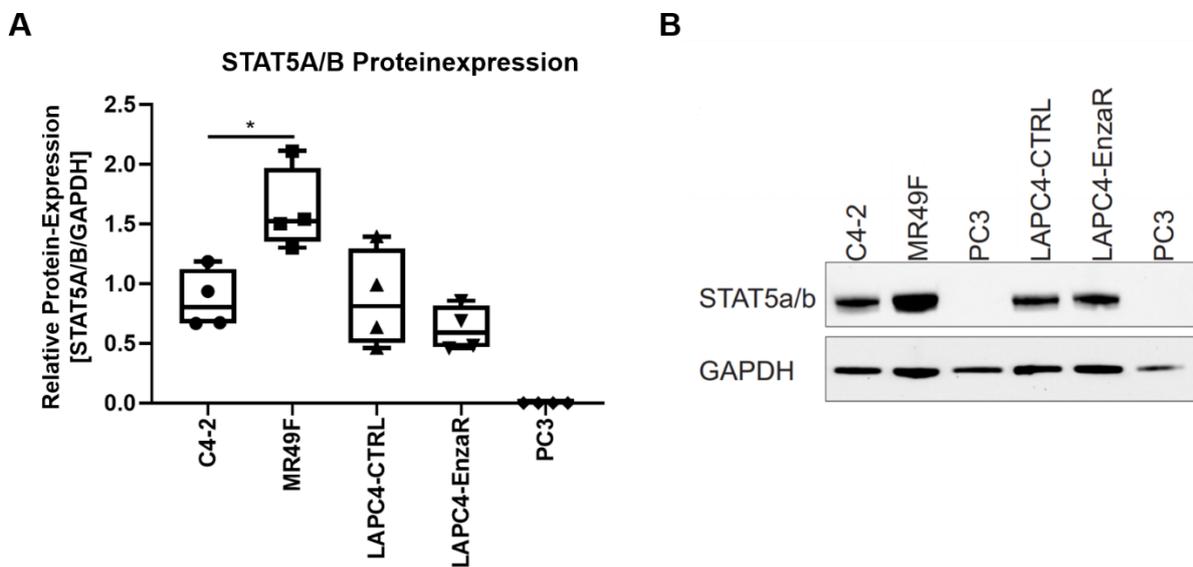


Abbildung 17: Die STAT5-Proteinexpression in Enzalutamid-resistenten Zellmodellen. (A) Densitometrische Analyse der STAT5-Proteinexpression relativ zu GAPDH. Box Plots mit Antennen (Min./Max.). * $p \leq 0,05$. $n = 3$. (B) Repräsentativer Western Blot der STAT5- und GAPDH-Expression der untersuchten Zelllinien aus $n = 3$.

Da der genutzte STAT5-Antikörper (Klon C-17, Tabelle 8) nicht zwischen den beiden Isoformen STAT5A und STAT5B unterscheiden kann, wurde zudem die STAT5A/B-mRNA-Expression untersucht. Die STAT5A mRNA-Level finden sich in den MR49F-Zellen signifikant erniedrigt im Vergleich zur C4-2-Zelllinie (Abbildung 18 A). Im Gegensatz dazu ist die STAT5B-mRNA-Expression in MR49F-Zellen im Vergleich zur Enzalutamid-sensiblen Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 18 B).

Die LAPC4-Zellen zeigen nahezu identische Level der STAT5A- bzw. STAT5B-mRNA, jedoch mit dem Unterschied, dass die detektierte STAT5A-Expression im Falle beider Zelllinien niedrig und die STAT5B-Expression hoch ist (Abbildung 18 A+B). Die STAT5-negativen PC3-Zellen zeigen keine STAT5-Expression (Abbildung 18 A+B).

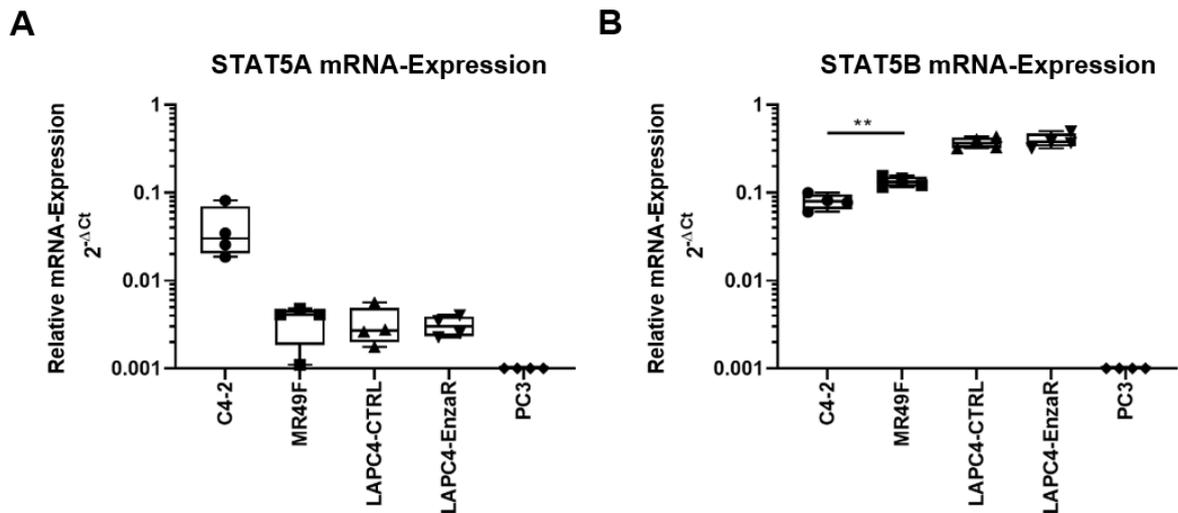


Abbildung 18: Die mRNA-Expression von STAT5A und STAT5B in Enzalutamid-resistenten Zelllinien. Relative (A) STAT5A- und (B) STAT5B-mRNA-Level in C4-2, MR49F, LAPC4-CTRL, LAPC4-EnzaR und PC3-Zellen (Negativkontrolle). Die Messung erfolgte mittels qPCR und Normalisierung auf HPRT1. Box Plots mit Antennen (Min./Max.). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. $n = 3$.

5.3 Die Zellmorphologie unter Enzalutamid-Behandlung

Zur Untersuchung der Zellmorphologie unter Enzalutamid-Exposition von 10 μM wurde das Wachstum der Zellen über einen Zeitraum von 96 h in Intervallen von 24 h in 100-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch dokumentiert. Hier zeigt sich zunächst ein spindelförmiges, konfluierendes Erscheinungsbild der LNCaP- sowie C4-2-Zellen (Abbildung 19, Abbildung 20), wohingegen MR49F-Zellen ein haufenförmiges Wachstum mit dreieckigen bis polygonalen Zellkörpern mit kleinen Zellausläufern aufweisen (Abbildung 21, s. Pfeilmarkierung). PC3-Zellen kennzeichnen sich durch konfluierendes Wachstum und rundliche, z.T. große, mehrkernige Zellkörper mit zahlreichen Vesikeln und Mitosen, allerdings ohne Zellausläufer (Abbildung 22). Vor allem C4-2-Zellen zeigen nach 96 h unter 10 μM Enzalutamid eine geringere Zelldichte. Außerdem verlassen sie ihre spindelförmige Konfiguration und entwickeln im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine langgezogene Form mit fadenförmigen Zellausläufern, insbesondere in Bereichen geringerer Zelldichte (Abbildung 20, s. Pfeilmarkierung). Die Morphologie sowie Zelldichte erscheint in der MR49F- sowie PC3-Zelllinie unter Enzalutamid-Exposition nicht verändert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 21, Abbildung 22).

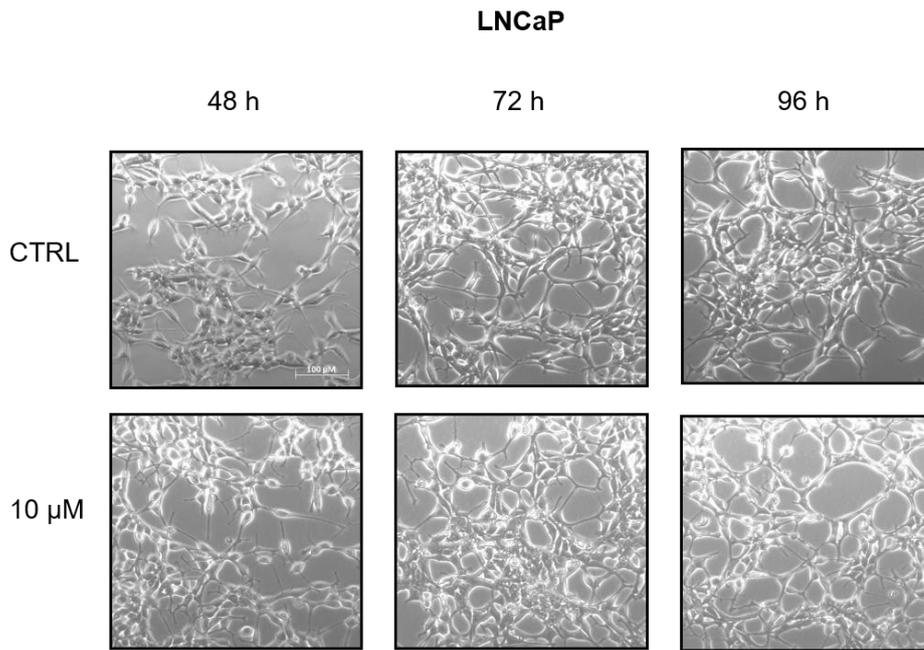


Abbildung 19: Zellmorphologie der LNCaP-Zellen über einen Zeitraum von 96 h unter Enzalutamid-Exposition (10 µM). Vergrößerung 100x.

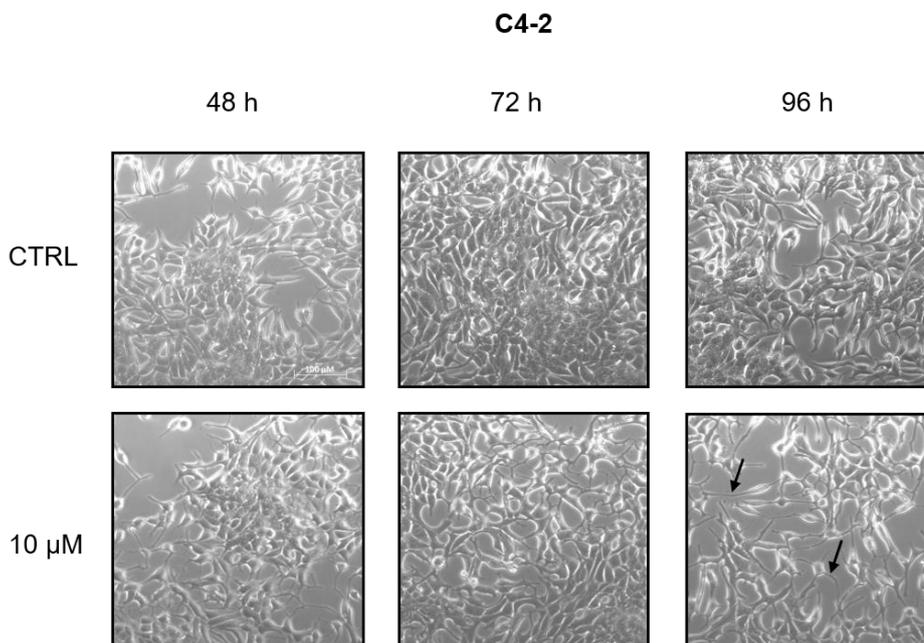


Abbildung 20: Zellmorphologie der C4-2 Zellen über einen Zeitraum von 96 h unter Enzalutamid-Exposition (10 µM). Die Pfeilmarkierung dient als Markierung für morphologische Veränderungen. Vergrößerung 100x.

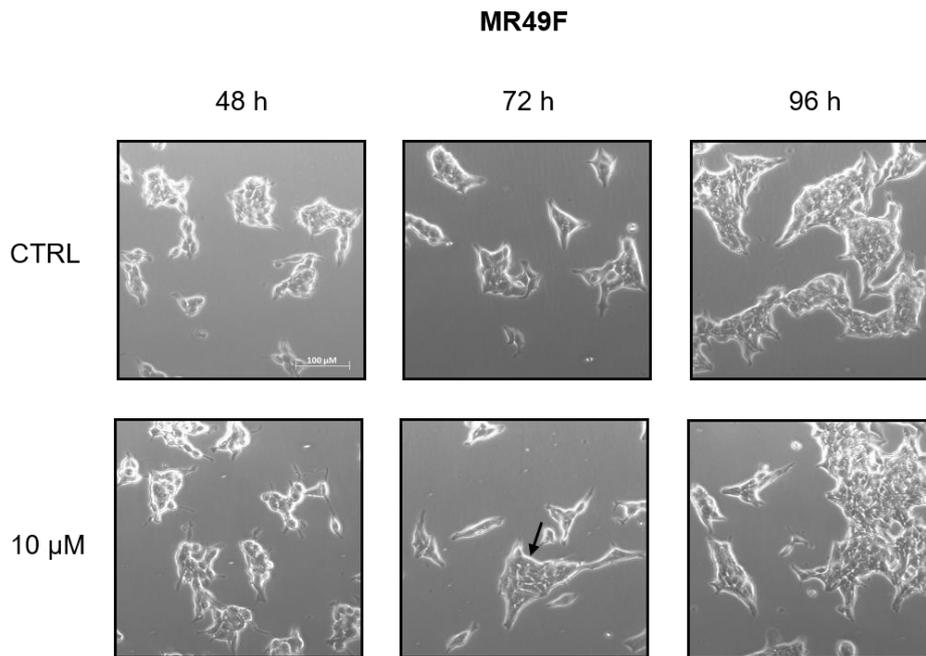


Abbildung 21: Zellmorphologie der MR49F-Zellen über einen Zeitraum von 96 h unter Enzalutamid-Exposition (10 µM). Die Pfeilmarkierung dient als Markierung für morphologische Veränderungen. Vergrößerung 100x.

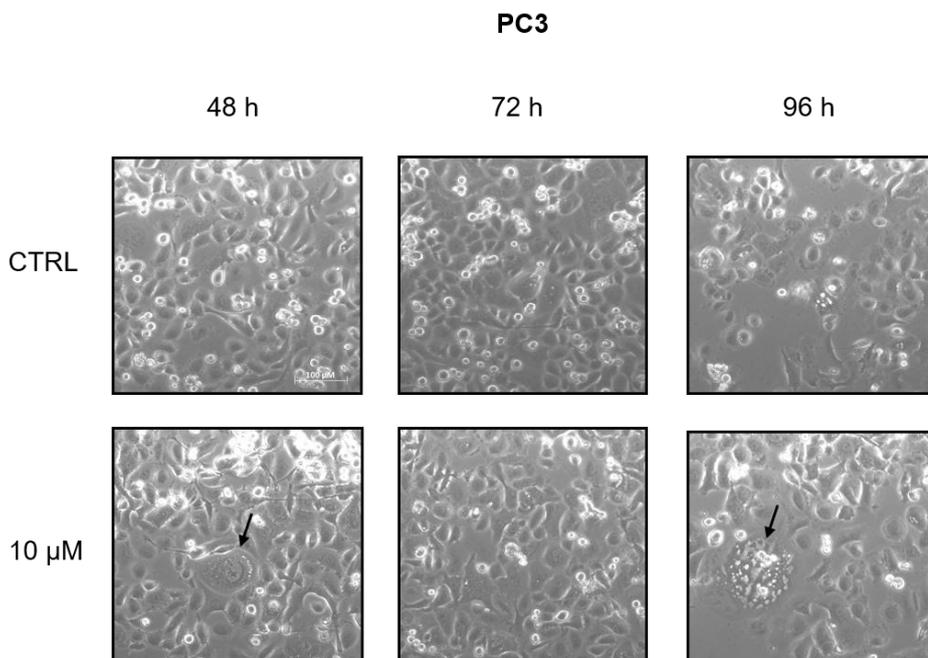


Abbildung 22: Zellmorphologie der PC3-Zellen über einen Zeitraum von 96 h unter Enzalutamid-Exposition (10 µM). Die Pfeilmarkierungen dienen als Markierungen für morphologische Veränderungen. Vergrößerung 100x.

5.4 Die Zellviabilität unter Enzalutamid-Behandlung

Zur Evaluation der zellviabilitätsinhibierenden Wirkung von Enzalutamid wurden AR-positive, hormonsensitive LNCaP-Zellen, AR-positive, kastrationsresistente C4-2-Zellen, AR-positive, Enzalutamid-resistente MR49F-Zellen sowie AR-negative PC3-Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 96 h mit aufsteigenden Dosen von 10^{-1} bis 10^4 nM Enzalutamid behandelt.

Insbesondere die Enzalutamid-sensiblen Zelllinien LNCaP und C4-2 zeigen hier eine zeit- und dosisabhängig reduzierte Zellviabilität, wobei dieser dosisabhängige Effekt nach einer Behandlung von 72 h signifikant zur Darstellung kommt. So weisen unbehandelte LNCaP-Zellen über 96 h eine kontinuierliche Viabilitätszunahme von insgesamt 200 % auf, wohingegen diese nach Behandlung mit der Maximaldosis von 10^4 nM nach 72 h lediglich 50 % beträgt und die Zellviabilität ab diesem Zeitpunkt nahezu stagniert. Eine signifikante Inhibition liegt nach 72 h bei einer Enzalutamid-Konzentration von 10^2 nM vor (Abbildung 23 A, Abbildung 24 A). Ein ähnlicher, aber stärkerer Effekt zeigt sich in der C4-2 Zelllinie, die unbehandelt eine kontinuierliche Zunahme der Viabilität um etwa 350 % aufweist, nach 72 h Behandlung in Maximaldosis eine Stagnation der Viabilität zeigt und nach 96 h unter maximaler Enzalutamid-Dosierung eine Inhibition der Viabilität von insgesamt 250 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erkennen lässt. Hier zeigt sich eine signifikante Inhibition der Zellviabilität bereits in einer Dosis von 1 nM Enzalutamid nach 72 h (Abbildung 23 B, Abbildung 24 B). In der AR-negativen PC3-Zelllinie findet sich keine signifikante zeit- oder dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität, nach 96 h Behandlung mit Maximaldosis liegt hier eine schwache, nicht signifikante Inhibition der Zellviabilität um ca. 35 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle vor (Abbildung 23 C, Abbildung 24 C). Die Enzalutamid-resistente Zelllinie MR49F zeigt nach 72 h eine moderate konzentrationsabhängige Inhibition der Zellviabilität von maximal 60 % unter Enzalutamid-Höchstdosis von 10^4 nM, dieser Effekt verstärkt sich nach 96 h auf 116 %. Signifikante inhibitorische Effekte treten nach 96 h ab einer Enzalutamid-Konzentration von $10^{2,5}$ nM auf (Abbildung 23 D, Abbildung 24 D).

Zusammenfassend demonstrieren diese Daten, dass Enzalutamid in den Enzalutamid-sensiblen Zelllinien LNCaP und C4-2 zu einer zeit- und dosisabhängigen Reduktion der Zellviabilität führt, welche in diesem Ausmaß weder in der AR-negativen Zelllinie PC3 noch in der Enzalutamid-resistenten MR49F-Zelllinie zu verzeichnen ist.

