

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

Die Bedeutung von STAT5 für das Wachstum taxanresistenter Prostatakarzinome

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

Vorgelegt von

Sophia Elisabeth Magnus
aus Berlin-Charlottenburg

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

22.05.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	2
2.1 Das Prostatakarzinom (PCa)	2
2.1.1 Epidemiologie	2
2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
2.1.3 Symptome, Diagnostik und Stadieneinteilung.....	3
2.1.4 Prognose.....	4
2.1.5 Therapie.....	4
2.2 STAT5.....	12
2.2.1 Familie der STAT-Proteine.....	12
2.2.2 Aktivierung von STAT-Proteinen und der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg	12
2.2.3 Das STAT-Protein STAT5.....	13
2.2.4 Funktion von STAT-Proteinen.....	13
2.2.5 Bekannte Auswirkungen von STAT-Proteinen und insbesondere von STAT5 auf die Karzinomentstehung, Metastasierung und Ausbildung von Resistenzen	14
2.3 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und ihre Rolle in der Ausbildung taxanresistenter PCa	15
3 Ziel der Dissertation	17
4 Material und Methoden	18
4.1 Material	18
4.1.1 Verbrauchsmaterialien	18
4.1.2 Reagenzien.....	19
4.1.3 Geräte und Arbeitsutensilien.....	22
4.1.4 Zelllinien.....	24
4.2 Methoden.....	25
4.2.1 Zellbiologische Methoden	25
4.2.2 Proliferationsassay - Resistenznachweis.....	26
4.2.3 Western Blot Analyse.....	28
4.2.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (<i>real-time quantitative</i> PCR).....	36

4.2.5	Evaluation der funktionellen Relevanz von STAT5	38
4.2.6	Statistische Auswertung.....	41
5	Ergebnisse.....	42
5.1	Resistenznachweis der Zellen: Proliferation unter Docetaxel oder Cabazitaxel - Bestimmung des IC50-Wertes in den parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen.....	42
5.2	Charakterisierung parentaler versus therapieresistenter PCa-Zellen.....	44
5.2.1	Proteinexpression der Differenzierungsmarker E-Cadherin und Vimentin in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen	44
5.2.2	Evaluation der Expression von Proteinen des Androgen-Signalwegs in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen	48
5.2.3	Proteinexpression des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen.....	49
5.2.4	Die Signalwandler und Aktivator der Transkription 5 (STAT5)-Expression auf Protein-Ebene von parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen.....	50
5.2.5	Die STAT5-Expression auf RNA-Ebene von parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen.....	52
5.3	Der Einfluss des STAT5-Knock-downs auf das Wachstumsverhalten parentaler und taxanresistenter PCa-Zellen	54
6	Diskussion.....	56
6.1	Resistenzinduktion und die daraus resultierenden Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von PCa-Zellen.....	56
6.2	Wandlung der Expressionsprofile taxanresistenter PCa-Zellen	57
6.2.1	Die Veränderung der Expression der Differenzierungsmarker E-Cadherin und Vimentin in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen liefert Hinweise auf die EMT.....	57
6.2.2	Expression von Proteinen des Androgen-Signalwegs in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen.....	58
6.2.3	Die Expression des GR steigt in docetaxelresistenten, nicht jedoch in cabazitaxelresistenten, PCa-Zellen an.....	59
6.2.4	Die STAT5-Expression zeigt sich in taxanresistenten PCa-Zellen vermehrt erhöht.....	61
6.3	Der Einfluss von STAT5 auf das Wachstumsverhalten taxanresistenter PCa-Zellen	63
6.4	Ausblick	66
7	Zusammenfassung	67
8	Literaturverzeichnis.....	69
9	Anhang	81
9.1	Gleason-Score.....	81

Inhaltsverzeichnis

9.2	UICC-Stadien.....	82
9.3	Etablierung der Ladekontrolle für die Western Blot-Analyse als Verrechnungsgrundlage: Untersuchung der Haushaltsgene GAPDH, β -Aktin und des Gesamtproteins.....	83
9.4	Etablierung der siRNA-Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX [®] und Lipofectamine 3.000 [®] Reagent	85
9.4.1	Etablierung einer siRNA-Transfektion unter Verwendung von Lipofectamine RNAiMAX [®]	85
9.4.2	siRNA-Transfektion unter Verwendung von Lipofectamine 3000 [®] Reagent	90
9.4.3	Nachweis der siRNA-Blockade (Transfektionskontrolle) auf Protein- und RNA-Ebene.....	95
10	Danksagung	98
11	Curriculum Vitae	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Wirkweise von Taxanen auf Mikrotubuli und den Androgen-Rezeptor-Signalweg.....	7
Abbildung 2:	Signaltransduktion durch rezeptorassoziierte Tyrosinkinase des JAK-STAT-Signalweges.	13
Abbildung 3:	Der in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendete Größenstandard.....	32
Abbildung 4:	Aufbau der Western Blot Apparatur für die Western Hybridisierung	34
Abbildung 5:	Dosis-Wirkungs-Kurven der Prostatakarzinom-Zelllinien unter Behandlung mit Docetaxel/Cabazitaxel	43
Abbildung 6:	Western Blot Analyse: E-Cadherin-Expression in parentalen und docetaxel- bzw. cabazitaxelresistenten PCa-Zellen.....	45
Abbildung 7:	Western Blot Analyse: Vimentin-Expression.....	47
Abbildung 8:	Western Blot Analyse: AR- und PSA-Expression.	48
Abbildung 9:	Western Blot Analyse: Glukokortikoid-Rezeptor-Expression.	50
Abbildung 10:	Western Blot Analyse: STAT5-Expression.	51
Abbildung 11:	STAT5A- und STAT5B-Expression auf RNA-Ebene.....	53
Abbildung 12:	Wachstumskinetiken der PCa-Zelllinien nach siRNA- <i>Knock-down</i> von STAT5.....	55
Abbildung 13:	Schematische Darstellung des Gleason-Scores.....	81
Abbildung 14:	Aktuelle pTNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (UICC).....	82
Abbildung 15:	Expression des Haushaltgens GAPDH.....	83
Abbildung 16:	Expression des Haushaltgens β -Aktin.	84
Abbildung 17:	Gesamtproteinmenge im Western Blot.....	85
Abbildung 18:	Etablierung des Transfektionsprotokolls für Lipofectamine [®] RNAiMAX Reagent.	86
Abbildung 19:	Etablierung des Transfektionsprotokolls für Lipofectamine [®] RNAiMAX Reagent.	87
Abbildung 20:	Ablaufschema und Erfolg der STAT5-siRNA-Transfektion mit Lipofectamine [®] 3000 Reagent.	91
Abbildung 21:	Dosis-Wirkungsanalysen nach Transfektion mit Lipofectamine [®] 3000 Reagent.	92
Abbildung 22:	Ablaufschema und Erfolg der STAT5-siRNA-Transfektion mit Lipofectamine [®] 3000 Reagent.	94
Abbildung 23:	Wirkungsanalysen nach Transfektion mit Lipofectamine [®] 3000 Reagent.	95
Abbildung 24:	Nachweis des STAT5A- bzw. STAT5B-Knock-down mittels siRNA in DU145 anhand der STAT5-Expression auf Protein-Ebene.....	96

Abbildung 25: Nachweis des *STAT5-Knock-downs* in DU145 auf RNA-Ebene.....97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Verbrauchsmaterialien und die dazugehörigen Hersteller mit Firmensitz	18
Tabelle 2:	Verwendeten Chemikalien und die dazugehörigen Hersteller mit Firmensitz	19
Tabelle 3:	Verwendeten Geräte sowie Arbeitsutensilien und die dazugehörigen Hersteller mit Firmensitz	22
Tabelle 4:	Übersicht über die genutzten Zellzahlen sowie Konzentrationen von Docetaxel und Cabazitaxel für die Bestimmung der Zellproliferation (BrdU).....	27
Tabelle 5:	Zusammensetzung des Extraktionspuffers.....	29
Tabelle 6:	Zusammensetzung des RIPA-Puffers.....	29
Tabelle 7:	Zusammensetzung Bradfordreagenz in fünffacher Konzentration	30
Tabelle 8:	Zusammensetzung Trenngel	30
Tabelle 9:	Zusammensetzung Trenngelpuffer	30
Tabelle 10:	Zusammensetzung Sammelgel	31
Tabelle 11:	Zusammensetzung Sammelgelpuffer	31
Tabelle 12:	Einfachkonzentrierter Laufpuffer der SDS-Page.....	32
Tabelle 13:	Zusammensetzung des Tank-Blot-Puffers der SDS-Page.....	33
Tabelle 14:	Zusammensetzung des TBS-Puffers	35
Tabelle 15:	Zusammensetzung des TBS-T-Puffers.....	35
Tabelle 16:	Zusammensetzung der Coomassie- <i>Destaining-Solution</i>	35
Tabelle 17:	Primäre Antikörper Western Blot	36
Tabelle 18:	Sekundäre Antikörper Western Blot.....	36
Tabelle 19:	Standardansatz für die qPCR	38
Tabelle 20:	Transfektionsansatz mit Lipofectamine 3000.....	40
Tabelle 21:	Zusammensetzung des für den MTT-Assay genutzten Solubilisierungspuffers.....	41
Tabelle 22:	Ermittelte IC50-Werte der parentalen (par) und docetaxelresistenten (DR) Zelllinien	44
Tabelle 23:	Ermittelte IC50-Werte parentaler (par) und cabazitaxelresistenter (CR) Zelllinien.....	44
Tabelle 24:	Transfektionsansatz für die Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX	88
Tabelle 25:	Transfektionsansatz mit Lipofecamine 3000. Angabe der Volumina der Transfektionsreagenzien in Abhängigkeit zur Plattenart.....	90

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADT	<i>Androgen-deprivation Therapy</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CR	cabazitaxelresistent
CRPC	<i>Castration-resistant Prostate Cancer</i>
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DR	docetaxelresistent
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
H ₂ O	Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
JAK	Janus-Kinase
M	Mol
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetra-zoliumbromid
n	Anzahl
nM	Nanomol

Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
NSCLC	<i>Non-small Cell Lung Cancer</i>
par	parental (unbehandelte Zellen)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCa	Prostatakarzinom
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet- derived Growth Factor</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>Revolutions per Minute</i>
SDS-Page	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
TBP	<i>TATA-binding Protein</i>
TBST	<i>TRIS-buffered Saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	TRIS(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
V	Volt

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes in Deutschland (1). Mit 14.500 Sterbefällen jährlich stellt es darüber hinaus in dieser Bevölkerungsgruppe die zweithäufigste karzinombedingte Todesursache dar.

Die Chemotherapie mit den Taxanen Docetaxel und Cabazitaxel ist dabei Bestandteil der Standardtherapie des metastasierten PCa (2). Unter Docetaxeltherapie zeigen sich positive Effekte, wie eine Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens, eine Schmerzreduktion, sinkende prostataspezifisches Antigen (PSA)-Level und ein Anstieg der Lebensqualität. Der Zugewinn an Lebenszeit durch die Docetaxeltherapie liegt jedoch im Bereich weniger Monate (3-5). Auch sprechen initial nicht alle Patienten auf die Chemotherapie an und es kommt in der Regel zur Ausbildung einer Therapieresistenz (6). Cabazitaxel kann bei Therapieversagen von Docetaxel eingesetzt werden (2, 7-9). Aber auch die Behandlung mit Cabazitaxel resultiert in einer Therapieresistenz. Die Identifikation der dieser Resistenzentwicklung zugrunde liegenden Mechanismen ist daher essentiell, um der Therapieresistenz entgegenwirken und die therapeutischen Optionen für PCa-Patienten verbessern zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher die Hintergründe für eine Therapieresistenz gegen die Taxane Docetaxel und Cabazitaxel untersucht.

STAT-Proteine (*Signal Transducers and Activators of Transkription*) haben ihre potentielle Bedeutung im Tumorprogress von verschiedenen Tumoren gezeigt. Für Vertreter dieser Proteinfamilie konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle in der Entstehung von Resistenzen spielen (10, 11). Sie nehmen vielfältig Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Wachstum und Proliferation. Insbesondere für den Transkriptionsfaktor STAT5 zeigten Untersuchungen eine fördernde Rolle auf das Wachstum und die Metastasierung im fortgeschrittenen Stadium des Prostatakarzinoms (12, 13). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass STAT5 Einfluss auf den Androgenrezeptor (AR) nimmt, dem eine zentrale Bedeutung in der Pathophysiologie des PCa zukommt (14, 15). Auch gibt es Hinweise darauf, dass STAT5 in die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) involviert ist (16). Interessanterweise wird dieser Vorgang auch mit der Entstehung von Docetaxelresistenzen in Verbindung gebracht (6). Die genaue funktionelle Rolle von STAT5 in taxanresistenten Zellen ist jedoch noch unbekannt.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Prostatakarzinom (PCa)

2.1.1 Epidemiologie

Das PCa ist mit 22,7 % aller diagnostizierten Krebsneuerkrankungen und einer jährlichen Inzidenz von etwa 60.000 die häufigste Krebserkrankung des Mannes in Deutschland (2, 17). Die altersstandardisierte Inzidenz variiert weltweit und liegt für Deutschland bei 107,1 Erkrankten/100.000 Männer. Insgesamt scheinen geographische Faktoren sowie ethnische Zugehörigkeiten eine Rolle zu spielen. So weisen afroamerikanische Männer die höchste Inzidenz auf. Weiße Nordamerikaner und Europäer sind seltener betroffen, wobei sich innerhalb Europas ein Nord-Süd-Gefälle zeigt. Asiaten erkranken selten (1, 2, 18). Migrationsstudien zeigen allerdings auch, dass die Inzidenz- und Mortalitätsraten migrierender Männer von Ländern mit niedrigem in Länder mit hohem Karzinomrisiko stiegen, was den Einfluss von Lifestylefaktoren nahelegt (19). Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 72 Jahren. Mit ca. 14.500 karzinombedingten Sterbefällen pro Jahr stellt das PCa, nach dem Lungenkarzinom, mit einem prozentualen Anteil von 11,6 % die zweithäufigste Krebstodesursache des Mannes in Deutschland dar. Das mittlere Sterbealter liegt bei 80 Jahren (17). Insgesamt beträgt die Lebenszeitprävalenz der männlichen Bevölkerung der westlichen Welt 40 %, wobei nur 10 % dieser Erkrankungsfälle symptomatisch werden und das Risiko an Prostatakrebs zu versterben 3 % beträgt (20). Im Hinblick auf die demographische Entwicklung, mit starkem Anwachsen des Anteils der über 60-jährigen Bevölkerung, sowie der in den letzten Jahren stetig verbesserten diagnostischen Möglichkeiten, ist sowohl ein Zuwachs der Inzidenz als auch der Prävalenz des PCa anzunehmen (2, 21).

2.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Es werden zahlreiche Risikofaktoren in Zusammenhang mit dem Auftreten des PCa diskutiert. Als hinreichend belegt gelten drei Hauptrisikofaktoren: Alter, ethnische Herkunft, sowie genetische Prädisposition (22). So ist das Erkrankungsrisiko für einen 75-Jährigen in Deutschland fünfzigmal höher als für einen 35-Jährigen (1), eine vergleichbare Tendenz findet sich auch international (23). Auch eine positive Familienanamnese ist als Risikofaktor beschrieben. Für Verwandte ersten Grades eines Erkrankten steigt das relative Risiko, ebenfalls ein PCa zu entwickeln, auf mehr

als das Doppelte an (24, 25). Weiterhin gelten eine hohe Anzahl erkrankter Verwandter, oder deren niedriges Erkrankungsalter, sowie ein höherer Grad der Verwandtschaft als erhöhende Risikofaktoren (25, 26).

Wie bereits unter 2.1.1 dargelegt, zeigen sich zudem geographische Unterschiede in der Auftretenshäufigkeit des klinisch apparent werdenden PCa. Daneben gibt es Hinweise auf den Einfluss exogener Faktoren wie das Ernährungsverhalten und sozioökonomische Gesichtspunkte auf die Progression des PCa (27-29). Auch das Sexualverhalten, chronische Erkrankungen, eine Testosteronsubstitution, die Einnahme von 5-alpha-Reduktase-Hemmern und berufsbedingte Schadstoffexposition werden diskutiert (30-32).