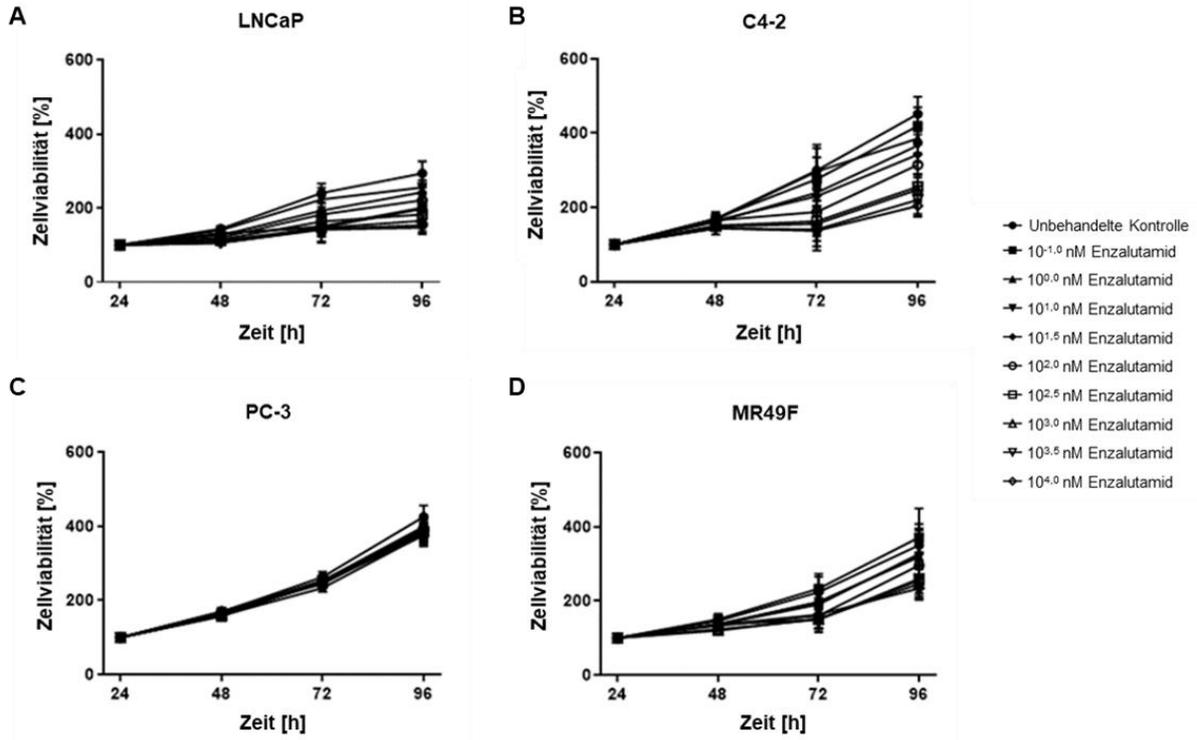


Abbildung 23: Zeit- und dosisabhängige Zellviabilität nach Enzalutamid-Behandlung der LNCaP (A), C4-2 (B), PC3 (C) und MR49F (D) Zellen. Auf der X-Achse findet sich die Behandlungszeit von insgesamt 96 h. Auf der Y-Achse ist die Zellviabilität in Prozent [%] aufgetragen. Normalisierung auf den 24 h-Wert der jeweiligen Enzalutamid-Behandlung [nM] (= 100 %). Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). n = 5.

A LNCaP									
Unbeh. CTRL VS	-1	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
24 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
48 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
72 h	ns	ns	ns	ns	*	***	***	***	***
96 h	ns	ns	ns	*	***	***	***	***	***

B C4-2									
Unbeh. CTRL VS	-1	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
24 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
48 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
72 h	ns	**	***	***	***	***	***	***	***
96 h	ns	**	***	***	***	***	***	***	***

C PC3									
Unbeh. CTRL VS	-1	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
24 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
48 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
72 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
96 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

D MR49F									
Unbeh. CTRL VS	-1	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
24 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
48 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
72 h	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
96 h	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	*	**

Abbildung 24: Statistische Auswertung der zeit- und dosisabhängigen Zellviabilität. Getestet wurde gegen die unbehandelte Kontrolle (unbeh. CTRL). Die Dosis -1 entspricht einer Enzalutamid-Konzentration von 10^{-1} nM, selbiges gilt für alle weiteren Dosierungen. ns: nicht signifikant. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. n = 5.

5.5 Ermittlung der IC₅₀-Werte durch Dosis-Wirkungs-Analysen

Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Versuche zur Zellviabilität wurde zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Analyse von Enzalutamid ein Behandlungszeitraum von 72 h gewählt. Zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden C4-2- und MR49F-Zellen in aufsteigender Konzentration von 0,1 µM bis 100 µM Enzalutamid für 72 h behandelt und die Viabilität mittels MTT-Assay gemessen. Der ermittelte IC₅₀-Wert stellt die Konzentration dar, bei der eine Inhibition der Zellviabilität um 50 % innerhalb des gewählten Konzentrationsbereichs vorliegt.

Es zeigt sich zu diesem Zeitpunkt eine dosisabhängige Zellviabilität beider Zelllinien, wobei die Enzalutamid-sensiblen C4-2-Zellen einen IC₅₀-Wert von 56,8 µM und die resistenten MR49F-Zellen einen im Vergleich dazu 4,6-fach höheren IC₅₀-Wert von 260,7 µM Enzalutamid aufweisen (Abbildung 25).

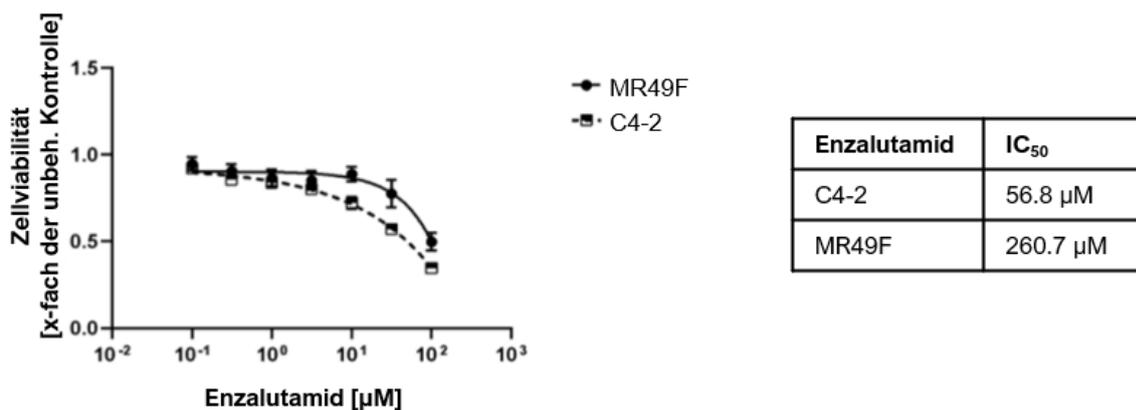


Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurven und hieraus ermittelte IC₅₀-Werte nach Enzalutamid-Behandlung über 72 h. Die Zellviabilität wurde in Relation (x-fach) zur unbehandelten Kontrolle (= 1) dargestellt. Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). n = 3.

5.6 Zellzyklusanalysen unter Enzalutamid-Behandlung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition der AR-vermittelten Wirkung durch Antiandrogene zum Zellzyklusarrest führt (277, 292). Um zu untersuchen, ob die hier beobachtete Reduktion der Zellviabilität durch einen Zellzyklusarrest verursacht ist, wurde eine Analyse des Zellzyklus nach Enzalutamid-Behandlung durchgeführt. Hier zeigt sich, dass es in den beiden untersuchten Enzalutamid-sensiblen Zelllinien LNCaP und C4-2 durch Enzalutamid-Behandlung mit 10 μ M zu einer Abnahme der S- sowie G2/M-Phase und einer Zunahme der G1-Phase kommt. Dieser Effekt ist in der Enzalutamid-resistenten Zelllinie nicht zu verzeichnen, hier kommt es unter Enzalutamid-Behandlung zu einer Abnahme der G1-Phase und leichten Zunahme der S-Phase (Abbildung 26). Bei diesen Daten handelt es sich um exemplarische Daten (n = 1).

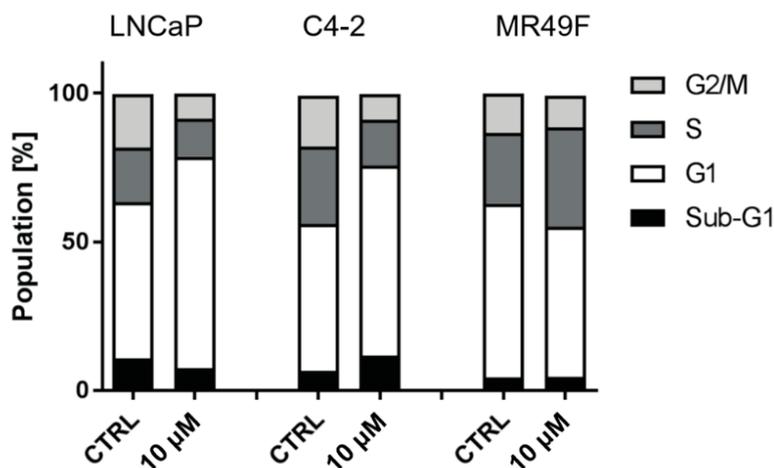


Abbildung 26: Verschiebung der Zellzyklusphasen unter Enzalutamid-Exposition (10 μ M) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (CTRL = 100 %). Die Zelllinien LNCaP, C4-2 und MR49F wurden für 72 h mit 10 μ M Enzalutamid behandelt. n = 1.

5.7 Kombinationsbehandlung mit Enzalutamid und Pimozid

Zur Evaluation der Effektivität einer Wirkstoffkombination aus AR-Blockade und STAT5-Inhibition wurden Kombinationsbehandlungen mit Enzalutamid und dem bereits zur Therapie von Tickstörungen und chronischen Psychosen zugelassenen STAT5-Inhibitor Pimozid durchgeführt (s. 4.1.7.3).

Zunächst wurde der inhibitorische Effekt von Pimozid auf STAT5 anhand der STAT5-Zielgenexpression von *CCND1* (Cyclin D1) und *BCL2L1* (Bcl-xL) nach Behandlung mit 10 μM Pimozid auf mRNA-Ebene untersucht. Hier findet sich in der C4-2-Zelllinie eine erhöhte mRNA-Expression von *CCND1* und eine reduzierte Expression von *BCL2L1* (Abbildung 27 A). In der MR49F-Zelllinie führt die pharmakologische STAT5-Inhibition zu einer Reduktion der mRNA-Level beider Zielgene (Abbildung 27 B).

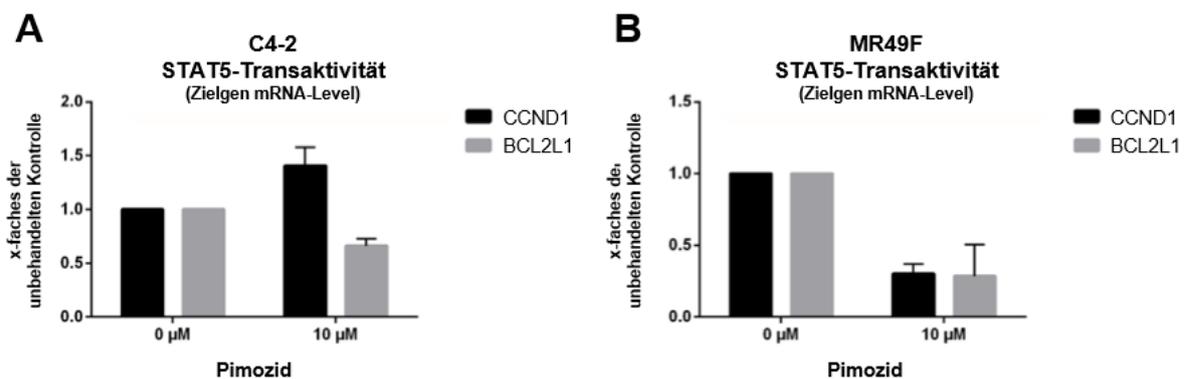


Abbildung 27: Die Wirkung von Pimozid auf die Expression relevanter STAT5-Zielgene in STAT5-positiven Zelllinien. Dargestellt sind die qPCR-Analysen der mRNA-Zielgenlevel nach 8 h Pimozid-Behandlung mit 10 μM als Vielfaches (x-fach) der unbehandelten Kontrolle (= 1). (A) *CCND1*- und *BCL2L1*-Expression in Enzalutamid-sensiblen C4-2 Zellen. (B) *CCND1*- und *BCL2L1*-Expression in Enzalutamid-resistenten MR49F-Zellen. Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). n = 3.

Die Behandlung mit Pimozid zeigt in den Zelllinien C4-2 sowie MR49F bis zu einer Dosis von 1 μM keine Beeinflussung der Zellviabilität. Diese ist signifikant ab 10 μM Pimozid zu verzeichnen und ab 30 μM besonders stark ausgeprägt, es kommt ab 30 μM zu einer maximalen Inhibition der Zellviabilität (Abbildung 28 A). In der STAT5-negativen Zelllinie PC3 findet sich in einer Dosierung von 10 μM Pimozid ebenfalls eine signifikante Reduktion der Zellviabilität, die jedoch im Vergleich zu den C4-2- und MR49F-Zellen mit 20 % am geringsten ausfällt (Abbildung 28 B). Der Effekt ist am stärksten in der C4-2 Zelllinie festzustellen, hier wird eine Reduktion der Zellviabilität um bis zu 50 % beobachtet (Abbildung 28 B).

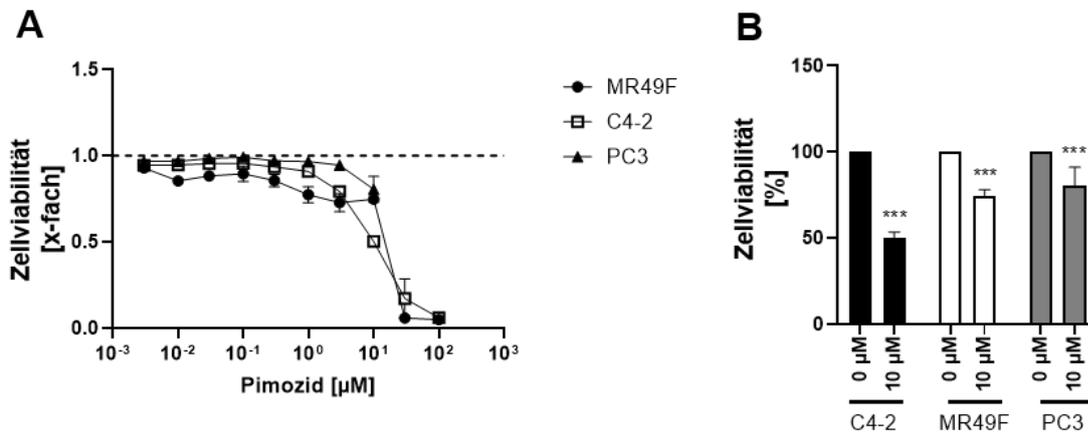


Abbildung 28: Die Wirkung des STAT5-Inhibitors Pimozid auf die Zellviabilität. (A) Dosisabhängige Wirkung von Pimozid auf die Zellviabilität in C4-2-, MR49F- und PC3-Zellen über einen Zeitraum von 72 h. Darstellung der Zellviabilität als Vielfaches (x-fach) der unbehandelten Kontrolle (= 1). Auf der x-Achse findet sich der dekadische Logarithmus der Pimozidkonzentration. (B) Einfluss von 10 µM Pimozid auf die Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (= 100 %) über einen Zeitraum von 72 h. Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. n = 3.

Zur Evaluation der Auswirkung einer AR-Blockade und gleichzeitiger STAT5-Inhibition durch Pimozid wurden Kombinationsversuche mit beiden Wirkstoffen durchgeführt. In der Isobologramm-Analyse finden sich die in Tabelle 16 dargestellten IC_{50} -Werte für die Behandlung mit Enzalutamid, Pimozid sowie die Kombinationsbehandlungen. Hier zeigt sich, dass die Kombination aus Enzalutamid und Pimozid bereits in gleicher Dosierung (Enzalutamid : Pimozid = 1:1) einen dosisabhängigen hemmenden Effekt auf die Zellviabilität im Vergleich zur Einzelbehandlung mit Enzalutamid ausübt ($IC_{50} = 56,8$ vs. $5,83$ für C4-2 bzw. $IC_{50} = 260,7$ vs. $4,67$ für MR49F) (Abbildung 29 A+B, Tabelle 16). Dieser zellviabilitäts-hemmende Effekt der Kombinationsbehandlung gegenüber einer singulären Enzalutamid-Behandlung zeigt sich auch in den Kombinationsverhältnissen 1:2 und 1:5 sowohl in den C4-2 (Abbildung 29 A) als auch MR49F-Zellen (Abbildung 29 B). Die Reduktion der Zellviabilität durch die Kombinationsbehandlung findet sich gleichermaßen in der Enzalutamid-sensiblen wie auch in der resistenten Zelllinie und führt zu einer deutlichen Reduktion der IC_{50} -Werte (Tabelle 16). Die Analyse der Kombinations-Indices (CI) zeigt, dass alle ermittelten Werte unter 1 liegen (Abbildung 30, Tabelle 16).

Tabelle 16: Isobologramm-Analyse

Einzelbehandlung		Kombinationsbehandlung			
C4-2	IC ₅₀	Verhältnis	Enzalutamid [µM]	Pimozid [µM]	CI
Enzalutamid (µM)	56.83	1:1	5.83	5.83	0.79
Pimozid (µM)	8.451	1:2	3.04	6.08	0.77
		1:5	1.17	5.84	0.71
Einzelbehandlung		Kombinationsbehandlung			
MR49F	IC ₅₀	Verhältnis	Enzalutamid [µM]	Pimozid [µM]	CI
Enzalutamid (µM)	260.7	1:1	4.67	4.67	0.40
Pimozid (µM)	12.24	1:2	4.81	9.63	0.81
		1:5	1.89	9.44	0.78

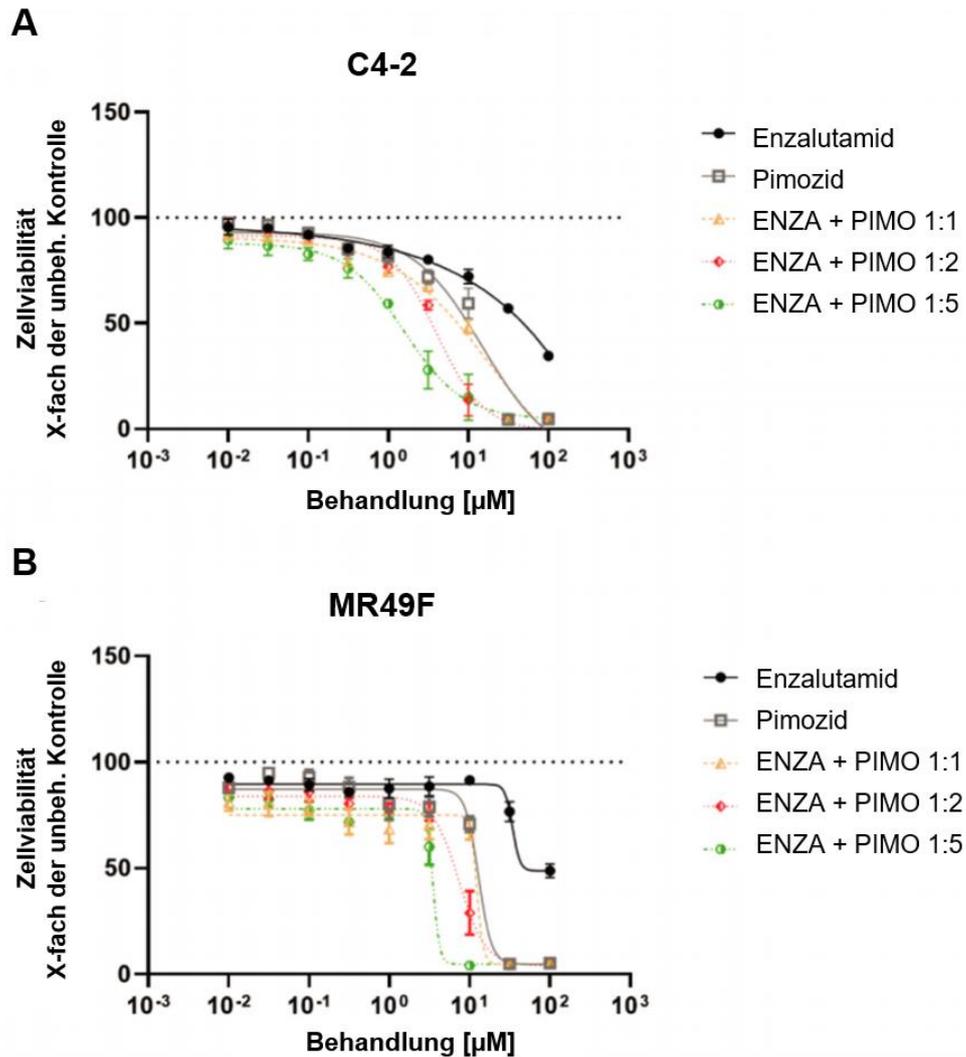
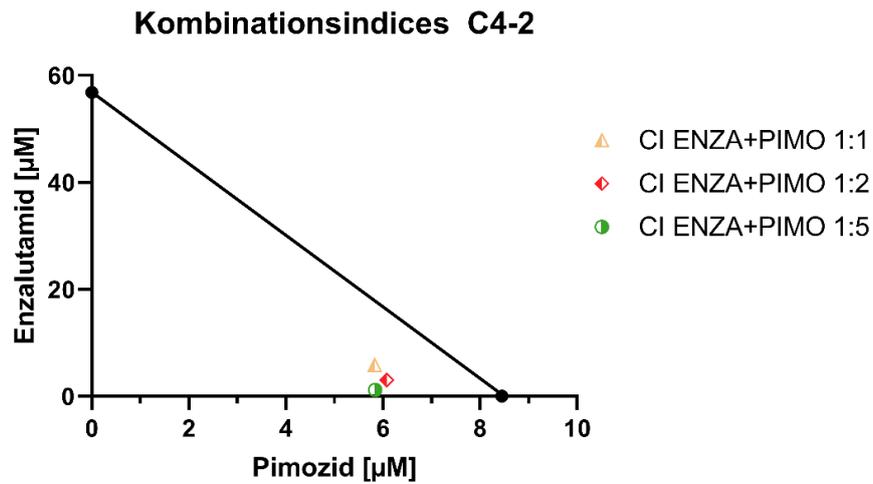


Abbildung 29: Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Enzalutamid (ENZA) und Pimozid (PIMO). Behandlung über einen Zeitraum von 72 h. Auf der y-Achse aufgetragen die im MTT ermittelte Zellviabilität als Vielfaches (x-fach) der unbehandelten Kontrolle (= 100). Auf der x-Achse findet sich die Konzentration von Enzalutamid/Pimozid als dekadischer Logarithmus. (A) Enzalutamid-sensible C4-2 Zellen. (B) Enzalutamid-resistente MR49F-Zellen. Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). $n = 3$.

A



B

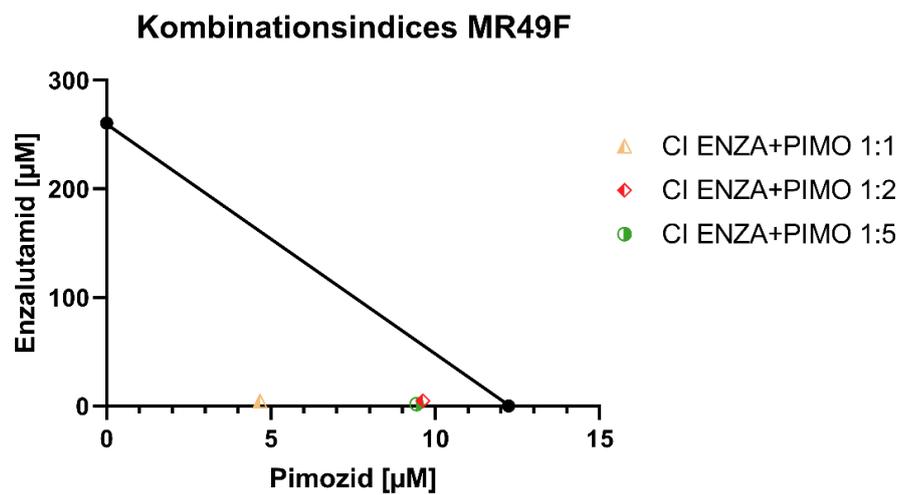


Abbildung 30: Darstellung der Kombinationsindices (CI) der Kombinationsbehandlungen mit Enzalutamid (ENZA) und Pimozid (PIMO) für C4-2 (A) und MR49F (B) Zellen. Auf der y-Achse findet sich die Enzalutamid-Konzentration [μM], auf der x-Achse die Pimozid-Konzentration [μM]. $n = 3$.

5.8 STAT5-Knockdown durch siRNA

Zur Validierung dieser Ergebnisse und zum Ausschluss möglicher unspezifischer Effekte der Pimozid-Behandlung wurde ein spezifischer STAT5-Knockdown mittels siRNA durchgeführt.

Zunächst wurde die STAT5-mRNA-Expression 48 h nach STAT5A- und STAT5B-Knockdown mittels qPCR-Analyse zur Bestätigung der Transfektionseffizienz untersucht (Abbildung 31). Es zeigt sich, dass sowohl der siRNA-vermittelte Knockdown von STAT5A als auch von STAT5B zu einer Reduktion der STAT5A- bzw. STAT5B-mRNA-Level führt (Abbildung 31 A+B). Die erniedrigten mRNA-Level von STAT5A/B finden sich bereits nach 24 h Behandlung. Dieser Effekt hält für einen Zeitraum von mindestens 72 h an. (Abbildung 31 C+D).

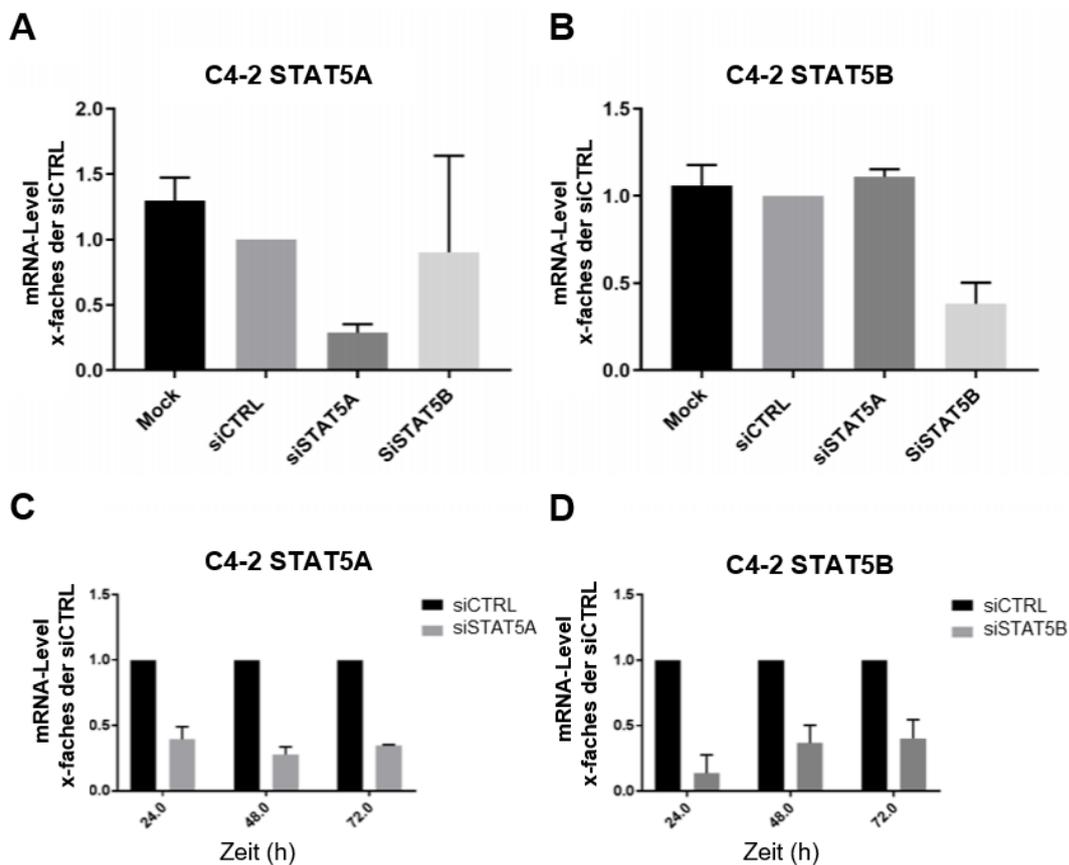


Abbildung 31: Bestätigung des STAT5A/B-Knockdowns mittels qPCR. (A+B) STAT5A (A) bzw. STAT5B (B) mRNA-Expression nach 48 h Transfektion mit Kontroll- (CTRL), STAT5A- und STAT5B-siRNA als Vielfaches (x-fach) der mRNA-Expression nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCTRL) (= 1). Mock= Unbehandelte, nicht-transfizierte Kontrolle. (C+D) STAT5A (C) bzw. STAT5B (D) mRNA-Level nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCTRL) und STAT5A-Knockdown (C) bzw. STAT5B-Knockdown (D) nach jeweils 24, 48 und 72 h als Vielfaches (x-fach) der mRNA-Expression nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCTRL) (= 1). Normalisierung auf HPRT1. Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). n = 3.

Ebenso findet sich in der Western Blot-Analyse nach STAT5-Knockdown eine Reduktion der STAT5-Proteinlevel, welche ab einer siRNA-Konzentration von 25 nm wirksam erfolgt (Abbildung 32 A). Nach STAT5A-Knockdown wird ein STAT5-Signal mit dem genutzten Antikörper (Klon C-17, Tabelle 8) detektiert, nach STAT5B-Knockdown jedoch nicht (Abbildung 32 B).

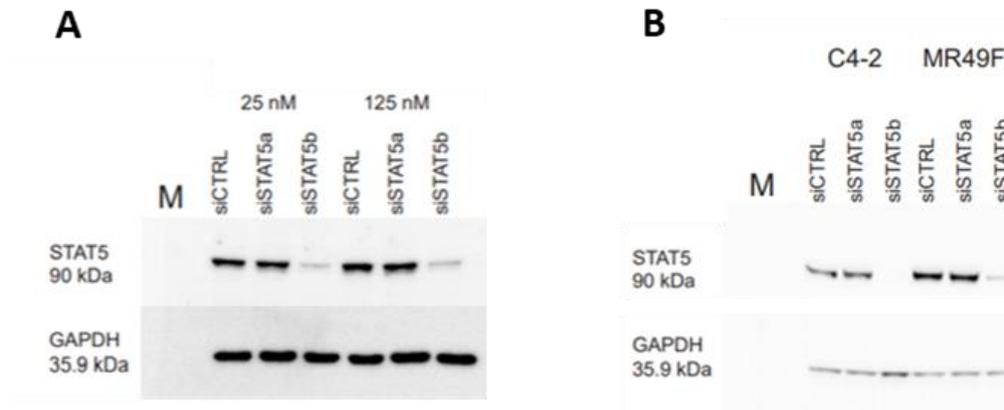


Abbildung 32: Repräsentativer Western Blot zur Validierung des STAT5-Knockdowns. Proteinexpression nach STAT5A/B-Knockdown im Western Blot nach 48 h Behandlung. (A) Transfektion von C4-2 Zellen mit Kontroll-siRNA (siCTRL), STAT5A- und STAT5B-siRNA (siSTAT5a/b) in Endkonzentrationen von 25 bzw. 125 nM. (B) STAT5B mRNA-Expression nach Kontrolltransfektion und STAT5A/B-Knockdown mit Kontroll-siRNA (siCTRL), STAT5A- und STAT5B-siRNA (siSTAT5a/b) in C4-2 und MR49F-Zellen mit einer Endkonzentration von 25 nM. Normalisierung auf GAPDH. M: Marker.

5.9 Der Einfluss des STAT5 A/B Knockdowns auf die Zellviabilität

Zur Evaluation der Auswirkung des STAT5 A/B-Knockdowns auf die Zellviabilität in MR49F- und C4-2-Zellen wurden MTT-Assays nach Transfektion mit den etablierten siRNAs und 72 h Enzalutamid-Behandlung durchgeführt.

Hier lassen sich in der Abwesenheit von Enzalutamid sowohl nach STAT5A- als auch nach STAT5B-Knockdown in beiden Zelllinien nur marginale Effekte des STAT5-Knockdowns auf die Zellviabilität im Vergleich zur Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCTRL) nach 72 h verzeichnen (Abbildung 33 A+B). Unter Enzalutamid-Behandlung für 72 h findet sich in der C4-2-Zelllinie nach Kontrolltransfektion sowie nach STAT5A- und STAT5B-Knockdown eine signifikante Reduktion der Zellviabilität von etwa 30 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Hier zeigt sich keine zusätzliche Wirkung eines STAT5-Knockdowns auf die durch Enzalutamid reduzierte Zellviabilität (Abbildung 33 A). In der resistenten MR49F-Zelllinie findet sich im Gegensatz zur Enzalutamid-sensiblen Zelllinie zwar nach Kontroll- und STAT5A-Knockdown kein zusätzlicher Effekt durch die Enzalutamid-Behandlung, jedoch führt diese nach STAT5B-Knockdown zu einem deutlichen Abfall der Zellviabilität auf ca. 70 % der unbehandelten, mit Kontroll-siRNA transfizierten MR49F-Zellen (Abbildung 33 B). Dieser Effekt entspricht in dieser Größenordnung der Enzalutamid-Wirkung auf die Enzalutamid-sensiblen C4-2-Zellen (Abbildung 33 A).

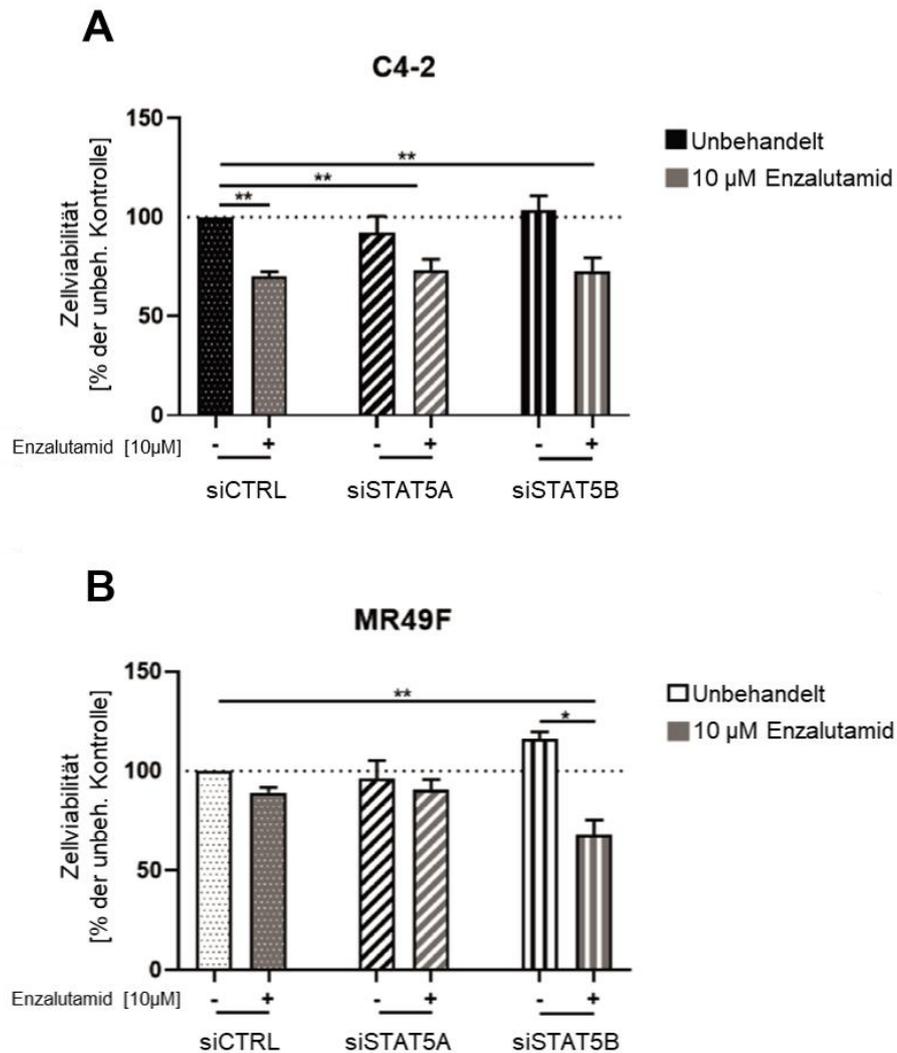


Abbildung 33: Zellviabilität nach STAT5A/B-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung von C4-2 (A) und MR49F-Zellen (B). Die Behandlung erfolgte nach Knockdown für 72 h in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von 10 µM Enzalutamid. Zellviabilität in Prozent [%] zur unbehandelten Kontrolle nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCTRL) (= 100 %). Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. n = 3.

5.10 Die Zellviabilität nach STAT5-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung

Zur näheren Untersuchung dieses Effekts wurden Dosis-Wirkungs-Versuche mit Enzalutamid-Konzentrationen von 0,001 bis 10 μM in MR49F-Zellen nach STAT5B-Knockdown durchgeführt und die Zellviabilität nach 72 h mittels MTT-Assay ermittelt. Nach Kontroll- bzw. STAT5A-Knockdown und zusätzlicher Enzalutamid-Behandlung können hier nur geringe Effekte auf die Zellviabilität beobachtet werden (Abbildung 34). Nach STAT5B-Knockdown kommt es jedoch zu einer Reduktion der Zellviabilität durch Enzalutamid, welche ab einer Konzentration von 0,1 μM Enzalutamid signifikant ist (Abbildung 34).

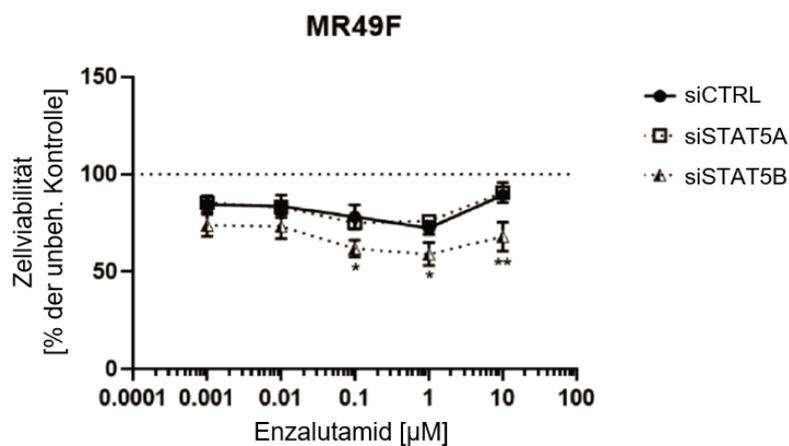


Abbildung 34: Dosisabhängige Wirkung von Enzalutamid auf die Zellviabilität nach STAT5-Knockdown. Dosiswirkungs-Kurven von MR49F-Zellen nach Kontroll-, STAT5A und STAT5B-Knockdown nach Behandlung mit Enzalutamid (0,001 bis 10 μM , x-Achse). Zellviabilität in Prozent [%] der unbehandelten Kontrolle (= 100 %). Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. $n = 3$.

Diese Daten demonstrieren, dass der alleinige STAT5-Knockdown nicht zu einer Reduktion der Zellviabilität in Enzalutamid-sensiblen und-resistenten Zellen führt. Weiterhin zeigt die Kombination aus STAT5-Knockdown und Enzalutamid keine zusätzlichen Effekte gegenüber einer singulären Enzalutamid-Behandlung in der C4-2-Zelllinie. Im Gegensatz dazu kann jedoch nach spezifischem STAT5B-Knockdown in der Enzalutamid-resistenten MR49F-Zelllinie eine Reduktion der Zellviabilität nach Enzalutamid-Behandlung verzeichnet werden.

5.11 Die Androgenrezeptor-Aktivität nach STAT5-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung

Um zu prüfen, ob dieser hemmende Effekt auf die Zellviabilität nach STAT5B-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung durch eine Änderung in der Aktivität des AR verursacht ist, wurde diese indirekt durch die Messung der mRNA-Level des klinisch relevanten AR-Zielgens PSA im Rahmen einer qPCR untersucht. Der alleinige STAT5A- und STAT5B-Knockdown führt hier in Abwesenheit von Enzalutamid weder in der C4-2 (Abbildung 35 A) noch in der MR49F-Zelllinie (Abbildung 35 B) zu einer signifikanten Änderung der PSA-Level auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Kontrolle (siCTRL).