2.1.3 Symptome, Diagnostik und Stadieneinteilung

Das PCa bleibt in frühen Stadien meist symptomlos. Erst durch verdrängendes und infiltratives Wachstum kommt es zu Symptomen wie Harnverhalt, Hämaturie, Inkontinenz und Impotenz. Häufig sind auch Knochenschmerzen als Erstsymptom bei zumeist lumbosakraler ossärer Metastasierung. In Deutschland wird zur Früherkennung des PCa für Männer ab dem Alter von 45 Jahren die digital-rektale Untersuchung (DRU) angeboten. Eine weitere zur Basisdiagnostik genutzte Untersuchung ist die Bestimmung des PSA -Wertes, sie ist aktuell noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion und wird nicht von den Krankenkassen bezahlt (33). Auch sind Wert und Risiken dieser Früherkennungsuntersuchungen hinsichtlich Überdiagnostik und -therapie wissenschaftlich noch umstritten, da das PCa im lokal begrenzten Stadium oder bei mäßiger Differenzierung einen protrahierten, relativ gutartigen Verlauf zeigt (34-38). Weitere zur Bestimmung der Tumorausbreitung (*Staging*) genutzte Untersuchungsmethoden sind der transrektale Ultraschall, die Stanzbiopsie der Prostata und weitere bildgebende Diagnostiken wie die Abdomensonographie, Computertomographie (CT) bzw. Magnetresonanztomographie (MRT) des Beckens, sowie die Skelettszintigraphie (39). Zur Stadieneinteilung wird die UICC-Klassifikation genutzt (siehe Anhang, Abbildung 14) (2). Die histologische Einteilung erfolgt anhand des Differenzierungsgrads nach Gleason. Der Gleason-Score errechnet sich aus der Addition zweier Gleason-Grade. Diese werden durch die mikroskopische Beurteilung der häufigsten und der am schlechtesten differenzierten Gleason-Grade in der Prostatastanzbiopsie oder durch die Addition des am häufigsten und dem am zweithäufigsten vorkommenden Gleason-

Grades eines Prostatektomiepräparates ermittelt. Je höher der Gleason-Score, desto höher der Grad der Entdifferenzierung. Der Gleason-Score ist einer der wichtigsten prognostischen Parameter des PCa ((40, 41) siehe Anhang, Abbildung 13) Eine Risikostratifizierung erfolgt nach D'Amico (42).

2.1.4 Prognose

Zur prognostischen Evaluation werden die drei folgenden Faktoren herangezogen: Die Tumor-Einstufung nach Gleason, das Stadium nach TNM-Klassifikation (43) sowie die histologische Beurteilung der Resektionsränder nach der OP. Prognostisch günstig sind hierbei ein niedriger Gleason-Score, eine niedrige TNM-Kategorie, sowie karzinomfreie Resektatränder. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Männer in Deutschland liegt bei 97 % im UICC-Stadium 1 und sinkt auf 52 % in Stadium 4 (1).

2.1.5 Therapie

Die Therapie des PCa ist komplex und richtet sich nach dem Tumorstadium sowie individuellen, patientenabhängigen Faktoren wie tumorunabhängiger Lebenserwartung, Komorbidität und Patientenwunsch. Neben aktiven Therapiestrategien stehen mit der *Active Surveillance* (aktive Überwachung) und dem palliativen Ansatz des *Watchful Waitings* (beobachtendes Abwarten) auch zwei primär abwartende Konzepte zur Verfügung (2).

Für lokal begrenzte Tumoren sind mit der radikalen Prostatektomie, ggf. mit Lymphadenektomie, der perkutanen Strahlentherapie und der interstitiellen Brachytherapie verschiedene kurative Therapieansätze etabliert. Eine Sonderstellung kommt dem Konzept der *Active Surveillance* zu. Hierbei werden regelmäßig Kontrolluntersuchungen durchgeführt, um im Falle einer Tumorprogression eine Therapie in kurativer Absicht einzuleiten. Adjuvant kann eine antiandrogene Hormon- oder eine Strahlentherapie erfolgen (44-49).

Bei Vorliegen von Fernmetastasen oder einer tumorunabhängigen Lebenserwartung von unter zehn Jahren wird dagegen auf palliative Therapiekonzepte zurückgegriffen. Dabei stehen mit der antiandrogenen Hormontherapie bzw. einer kombinierten Hormon-Chemotherapie oder dem *Watchful Waiting* vorrangig symptomorientierte therapeutische Optionen zur Verfügung (22, 50). Durch das typischerweise langsame Fortschreiten dieser Tumorerkrankung kann sich der Diagnose auch ohne kurative Therapie eine mehrere Jahre umfassende palliative Phase anschließen. Relevante

Komorbiditäten stellen hier oft den begrenzenden Faktor der Lebenserwartung dar (51). Ein nicht zu vernachlässigender Bestandteil aller palliativen Therapiekonzepte ist zudem die palliative Schmerztherapie (52). Sie kommt auch bei dem Auftreten von Knochenmetastasen zum Tragen. In dem Fall ist die Strahlentherapie zur Schmerzlinderung die auch heute noch am häufigsten verwendete Therapie.

Da die meisten PCa ein androgenabhängiges Wachstum zeigen (53), bietet die Androgendeprivation (ADT) einen effektiven therapeutischen Ansatzpunkt. Diese kann chemisch, z. B. durch GnRH-Analoga, oder operativ durch beidseitige Orchiektomie erreicht werden. Trotz der initial hohen Effektivität dieser therapeutischen Verfahren gehen so behandelte Karzinome in ein therapieresistentes, androgenunabhängiges Stadium (CRPC: *castration-resistant prostate cancer*) über. Neben einer Erweiterung der androgendeprivativen Therapie, beispielsweise mit Abirateron und Enzalutamid, wird daher darüber hinaus eine ergänzende Chemotherapie empfohlen (54-56). War das Chemotherapeutikum Docetaxel in Deutschland lange nur als Teil der Erstlinientherapie des CRPC zugelassen, wird eine kombinierte Hormon-Chemotherapie in der aktuellen Leitlinie auch zur Therapie des hormonsensitiven PCa empfohlen, da sich ein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben zeigte (2, 3, 57). Das Taxan Cabazitaxel kommt im Rahmen der Zweitlinientherapie bei CRPC nach Docetaxeltherapie zur Anwendung (7).

2.1.5.1 Die Gruppe der Taxane und ihre Rolle in der PCa-Therapie

Bei den Taxanen handelt es sich um Zytostatika natürlichen Ursprungs, ihre drei Vertreter sind das Paclitaxel, Docetaxel und Cabazitaxel. Taxane werden chemisch den Diterpenoiden zugeordnet. Ihren Ursprung nahmen die Taxane mit der Isolation von Paclitaxel aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*). Die Herstellung von Taxanen der zweiten Generation (Docetaxel und Cabazitaxel) erfolgt halbsynthetisch aus Extrakten der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) (58, 59). Die Erstzulassung eines Taxans in Deutschland erfolgte 1993 mit der Zulassung von Paclitaxel zur Therapie des Ovarialkarzinoms (60).

2.1.5.1.1 Wirkungsweise der Taxane

Taxane gehören zu den Mitosehemmstoffen und richten sich gegen die Mikrotubuli. Diese stellen einen wichtigen Teil des Zytoskelettes eukaryotischer Zellen dar und sind an vielfältigen Aufgaben, wie der Ausbildung des Spindelapparates, beteiligt. Sie

spielen damit eine zentrale Rolle während der Mitose (Kernteilung). Mikrotubuli bestehen aus röhrenförmigen Filamenten, welche sich aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren zusammensetzen und dynamischen Auf- und Abbauprozessen unterworfen sind. Ihre Wirkung entfalten die Taxane über eine Interaktion mit β -Tubulin, welche die Ausbildung von atypischen, funktionsgehemmten Mikrotubuli fördert und gleichzeitig die Tubulin-Depolarisation hemmt. Dies bewirkt einen Metaphasenarrest in der Mitose und die anschließende Induktion der Apoptose. Taxane wirken damit antiproliferativ und zytotoxisch (61).