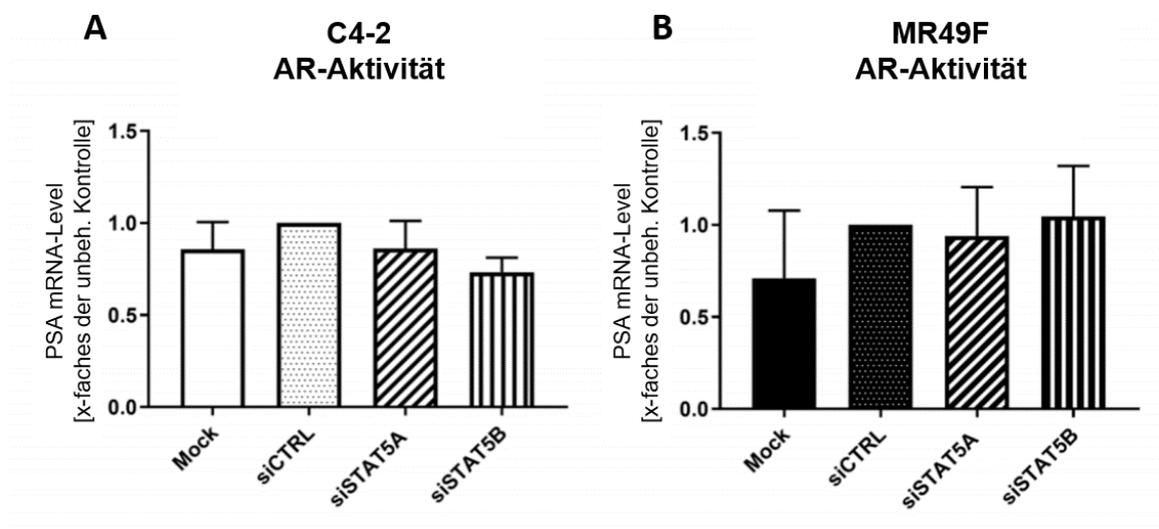


Abbildung 35: Analyse der relativen Androgenrezeptor (AR)-Aktivität nach STAT5-Knockdown. qPCR-Analyse der PSA mRNA-Level als Vielfaches (x-fach) zur mRNA-Expression nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (siCTRL) (= 100 %) als Indikator der AR-Aktivität in C4-2 (A) und MR49F (B) Zellen in Abwesenheit von Enzalutamid nach 24 h. Mock = Unbehandelte, nicht-transfizierte Kontrolle. Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). n = 3.

Durch Behandlung mit 10 μ M Enzalutamid kommt es in der Enzalutamid-sensiblen Zelllinie C4-2 sowohl nach Transfektion mit Kontroll-siRNA als auch mit STAT5B-siRNA zu einer signifikanten Reduktion der PSA-Expression um etwa 90 % im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle (Abbildung 36).

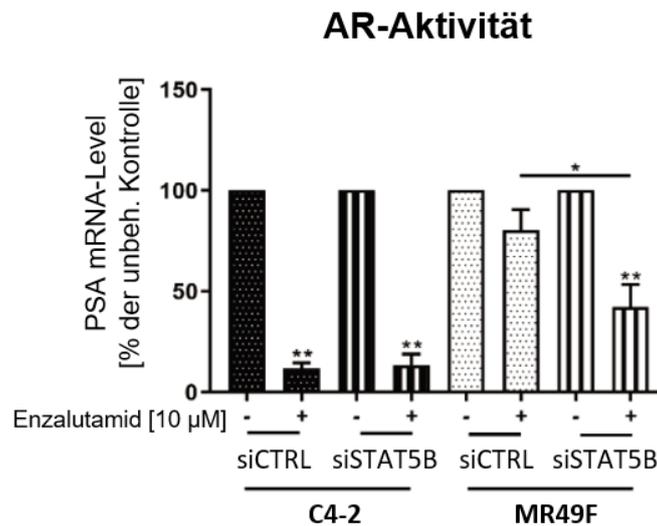


Abbildung 36: Androgenrezeptor (AR)-Aktivität nach STAT5B-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung. qPCR-Analyse der PSA mRNA-Expression in Prozent [%] zur unbehandelten Kontrolle (-) (= 100 %) als Indikator der AR-Aktivität in C4-2 und MR49F-Zellen mit und ohne Enzalutamid-Behandlung (10 μ M für 72 h) nach Kontroll- bzw. STAT5B-Knockdown. Fehlerbalken = Standardfehler (\pm SEM). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. n = 3.

Im Gegensatz hierzu findet sich nach Kontrolltransfektion eine geringe Reduktion der AR-Aktivität durch Enzalutamid in den Enzalutamid-resistenten MR49F-Zellen. Nach STAT5B-Knockdown kann jedoch ein signifikanter Abfall der PSA-Level auf 36 % des Ausgangswertes durch die Enzalutamid-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 36).

6 Diskussion

In der vergangenen Dekade konnte die Therapielandschaft des PCa eine beachtliche und vielfältige Bereicherung durch zahlreiche neue Behandlungsoptionen erfahren (293). Hierzu zählt auch das nichtsteroidale Zweitgenerations-Antiandrogen Enzalutamid, welches im Rahmen zahlreicher Studien das Überleben und den Krankheitsverlauf an Prostatakrebs erkrankter Patienten in hohem Maße beeinflussen konnte (3, 5, 6). So ist Enzalutamid zum aktuellen Zeitpunkt eine klinisch unverzichtbare Option in der Therapie nmCRPC, mCRPC und mHSPC. Primäre oder erworbene Therapieresistenzen sind jedoch verantwortlich für ungünstige Krankheitsverläufe und schlechte Überlebensraten (294, 295). Sie stellen sowohl Patienten als auch Behandelnde und Forschende vor große Herausforderungen. Zahlreiche Mechanismen für eine erworbene oder aber bereits vorbestehende Kastrations- sowie Enzalutamidresistenz konnten bisher identifiziert werden (124, 125). Hierzu zählen AR-Spleißvarianten und -mutationen, wie z.B. die F877L-Mutation, welche sich in der Enzalutamid-resistenten Zelllinie MR49F findet und eine gesteigerte Aktivität des AR durch verschiedene Antiandrogene, u.a. Enzalutamid, verursacht (126, 127, 141, 142, 278). Zudem zählen die intratumorale Androgensynthese, die neuroendokrine Transdifferenzierung und die Überexpression des GR zu den Enzalutamid-Resistenzmechanismen (12-15, 156). Auch konnte ein Zusammenhang zwischen alterierten intrazellulären Signalwegen und Enzalutamid-Resistenz gefunden werden. Beispielsweise konnten hier der Wnt/ β -Catenin-Signalweg und die IL6/STAT3-Achse als assoziiert mit Enzalutamid-Resistenz identifiziert werden (164, 168). Einen weiteren solchen Resistenzmechanismus stellt auch eine Modulation der JAK2/STAT5-Signalachse bzw. des Transkriptionsfaktors STAT5 dar. Dessen aktivierte Form fand sich nach einer stattgehabten Androgendeprivation häufiger als bei Patienten ohne ADT sowie bei einem Großteil kastrationsresistenter Tumore (24). Thomas *et al.* konnten ebenfalls einen solchen Effekt nach Androgendeprivation zeigen und durch einen gezielten STAT5-Knockdown die Entstehung einer Kastrationsresistenz verzögern (23). Eine Studie von Gu *et al.* zeigte die Möglichkeit der Wachstumsinhibition von sowohl hormonnaiven als auch kastrationsresistenten Xenografttumoren in Mäusen durch den JAK2-Inhibitor AZD1480 (296). Der Inhibitor war in der Lage, die STAT5A/B-Phosphorylierung und -Dimerisation sowie die nukleäre Translokation und die DNA-Bindung von STAT5A/B zu inhibieren. Er führte *in vitro* durch STAT5A/B-Inhibition zu einer Reduktion der Zellviabilität durch Apoptose. Eine aktuelle Studie von Udhane *et al.* konnte den Transkriptionsfaktor STAT5 und den JAK2/STAT5-Signalweg als involviert in die Entstehung der Enzalutamidresistenz einordnen (26). So demonstrierte diese Gruppe nach und unter laufender Enzalutamidtherapie eine Zunahme des STAT5-Proteins sowie der STAT5-Aktivität. Das aktivierte STAT5 seinerseits induziert die mRNA-Expression der JAK2, wodurch wiederum die STAT5-Aktivierung erfolgt. So kommt es zu einem sich selbst unterhaltenden

und potenzierenden Kreislauf der STAT5-Aktivierung, der zur Enzalutamid-Resistenz beiträgt (26). Aufgrund der Notwendigkeit der Identifizierung neuer therapeutischer Ziele, insbesondere auch in der therapierefraktären Situation, sollte diese Arbeit dazu beitragen, die Rolle von STAT5 in der Enzalutamid-resistenten Situation zu untersuchen und zu prüfen, inwiefern eine Inhibition von STAT5 der Überwindung der Enzalutamidresistenz dienen kann. Hierzu wurden Enzalutamid-resistente Zelllinien untersucht, welche aus einem Xenograft-Mausmodell (MR49F) bzw. in einem Dosisescalationsmodell (LAPC4-EnzaR) generiert wurden. Diese wurden hinsichtlich ihrer STAT5-Expression, ihres Wachstumsverhaltens unter Enzalutamid-Exposition sowie der Auswirkungen einer siRNA-vermittelten sowie pharmakologischen Inhibition von STAT5 in Kombination mit einer Enzalutamid-Behandlung auf die Zellviabilität und die Aktivität des AR untersucht.

Von den getesteten Zelllinien konnten auf Grundlage der Charakterisierung hinsichtlich der AR- und PSA-Proteinexpression die im Xenograft-Modell etablierten Zelllinien C4-2 und MR49F als eindeutig PSA-positiv mit in der Konsequenz intaktem AR klassifiziert werden. Aus diesem Grund wurden diese Zelllinien für die weiteren Versuche ausgewählt. Dabei stellen die C4-2-Zellen das Modell für die kastrationsresistente, Enzalutamid-sensible Situation dar, während die MR49F-Zellen ein Modell für die Enzalutamid-Resistenz sind.

Im Rahmen der Proteinexpressionsanalysen fand sich korrespondierend zu den Ergebnissen von Udhane *et al.* eine erhöhte STAT5-Expression in der Enzalutamid-resistenten Zelllinie MR49F im Vergleich zum CRPC-Modell C4-2 (26). Ursächlich hierfür könnte der von Udhane *et al.* identifizierte Mechanismus der sich selbst unterhaltenden und potenzierenden STAT5-Aktivierung sein (26). Da der in der vorliegenden Studie eingesetzte STAT5-Antikörper nicht zwischen den beiden Isoformen A und B des STAT5-Proteins differenzieren kann, wurde zusätzliche eine Analyse der mRNA-Expression durchgeführt. Hier fand sich eine erhöhte STAT5B-Expression in MR49F-Zellen im Vergleich zur Expression im CRPC-Zelllinienmodell C4-2. Im Gegensatz dazu schien die STAT5A-Expression in der verwendeten Enzalutamid-resistenten MR49F-Zelllinie aufgrund der geringen Expression vernachlässigbar zu sein. Die sehr niedrige mRNA-Expression von STAT5A in der MR49F-Zelllinie in Zusammenschau mit der erhöhten STAT5-Proteinexpression in dieser Zelllinie führt zu der Schlussfolgerung, dass der genutzte Antikörper im Wesentlichen STAT5B detektiert. Hierfür spricht, dass nach STAT5A-Knockdown im Western Blot noch ein STAT5-Signal detektiert werden konnte, welches nach STAT5B-Knockdown nicht mehr zu verzeichnen war. Bei STAT5B scheint es sich um die stärker exprimierte Isoform zu handeln. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Studien und unterstützt die Annahme, dass STAT5B eine wichtigere Rolle für das Wachstum und die Progression von PCa-Zellen einnimmt als STAT5A (18, 22, 23). Im Gegensatz zu diesem Ergebnis zeigte die PSA-negative, Enzalutamid-resistente Sub-Zelllinie

der LAPC4-Zellen (LAPC4-EnzaR) keine Hochregulation der STAT5-Expression auf Proteinebene im Vergleich zu ihrer therapi sensitiven Kontrolle. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Bishop und Kollegen überein, die bereits Unterschiede zwischen PSA-positiven (AR-abhängigen) und PSA-negativen (nicht AR-abhängigen) präklinischen Enzalutamid-resistenten PCa-Modellen beschreiben konnten (297). Die Gruppe untersuchte, ob und inwiefern immuntherapeutische Zielstrukturen in der Enzalutamid-Resistenz moduliert vorliegen. Sie konnten zeigen, dass in einem präklinischen Enzalutamid-resistenten Modell die PD-L1-Expression deutlich erhöht vorlag im Vergleich zur Enzalutamid-sensiblen, kastrationsresistenten Kontrolle. Diese Hochregulation der Immuncheckpoint-Proteine fand sich jedoch nur in PSA-negativen Zelllinien, woraus die Autoren schließen, dass es sich bei einer solchen Modulation immuntherapeutischer Zielstrukturen um einen vom AR unabhängigen Mechanismus der Enzalutamid-Resistenz handeln könnte, welcher so z.B. in neuroendokrinen Tumoren eine Rolle spielt (297). Die Autoren postulieren, dass eine Unterscheidung in PSA-positive (AR-abhängige) und PSA-negative (AR-unabhängige) Tumore zur besseren Stratifizierung und Entwicklung eines prädiktiven Modells bezüglich der Entstehung der Enzalutamid-Resistenz beitragen könnte. In Protein- und Datenbankanalysen fand sich eine deutliche Heterogenität der STAT5-Expression in verschiedenen Enzalutamid-resistenten, AR-positiven Zelllinien (298). Insbesondere zeigte sich, dass die Regulation von STAT5A und STAT5B zwischen parentalen und resistenten Zelllinien keinem einheitlichen Muster folgt (298).

Die Resistenz der hier untersuchten MR49F-Zelllinie gegenüber Enzalutamid wurde von Kuruma *et al.* beschrieben (277). Die MR49F-Zellen wurden aus einem LNCaP-CRPC-Xenograftmodell etabliert und zeigten in ihrem Wachstumsverhalten ein deutlich geringeres Ansprechen auf Enzalutamid als die LNCaP-Kontrollen. Ebenso konnte in diesen Zellen keine PSA-Reduktion durch Enzalutamid beobachtet werden (277). Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte die Enzalutamid-Resistenz der MR49F-Zellen in Dosis-Wirkungs-Experimenten unter Betrachtung der Zellviabilität bestätigt werden. Hier zeigten die MR49F-Zellen im Vergleich zur Enzalutamid-sensiblen Zelllinie C4-2 ein deutlich verzögertes Enzalutamid-Ansprechen mit einem 4,6-fach erhöhten IC_{50} -Wert. Die durchgeführten Versuche zur Zellviabilität unter Enzalutamid-Exposition zeigten nach 72 h Behandlung einen signifikanten zellviabilitätshemmenden Effekt von Enzalutamid auf die hormonsensitiven LNCaP-Zellen sowie auf die kastrationsresistenten C4-2 Zellen, wobei letztere eine noch stärkere Reduktion der Zellviabilität aufwiesen. Hier fanden sich signifikante Effekte nach 72 h Behandlung. Die Enzalutamid-resistente Zelllinie MR49F zeigte allerdings erst ab einer deutlich höheren Enzalutamid-Konzentration und einem Behandlungszeitraum von 96 h signifikante Effekte auf die Zellviabilität, was die vorliegende Resistenzsituation zum Ausdruck bringt. AR-negative PC-3 Zellen zeigten keine signifikante Hemmung der Viabilität durch Enzalutamid. Abazid

et al. verglichen in ihrer Arbeit die Wirkung von Enzalutamid auf LNCaP- und PC3-Zellen mit höheren Dosen und längerer Behandlungsdauer als in der vorliegenden Arbeit (299). Hier konnte in höherer Enzalutamid-Dosierung ab 30 μM bereits nach 48 h ein antiproliferativer Effekt auch auf AR-negative PC3-Zellen gefunden werden, welcher sich in einer Dosierung von 100 μM noch deutlich verstärkte (299). Die Autoren konnten ebenso unabhängig von vorliegender AR-Expression die Beeinflussung der Synthese steroidrezeptor-assoziiierter Hitzeschockproteine und die Induktion apoptotischer Ereignisse beschreiben. Diese Daten deuten auf AR-unabhängige antiproliferative Wirkmechanismen von Enzalutamid hin, die zur Effizienz des Wirkstoffs beitragen (299). Die beobachteten Effekte scheinen jedoch zeit- und dosisabhängig aufzutreten, möglicherweise könnten auch konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkmechanismen vorliegen. Interessant sind die beschriebenen AR-unabhängigen Wirkmechanismen insbesondere vor dem Hintergrund des häufig beobachteten Verlusts der AR-Expression in fortgeschrittenen Tumoren und könnten eine Erklärung für das gute Ansprechen von Enzalutamid in diesen Tumoren sein (299).

Die Wirkung von Enzalutamid auf den Zellzyklus wurde in der vorliegenden Studie untersucht. In der G0/G1-Phase liegt in der ruhenden Zelle ein einfacher Chromosomensatz vor. Nach der Synthesephase (S-Phase) liegt die DNA in der G2/M-Phase verdoppelt in Form von vier Schwesterchromatiden vor, im Anschluss erfolgt die mitotische Teilung. Eine Deregulation des Zellzyklus mit ungehemmter Zellteilung ist mit Krebserkrankungen assoziiert (300, 301). Ein durch Enzalutamid induzierter G1-Zellzyklusarrest wurde bereits für AR-abhängige PCa-Zelllinien beschrieben (302). Dieser ist auch für weitere Antiandrogene, wie z.B. Bicalutamid, bekannt (277, 292). In der hier durchgeführten Zellzyklus-Analyse mit der Durchflusszytometrie konnte in einem exemplarischen Versuch in Enzalutamid-sensitiven C4-2-Zellen eine Abnahme der S- und G2/M-Phase bei zunehmender G1-Phase unter Enzalutamid-Exposition verzeichnet werden. Diese Daten weisen in Übereinstimmung mit der Literatur auf eine Induktion des G1-vermittelten Zellzyklusarrests durch Enzalutamid hin (277, 292, 302-304). In der Enzalutamid-resistenten Zelllinie MR49F konnte ein G0/G1-Arrest nicht detektiert werden, es kommt im Gegenteil zu einer leichten Zunahme der S-Phase und somit der DNA-Replikation. In verschiedenen Studien konnte die Beteiligung von STAT5 an Regulationsprozessen des Zellzyklus und der Apoptose demonstriert werden (252, 305, 306). Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der S-Phase in der Enzalutamid-resistenten Zelllinie könnte die durch erhöhte STAT5-Level vermehrte Expression des STAT5-Zielgens *CCND1* darstellen (209, 210). *CCND1* codiert für das Protein Cyclin D1, bei dem es sich um ein zellzyklusregulierendes Protein aus der Cyclin-Familie handelt, das den Eintritt der Zelle in die S-Phase durch Bindung an Cyclin-abhängige Kinasen vermittelt (307). Eine Amplifikation oder Überexpression von Cyclin D1 findet sich in verschiedenen Tumorentitäten, so z.B. beim Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Melanom und PCa (308-313). Chen *et al.* zeigten, dass die

Cyclin D1-Überexpression in LNCaP-Zellen zu einer Zunahme des Wachstums und der Tumorigenität führt (314). Cyclin D1 wurde weiterhin beim PCa als Teil einer vierteiligen Gensignatur identifiziert, welche einen prognostischen Wert für die Entwicklung eines biochemischen Rezidivs und Ausbildung von Metastasen hat (315). Es konnte weiterhin ein direkter Zusammenhang zwischen der STAT5-Expression und dem Cyclin D1-Proteingehalt in Prolaktinom-Zellen gefunden werden (316). So wurde gezeigt, dass sowohl durch den pharmakologischen STAT5-Inhibitor Pimozid als auch durch einen spezifischen STAT5-Knockdown mittels siRNA die Expression von Cyclin D1 abnimmt (316). Diese Daten stützen das hier erhobene Ergebnis, auch wenn zur Verifizierung weitere Untersuchungen nötig sind. Interessanterweise konnte auch in multiresistenten, AR-indifferenten PCa-Zellkulturmodellen eine Zellzyklusaktivierung demonstriert werden. Diese äußerte sich in der Aktivierung der Zellzyklus-regulierenden Proteinfamilie E2F und damit Induktion wichtiger pro-proliferativer Zielgene (317). Die Zellen wiesen eine Antiandrogen-, Kastrations- sowie Chemotherapieresistenz auf und exprimierten zwar den AR, zeigten sich in ihrem Wachstum jedoch nicht von diesem abhängig (vgl. AR-indifferentes PCa (318, 319)). Die hier beschriebene Form der Zellzyklusaktivierung könnte einen Resistenzmechanismus von AR-unabhängigen Zellen darstellen. Zur näheren Identifizierung möglicher Änderungen des Zellzyklus in der Enzalutamid-Resistenz und der potentiellen Involvierung der STAT5-Isoformen sind weitere Untersuchungen nötig.

Die Inhibition des STAT5-Proteins kann zu einer Reduktion von Zellwachstum und Induktion von Apoptose führen (254, 256, 320). Bei dem klinisch erprobten STAT5-Inhibitor Pimozid handelt es sich eine bereits zugelassene Substanz, die zur Behandlung von chronischen Psychosen, dem Tourette-Syndrom und Tic-Störungen eingesetzt wird (267). Für Pimozid wurde eine krebshemmende Wirkung in verschiedenen Tumorentitäten, einschließlich des PCa, gezeigt (268). Dazu zählen z.B. das Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, das maligne Melanom und die akute und chronische myeloische Leukämie (265, 266, 321-323). In der Literatur wird ein effektiver inhibitorischer Effekt von Pimozid auf die STAT5-Inhibition in einer Konzentration von 10 µM Pimozid angegeben (266, 324). Weiterhin konnte diese Konzentration als gut verträglich in C4-2-Zellen identifiziert werden (324). Zunächst konnte der inhibitorische Effekt von Pimozid auf STAT5 anhand der Reduktion der mRNA-Level der STAT5-Zielgene *CCND1* (Cyclin D1) und *BCL2L1* (Bcl-xL) nach Pimozid-Behandlung bestätigt werden. Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Pimozid-vermittelten STAT5-Inhibition auf die Enzalutamid-Wirkung wurden Kombinationsbehandlungen mit beiden Wirkstoffen durchgeführt. Die Isobologrammanalysen ergaben, dass eine STAT5-Inhibition mit Pimozid in Kombination mit einer Enzalutamid-Behandlung zu einem synergistischen inhibitorischen Effekt auf die Zellviabilität in sowohl C4-2- als auch MR49F-Zellen führt (CI < 1). In der Kombination beider Wirkstoffe konnte, abhängig vom eingesetzten Kombinations-Verhältnis,

eine Reduktion der Zellviabilität in deutlich niedrigeren Enzalutamid-Konzentrationen beobachtet werden als mit alleiniger Enzalutamid-Behandlung. Die Zellen reagieren folglich bei zusätzlicher STAT5-Inhibition erheblich sensibler auf niedrigere Enzalutamid-Dosen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch die Gruppe von Udhane *et al.*, die ein reduziertes Tumorwachstum nach Behandlung mit der Kombination aus STAT5-Inhibitor und Enzalutamid im Vergleich zur Enzalutamid-Einzelbehandlung beschrieben (26). Ebenso konnte die Gruppe zeigen, dass die singuläre STAT5-Blockade in einem Xenograft-Tumormodell *in vivo* wirksam das Wachstum Androgen-sensitiver Tumore inhibieren kann (26). Interessanterweise zeigten die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, dass die alleinige STAT5-Inhibition durch Pimozid erst ab einer Konzentration von 10 μM signifikanten Effekte auf die Zellviabilität bei C4-2- und MR49F-Zellen hat. Ab 100 μM kam es jedoch zu einer letalen Auswirkung auf die Zellen. Da sich ab 10 μM Pimozid jedoch auch in der STAT5-negativen Zelllinie PC3 bereits leichte inhibitorische Effekte auf die Zellviabilität zeigten, sind zusätzliche unspezifische Effekte der Pimozid-Behandlung im Sinne einer Aktivität gegen andere Kinasen und Transkriptionsfaktoren wie NF κ B oder STAT1 nicht ausgeschlossen (266, 268, 324). Aus diesem Grund wurde in der Folge ein spezifischer STAT5-Knockdown mittels siRNA durchgeführt.

In Abwesenheit von Enzalutamid zeigte weder der spezifische STAT5A- noch STAT5B-Knockdown mittels siRNA Auswirkungen auf die Zellviabilität sowohl von Enzalutamid-sensitiven C4-2- als auch Enzalutamid-resistenten MR49F-Zellen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Ahonen *et al.*, die eine durch den STAT5A/B-Knockdown induzierte Apoptose beschreiben (19), sowie zu den bereits aufgeführten Ergebnissen von Udhane *et al.* (26). Zu beachten sind bei der Bewertung dieser Daten Unterschiede im Versuchsaufbau, die sowohl die Auswahl des Tumorzellmodells als auch die Form der STAT5-Inhibitor betreffen und möglicherweise erklärend sein könnten für die in dieser Arbeit nicht zu verzeichnende Wirksamkeit der alleinigen STAT5-Inhibitor. Darüber hinaus hatte hier in Gegenwart von 10 μM Enzalutamid weder der STAT5A- noch STAT5B-Knockdown einen zusätzlichen Effekt auf die Zellviabilität der C4-2-Zellen. Die synergistischen Effekte, die in den Isobologramm-Analysen mit der Kombination aus Enzalutamid und Pimozid in der C4-2-Zelllinie zu verzeichnen waren, könnten möglicherweise auf die bereits benannten unspezifischen Effekte von Pimozid zurückzuführen sein.

In Enzalutamid-resistenten MR49F-Zellen jedoch führte der siRNA-vermittelte Knockdown von STAT5B und die zusätzliche Behandlung mit 10 μM Enzalutamid zu einer Reduktion der Zellviabilität auf 70 %. Dieser hemmende Effekt auf die Zellviabilität waren vergleichbar mit dem Effekt von Enzalutamid auf die Zellviabilität der Enzalutamid-sensiblen C4-2-Zellen. Ein Wiederansprechen der resistenten MR49F-Zellen auf Enzalutamid konnte nach dem STAT5B-

Knockdown in einem erneuten Dosis-Wirkungs-Versuch mit einer dosisabhängigen Reduktion der Zellviabilität durch Enzalutamid bestätigt werden.

Zusätzlich zur Zellviabilität wurde die Aktivität des AR nach STAT5B-Knockdown und Enzalutamid-Behandlung anhand der PSA-Expression als klinisches und experimentelles Surrogat der AR-Transaktivität und als AR-Zielgen auf molekularer Ebene untersucht. Hier zeigten die Enzalutamid-sensiblen C4-2-Zellen nach Enzalutamid-Behandlung wie erwartet einen Abfall der PSA-Expression auf weniger als 10 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieser Effekt konnte in resistenten MR49F-Zellen durch singuläre Enzalutamid-Behandlung aufgrund der bestehenden Resistenzsituation nicht beobachtet werden. Jedoch war Enzalutamid in der Lage, bei Enzalutamid-resistenten MR49F-Zellen eine signifikante Reduktion der PSA-Expression nach spezifischem STAT5B-Knockdown herbeizuführen. Diese Ergebnisse zur Zellviabilität und AR-Aktivität nach spezifischem STAT5B-Knockdown lassen darauf schließen, dass der zielgerichtete STAT5B-Knockdown in der Lage ist, resistente MR49F-Zellen wieder für Enzalutamid zu resensitivieren. Die reduzierte Zellviabilität und AR-Aktivität nach STAT5B-Knockdown könnte zusätzlich auf einer proteolytischen Degradation des AR durch Enzalutamid beruhen. Eine AR-Degradation nach STAT5-Knockdown in hormonsensitiven LNCaP und kastrationsresistenten LNCaP wurde bereits beschrieben (23). Kürzlich konnten Erb *et al.* eine Enzalutamid-vermittelte Degradation des AR in LNCaP-Zellen identifizieren (325). Der zugrundeliegende Mechanismus scheint jedoch komplex, es konnte nur partiell die Involvierung des proteasomalen Systems in die AR-Degradation beobachtet werden konnte (325). Das STAT5-Protein, für das ein starker physikalischer Synergismus mit dem AR beschrieben wurde, scheint hingegen den AR vor der Degradation zu schützen (23, 24, 326). Möglicherweise spielt die Regulation der AR-Degradation also auch in Enzalutamid-resistenten Zellen, welche das STAT5-Protein überexprimieren, eine Rolle. STAT5 könnte hier zur Stabilisierung des AR beitragen und dessen Enzalutamid-induzierten Abbau verhindern.

In weiterführenden Untersuchungen, welche auf den hier präsentierten Daten aufbauen, wurde auch die Enzalutamid-resistente Zelllinie LAPC4-EnzaR hinsichtlich der Möglichkeit einer Resensitivierung für Enzalutamid untersucht (298). Im Gegensatz zu der MR49F-Zelllinie konnte in resistenten LAPC4-Zellen keine Erhöhung der STAT5A- oder STAT5B-mRNA-Level im Vergleich zur sensitiven Kontrolle gefunden werden. Allerdings zeigte sich hier insgesamt eine hohe STAT5B- und niedrige STAT5A-Expression. Die LAPC4-EnzaR-Zellen wiesen im Vergleich zu ihrer Enzalutamid-sensiblen Kontrolle keine erhöhte STAT5-Proteinexpression auf, jedoch konnte gezeigt werden, dass, ebenso wie im Fall der MR49F-Zellen, im Vergleich zur sensitiven Kontrollzelllinie eine erhöhte nukleäre STAT5A/B-Expression vorliegt (298). Diese nukleäre Lokalisation stellt einen Indikator für die STAT5A/B-Aktivität dar, da hierfür die

vorangegangene Phosphorylierung und damit Aktivierung des Proteins notwendig ist (26, 298). Nach Kombinationsbehandlung mit Pimozid und Enzalutamid konnte in den LAPC4-Subzelllinien ein additiver Effekt auf die Inhibition der Zellviabilität verzeichnet werden. Diese Zellen zeigten weiterhin nach spezifischem STAT5A-Knockdown ebenso einen Rückgang der Zellviabilität, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei MR49F-Zellen nicht festgestellt werden konnte. STAT5A konnte bereits als therapeutische Zielstruktur im CRPC beschrieben werden, möglicherweise aufgrund der Induktion von Apoptose durch die Regulation anti-apoptotischer Proteine (20, 324). Weiterhin konnte eine Interaktion von STAT5A und dem GR identifiziert werden (327, 328). Auch beschrieben Stöcklin et al. den GR als transkriptionellen Co-Aktivator für das STAT5-Protein (329). Unter Kenntnis der Ergebnisse von Puhr *et al.*, die eine essentielle Rolle des GR auf die Proliferation von LAPC4-Zelllinien beschrieben, könnten die hier gesehenen Effekte nach STAT5A-Knockdown in Zusammenhang mit dem Einfluss von STAT5A auf den GR stehen, was auf dessen Involvierung in die Enzalutamid-Resistenz verweist (156). Die durch einen STAT5B-Knockdown vermittelte Resensitivierung für Enzalutamid, wie sie in der MR49F-Zelllinie beobachtet werden konnte, zeigte sich in der LAPC4-EnzaR-Zelllinie jedoch nicht, was auf die bereits beschriebene Heterogenität und Vielzahl der Mechanismen der Enzalutamid-Resistenz verweist.

Aufgrund dieser Ergebnisse bleibt die Tumorheterogenität des PCa eine der bedeutendsten Herausforderung für Klinik und Forschung. Die zahlreichen Resistenzmechanismen unter antiandrogener Therapie, sowohl den AR betreffend, wie etwa Spleißvarianten oder Mutationen, aber auch AR-unabhängig, wie z.B. Veränderungen intrazellulärer Signalwege, erschweren gleichermaßen die Behandlung Erkrankter wie auch die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und sind in ihrer Komplexität nicht eingehend erfasst. Obwohl STAT5 bereits in zahlreichen Arbeiten als Zielstruktur im PCa untersucht wurde, konnte die vorliegende Arbeit aufgrund der hier präsentierten *in vitro*-Daten die Möglichkeit einer STAT5-Inhibition zur Überwindung der Enzalutamid-Resistenz nicht einheitlich klären. Dennoch könnte aber eine erhöhte STAT5-Expression in der Enzalutamid-resistenten Situation einen Anhaltspunkt für eine mögliche Resensitivierung mittels pharmakologischer STAT5-Inhibition bieten. Wenn gleich auch die hier untersuchte pharmakologische STAT5-Inhibition durch Pimozid in Kombination mit Enzalutamid synergistische Effekte auf die Reduktion der Zellviabilität in Enzalutamid-resistenten MR49F-Zellen zeigte, können unspezifische Effekte des STAT5-Inhibitors Pimozid auf andere Kinasen und Transkriptionsfaktoren nicht ausgeschlossen werden (266, 268, 324). Daher ist die Entwicklung spezifischer STAT5-Inhibitoren nötig, welche zeitgleich eine geringe Toxizität sowie günstige pharmakologische Eigenschaften aufweisen. Zu den erforderlichen Eigenschaften zählen eine gute orale Bioverfügbarkeit sowie ein niedriges Interaktionspotenzial, weiterhin eine sichere Metabolisierung und Elimination. Bisherige zur Verfügung stehende Wirkstoffe zur STAT5-

Inhibition, bei denen es sich im Wesentlichen um Inhibitoren von Tyrosinkinase handelt, zeichneten sich in präklinischen Studien u.a. durch zu geringe Selektivität mit Beeinträchtigung multipler Kinasen und eine hohe Toxizität aus, weiterhin konnte eine rasche Resistenzentwicklung von Tumorzellen beobachtet werden (265, 266, 330-332). Zur Reduktion von unspezifischen Effekten wurden spezifische *Small-molecule* Inhibitoren des STAT5-Proteins entwickelt, zu denen u.a. die Verbindungen Stafib-2 (333), AC-3-19 (334) und AC-4-130 (256) zählen. Hierbei stellt die spezifische Inhibition eines Transkriptionsfaktors aufgrund seiner fehlenden Kinase-Aktivität sowie der bestehenden Protein-Protein- als auch Protein-DNA-Interaktionen eine bedeutende Hürde dar. Im Rahmen von *in silico* Analysen wurde zudem ein direkter STAT5-Inhibitor, IST5-002, identifiziert, welcher auf zytoplasmatischer Ebene durch Bindung an die SH2-Domäne des STAT5-Proteins dessen Phosphorylierung und Dimerisierung blockiert (254). Aktuelle Daten zeigen in Transkriptomanalysen eine hohe Spezifität von IST5-002 verglichen mit einer shRNA-vermittelten STAT5-Blockade *in vitro* (255). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von IST5-002 auf die Phosphorylierung von STAT5 nicht zu einer Inhibition weiterer (im Signalweg vorgeschalteter) Kinasen, wie z.B. JAK 2, Src oder Abl1/2, führt (255). Sowohl einzeln als auch in Kombination mit Enzalutamid konnte dieser Inhibitor das Wachstum Enzalutamid-sensitiver und -resistenter Zellen hemmen (255). Diese Daten unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Möglichkeit der Überwindung der Enzalutamid-Resistenz mittels STAT5-Inhibition. In weiterführenden Untersuchungen fanden sich für IST5-002 im Tiermodell bisher keine Hinweise für signifikante toxische Effekte (255). Die Weiterentwicklung derartiger Inhibitoren könnte sowohl im Kontext der Behandlung therapie-naiver wie auch therapieresistenter Tumoren eine bedeutende Rolle einnehmen und ist aus diesem Grund von hoher Relevanz.

7 Zusammenfassung

Das Zweitgenerations-Antiandrogen Enzalutamid hat seit seiner Erstzulassung im Jahr 2012 die Behandlung von Männern mit einem Prostatakarzinom nachhaltig verändert. Es inhibiert die Androgenrezeptor-Signalachse, indem es sowohl die Bindung des Androgenrezeptors an seinen natürlichen Liganden Dihydrotestosteron als auch die Translokation des Androgenrezeptors in den Nukleus sowie dessen Bindung an die DNA und die Rekrutierung von Kofaktoren hemmt. Derzeit steht Enzalutamid zur Behandlung von Männern mit einem metastasierten hormonsensitiven Prostatakarzinom und einem nicht-metastasierten oder metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom zur Verfügung. Trotz enormer Erfolge in der Weiterentwicklung und Zulassung von Enzalutamid für das kastrationsresistente und/oder metastasierte Prostatakarzinom in den vergangenen 10 Jahren sind sowohl Patienten als auch Behandelnde mit zahlreichen Rückschlägen im Sinne sich entwickelnder oder bereits vorbestehender Therapieresistenzen konfrontiert. Eine Vielzahl von Mechanismen, wie Mutationen oder die Hochregulation alternativer Signalwege, konnten identifiziert werden, die mit Kastrationsresistenz und speziell Enzalutamidresistenz assoziiert sind. Hierzu zählt auch der Transkriptionsfaktor *Signal Transducer and Activator of Transcription 5* (STAT5). Im Rahmen zahlreicher Studien wurde die Bedeutung von STAT5 für Wachstum und Progression sowie das Metastasierungsverhalten des Prostatakarzinoms verdeutlicht. Zudem wurde ein starker Synergismus zwischen dem Androgenrezeptor und STAT5 beschrieben, welcher unter Enzalutamid-Behandlung zu einer sich selbst unterhaltenden STAT5-Aktivierung und Tumorprogression führt. Die Inhibition von STAT5 resultierte sowohl singulär als auch in Kombination mit Enzalutamid in einer Wachstumsinhibition *in vitro* und *in vivo*. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen auf der einen Seite die bereits gewonnenen Erkenntnisse zur Möglichkeit der Resistenzüberwindung durch eine STAT5-Inhibition und stellen insbesondere STAT5B als wichtige Zielstruktur heraus. So gelang durch gezielten siRNA-vermittelten STAT5B-Knockdown eine Resensitivierung von Enzalutamid-resistenten MR49F-Zellen für Enzalutamid. Auch die Kombination von Enzalutamid mit dem pharmakologischen STAT5-Inhibitor Pimozid konnte die Zellviabilität Enzalutamid-resistenter MR49F-Zellen in synergistischer Weise hemmen. Auf der anderen Seite spiegeln die erhobenen Daten aber auch die Heterogenität und Komplexität des Prostatakarzinoms wider. Hier ergibt sich die Notwendigkeit nach tiefergehenden Untersuchungen von STAT5 sowohl in der Resistenzentwicklung als auch in der Enzalutamid-resistenten Situation. Vor dem Hintergrund der molekularen Vielfalt der Resistenzmechanismen ist eine Identifizierung und nähere Klassifizierung derjenigen Subgruppen nötig, die von einer STAT5-Inhibition profitieren können. Zudem stellt die Entwicklung spezifischer und verträglicher Inhibitoren eine große Herausforderung auf dem Weg zur Überwindung der Enzalutamid-Resistenz dar.

8 Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2015/2016. Robert Koch-Institut. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV. 2019.
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.1, 2021, AWMF Registernummer: 043/022OL. Zugegriffen am 12.09.2021 [Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/>].
3. Beer TM, Armstrong AJ, Rathkopf DE, Loriot Y, Sternberg CN, Higano CS, et al. Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(5):424-33.
4. Scher HI, Beer TM, Higano CS, Anand A, Taplin M-E, Efsthathiou E, et al. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1–2 study. *The Lancet*. 2010;375(9724):1437-46.
5. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin M-E, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(13):1187-97.
6. Hussain M, Fizazi K, Saad F, Rathenborg P, Shore N, Ferreira U, et al. Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2018;378(26):2465-74.
7. Sweeney C, Martin AJ, Zielinski RR, Thomson A, Tan TH, Sandhu SK, et al. Overall survival (OS) results of a phase III randomized trial of standard-of-care therapy with or without enzalutamide for metastatic hormone-sensitive prostate cancer (mHSPC): ENZAMET (ANZUP 1304), an ANZUP-led international cooperative group trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(18_suppl):LBA2-LBA.
8. Armstrong AJ, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, Holzbeierlein J, Villers A, Azad A, et al. ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(32):2974-86.
9. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC, et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(11):1028-38.
10. Prekovic S, van Royen M, Voet A, Geverts B, Houtman R, Melchers D, et al. The Effect of F877L and T878A Mutations on Androgen Receptor Response to Enzalutamide. *Molecular cancer therapeutics*. 2016;15.
11. Wyatt AW, Azad AA, Volik SV, Annala M, Beja K, McConeghy B, et al. Genomic Alterations in Cell-Free DNA and Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(12):1598-606.
12. Mostaghel EA, Page ST, Lin DW, Fazli L, Coleman IM, True LD, et al. Intraprostatic Androgens and Androgen-Regulated Gene Expression Persist after Testosterone Suppression: Therapeutic Implications for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer research*. 2007;67(10):5033-41.