Mikrotubuli spielen nicht nur eine Schlüsselrolle bei der Zellteilung, sondern auch in Transport- und Signalprozessen der Interphase (62, 63). Neuere Studien geben Hinweise auf weitere regulierende Einflüsse der Taxane auf endokrine Signalwege. Paclitaxel und Docetaxel beeinflussen die Aktivität und die Signalwege des Androgen-Rezeptors (AR) an unterschiedlichen Stellen. So konnte *in vitro* eine Reduktion der AR-Expression und der PSA-Sekretion durch Docetaxelbehandlung gezeigt werden. Auch eine Inhibition der AR-Translokation in den Zellkern und ein Rückgang sowohl der AR-Transkriptionsaktivität als auch der Aktivität der dem Signalweg nachgeschalteten Proteine wurde beschrieben (64, 65). Dies weist darauf hin, dass die unter Docetaxeltherapie verminderten PSA-Spiegel nicht allein auf die Zytotoxizität des Chemotherapeutikums, sondern weiterhin auf dessen Eingriff in den PSA-Stoffwechsel zurückzuführen sein könnten (66). Einen weiteren inhibitorischen Einfluss auf die AR-Aktivität sowie die PSA-Level und die Zellviabilität könnte auch die unter Paclitaxelbehandlung auftretende Akkumulation von FOXO1, einem den AR-unterdrückenden Transkriptionsfaktor, ausüben (67). Eine Übersicht über unterschiedliche bekannte Rezeptorinteraktionen von Taxanen zeigt Abbildung 1.

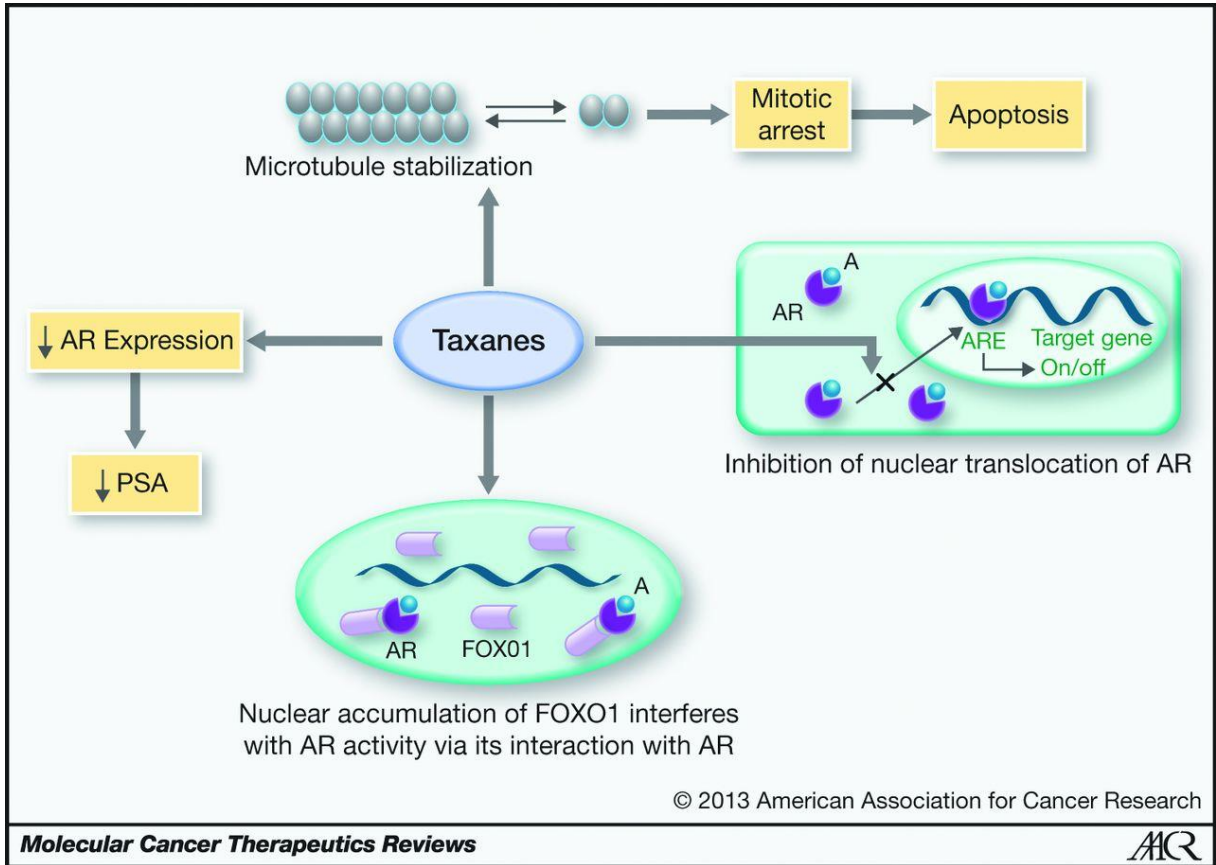


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkweise von Taxanen auf Mikrotubuli und den Androgen-Rezeptor-Signalweg. Taxane führen über eine Stabilisierung von Mikrotubuli zu einem Mitosearrest und damit zur Apoptose. Des Weiteren greifen sie in den Signalweg des AR ein, indem sie die AR-Expression herunterregulieren, was wiederum zu einem Abfall des PSA-Niveaus führt. Außerdem interferieren sie durch die Inhibition der Mikrotubulifunktion mit der Translokation des AR und Aktivierung des ARE in den Zellkern und damit der Expression von Zielgenen des AR. Auch die taxanbedingte Akkumulation von FOXO1 im Zellkern könnte einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des AR ausüben. A: Androgen, AR: Androgen-Rezeptor; ARE: Androgen-Rezeptor-Response-Element (68).

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen zur Wirkweise von Paclitaxel und Docetaxel scheint das Taxan Cabazitaxel seine Wirkung größtenteils über einen AR-unabhängigen Mechanismus zu entfalten (69).

2.1.5.1.2 Wirksamkeit von Docetaxel

Die Wirksamkeit von Docetaxel auf das CRPC wurde in zwei großen, voneinander unabhängigen Phase-III-Studien untersucht. In der TAX 327-Studie wurde randomisiert mit Mitoxantron und Prednisolon oder Docetaxel und Prednisolon behandelt (3). Es zeigte sich ein Überlebensvorteil der dreiwöchentlich mit Docetaxel und Prednisolon behandelten Patienten (4). Auch hinsichtlich der sekundären Studienendpunkte wie Schmerzintensität oder Lebensqualität zeigte sich ein Vorteil der Docetaxeltherapie im Vergleich zu Mitoxantron. In der SWOG (Southwest Oncology Group) 9916-Studie wurden die beiden Zytostatika Docetaxel und

Estramustin gegen Mitoxantron plus Prednisolon getestet. Auch hier zeigte sich eine Verbesserung des medianen Überlebens in der mit Docetaxel/Estramustin behandelten Gruppe (5). Im Oktober 2004 erfolgt daraufhin die Zulassung in der EU zur Therapie des hormonrefraktären metastasierten PCa (70).

Darüber hinaus wurde in mehreren großen randomisierten kontrollierten Studien (CHAARTED, GETUG-15, STAMPEDE) eine Kombinationstherapie aus Docetaxel und ADT untersucht (57). Die Ergebnisse der Studien zeigten insgesamt einen statistisch signifikanten Vorteil auf das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben unter einer kombinierten Hormon-Chemotherapie (57, 71). Dabei scheinen vor allem Patienten mit einer hohen Tumorlast von der kombinierten Hormon-Chemotherapie zu profitieren (71).