13. Locke JA, Guns ES, Lubik AA, Adomat HH, Hendy SC, Wood CA, et al. Androgen Levels Increase by Intratumoral De novo Steroidogenesis during Progression of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer research*. 2008;68(15):6407-15.
14. Dang Q, Li L, Xie H, He D, Chen J, Song W, et al. Anti-androgen enzalutamide enhances prostate cancer neuroendocrine (NE) differentiation via altering the infiltrated mast cells → androgen receptor (AR) → miRNA32 signals. *Molecular oncology*. 2015;9(7):1241-51.
15. Lee GT, Rosenfeld JA, Kim WT, Kwon YS, Palapattu G, Mehra R, et al. TCF4 induces enzalutamide resistance via neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *PLOS ONE*. 2019;14(9):e0213488.
16. Cui Y, Nadiminty N, Liu C, Lou W, Schwartz CT, Gao AC. Upregulation of glucose metabolism by NF-κB2/p52 mediates enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(3):435-42.
17. Arora VK, Schenkein E, Murali R, Subudhi SK, Wongvipat J, Balbas MD, et al. Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell*. 2013;155(6):1309-22.
18. Kazansky AV, Spencer DM, Greenberg NM. Activation of signal transducer and activator of transcription 5 is required for progression of autochthonous prostate cancer: evidence from the transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate system. *Cancer research*. 2003;63(24):8757-62.
19. Ahonen TJ, Xie J, LeBaron MJ, Zhu J, Nurmi M, Alanen K, et al. Inhibition of transcription factor Stat5 induces cell death of human prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(29):27287-92.
20. Dagvadorj A, Kirken RA, Leiby B, Karras J, Nevalainen MT. Transcription Factor Signal Transducer and Activator of Transcription 5 Promotes Growth of Human Prostate Cancer Cells *In vivo*. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(5):1317-24.
21. Dagvadorj A, Collins S, Jomain JB, Abdulghani J, Karras J, Zellweger T, et al. Autocrine prolactin promotes prostate cancer cell growth via Janus kinase-2-signal transducer and activator of transcription-5a/b signaling pathway. *Endocrinology*. 2007;148(7):3089-101.
22. Tan S-H, Nevalainen MT. Signal transducer and activator of transcription 5A/B in prostate and breast cancers. 2008;15(2):367.
23. Thomas C, Zoubeidi A, Kuruma H, Fazli L, Lamoureux F, Beraldi E, et al. Transcription factor Stat5 knockdown enhances androgen receptor degradation and delays castration-resistant prostate cancer progression in vivo. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(2):347-59.
24. Tan S-H, Dagvadorj A, Shen F, Gu L, Liao Z, Abdulghani J, et al. Transcription Factor Stat5 Synergizes with Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells. *Cancer research*. 2008;68(1):236-48.
25. Li H, Ahonen TJ, Alanen K, Xie J, LeBaron MJ, Pretlow TG, et al. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 5 in Human Prostate Cancer Is Associated with High Histological Grade. *Cancer research*. 2004;64(14):4774-82.

26. Udhane V, Maranto C, Hoang DT, Gu L, Erickson A, Devi S, et al. Enzalutamide Induced Feed-Forward Signaling Loop Promotes Therapy-Resistant Prostate Cancer Growth Providing an Exploitable Molecular Target for Jak2 Inhibitors. *Molecular cancer therapeutics*. 2019;molcanther.0508.2019.
27. Humphrey PA. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*. 2012;60(1):59-74.
28. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European urology*. 2017;71(4):618-29.
29. Huggins C, Hodges CV. Studies on Prostatic Cancer: I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Journal of Urology*. 2002;168(1):9-12.
30. Reinhold T, Dornquast C, Börgermann C, Weißbach L. Behandlungskosten des lokal begrenzten Prostatakarzinoms in Deutschland. *Der Urologe*. 2016;55(12):1573-85.
31. Mariotto AB, Yabroff KR, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML. Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *Journal of the National Cancer Institute*. 2011;103(2):117-28.
32. Statistisches Bundesamt (Destatis). Tabelle 23631-0001: Krankheitskosten: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD-10). Abgerufen am 13.05.2020 [
33. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, et al. *Anatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014.
34. Gray H. Anatomy of the human body. *Annals of surgery*. 1918;68(5):564-6.
35. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology*. 1988;12(8):619-33.
36. Lindzey J, Vijay Kumar M, Grossman M, Young C, Tindall DJ. Molecular Mechanisms of Androgen Action. In: Litwack G, editor. *Vitamins & Hormones*. 49: Academic Press; 1994. p. 383-432.
37. Bruchofsky N, Lesser B, Van Doorn E, Craven S. Hormonal effects on cell proliferation in rat prostate. *Vitamins and hormones*. 1975;33:61-102.
38. Bruchofsky N, Wilson JD. The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 1968;243(8):2012-21.
39. Bruchofsky N, Wilson JD. The intranuclear binding of testosterone and 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate. *The Journal of biological chemistry*. 1968;243(22):5953-60.
40. Lubahn D, Joseph D, Sullivan P, Willard H, French F, Wilson E. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*. 1988;240(4850):327-30.
41. Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, et al. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet*. 1989;44(2):264-9.

42. Crona D, Whang Y. Androgen Receptor-Dependent and -Independent Mechanisms Involved in Prostate Cancer Therapy Resistance. *Cancers*. 2017;9:67.
43. Veldscholte J, Berrevoets CA, Zegers ND, van der Kwast TH, Grootegoed JA, Mulder E. Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry*. 1992;31(32):7422-30.
44. Albany C, Hahn NM. Heat shock and other apoptosis-related proteins as therapeutic targets in prostate cancer. *Asian journal of andrology*. 2014;16(3):359-63.
45. Wong C, Zhou Z, Sar M, Wilson E. Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH2-terminal and steroid-binding domains. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268:19004-12.
46. Zhou ZX, Kempainen JA, Wilson EM. Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1995;9(5):605-15.
47. Claessens F, Celis L, Peeters B, Heyns W, Verhoeven G, Rombauts W. Functional characterization of an androgen response element in the first intron of the C3(1) gene of prostatic binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;164(2):833-40.
48. Heemers HV, Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine reviews*. 2007;28(7):778-808.
49. Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog*. 2011;10:20-.
50. Jenster G. Ligand-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer by growth factors and cytokines. *The Journal of Pathology*. 2000;191(3):227-8.
51. Pelekanou V, Notas G, Stathopoulos EN, Castanas E, Kampa M. Androgen receptors in early and castration resistant prostate cancer: friend or foe? *Hormones (Athens, Greece)*. 2013;12(2):224-35.
52. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(6):394-424.
53. Taitt HE. Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location. *Am J Mens Health*. 2018;12(6):1807-23.
54. Ferlay J, ESM LF, Colombet M, Mery L, Pineros M, Znaor A, Soerjomataram I, et al. Global cancer observatory: cancer tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2019. Zugegriffen am 21.06.2019 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today>].
55. Bell KJ, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *International journal of cancer*. 2015;137(7):1749-57.

56. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *The Prostate*. 1990;17(4):337-47.
57. Kheirandish P, Chinegwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. *British journal of cancer*. 2011;105(4):481-5.
58. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World journal of oncology*. 2019;10(2):63-89.
59. Chu LW, Ritchey J, Devesa SS, Quraishi SM, Zhang H, Hsing AW. Prostate cancer incidence rates in Africa. *Prostate cancer*. 2011;2011:947870.
60. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *International journal of cancer*. 2000;85(1):60-7.
61. Etminan M, Takkouche B, Caamano-Isorna F. The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2004;13(3):340-5.
62. Ozasa K, Nakao M, Watanabe Y, Hayashi K, Miki T, Mikami K, et al. Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. *Cancer science*. 2004;95(1):65-71.
63. Heidenreich A, Abrahamsson PA, Artibani W, Catto J, Montorsi F, Van Poppel H, et al. Early detection of prostate cancer: European Association of Urology recommendation. *European urology*. 2013;64(3):347-54.
64. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer chemotherapy reports*. 1966;50(3):125-8.
65. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2005;29(9):1228-42.
66. Epstein JI. An update of the Gleason grading system. *The Journal of urology*. 2010;183(2):433-40.
67. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology*. 2016;40(2):244-52.
68. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology*. 2004;17(3):292-306.
69. Kang DE, Fitzsimons NJ, Presti JC, Jr., Kane CJ, Terris MK, Aronson WJ, et al. Risk stratification of men with Gleason score 7 to 10 tumors by primary and secondary Gleason score: results from the SEARCH database. *Urology*. 2007;70(2):277-82.
70. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU international*. 2013;111(5):753-60.

71. Spratt DE, Cole AI, Palapattu GS, Weizer AZ, Jackson WC, Montgomery JS, et al. Independent surgical validation of the new prostate cancer grade-grouping system. *BJU international*. 2016;118(5):763-9.
72. Nanda A, Chen MH, Renshaw AA, D'Amico AV. Gleason Pattern 5 prostate cancer: further stratification of patients with high-risk disease and implications for future randomized trials. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;74(5):1419-23.
73. Sabolch A, Feng FY, Daignault-Newton S, Halverson S, Blas K, Phelps L, et al. Gleason pattern 5 is the greatest risk factor for clinical failure and death from prostate cancer after dose-escalated radiation therapy and hormonal ablation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;81(4):e351-60.
74. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European urology*. 2016;70(1):106-19.
75. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH. TNM: Klassifikation maligner Tumoren. 8th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2017.
76. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Jama*. 1998;280(11):969-74.
77. Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and Clinical Findings to Predict Tumor Extent of Nonpalpable (Stage T1 c) Prostate Cancer. *Jama*. 1994;271(5):368-74.
78. Oon SF, Watson RW, O'Leary JJ, Fitzpatrick JM. Epstein criteria for insignificant prostate cancer. *BJU international*. 2011;108(4):518-25.
79. Bastian PJ, Carter BH, Bjartell A, Seitz M, Stanislaus P, Montorsi F, et al. Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *European urology*. 2009;55(6):1321-30.
80. Azzouzi A-R, Vincendeau S, Barret E, Cicco A, Kleinclaus F, van der Poel HG, et al. Padeliporfin vascular-targeted photodynamic therapy versus active surveillance in men with low-risk prostate cancer (CLIN1001 PCM301): an open-label, phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(2):181-91.
81. Iversen P, Johansson JE, Lodding P, Kylmälä T, Lundmo P, Klarskov P, et al. Bicalutamide 150 mg in addition to standard care for patients with early non-metastatic prostate cancer: updated results from the Scandinavian Prostate Cancer Group-6 Study after a median follow-up period of 7.1 years. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 2006;40(6):441-52.
82. Lu-Yao GL, Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, DiPaola RS, et al. Fifteen-year survival outcomes following primary androgen-deprivation therapy for localized prostate cancer. *JAMA internal medicine*. 2014;174(9):1460-7.
83. Studer UE, Whelan P, Wimpissinger F, Casselman J, de Reijke TM, Knönagel H, et al. Differences in time to disease progression do not predict for cancer-specific survival in patients receiving immediate or deferred androgen-deprivation therapy for prostate cancer: final results of EORTC randomized trial 30891 with 12 years of follow-up. *European urology*. 2014;66(5):829-38.

84. Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Priou F, Esterni B, et al. Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(2):149-58.
85. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10024):1163-77.
86. Sweeney CJ, Chen Y-H, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2015;373(8):737-46.
87. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2017;377(4):352-60.
88. James ND, de Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, et al. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *The New England journal of medicine*. 2017;377(4):338-51.
89. Chi KN, Agarwal N, Bjartell A, Chung BH, Pereira de Santana Gomes AJ, Given R, et al. Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2019;381(1):13-24.
90. A Phase III Study for Patients With Metastatic Hormone-naïve Prostate Cancer (PEACE1). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01957436. Zugegriffen am 08.06.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01957436>].
91. Impact of Radical Prostatectomy as Primary Treatment in Patients With Prostate Cancer With Limited Bone Metastases (g-RAMPP). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02454543. Zugegriffen am 08.06.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02454543>].
92. Saad F, Hotte SJ. Guidelines for the management of castrate-resistant prostate cancer. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada*. 2010;4(6):380-4.
93. Smith MR, Saad F, Chowdhury S, Oudard S, Hadaschik BA, Graff JN, et al. Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2018;378(15):1408-18.
94. Fizazi K, Shore N, Tammela TL, Ulys A, Vjaters E, Polyakov S, et al. Darolutamide in Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2019;380(13):1235-46.
95. Ryan CJ, Crawford ED, Shore ND, Underwood W, 3rd, Taplin ME, Londhe A, et al. The IMAAGEN Study: Effect of Abiraterone Acetate and Prednisone on Prostate Specific Antigen and Radiographic Disease Progression in Patients with Nonmetastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *The Journal of urology*. 2018;200(2):344-52.

96. Ryan CJ, Smith MR, Fizazi K, Saad F, Mulders PF, Sternberg CN, et al. Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2015;16(2):152-60.
97. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fosså SD, et al. Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(3):213-23.
98. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(15):1502-12.
99. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *American journal of clinical oncology*. 1982;5(6):649-55.
100. Terada N, Maughan BL, Akamatsu S, Kobayashi T, Yamasaki T, Inoue T, et al. Exploring the optimal sequence of abiraterone and enzalutamide in patients with chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer: The Kyoto-Baltimore collaboration. *International Journal of Urology*. 2017;24(6):441-8.
101. Khalaf DJ, Annala M, Taavitsainen S, Finch DL, Oja C, Vergidis J, et al. Optimal sequencing of enzalutamide and abiraterone acetate plus prednisone in metastatic castration-resistant prostate cancer: a multicentre, randomised, open-label, phase 2, crossover trial. *The Lancet Oncology*. 2019;20(12):1730-9.
102. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet (London, England)*. 2010;376(9747):1147-54.
103. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(21):1995-2005.
104. de Wit R, de Bono J, Sternberg CN, Fizazi K, Tombal B, Wülfing C, et al. Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(26):2506-18.
105. Enzalutamide and Cabazitaxel in Treating Patients With Metastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02522715*. Zugegriffen am 07.07.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02522715>].
106. Mateo J, Porta N, Bianchini D, McGovern U, Elliott T, Jones R, et al. Olaparib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair gene aberrations (TOPARP-B): a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2020;21(1):162-74.
107. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S, et al. Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(22):2091-102.

108. A Study of Niraparib in Combination With Abiraterone Acetate and Prednisone Versus Abiraterone Acetate and Prednisone for Treatment of Participants With Metastatic Prostate Cancer(MAGNITUDE). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03748641. Zugegriffen am 11.06.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03748641>].
109. Calopedos RJS, Chalasani V, Asher R, Emmett L, Woo HH. Lutetium-177-labelled anti-prostate-specific membrane antigen antibody and ligands for the treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017;20(3):352-60.
110. Heck MM, Retz M, D'Alessandria C, Rauscher I, Scheidhauer K, Maurer T, et al. Systemic Radioligand Therapy with (177)Lu Labeled Prostate Specific Membrane Antigen Ligand for Imaging and Therapy in Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer. *The Journal of urology.* 2016;196(2):382-91.
111. Hansen AR, Massard C, Ott PA, Haas NB, Lopez JS, Ejadi S, et al. Pembrolizumab for advanced prostate adenocarcinoma: findings of the KEYNOTE-028 study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.* 2018;29(8):1807-13.
112. Tucker MD, Zhu J, Marin D, Gupta RT, Gupta S, Berry WR, et al. Pembrolizumab in men with heavily treated metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Cancer medicine.* 2019;8(10):4644-55.
113. Study of Pembrolizumab (MK-3475) Plus Enzalutamide Versus Placebo Plus Enzalutamide in Participants With Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer (mCRPC) (MK-3475-641/KEYNOTE-641). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03834493. Zugegriffen am 11.06.2020.
114. Agarwal N, Lortot Y, McGregor BA, Dreicer R, Dorff TB, Maughan BL, et al. Cabozantinib (C) in combination with atezolizumab (A) in patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC): Results of Cohort 6 of the COSMIC-021 Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2020;38(6_suppl):139-.
115. Study of Cabozantinib in Combination With Atezolizumab Versus Second NHT in Subjects With mCRPC (CONTACT-02). ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04446117. Zugegriffen am 07.07.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04446117>].
116. Rice MA, Malhotra SV, Stoyanova T. Second-Generation Antiandrogens: From Discovery to Standard of Care in Castration Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in oncology.* 2019;9:801.
117. 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 (New York, NY).* 2009;324(5928):787-90.
118. Rodriguez-Vida A, Galazi M, Rudman S, Chowdhury S, Sternberg CN. Enzalutamide for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug design, development and therapy.* 2015;9:3325-39.
119. Foster WR, Car BD, Shi H, Levesque PC, Obermeier MT, Gan J, et al. Drug safety is a barrier to the discovery and development of new androgen receptor antagonists. *The Prostate.* 2011;71(5):480-8.

120. Traina TA, Miller K, Yardley DA, Eakle J, Schwartzberg LS, O'Shaughnessy J, et al. Enzalutamide for the Treatment of Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(9):884-90.
121. Harding JJ, Kelley RK, Tan B, Capanu M, Kinh Do G, Shia J, et al. Phase Ib Study of Enzalutamide with or Without Sorafenib in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *The Oncologist*.n/a(n/a).
122. Zhao J, Sun Y, Lin H, Chou F, Xiao Y, Jin Ra, et al. Olaparib and enzalutamide synergistically suppress HCC progression via the AR-mediated miR-146a-5p/BRCA1 signaling. *The FASEB Journal*. 2020;34(4):5877-91.
123. Buttigliero C, Tucci M, Bertaglia V, Vignani F, Bironzo P, Di Maio M, et al. Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2015;41(10):884-92.
124. Linder S, van der Poel HG, Bergman AM, Zwart W, Prekovic S. Enzalutamide therapy for advanced prostate cancer: efficacy, resistance and beyond. *Endocrine-related cancer*. 2018;26(1):R31-R52.
125. Claessens F, Helsen C, Prekovic S, Van den Broeck T, Spans L, Van Poppel H, et al. Emerging mechanisms of enzalutamide resistance in prostate cancer. *Nature reviews Urology*. 2014;11(12):712-6.
126. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*. 2009;69(1):16-22.
127. Li Y, Chan SC, Brand LJ, Hwang TH, Silverstein KAT, Dehm SM. Androgen Receptor Splice Variants Mediate Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer Cell Lines. *Cancer research*. 2013;73(2):483-9.
128. Liu C, Lou W, Zhu Y, Nadiminty N, Schwartz CT, Evans CP, et al. Niclosamide inhibits androgen receptor variants expression and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(12):3198-210.
129. Liu C, Armstrong CM, Lou W, Lombard AP, Cucchiara V, Gu X, et al. Niclosamide and Bicalutamide Combination Treatment Overcomes Enzalutamide- and Bicalutamide-Resistant Prostate Cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2017;16(8):1521-30.
130. Schweizer MT, Haugk K, McKiernan JS, Gulati R, Cheng HH, Maes JL, et al. A phase I study of niclosamide in combination with enzalutamide in men with castration-resistant prostate cancer. *PLOS ONE*. 2018;13(6):e0198389.
131. Tucci M, Zichi C, Buttigliero C, Vignani F, Scagliotti GV, Di Maio M. Enzalutamide-resistant castration-resistant prostate cancer: challenges and solutions. *Onco Targets Ther*. 2018;11:7353-68.
132. Myung J-K, Banuelos CA, Fernandez JG, Mawji NR, Wang J, Tien AH, et al. An androgen receptor N-terminal domain antagonist for treating prostate cancer. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2948-60.

133. Moigne RL, Zhou H-J, Obst JK, Banuelos CA, Jian K, Williams D, et al. Lessons learned from the metastatic castration-resistant prostate cancer phase I trial of EPI-506, a first-generation androgen receptor N-terminal domain inhibitor. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(7_suppl):257-.
134. Asangani IA, Dommeti VL, Wang X, Malik R, Cieslik M, Yang R, et al. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2014;510(7504):278-82.
135. Vázquez R, Civenni G, Kokanovic A, Shinde D, Cantergiani J, Marchetti M, et al. Efficacy of Novel Bromodomain and Extraterminal Inhibitors in Combination with Chemotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology Oncology*. 2019.
136. Asangani IA, Wilder-Romans K, Dommeti VL, Krishnamurthy PM, Apel IJ, Escara-Wilke J, et al. BET Bromodomain Inhibitors Enhance Efficacy and Disrupt Resistance to AR Antagonists in the Treatment of Prostate Cancer. *Mol Cancer Res*. 2016;14(4):324-31.
137. A Study of ZEN003694 in Combination With Enzalutamide in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02711956*. Zugegriffen am 05.07.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02711956>].
138. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of GS-5829 as a Single Agent and In Combination With Enzalutamide in Participants With Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02607228*. Zugegriffen am 05.07.2020 [
139. Wang K, Luo J, Yeh S, You B, Meng J, Chang P, et al. The MAO inhibitors phenelzine and clorgyline revert enzalutamide resistance in castration resistant prostate cancer. *Nature Communications*. 2020;11(1):2689.
140. Dyshlovoy SA, Otte K, Alsdorf WH, Hauschild J, Lange T, Venz S, et al. Marine compound rhizochalalin shows high in vitro and in vivo efficacy in castration resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(43).
141. Joseph JD, Lu N, Qian J, Sensintaffar J, Shao G, Brigham D, et al. A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509. *Cancer discovery*. 2013;3(9):1020-9.
142. Lallous N, Volik SV, Awrey S, Leblanc E, Tse R, Murillo J, et al. Functional analysis of androgen receptor mutations that confer anti-androgen resistance identified in circulating cell-free DNA from prostate cancer patients. *Genome Biology*. 2016;17(1):10.
143. Borgmann H, Lallous N, Ozistanbullu D, Beraldi E, Paul N, Dalal K, et al. Moving Towards Precision Urologic Oncology: Targeting Enzalutamide-resistant Prostate Cancer and Mutated Forms of the Androgen Receptor Using the Novel Inhibitor Darolutamide (ODM-201). *European urology*. 2018;73(1):4-8.
144. Yamamoto Y, Loriot Y, Beraldi E, Zhang F, Wyatt AW, Nakouzi NA, et al. Generation 2.5 Antisense Oligonucleotides Targeting the Androgen Receptor and Its Splice Variants Suppress Enzalutamide-Resistant Prostate Cancer Cell Growth. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(7):1675-87.

145. Hoefler J, Akbor M, Handle F, Ofer P, Puhf M, Parson W, et al. Critical role of androgen receptor level in prostate cancer cell resistance to new generation antiandrogen enzalutamide. *Oncotarget*. 2016;7(37):59781-94.
146. Conteduca V, Wetterskog D, Sharabiani MTA, Grande E, Fernandez-Perez MP, Jayaram A, et al. Androgen receptor gene status in plasma DNA associates with worse outcome on enzalutamide or abiraterone for castration-resistant prostate cancer: a multi-institution correlative biomarker study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(7):1508-16.
147. Liu C, Lou W, Zhu Y, Yang JC, Nadiminty N, Gaikwad NW, et al. Intracrine Androgens and AKR1C3 Activation Confer Resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer. *Cancer research*. 2015;75(7):1413-22.
148. Liu C, Armstrong CM, Lou W, Lombard A, Evans CP, Gao AC. Inhibition of AKR1C3 Activation Overcomes Resistance to Abiraterone in Advanced Prostate Cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2017;16(1):35-44.
149. Enzalutamide and Indomethacin in Treating Patients With Recurrent or Metastatic Hormone-Resistant Prostate Cancer. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02935205*. Zugegriffen am 06.07.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02935205>].
150. ALANEE S, MOORE A, NUTT M, HOLLAND B, DYNDA D, EL-ZAWAHRY A, et al. Contemporary Incidence and Mortality Rates of Neuroendocrine Prostate Cancer. *Anticancer Research*. 2015;35(7):4145-50.
151. Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, Zhang L, Feng FY, Thomas GV, et al. Clinical and Genomic Characterization of Treatment-Emergent Small-Cell Neuroendocrine Prostate Cancer: A Multi-institutional Prospective Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(24):2492-503.
152. Shen R, Dorai T, Szaboles M, Katz AE, Olsson CA, Buttyan R. Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. *Urol Oncol*. 1997;3(2):67-75.
153. Wright ME, Tsai M-J, Aebbersold R. Androgen Receptor Represses the Neuroendocrine Transdifferentiation Process in Prostate Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*. 2003;17(9):1726-37.
154. Zaffuto E, Pompe R, Zanaty M, Bondarenko HD, Leyh-Bannurah S-R, Moschini M, et al. Contemporary Incidence and Cancer Control Outcomes of Primary Neuroendocrine Prostate Cancer: A SEER Database Analysis. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2017;15(5):e793-e800.
155. Conteduca V, Scarpi E, Salvi S, Casadio V, Lolli C, Gurioli G, et al. Plasma androgen receptor and serum chromogranin A in advanced prostate cancer. *Scientific Reports*. 2018;8(1):15442.
156. Puhf M, Hoefler J, Eigentler A, Ploner C, Handle F, Schaefer G, et al. The Glucocorticoid Receptor Is a Key Player for Prostate Cancer Cell Survival and a Target for Improved Antiandrogen Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(4):927-38.
157. Enzalutamide and Mifepristone in Treating Patients With Metastatic Hormone Resistant Prostate Cancer. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02012296*. Zugegriffen am 08.07.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02012296>].

158. YANG Y, LI X, MAMOUNI K, KUCUK O, WU D. Mifepristone Has Limited Activity to Enhance the In Vivo Efficacy of Docetaxel and Enzalutamide Against Bone Metastatic and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Anticancer Research*. 2017;37(11):6235-43.
159. Zhou H, Jachan N, Singh M, Tran C, McWeeney D, Balbas M, et al. Abstract 4172: Activation of AR signaling by mifepristone enhances prostate cancer growth and impairs enzalutamide response. *Cancer research*. 2017;77(13 Supplement):4172-.
160. Study to Evaluate CORT125281 in Combination With Enzalutamide in Patients With mCRPC. *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT03437941. Zugegriffen am 08.07.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03437941>].
161. Nguyen HG, Yang JC, Kung HJ, Shi XB, Tilki D, Lara PN, et al. Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model. *Oncogene*. 2014;33(36):4521-30.
162. Parikh M, Robles D, Pan C-x, Lara P, Yang JC, Gao A, et al. Results from a phase Ib/II study of enzalutamide and metformin in men with castration resistant prostate cancer (CRPC). *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(15_suppl):5054-.
163. Investigation of Metformin in Patients With Castration Resistant Prostate Cancer in Combination With Enzalutamide vs. Enzalutamide Alone. *ClinicalTrials.gov* Identifier: NCT02640534. Zugegriffen am 09.07.2020 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02640534>].
164. Chen WS, Aggarwal R, Zhang L, Zhao SG, Thomas GV, Beer TM, et al. Genomic Drivers of Poor Prognosis and Enzalutamide Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer. *European urology*. 2019;76(5):562-71.
165. Shariat SF, Andrews B, Kattan MW, Kim J, Wheeler TM, Slawin KM. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. *Urology*. 2001;58(6):1008-15.
166. Lee SO, Lou W, Hou M, de Miguel F, Gerber L, Gao AC. Interleukin-6 Promotes Androgen-independent Growth in LNCaP Human Prostate Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(1):370-6.
167. Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, Oya M, Ohigashi T, Asakura H, et al. Serum Interleukin 6 as a Prognostic Factor in Patients with Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2000;6(7):2702-6.
168. Liu C, Zhu Y, Lou W, Cui Y, Evans CP, Gao AC. Inhibition of constitutively active Stat3 reverses enzalutamide resistance in LNCaP derivative prostate cancer cells. *The Prostate*. 2014;74(2):201-9.
169. Canesin G, Evans-Axelsson S, Hellsten R, Sterner O, Krzyzanowska A, Andersson T, et al. The STAT3 Inhibitor Galiellalactone Effectively Reduces Tumor Growth and Metastatic Spread in an Orthotopic Xenograft Mouse Model of Prostate Cancer. *European urology*. 2016;69(3):400-4.
170. Handle F, Puhr M, Schaefer G, Lorito N, Hoefler J, Gruber M, et al. The STAT3 Inhibitor Galiellalactone Reduces IL6-Mediated AR Activity in Benign and Malignant Prostate Models. *Molecular cancer therapeutics*. 2018;17(12):2722-31.

171. Thaper D, Vahid S, Kaur R, Kumar S, Nouruzi S, Bishop JL, et al. Galiellalactone inhibits the STAT3/AR signaling axis and suppresses Enzalutamide-resistant Prostate Cancer. *Sci Rep.* 2018;8(1):17307.
172. Liu Q, Tong D, Liu G, Xu J, Do K, Geary K, et al. Metformin reverses prostate cancer resistance to enzalutamide by targeting TGF- β 1/STAT3 axis-regulated EMT. *Cell Death Dis.* 2017;8(8):e3007-e.
173. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, et al. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997;278(5344):1803-5.
174. Hoefler J, Schäfer G, Klocker H, Erb HHH, Mills IG, Hengst L, et al. PIAS1 Is Increased in Human Prostate Cancer and Enhances Proliferation through Inhibition of p21. *The American Journal of Pathology.* 2012;180(5):2097-107.
175. Puhr M, Hoefler J, Eigentler A, Dietrich D, van Leenders G, Uhl B, et al. PIAS1 is a determinant of poor survival and acts as a positive feedback regulator of AR signaling through enhanced AR stabilization in prostate cancer. *Oncogene.* 2016;35(18):2322-32.
176. Handle F, Erb HHH, Luef B, Hoefler J, Dietrich D, Parson W, et al. SOCS3 Modulates the Response to Enzalutamide and Is Regulated by Androgen Receptor Signaling and CpG Methylation in Prostate Cancer Cells. *Molecular Cancer Research.* 2016;14(6):574-85.
177. Azad AA, Volik SV, Wyatt AW, Haegert A, Le Bihan S, Bell RH, et al. Androgen Receptor Gene Aberrations in Circulating Cell-Free DNA: Biomarkers of Therapeutic Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2015;21(10):2315-24.
178. Lolli C, De Lisi D, Conteduca V, Gurioli G, Scarpi E, Schepisi G, et al. Testosterone levels and androgen receptor copy number variations in castration-resistant prostate cancer treated with abiraterone or enzalutamide. *The Prostate.* 2019;79(11):1211-20.
179. Okegawa T, Ninomiya N, Masuda K, Nakamura Y, Tambo M, Nutahara K. AR-V7 in circulating tumor cells cluster as a predictive biomarker of abiraterone acetate and enzalutamide treatment in castration-resistant prostate cancer patients. *The Prostate.* 2018;78(8):576-82.
180. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, Wang H, Chen Y, Zhu Y, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol.* 2017;35(19):2149-56.
181. Armstrong AJ, Halabi S, Luo J, Nanus DM, Giannakakou P, Szmulewitz RZ, et al. Prospective Multicenter Validation of Androgen Receptor Splice Variant 7 and Hormone Therapy Resistance in High-Risk Castration-Resistant Prostate Cancer: The PROPHECY Study. *J Clin Oncol.* 2019;37(13):1120-9.
182. Benoist GE, van Oort IM, Boerrigter E, Verhaegh GW, van Hooij O, Groen L, et al. Prognostic Value of Novel Liquid Biomarkers in Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated with Enzalutamide: A Prospective Observational Study. *Clinical Chemistry.* 2020;66(6):842-51.
183. Takemura K, Ito M, Nakanishi Y, Kataoka M, Sakamoto K, Suzuki H, et al. Serum γ -Glutamyltransferase as a Prognostic Biomarker in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer Treated With Enzalutamide. *Anticancer Res.* 2019;39(10):5773-80.

184. Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular BioSystems*. 2006;2(11):536-50.
185. Gouilleux F, Wakao H, Mundt M, Groner B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *The EMBO journal*. 1994;13(18):4361-9.
186. Wakao H, Gouilleux F, Groner B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *The EMBO journal*. 1994;13(9):2182-91.
187. Wakao H, Schmitt-Ney M, Groner B. Mammary gland-specific nuclear factor is present in lactating rodent and bovine mammary tissue and composed of a single polypeptide of 89 kDa. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(23):16365-70.
188. Mui AL, Wakao H, O'Farrell AM, Harada N, Miyajima A. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *The EMBO journal*. 1995;14(6):1166-75.
189. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Wong SC, McKnight SL. Identification and purification of human stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity*. 1995;2(4):321-9.
190. Lin J-X, Mietz J, Modi WS, John S, Leonard WJ. Cloning of Human Stat5B: RECONSTITUTION OF INTERLEUKIN-2-INDUCED Stat5A AND Stat5B DNA BINDING ACTIVITY IN COS-7 CELLS. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(18):10738-44.
191. Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(19):8831-5.
192. Yamamoto K, Kobayashi H, Arai A, Miura O, Hirosawa S, Miyasaka N. cDNA cloning, expression and chromosome mapping of the human STAT4 gene: both STAT4 and STAT1 genes are mapped to 2q32.2-->q32.3. *Cytogenetics and cell genetics*. 1997;77(3-4):207-10.
193. Leek JP, Hamlin PJ, Bell SM, Lench NJ. Assignment of the STAT6 gene (STAT6) to human chromosome band 12q13 by in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*. 1997;79(3-4):208-9.
194. Goureau A, Garrigues A, Tosser-Klopp G, Lahbib-Mansais Y, Chardon P, Yerle M. Conserved synteny and gene order difference between human chromosome 12 and pig chromosome 5. *Cytogenetics and cell genetics*. 2001;94(1-2):49-54.
195. Schindler C, J. E. Darnell J. TRANSCRIPTIONAL RESPONSES TO POLYPEPTIDE LIGANDS: The JAK-STAT Pathway. *Annual Review of Biochemistry*. 1995;64(1):621-52.
196. Moriggl R, Gouilleux-Gruart V, Jähne R, Berchtold S, Gartmann C, Liu X, et al. Deletion of the carboxyl-terminal transactivation domain of MGF-Stat5 results in sustained DNA binding and a dominant negative phenotype. *Mol Cell Biol*. 1996;16(10):5691-700.
197. Morris R, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Science*. 2018;27(12):1984-2009.

198. Decker T, Kovarik P. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene*. 2000;19(21):2628-37.
199. Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(8):602-12.
200. Horvath CM, Wen Z, Darnell JE, Jr. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes & development*. 1995;9(8):984-94.
201. Soldaini E, John S, Moro S, Bollenbacher J, Schindler U, Leonard WJ. DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol Cell Biol*. 2000;20(1):389-401.
202. Aoki N, Matsuda T. A Nuclear Protein Tyrosine Phosphatase TC-PTP Is a Potential Negative Regulator of the PRL-Mediated Signaling Pathway: Dephosphorylation and Deactivation of Signal Transducer and Activator of Transcription 5a and 5b by TC-PTP in Nucleus. *Molecular Endocrinology*. 2002;16(1):58-69.
203. Happ B, Groner B. The activated mammary gland specific nuclear factor (MGF) enhances in vitro transcription of the β -casein gene promoter. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1993;47(1):21-30.
204. Nelson EA, Walker SR, Alvarez JV, Frank DA. Isolation of Unique STAT5 Targets by Chromatin Immunoprecipitation-based Gene Identification. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(52):54724-30.
205. Basham B, Sathe M, Grein J, McClanahan T, D'Andrea A, Lees E, et al. In vivo identification of novel STAT5 target genes. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(11):3802-18.
206. Kanai T, Seki S, Jenks JA, Kohli A, Kawli T, Martin DP, et al. Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. *PloS one*. 2014;9(1):e86790-e.
207. Kornfeld JW, Grebien F, Kerenyi MA, Friedbichler K, Kovacic B, Zankl B, et al. The different functions of Stat5 and chromatin alteration through Stat5 proteins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:6237-54.
208. Wingelhofer B, Neubauer HA, Valent P, Han X, Constantinescu SN, Gunning PT, et al. Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer. *Leukemia*. 2018;32(8):1713-26.
209. de Groot RP, Raaijmakers JAM, Lammers J-WJ, Koenderman L. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL Expression in Bcr-Abl-Transformed Cells. *Molecular Cell Biology Research Communications*. 2000;3(5):299-305.
210. Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Albanese C, et al. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *The EMBO journal*. 1999;18(5):1367-77.
211. Nevalainen MT, Ahonen TJ, Yamashita H, Chandrashekar V, Bartke A, Grimley PM, et al. Epithelial Defect in Prostates of Stat5a-Null Mice. *Laboratory Investigation*. 2000;80(7):993-1006.
212. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes & development*. 1997;11(2):179-86.

213. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *The EMBO journal*. 1999;18(17):4754-65.
214. Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, et al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood*. 2007;109(10):4368-75.
215. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999;98(2):181-91.
216. Kaltenecker D, Themanns M, Mueller KM, Spirk K, Suske T, Merkel O, et al. Hepatic growth hormone - JAK2 - STAT5 signalling: Metabolic function, non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma progression. *Cytokine*. 2019;124:154569.
217. Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, Claisse JF, Capiod JC, Delobel J, et al. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood*. 1996;87(5):1692-7.
218. Ilaria RL, Jr., Van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(49):31704-10.
219. Shuai K, Halpern J, ten Hoeve J, Rao X, Sawyers CL. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 1996;13(2):247-54.
220. de Araujo ED, Erdogan F, Neubauer HA, Meneksedag-Erol D, Manaswiyoungkul P, Eram MS, et al. Structural and functional consequences of the STAT5BN642H driver mutation. *Nature Communications*. 2019;10(1):2517.
221. Pham HTT, Maurer B, Prchal-Murphy M, Grausenburger R, Grundschober E, Javaheri T, et al. STAT5BN642H is a driver mutation for T cell neoplasia. *J Clin Invest*. 2018;128(1):387-401.
222. Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, Fajmann S, Cerny-Reiterer S, Hölbl A, et al. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2011;117(12):3409-20.
223. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36(1):93-9.
224. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding P-R, Ashby CR, Chen Z-S. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leukemia Research*. 2010;34(10):1255-68.
225. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-42.
226. Ren S, Cai HR, Li M, Furth PA. Loss of Stat5a delays mammary cancer progression in a mouse model. *Oncogene*. 2002;21(27):4335-9.
227. Humphreys RC, Hennighausen L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene*. 2000;19(8):1085-91.

228. Shan L, Yu M, Clark BD, Snyderwine EG. Possible role of Stat5a in rat mammary gland carcinogenesis. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2004;88(3):263-72.
229. Iavnilovitch E, Cardiff RD, Groner B, Barash I. Deregulation of Stat5 expression and activation causes mammary tumors in transgenic mice. *International journal of cancer*. 2004;112(4):607-19.
230. Nevalainen MT, Xie J, Torhorst J, Bubendorf L, Haas P, Kononen J, et al. Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2004;22(11):2053-60.
231. Yamashita H, Nishio M, Ando Y, Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, et al. Stat5 expression predicts response to endocrine therapy and improves survival in estrogen receptor-positive breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(3):885-93.
232. Peck AR, Witkiewicz AK, Liu C, Stringer GA, Klimowicz AC, Pequignot E, et al. Loss of nuclear localized and tyrosine phosphorylated Stat5 in breast cancer predicts poor clinical outcome and increased risk of antiestrogen therapy failure. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(18):2448-58.
233. Koppikar P, Lui VWY, Man D, Xi S, Chai RL, Nelson E, et al. Constitutive activation of signal transducer and activator of transcription 5 contributes to tumor growth, epithelial-mesenchymal transition, and resistance to epidermal growth factor receptor targeting. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(23):7682-90.
234. Lee TK, Man K, Poon RT, Lo CM, Yuen AP, Ng IO, et al. Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer research*. 2006;66(20):9948-56.
235. Zhang L, Zhao Z, Feng Z, Yin N, Lu G, Shan B. RNA interference-mediated silencing of Stat5 induces apoptosis and growth suppression of hepatocellular carcinoma cells. *Neoplasia*. 2012;59(3):302-9.
236. Du W, Wang YC, Hong J, Su WY, Lin YW, Lu R, et al. STAT5 isoforms regulate colorectal cancer cell apoptosis via reduction of mitochondrial membrane potential and generation of reactive oxygen species. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(6):2421-9.
237. Sánchez-Ceja SG, Reyes-Maldonado E, Vázquez-Manríquez ME, López-Luna JJ, Belmont A, Gutiérrez-Castellanos S. Differential expression of STAT5 and Bcl-x_L, and high expression of Neu and STAT3 in non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2006;54(2):163-8.
238. Jinawath N, Vasoontara C, Jinawath A, Fang X, Zhao K, Yap KL, et al. Oncoproteomic analysis reveals co-upregulation of RELA and STAT5 in carboplatin resistant ovarian carcinoma. *PLoS One*. 2010;5(6):e11198.
239. Caponnetto S, Iannantuono GM, Barchiesi G, Magri V, Gelibter A, Cortesi E. Prolactin as a Potential Early Predictive Factor in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *Oncology*. 2017;93(1):62-6.
240. Legostaev VM, Ayrapetova TG, Kit OI, Frantsiyants EM, Bandovkina VA, Babenkov OM, et al. Ectopic prolactin production by lung cancer cells as an indicator of aggressive nature of tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2019;37(15_suppl):e20021-e.