2.1.5.1.3 Resistenzbildung unter Docetaxeltherapie

Trotz der Verbesserung des Gesamtüberlebens unter Docetaxeltherapie spricht ein Teil der CRPC- Patienten nicht auf die Therapie an. Darüber hinaus kommt es auch bei initial gutem Ansprechen auf Docetaxel unweigerlich zur Ausbildung einer Therapieresistenz (72, 73). Die genauen Mechanismen dieser Resistenzbildung sind noch nicht vollständig geklärt. Allgemein wird in endogene Zellmechanismen und Veränderungen des Mikromilieus des Tumors unterschieden. Meist liegen innerhalb der Karzinompopulationen mehrere Resistenzmechanismen gleichzeitig vor (74).

Als Hauptmechanismen werden Veränderungen des Mikrotubulsystems (und damit eine verminderte Sensitivität gegenüber Docetaxel) und der vermehrte aktive Transport von Wirkstoffen aus der Zelle durch Transportproteine wie dem P-Glykoprotein verantwortlich gemacht (73, 75-77).

Dabei lassen sich in docetaxelresistenten PCa-Zellen Veränderungen an den Tubulinproteinen beobachten (78). Die Mehrheit der Mutationen betreffen die Docetaxel-Bindestellen, was in den meisten Fällen zu einer herabgesetzten Affinität zwischen Chemotherapeutikum und Tubulin führt. Daneben ist auch eine Überexpression des Mikrotubuli assoziierten Tau-Proteins beschrieben, welche mit einer reduzierten Docetaxelsensitivität einhergehen (78).

Darüber hinaus kommt es durch verschiedene Mutationen und Veränderungen der Expression von Anti-Onkogenen, Protoonkogenen und Regulatorproteinen wie dem Protein p53, der Serin/Threonin-Protein-Kinase 1 (PIM1), dem *B-cell lymphoma*

2-Protein (Bcl-2) und Clusterin zur Blockade von Apoptose-Signalwegen (10, 74, 79-82). Die Inaktivierung von PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) resultiert in einer erhöhten Expression der phosphorylierten Proteinkinase B (AKT) und damit in einer Überaktivierung des Phosphoinositide 3-Kinasen/ Proteinkinase B (PI3/AKT) -Signalweges (78), welcher relevant für das Zellüberleben und -wachstum ist.

Des Weiteren konnte *in vitro* eine Subpopulation von Karzinomzellen identifiziert werden, welche per se docetaxelresistent sind. Diese Zellen sind undifferenziert, exprimieren verstärkt Signalwege wie *Notch* und *Hedgehog* und sind mit einer erhöhten Tumoraggressivität sowie schlechten Prognose assoziiert. Die Signalwege werden daher ebenfalls als Ursache für die Entwicklung der Docetaxelresistenz diskutiert (72). Auch für mehrere Vertreter der STAT-Proteinfamilie, darunter STAT1 und 3, wurde ein Bezug zur Ausbildung einer Chemotherapieresistenz identifiziert (83).

2.1.5.1.4 Wirksamkeit von Cabazitaxel

Ein Ansatzpunkt zur Therapie des docetaxelresistenten PCa ist der Einsatz von Cabazitaxel. Es steht als eine Therapieoption neben Abirateron und Enzalutamid bei Docetaxelresistenz zur Verfügung (2). Im Rahmen der randomisierten Phase-III *TROPIC*-Studie wurden Patienten mit Mitoxantron und Prednisolon oder Cabazitaxel und Prednisolon behandelt. Der primäre Endpunkt war das Gesamtüberleben, sekundäre Endpunkte u. a. das progressionsfreie Überleben und die Therapiesicherheit. Unter Therapie mit Cabazitaxel zeigte sich eine Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens von 2,4 Monaten (15,1 vs. 12,7 Monate; HR 0,7; $p < 0,0001$). Darüber hinaus zeigten sich signifikante Effekte auf das progressionsfreie Überleben (2,8 vs. 1,4 Monate; HR 0,74; $p < 0,0001$) (7). Im Rahmen der *PROSELICA*-Studie wurde eine niedrigere Cabazitaxeldosis verwendet, die sich gleichwertig in ihrer Wirkung bei gleichzeitig reduziertem Nebenwirkungsprofil zeigte (8). Mit der *FUJI*-Kohortenstudie wurde das Therapiepotenzial von Cabazitaxel nach Docetaxelversagen auch in der routinemäßigen klinischen Praxis der Therapie des metastasierten CRPC untersucht. Hier lag das Gesamtüberleben mit 11,9 Monaten (vs 15,1 bzw. 13,4/14,5 Monate) unter dem der *TROPIC*- oder *PROSELICA*-Studie. Als Grund für diese Diskrepanz führten die Autoren den Einschluss eines deutlich älteren und morbideren Patientenkollektives in diese Studie an (9).

Die Zulassung von Cabazitaxel in der EU erfolgte im April 2011 (84).

Als Hauptgrund für den Erfolg von Cabazitaxel nach Docetaxelresistenz wird eine niedrigere Cabazitaxel-Affinität des P-Glykoproteins angenommen (85). Hierdurch kommt es zu einem deutlich geringeren aktiven Efflux von Cabazitaxel aus der Zelle. Des Weiteren zeigte sich in einer Phase-I-Studie im Vergleich zu Docetaxel eine deutlich ausgeprägtere Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und somit eine mögliche Wirkung im zentralen Nervensystem (86).

Im Rahmen der *Firstana*-Studie wurde der Erfolg von Cabazitaxel und Docetaxel in der Therapie des metastasierten CRPC bei Chemotherapie-naiven Patienten verglichen (87). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Therapieerfolg beider Zytostatika. Da sich Docetaxel und Cabazitaxel jedoch in ihrem Nebenwirkungsprofil unterscheiden, bedeutet dies mehr Flexibilität in der Therapie von Patienten mit bestimmten Komorbiditäten.

Weitere auf Cabazitaxel beruhende Therapiemöglichkeiten auch in Kombination mit anderen zytostatischen Substanzen sind zum jetzigen Zeitpunkt noch Gegenstand weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen (88). Aktuell laufen unter anderem Studien zur Wirksamkeit von Cabazitaxel in Zusammenwirken mit Abirateron oder unter ADT (89, 90).

2.1.5.1.5 Resistenzbildung unter Cabazitaxeltherapie

Cabazitaxel stellt für Patienten mit CRPC oder docetaxelresistentem PCa eine weitere Therapieoption dar. Doch auch hier kommt es zur Ausbildung von Resistenzen. Diese Resistenzen sind derzeit noch Gegenstand der Forschung, über ihre molekularen Grundlagen ist bisher wenig bekannt. Erste Untersuchungen geben Hinweise auf Veränderungen der Zellzyklusregulation sowie verschiedener Signalkaskaden und Zytokine als mögliche Ursachen (91, 92). So zeigt sich nach Ausbildung einer Cabazitaxelresistenz eine Aktivierung des MAPK/ERK- und PI3K/AKT-Signalweges sowie eine Resistenz der Zellen in den G2/Metaphasen-Arrest zu treten (91). Daneben wurde eine Überexpression des CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2) in cabazitaxelresistenten PCa-Zellen detektiert, worüber es zu einem Absinken der Apoptoseinduktion kam (92).

Auch unter Cabazitaxelbehandlung zeigt sich zudem eine Aktivierung der *multi-drug-resistant* (MDR) Transportproteine (93). Eine veränderte Mikrotubulidynamik, die mit einer Überexpression von Klasse III β -Tubulin (TUBB3) sowie einer supprimierten

Expression des *Breast Cancer 1* Gens (BRCA1) einherging, konnte ebenfalls detektiert werden. Weiterhin entwickelte sich ein aggressiverer und invasiverer Phänotyp unter Cabazitaxelbehandlung unter Zunahme mesenchymaler Marker (93).

In PCa-Zellen zeigte sich, dass die Überexpression von *ETS-related gene* (ERG) zu der Induktion einer Cabazitaxelresistenz führt (94). Die Interaktion zwischen ERG und den Mikrotubuli verhindert, dass die Taxane effektiv wirken können (95).

2.2 STAT5

2.2.1 Familie der STAT-Proteine

Bei den *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)-Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Sie sind Teil des Janus-Kinase (JAK)-STAT-Signaltransduktionsweges, welcher Einfluss auf das Zellwachstum, die Proliferation und die Funktionen des Immunsystems hat (96). Er wird durch zahlreiche Zytokine, aber auch durch Hormone aktiviert (97). Bisher wurden sieben Vertreter der STAT-Proteine in Säugetieren identifiziert: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6 (98).

2.2.2 Aktivierung von STAT-Proteinen und der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg

Bei dem klassischen JAK-STAT-Signaltransduktionsweg resultiert die Bindung eines Liganden in einer Rezeptordimerisierung. Dadurch werden rezeptorassoziierte JAK aktiviert, dabei kommt es zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten. Über ihre SH2-Domäne werden STAT-Proteinen gebunden, die ihrerseits durch die JAK phosphoryliert werden. In der Folge kommt es zur Dimerisierung zweier STAT-Proteine. Die STAT-Dimere translozieren in den Zellkern, wo sie spezifische DNA-Abschnitte binden und die Transkription Zytokin-abhängiger Gene aktivieren. Eine Übersicht über den Ablauf des JAK-STAT-Signaltransduktionsweges findet sich in Abbildung 2. Daneben gibt es noch weitere Aktivierungswege der STAT-Proteine. So können virale Onkoproteine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu einer konstitutiven Aktivierung führen. Zu den Aktivatoren werden unter anderem auch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) gezählt (98).

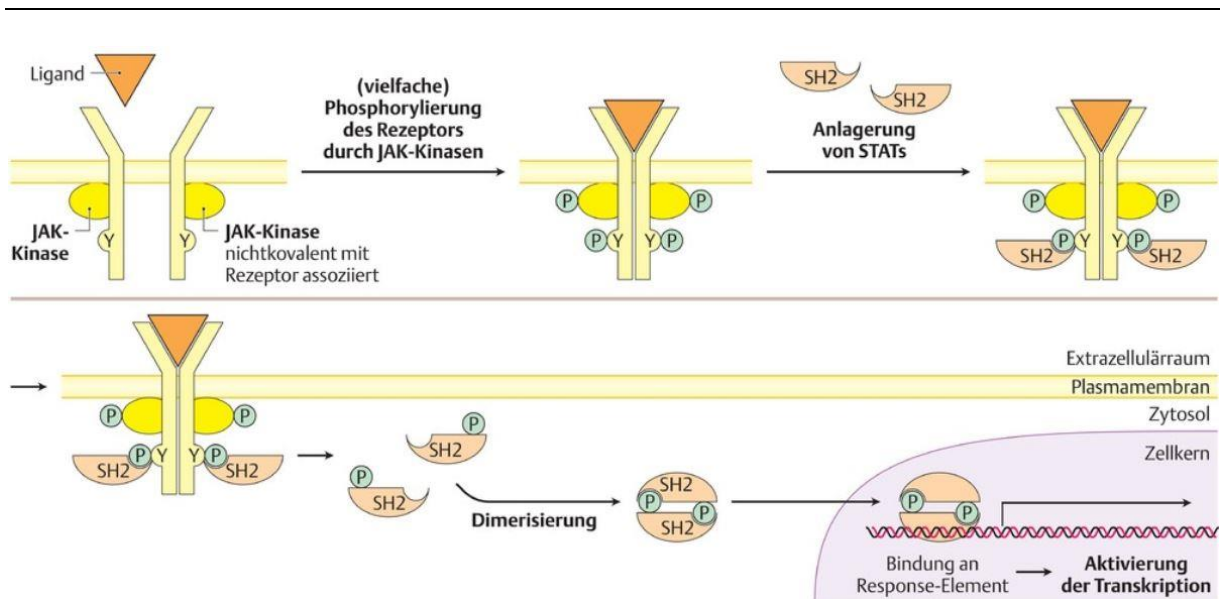


Abbildung 2: Signaltransduktion durch rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen des JAK-STAT-Signalweges. Durch Bindung des Liganden an die JAK-Kinase kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Autophosphorylierung durch assoziierte JAK. Durch eine Konfigurationsveränderung werden Bindungsstellen für die SH2-Domäne der STAT-Proteine frei. Nach Anlagerung werden diese ebenfalls an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Es kommt daraufhin zur Dimerisierung zweier STAT-Proteine und zur Translokation in den Zellkern. Dort aktivieren sie durch Bindung spezifischer Genabschnitte die Transkription ligandenabhängiger Gene (97).

2.2.3 Das STAT-Protein STAT5

STAT5 wurde ursprünglich in Zellen der Brustdrüse als Prolaktin-induzierter Transkriptionsfaktor (MGF) identifiziert (99). STAT5 wird jedoch ebenfalls von einer Reihe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Hormonen aktiviert, darunter verschiedenen Interleukinen sowie Thrombo- und Erythropoietin (100). STAT5 kommt in zwei verwandten Formen vor: STAT5A und STAT5B. Auf Proteinebene zeigt sich eine 94 -prozentige Homologie (101). Beide Proteinisoformen sind auf verschiedenen Genen auf Chromosom 17 des menschlichen Genoms kodiert und haben eine Größe von 94 kDa (STAT5A) bzw. 92 kDa (STAT5B) (101, 102). Sie unterscheiden sich vor allem an ihrem C-Terminus. Es wurde die Bildung sowohl von Homo- als auch Heterodimeren von STAT5A und STAT5B beschrieben (98).

2.2.4 Funktion von STAT-Proteinen

Über ihre Funktionen in unterschiedlichen Signalwegen nehmen STAT-Proteine Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse wie das Wachstum, das Überleben, die Entwicklung und die Differenzierung. Die genaueren Funktionen der einzelnen STAT-Proteine wurden anhand von gewebespezifischen *Knock-down*-Versuchen in Mäusen untersucht. STAT5A beeinflusst die Entwicklung von Brustdrüsengewebe und die Laktation während der Schwangerschaft (103). Außerdem spielt STAT5A eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Fettgewebe und dem Fettstoffwechsel (104).

STAT5B hingegen findet sich vor allem in Muskel- und Leberzellen (105). In *Knock-down*-Versuchen mit STAT5B zeigen sich deutliche Veränderungen der für Geschlechtsdimorphismus typischen Effekte nach Somatotropinausschüttung. Auch verschiedene Interaktionen mit dem Immunsystem wurden beschrieben (106). So sind beide Isoformen von STAT5 an der Entwicklung von Lymphozyten beteiligt (107).

2.2.5 Bekannte Auswirkungen von STAT-Proteinen und insbesondere von STAT5 auf die Karzinomentstehung, Metastasierung und Ausbildung von Resistenzen

Genau wie die Funktion der STAT-Proteinfamilie sind auch ihre Einflüsse auf Inflammation und Prozesse der Karzinogenese vielfältig. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT5 chronische Entzündung und damit das Risiko der Krebsentstehung fördern (101, 108). Konstitutiv aktivierte STAT-Proteine wurden in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen (98, 101). Für STAT5 konnte eine essentielle Bedeutung in der Karzinogenese, insbesondere von verschiedenen hämatologischen Tumoren, nachgewiesen werden (109, 110). Auch in soliden Tumoren wie dem Prostata-, Mamma-, Uterus- und Plattenepithelkarzinom sowie bei Kopf-Hals-Tumoren ist häufig eine gesteigerte STAT5-Aktivierung zu beobachten (111).

Eine permanente Aktivierung von STAT5 scheint über verschiedene Wege möglich. Diese umfassen Veränderungen in der Epigenetik, in miRNA-regulierten Transkriptionsfaktoren, in der Proteolyse oder hormonregulierten Signalwegen (112). Aktives STAT5 nimmt unter anderem Einfluss auf die Expression der Proteine *B-cell lymphoma-2* (Bcl-2), Survivin, Metalloproteinase -2 und -9 (MMP-2 und MMP-9), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und E-Cadherin und interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren wie dem Protein 53 (p53), *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of Activated B-cells* (NF- κ B) und Vertretern der *Runt-related Transcription Factor* (RUNX)-Proteinfamilie. Es nimmt so Einfluss auf Prozesse mit onkogenem Potential wie Apoptose, Angiogenese und Metastasierung (101).