241. Hatzieremia S, Mohammed Z, McCall P, Willder JM, Roseweir AK, Underwood MA, et al. Loss of signal transducer and activator of transcription 1 is associated with prostate cancer recurrence. *Molecular Carcinogenesis*. 2016;55(11):1667-77.
242. Don-Doncow N, Marginean F, Coleman I, Nelson PS, Ehrnström R, Krzyzanowska A, et al. Expression of STAT3 in Prostate Cancer Metastases. *European urology*. 2017;71(3):313-6.
243. Abdulghani J, Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, Leiby B, Bonuccelli G, et al. Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer. *The American journal of pathology*. 2008;172(6):1717-28.
244. Spiotto MT, Chung TDK. STAT3 mediates IL-6-induced neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. *The Prostate*. 2000;42(3):186-95.
245. Tam L, McGlynn LM, Traynor P, Mukherjee R, Bartlett JM, Edwards J. Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer. *British journal of cancer*. 2007;97(3):378-83.
246. Zemskova M, Sahakian E, Bashkirova S, Lilly M. The PIM1 kinase is a critical component of a survival pathway activated by docetaxel and promotes survival of docetaxel-treated prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(30):20635-44.
247. Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest*. 1997;99(4):618-27.
248. Li H, Zhang Y, Glass A, Zellweger T, Gehan E, Bubendorf L, et al. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription-5 in Prostate Cancer Predicts Early Recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(16):5863-8.
249. Mirtti T, Leiby BE, Abdulghani J, Aaltonen E, Pavela M, Mamtani A, et al. Nuclear Stat5a/b predicts early recurrence and prostate cancer-specific death in patients treated by radical prostatectomy. *Human pathology*. 2013;44(3):310-9.
250. Haddad BR, Gu L, Mirtti T, Dagvadorj A, Vogiatzi P, Hoang DT, et al. STAT5A/B gene locus undergoes amplification during human prostate cancer progression. *Am J Pathol*. 2013;182(6):2264-75.
251. Talati PG, Gu L, Ellsworth EM, Gironde MA, Trerotola M, Hoang DT, et al. Jak2-Stat5a/b Signaling Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem-Like Cell Properties in Prostate Cancer. *The American journal of pathology*. 2015;185(9):2505-22.
252. Gu L, Vogiatzi P, Pühr M, Dagvadorj A, Lutz J, Ryder A, et al. Stat5 promotes metastatic behavior of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Endocrine-related cancer*. 2010;17(2):481-93.
253. Maranto C, Udhane V, Hoang DT, Gu L, Alexeev V, Malas K, et al. STAT5A/B Blockade Sensitizes Prostate Cancer to Radiation through Inhibition of RAD51 and DNA Repair. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(8):1917-31.

254. Liao Z, Gu L, Vergalli J, Mariani S, De Dominici M, Lokareddy R, et al. Structure-Based Screen Identifies a Potent Small Molecule Inhibitor of Stat5a/b with Therapeutic Potential for Prostate Cancer and Chronic Myeloid Leukemia. *Molecular cancer therapeutics*. 2015;14.
255. Maranto C, Udhane V, Jia J, Verma R, Müller-Newen G, LaViolette PS, et al. Prospects for Clinical Development of Stat5 Inhibitor IST5-002: High Transcriptomic Specificity in Prostate Cancer and Low Toxicity In Vivo. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11).
256. Wingelhofer B, Maurer B, Heyes EC, Cumaraswamy AA, Berger-Becvar A, de Araujo ED, et al. Pharmacologic inhibition of STAT5 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018;32(5):1135-46.
257. Brachet-Botineau M, Polomski M, Neubauer HA, Juen L, Hédou D, Viaud-Massuard M-C, et al. Pharmacological Inhibition of Oncogenic STAT3 and STAT5 Signaling in Hematopoietic Cancers. *Cancers*. 2020;12(1):240.
258. Cortes JE, Kim DW, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, Dyagil I, Griskevicius L, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3486-92.
259. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*. 2016;34(20):2333-40.
260. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *New England Journal of Medicine*. 2017;377(5):454-64.
261. Pinz S, Unser S, Rasclé A. The Natural Chemopreventive Agent Sulforaphane Inhibits STAT5 Activity. *PLOS ONE*. 2014;9(6):e99391.
262. Blasius R, Reuter S, Henry E, Dicato M, Diederich M. Curcumin regulates signal transducer and activator of transcription (STAT) expression in K562 cells. *Biochemical pharmacology*. 2006;72(11):1547-54.
263. Liu S, Walker SR, Nelson EA, Cerulli R, Xiang M, Toniolo PA, et al. Targeting STAT5 in hematologic malignancies through inhibition of the bromodomain and extra-terminal (BET) bromodomain protein BRD2. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(5):1194-205.
264. Tan Y, Wang L, Du Y, Liu X, Chen Z, Weng X, et al. Inhibition of BRD4 suppresses tumor growth in prostate cancer via the enhancement of FOXO1 expression. *Int J Oncol*. 2018;53(6):2503-17.
265. Nelson EA, Walker SR, Xiang M, Weisberg E, Bar-Natan M, Barrett R, et al. The STAT5 Inhibitor Pimozide Displays Efficacy in Models of Acute Myelogenous Leukemia Driven by FLT3 Mutations. *Genes & cancer*. 2012;3(7-8):503-11.
266. Nelson EA, Walker SR, Weisberg E, Bar-Natan M, Barrett R, Gashin LB, et al. The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood*. 2011;117(12):3421-9.
267. Egolf A, Coffey BJ. Current pharmacotherapeutic approaches for the treatment of Tourette syndrome. *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)*. 2014;50(2):159-79.

268. Zhou W, Chen MK, Yu HT, Zhong ZH, Cai N, Chen GZ, et al. The antipsychotic drug pimozide inhibits cell growth in prostate cancer through suppression of STAT3 activation. *Int J Oncol.* 2016;48(1):322-8.
269. Chen JJ, Cai N, Chen GZ, Jia CC, Qiu DB, Du C, et al. The neuroleptic drug pimozide inhibits stem-like cell maintenance and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(11):17593-609.
270. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer research.* 1983;43(4):1809-18.
271. Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, et al. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(2):534-40.
272. Sun C, Shi Y, Xu LL, Nageswararao C, Davis LD, Segawa T, et al. Androgen receptor mutation (T877A) promotes prostate cancer cell growth and cell survival. *Oncogene.* 2006;25(28):3905-13.
273. Taplin ME, Bublely GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *The New England journal of medicine.* 1995;332(21):1393-8.
274. Suzuki H, Akakura K, Komiya A, Aida S, Akimoto S, Shimazaki J. Codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancer: relation to antiandrogen withdrawal syndrome. *The Prostate.* 1996;29(3):153-8.
275. Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, Chung LW. Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *International journal of cancer.* 1994;57(3):406-12.
276. Liao Y, Liu Y, Xia X, Shao Z, Huang C, He J, et al. Targeting GRP78-dependent AR-V7 protein degradation overcomes castration-resistance in prostate cancer therapy. *Theranostics.* 2020;10(8):3366-81.
277. Kuruma H, Matsumoto H, Shiota M, Bishop J, Lamoureux F, Thomas C, et al. A Novel Antiandrogen, Compound 30, Suppresses Castration-Resistant and MDV3100-Resistant Prostate Cancer Growth In Vitro and In Vivo. *Molecular cancer therapeutics.* 2013;12(5):567-76.
278. Coleman DJ, Van Hook K, King CJ, Schwartzman J, Lisac R, Urrutia J, et al. Cellular androgen content influences enzalutamide agonism of F877L mutant androgen receptor. *Oncotarget.* 2016;7(26):40690-703.
279. Klein KA, Reiter RE, Redula J, Moradi H, Zhu XL, Brothman AR, et al. Progression of metastatic human prostate cancer to androgen independence in immunodeficient SCID mice. *Nature Medicine.* 1997;3(4):402-8.
280. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology.* 1979;17(1):16-23.
281. Hoosein NM, Boyd DD, Hollas WJ, Mazar A, Henkin J, Chung LW. Involvement of urokinase and its receptor in the invasiveness of human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer communications.* 1991;3(8):255-64.

282. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*. 2011;71(15):1668-79.
283. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.
284. Loewe S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittel-Forschung*. 1953;3(6):285-90.
285. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
286. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
287. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
288. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):7276-80.
289. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR methods and applications*. 1995;4(6):357-62.
290. Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*. 1969;166(3906):747-9.
291. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*. 2003;57(3):205-25.
292. Murthy S, Wu M, Bai VU, Hou Z, Menon M, Barrack ER, et al. Role of Androgen Receptor in Progression of LNCaP Prostate Cancer Cells from G1 to S Phase. *PLOS ONE*. 2013;8(2):e56692.
293. Teo MY, Rathkopf DE, Kantoff P. Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Annual review of medicine*. 2019;70:479-99.
294. Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & development*. 2018;32(17-18):1105-40.
295. Nakazawa M, Paller C, Kyprianou N. Mechanisms of Therapeutic Resistance in Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2017;19(2):13-.
296. Gu L, Liao Z, Hoang DT, Dagvadorj A, Gupta S, Blackmon S, et al. Pharmacologic inhibition of Jak2-Stat5 signaling By Jak2 inhibitor AZD1480 potently suppresses growth of both primary and castrate-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(20):5658-74.

297. Bishop JL, Sio A, Angeles A, Roberts ME, Azad AA, Chi KN, et al. PD-L1 is highly expressed in Enzalutamide resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 2015;6(1):234-42.
298. Erb HHH, Bodenbender J, Handle F, Diehl T, Donix L, Tsaour I, et al. Assessment of STAT5 as a potential therapy target in enzalutamide-resistant prostate cancer. *PLoS One*. 2020;15(8):e0237248.
299. Abazid A, Martin B, Choinowski A, McNeill RV, Brandenburg LO, Ziegler P, et al. The androgen receptor antagonist enzalutamide induces apoptosis, dysregulates the heat shock protein system, and diminishes the androgen receptor and estrogen receptor β 1 expression in prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2019;120(10):16711-22.
300. Ben-Salem S, Venkadakrishnan VB, Heemers HV. Novel insights in cell cycle dysregulation during prostate cancer progression. *Endocrine-related cancer*. 2021;28(6):R141-R55.
301. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2021.
302. Qi W, Morales C, Cooke LS, Johnson B, Somer B, Mahadevan D. Reciprocal feedback inhibition of the androgen receptor and PI3K as a novel therapy for castrate-sensitive and -resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 2015;6(39):41976-87.
303. Bai VU, Cifuentes E, Menon M, Barrack ER, Reddy GP-V. Androgen receptor regulates Cdc6 in synchronized LNCaP cells progressing from G1 to S phase. *Journal of cellular physiology*. 2005;204(2):381-7.
304. Cifuentes E, Croxen R, Menon M, Barrack ER, Reddy GPV. Synchronized prostate cancer cells for studying androgen regulated events in cell cycle progression from G1 into S phase. *Journal of cellular physiology*. 2003;195(3):337-45.
305. Kwon EM, Holt SK, Fu R, Kolb S, Williams G, Stanford JL, et al. Androgen metabolism and JAK/STAT pathway genes and prostate cancer risk. *Cancer epidemiology*. 2012;36(4):347-53.
306. Kroon P, Berry PA, Stower MJ, Rodrigues G, Mann VM, Simms M, et al. JAK-STAT blockade inhibits tumor initiation and clonogenic recovery of prostate cancer stem-like cells. *Cancer research*. 2013;73(16):5288-98.
307. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & development*. 1993;7(5):812-21.
308. Day KC, McCabe MT, Zhao X, Wang Y, Davis JN, Phillips J, et al. Rescue of embryonic epithelium reveals that the homozygous deletion of the retinoblastoma gene confers growth factor independence and immortality but does not influence epithelial differentiation or tissue morphogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(46):44475-84.
309. Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4215-24.
310. Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA. Cell cycle control in breast cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;97(2):261-74.
311. Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):298-306.

312. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol.* 2013;183(1):3-9.
313. Ju X, Casimiro MC, Gormley M, Meng H, Jiao X, Katiyar S, et al. Identification of a cyclin D1 network in prostate cancer that antagonizes epithelial-mesenchymal restraint. *Cancer research.* 2014;74(2):508-19.
314. Chen Y, Martinez LA, LaCava M, Coghlan L, Conti CJ. Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1. *Oncogene.* 1998;16(15):1913-20.
315. Ding Z, Wu C-J, Chu GC, Xiao Y, Ho D, Zhang J, et al. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature.* 2011;470(7333):269-73.
316. Xiao Z, Liang J, Deng Q, Song C, Yang X, Liu Z, et al. Pimozide augments bromocriptine lethality in prolactinoma cells and in a xenograft model via the STAT5/cyclin D1 and STAT5/Bcl-xL signaling pathways. *Int J Mol Med.* 2021;47(1):113-24.
317. Handle F, Prekovic S, Helsen C, Van den Broeck T, Smeets E, Moris L, et al. Drivers of AR indifferent anti-androgen resistance in prostate cancer cells. *Scientific Reports.* 2019;9(1):13786.
318. Mu P, Zhang Z, Benelli M, Karthaus WR, Hoover E, Chen C-C, et al. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53-and RB1-deficient prostate cancer. *Science.* 2017;355(6320):84-8.
319. Vlachostergios PJ, Puca L, Beltran H. Emerging variants of castration-resistant prostate cancer. *Curr Oncol Rep.* 2017;19(5):32.
320. Simpson HM, Furusawa A, Sadashivaiah K, Civin CI, Banerjee A. STAT5 inhibition induces TRAIL/DR4 dependent apoptosis in peripheral T-cell lymphoma. *Oncotarget.* 2018;9(24):16792-806.
321. Dakir el H, Pickard A, Srivastava K, McCrudden CM, Gross SR, Lloyd S, et al. The anti-psychotic drug pimozide is a novel chemotherapeutic for breast cancer. *Oncotarget.* 2018;9(79):34889-910.
322. Taub R, Baker M. Treatment of metastatic malignant melanoma with pimozide. *The Lancet.* 1979;313(8116):605.
323. Strobl JS, Kirkwood KL, Lantz TK, Lewine MA, Peterson VA, Worley JF, 3rd. Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine. *Cancer research.* 1990;50(17):5399-405.
324. Mohanty SK, Yagiz K, Pradhan D, Luthringer DJ, Amin MB, Alkan S, et al. STAT3 and STAT5A are potential therapeutic targets in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(49):85997-6010.
325. ERB HHH, OSTER MA, GELBRICH N, CAMMANN C, THOMAS C, MUSTEA A, et al. Enzalutamide-induced Proteolytic Degradation of the Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells Is Mediated Only to a Limited Extent by the Proteasome System. *Anticancer Research.* 2021;41(7):3271-9.
326. Hoang DT, Gu L, Liao Z, Shen F, Talati PG, Koptyra M, et al. Inhibition of Stat5a/b Enhances Proteasomal Degradation of Androgen Receptor Liganded by Antiandrogens in Prostate Cancer. *Molecular cancer therapeutics.* 2015;14(3):713-26.

327. Song C, Kim Y, Min GE, Ahn H. Dihydrotestosterone enhances castration-resistant prostate cancer cell proliferation through STAT5 activation via glucocorticoid receptor pathway. *The Prostate*. 2014;74(12):1240-8.
328. Baugh Jr. JE, Floyd ZE, Stephens JM. The Modulation of STAT5A/GR Complexes during Fat Cell Differentiation and in Mature Adipocytes. *Obesity*. 2007;15(3):583-90.
329. Stöcklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*. 1996;383(6602):726-8.
330. Nam S, Scuto A, Yang F, Chen W, Park S, Yoo H-S, et al. Indirubin derivatives induce apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells involving inhibition of Stat5 signaling. *Molecular oncology*. 2012;6(3):276-83.
331. Müller J, Sperl B, Reindl W, Kiessling A, Berg T. Discovery of chromone-based inhibitors of the transcription factor STAT5. *Chembiochem*. 2008;9(5):723-7.
332. Engelman JA, Settleman J. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):73-9.
333. Elumalai N, Berg A, Rubner S, Blechschmidt L, Song C, Natarajan K, et al. Rational development of Stafib-2: a selective, nanomolar inhibitor of the transcription factor STAT5b. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-9.
334. Cumaraswamy AA, Lewis AM, Geletu M, Todici A, Diaz DB, Cheng XR, et al. Nanomolar-potency small molecule inhibitor of STAT5 protein. *ACS medicinal chemistry letters*. 2014;5(11):1202-6.

9 Veröffentlichungen

Aus der Dissertation ist folgende Publikation entstanden:

Erb H, **Bodenbender J**, Handle F, Diehl T, Donix L, Tsaur I, Gleave M, Haferkamp A, Huber J, Füssel S, Jüngel E, Culig Z, Thomas C: Assessment of STAT5 as a potential therapy target in enzalutamide-resistant prostate cancer. PLoS One 2020.

Außerdem wurden Teile der Arbeit im Rahmen von Kongressen vorgestellt:

Erb H, **Bodenbender J**, Culig Z, Thomas C: Inhibition des Transkriptions-faktors STAT5B resensitiviert MR49F-Prostatakarzinom-Zellen für Enzalutamid. 13. Nordkongress Urologie, Hamburg 2019.

Erb H, **Bodenbender J**, Handle F, Diehl T, Tsaur I, Gleave M, Haferkamp A, Füssel S, Huber J, Jüngel E, Culig Z, Thomas C: Inhibition des Transkriptionsfaktors STAT5B resensitiviert MR49F-Prostatakarzinom-Zellen für Enzalutamid. 60. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie, Stuttgart 2019.

Erb H, **Bodenbender J**, Diehl T, Tsaur I, Jüngel E, Gleave M, Haferkamp A, Culig Z, Thomas C: Overcoming enzalutamide-resistance by inhibition of the transcription factor Stat5b in prostate cancer. 34th Annual EAU Congress, Barcelona 2019.

Erb H, **Bodenbender J**, Diehl T, Tsaur I, Gleave M, Culig Z, Haferkamp A, Jüngel E, Thomas C: Overcoming Enzalutamide-Resistance by Inhibition of the Transcription Factor STAT5B in Prostate Cancer. 10. Symposium der Arbeitsgruppe urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Mainz 2018.

Erb H, **Bodenbender J**, Diehl T, Tsaur I, Gleave M, Culig Z, Haferkamp A, Jüngel E, Thomas C: Inhibition of Transcription Factor STAT5B resensitizes MR49F Prostate Cancer Cells to Enzalutamide. 2nd Translational Science Meeting, Innsbruck 2018.

Thomas C, Erb H, **Bodenbender J**, Diehl T, Tsaur I, Gleave M, Culig Z, Jüngel E, Haferkamp A: Overcoming enzalutamide-resistance by specific knockdown of transcription-factor STAT5 in prostate cancer. 33rd Annual EAU Congress, Kopenhagen 2018.

10 Danksagung

11 Tabellarischer Lebenslauf