Neuere Studien unterstreichen besonders die Relevanz von STAT5 für das Wachstum und die Metastasierung des PCa (13, 113-115). Im Gegensatz zu gesundem Prostatagewebe ist STAT5 in einem Großteil der untersuchten Karzinomzelllinien konstitutiv aktiviert (12). Wird diese Aktivierung geblockt, führt dies zum apoptotischen Zelltod (116). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivierung

von STAT5 mit einem aggressiveren Tumorwachstum und hohem Gleason-Score assoziiert ist (102). Weiterhin steigt mit STAT5 Aktivierung die Gefahr von Frührezidiven und es verkürzt sich das progressionsfreie Überleben (117).

Mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse ermittelten Gu *et al.* im Jahr 2010 mit STAT5 in Zusammenhang stehende Gene einer PCa-Zelllinie und gruppierten diese im Hinblick auf ihren Funktionsbereich (13). 21 % der STAT5-regulierten Gene waren mit der Bildung von Metastasen, 7,9 % mit der Proliferation und 3,9 % mit der Apoptose assoziiert. Bei der Untersuchung verschiedener klinischer PCa-Metastasen wurde zudem eine erhöhte STAT5-Expression in 61 % aller untersuchten Metastasen nachgewiesen (13). Mit 81 % in Lymphknotenmetastasen, 33 % in ossären Metastasen und 46 % in weiteren, nicht ossären Fernmetastasen war die Aktivität besonders in Lymphknotenmetastasen sehr hoch. Auch im Mausmodell zeigte sich eine metastaseninduzierende Wirkung von STAT5, dabei war die Metastasierungsrate unter dem Einfluss von STAT5 um das 11-fache erhöht (13). Weiterhin reduzierte STAT5 die E-Cadherin-Expression von Karzinomzellen und erhöhte gleichzeitig die Adhäsion an Endothelzellen und damit die Fähigkeit zur Fernmetastasierung (13, 118).

Die genauen molekularen Mechanismen, die zur Progression und Metastasierung des PCa führen, sind jedoch größtenteils noch nicht bekannt (119).

2.3 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und ihre Rolle in der Ausbildung taxanresistenter PCa

Die EMT ist im Zuge des Progresses verschiedener aus Epithel abgeleiteter Tumore beschrieben. Betroffene Zellen verlieren im Laufe dieses Prozesses ihre epithelialen Eigenschaften und nehmen durch Umbau ihres Zytoskeletts, Verlust von Zell-Zell-Kontakten, Herunterregulation von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und Verlust ihrer apikal-basalen Polarität einen mesenchymalen Charakter an, der invasives Wachstum und Migration ermöglicht (120-122). Während der Verlust epithelialer Merkmale weitestgehend nachvollzogen ist, ist der Erwerb mesenchymaler Eigenschaften noch wenig erforscht. Er beinhaltet unter anderem die vermehrte Expression des mesenchymalen Intermediärfilaments Vimentin und Veränderungen von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie dem Glykoprotein Fibronectin (120). Diese Verschiebung von epithelialen zu mesenchymalen Charakteristika der Tumorzellen konnte mit ihrer Fähigkeit zur Metastasierung in Verbindung gebracht werden (123). Studien zum kolorektalen Karzinom und nicht-kleinzelligen

Lungenkarzinom (NSCLC = *non-small-cell lung cancer*) legen darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der Ausbildung von Arzneimittelresistenzen und EMT nahe. Hier zeigten resistente Zellen nach Chemo- bzw. Radiochemotherapie charakteristische phänotypische und molekularbiologische Veränderungen für eine EMT (124-126). Ob und wie genau die EMT in die Arzneimittelresistenzen involviert ist, ist jedoch noch nicht hinreichend belegt. Mögliche Erklärungsansätze beziehen sich auf die repressive Auswirkung der EMT auf die Zellproliferation und der damit einhergehenden abgeschwächten Wirkung vieler Chemotherapeutika, die Inhibition der Apoptose oder einen Einfluss der EMT auf die Bildung sogenannter Krebsstammzellen (CSC = *Cancer Stem Cells*) (127). Mehrere Studien geben Hinweise darauf, dass Mechanismen, die die EMT fördern, einen stammzell- bzw. progenitorähnlichen Phänotyp induzieren. Auf diese Weise veränderte Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und erhöhte Kanzerogenität aus (128-130). CSC wurden in verschiedenen Tumoren nachgewiesen, darunter Leukämiezellen sowie solide Tumore der Brust, der Prostata, des Colons und des Gehirns. Ihnen wird unter anderem ein Einfluss auf die Metastasierung, die Rezidiv- und Resistenzbildung zugeschrieben (127). Die Aktivität der CSC wird durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren und Signalwege wie dem JAK-STAT-Signalweg reguliert (129, 131, 132). Für STAT5 wurde ein Einfluss auf die molekularen Marker und funktionellen Endpunkte der EMT nachgewiesen (16). Es kam zur Ausbildung stammzellähnlicher Eigenschaften und eines EMT-typischen Expressionsmusters von N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin (16). *In vitro* wurde die Metastasierung induziert. Umgekehrt unterdrückte die pharmakologische Inhibition und der genetische *Knock-down* des JAK-STAT5-Signalweges die Ausbildung der mesenchymalen Marker (16). Hier zeigt sich ein potentiell Zusammenspiel der EMT und der STAT5-Proteine in den CSCs.

Auch in resistenten PCa-Zellen konnten morphologische Veränderungen unter Ausbildung mesenchymaler Merkmale und ein stammzellähnlicher Phänotyp beobachtet werden (6).

3 Ziel der Dissertation

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die taxanresistenten PCa-Zellen zu charakterisieren und die funktionelle Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT5 zu analysieren. Dabei sollte ermittelt werden, ob und inwiefern STAT5 Einfluss auf das progressive Wachstumsverhalten und die Resistenzbildung von taxanresistenten, androgensensitiven und -insensitiven PCa-Zellen nimmt.

Um die parentalen und docetaxel- bzw. cabazitaxelresistenten PCa-Zellen zu charakterisieren, wurden mittels Western Blot Analysen die Expressionsprofile relevanter PCa assoziierter Proteine erstellt. Um die funktionelle Bedeutung von STAT5 für die Tumorzellen zu untersuchen, wurden die Transkriptionsfaktoren STAT5A und STAT5B mit Hilfe von siRNA geblockt. Zur Quantifizierung des Zellwachstums und der Proliferation wurden entsprechende funktionelle Assays durchgeführt (MTT- und BrdU-Assay).

Längerfristiges Ziel ist die Entwicklung neuer, wirkungsvollerer Therapieansätze für Patienten mit fortgeschrittenem PCa im Sinne der Präzisionsmedizin. Die vorliegende Arbeit sollte dabei eine erste Basis für ein verbessertes Verständnis der relevanten Deregulationen im Rahmen des Tumorprogresses und der Therapieresistenz bilden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien und die dazugehörigen Hersteller mit Firmensitz

Verbrauchsmaterial	Firma	Firmensitz
<i>Disposable Glass Pasteur Pipettes</i> 230 mm	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Tubes® 5.0 mL mit Schraubdeckel	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
FILTER PAPER 50/PKG, MINI T/B	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar® 25 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar® 75 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
LUNA™ <i>Cell Counting Slides</i>	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich
MIC Tubes and Caps	Bio Molecular Systems	Upper Coomera, QLD, Australia
Mikroreaktionsröhrchen 0,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsröhrchen 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsröhrchen 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Nunc™ Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Petrischale 94/16 mm steril	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipetten 10 ml, steril	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipetten 2 ml, steril	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipetten 25 ml, steril	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipetten 5 ml, steril	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipetten 50 ml, steril	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 10 ml	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 100 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 1250 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland

Material und Methoden

Verbrauchsmaterial	Firma	Firmensitz
Pipettenspitzen 2 ml	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 20 µl	STARLAB GmbH	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 25 ml	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 5 ml	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Präzisions-Dispenser-Tips 0,5 ml	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Präzisions-Dispenser-Tips 1 ml	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Präzisions-Dispenser-Tips 10 ml	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Präzisions-Dispenser-Tips 2,5 ml	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Reaktionsröhrchen für PCR, 0,2 ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG	Steinfurt, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 mm	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Tubes 2,0 mm	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
TransBlot® Turbo™ Midi-size PVDF Membrane	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
Zellkulturschale 145/20mm	Cellstar, Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich

4.1.2 Reagenzien

Tabelle 2: Verwendeten Chemikalien und die dazugehörigen Hersteller mit Firmensitz

Chemikalie	Firma	Firmensitz
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth Carl GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa (Aqua dest.)	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg, Deutschland

Material und Methoden

Chemikalie	Firma	Firmensitz
Antibiotic-Antimycotic (100x)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
BIO-RAD Trans-Blot Turbo 5x Transfer Puffer	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
Biozym Probe qPCR Kit	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo as RNAi Transfection Control	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Cabazitaxel	Achemblock	Hayward, CA, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche; Sigma-Aldrich; Merck	Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G 250	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Docetaxel	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
DTT 0,5 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Ethanol absolut	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Fetal Bovine Serum	Gibco, Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
HEPES (1M) Pufferlösung	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Hydrochloric Acid 1 mol/l (1N) HCl	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad	Hercules, CA., USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Laemmli <i>Sample Buffer</i> 4x	Bio-Rad	Hercules, CA., USA
Lipofectamine™ 3000 <i>Transfection Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Lipofectamine™ RNAiMAX <i>Transfection Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Magermilchpulver (nfd Milchpulver)	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA

Material und Methoden

Chemikalie	Firma	Firmensitz
Methanol	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
MTT <i>Reagent</i> 0,5 % in PBS	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Acetat	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Np-40 (TERGITOL™)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
<i>Nuklease free water</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
<i>ON-TARGETplus</i> Human STAT5A (6776) siRNA	Dharmacon	Lafayette, CO, USA
<i>ON-TARGETplus</i> Human STAT5B (6777) siRNA	Dharmacon	Lafayette, CO, USA
<i>ON-TARGETplus Non-targeting Control</i> siRNA	Dharmacon	Lafayette, CO, USA
Ortho Phosphorsäure 85 %	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco, Thermo Fischer Scientific	Waltham, MA, USA
Phosphatase <i>Inhibitor Cocktail 2</i>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride solution) 100 mM	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
<i>Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards</i>	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
<i>Primer HPRT1</i>	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
<i>Primer STAT5 A</i>	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
<i>Primer STAT5 B</i>	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
<i>Primer TBP</i>	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel A	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel B	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Material und Methoden

Chemikalie	Firma	Firmensitz
Salzsäure HCl 1N	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (1N) 0,5M	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Sodium deoxycholate monhydrate	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 98 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
TRI Reagent®	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Trizma® base (TRIS)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau „Trypan Blue Stain 0,4 %“	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA
Trypsin EDTA 0,25 %	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland

4.1.3 Geräte und Arbeitsutensilien

Tabelle 3: Verwendeten Geräte sowie Arbeitsutensilien und die dazugehörigen Hersteller mit Firmensitz

Name	Firma	Firmensitz
AE2000 Binocular	Motic Deutschland GmbH	Wetzlar, Germany
Brutschrank	Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach, Deutschland
Bunsenbrenner, FIREBOY eco	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
CO2 Incubator HERAcCell® VIOS 160i	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Dichtung Mini-PROTEAN® Casting Stand Gaskets	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH	Isernhagen, Deutschland
FluorChem E Imaging System from ProteinSimple	Biocompare	San Francisco, CA, USA
Gel Releaser	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
Gelgießrahmen	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.

Material und Methoden

Name	Firma	Firmensitz
Gelgießstand	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
GeneTouch Thermal Cycler	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Glasplatte Short plate	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
HandyStep® electronic Elektronischer Mehrfachdispenser	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Heizblock Techne Dri-Block DB-3	Techne	Staffordshire, U.K.
Heraeus Megafuge 16R Zentrifuge	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Herasafe™ KS Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
LAUDA Aqualine AL 18	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
LUNA™ <i>Automated Cell Counter</i>	Logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich
<i>Magnetic Induciton Cycler</i>	Bio Molecular Systems	Upper Coomera, QLD, Australia
Manueller Mehrfachdispenser HandyStep® S	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Mini Trans-Blot® <i>Electrophoretic Transfer Cell</i>	Bio-Rad	Hercules, CA., USA
Mini-PROTEAN® Comb, 15-well	Bio-Rad	Hercules, CA., USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad	Hercules, CA., USA
<i>Multichannel pipette</i> Transferpette Transferpette® S -8	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Multichannel pipette Transferpette® S -12	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
NanoDrop Mikrovolumen-Spektralphotometer und -Fluorometer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Pipette Eppendorf Research® plus 0,5-10 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research® plus 100-1000 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research® plus 10-100 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research® plus 20-200 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research® plus 2-20 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettetierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland

Name	Firma	Firmensitz
PowerPac™ <i>Basic Power Supply</i>	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
Rollenmischer Stuart SRT9	Cole-Parmer	Stone, U.K.
<i>Spacer plates</i> 1.0 mm	Bio-Rad	Hercules, CA., USA.
Tecan US Inc. Spark 10M	Tecan Austria GesmbH	Grödig, Österreich
ThermoCell <i>MixingBlock</i>	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd.	Hangzhou, China
UVC/T-M-AR, DNA-/RNA UV-Reinigungsbox	Biosan	Riga, Lettland
VACUSAFE-Absaugsystem	INTEGRA Biosciences GmbH	Biebertal, Deutschland
Vortexer	Phönix Instruments	Garbsen, Deutschland
Zeiss AxioObserver Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland

4.1.4 Zelllinien

Das PCa ist eine sehr heterogene Tumorentität. Daher wurde für diese Arbeit mit drei verschiedenen, etablierten PCa-Zelllinien unterschiedlicher Charakteristika gearbeitet.

Dabei wurden jeweils parentale, also unbehandelte, und docetaxel- bzw. cabazitaxelresistente Subzelllinien verwendet. Die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Jindrich Cinatl (Interdisziplinäres Labor für Tumor- und Virusforschung, Universitätsklinikum Frankfurt), Herrn Prof. Martin Michaelis (School of Biosciences, University of Kent) und Herrn Prof. Zoran Culig sowie Herrn PD Dr. Martin Pühr (Urologie, Universitätsklinik Innsbruck) zur Verfügung gestellt. Cabazitaxelresistente PC3-Zellen standen für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht zur Verfügung.

4.1.4.1 LNCaP

Die LNCaP-Zelllinie stammt aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase. Sie ist androgensensitiv und produziert PSA (133). Die Zelllinie weist ein verändertes AR-System auf. Durch eine Mutation zeigt der Rezeptor ein erweitertes Ligandenspektrum, so ist er durch eine veränderte Interaktion mit Steroidhormonen sowohl durch Androgene, Progestagene, Östrogene als auch Anti-Androgene aktivierbar (134).

4.1.4.2 DU145

Die DU145-Zelllinie stammt aus einer Hirnmetastase des PCa (135). DU145-Zellen sind androgeninsensitiv, obwohl sie in geringem Maße einen mutierten AR exprimieren. Eine Aktivierung dieses Rezeptors führt jedoch nicht zu einer erhöhten Expression der nachgeschalteten Rezeptor-*response* Gene. Die Zelllinie produziert kein PSA (136).

4.1.4.3 PC3

Die PC3-Zelllinie wurde aus Gewebe einer PCa-Metastase des Knochens isoliert (137). PC3-Zellen sind androgeninsensitiv, weisen kein funktionelles AR-Protein auf (136) und produzieren kein PSA (138).

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

4.2.1.1 Kultivierung der Zellen

Für alle Zellreihen wurde das Basalmedium RPMI 1640 verwendet, dem zehn Prozent fetales Kälberserum (fetal calf serum = FCS) und ein Prozent GlutaMAX™ (100-fach konzentriert) zugesetzt wurde. Um pH-Wertschwankungen abzupuffern, wurde zudem 25 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Puffer hinzugegeben (2 %). Des Weiteren wurde ein Prozent Penicillin/Streptomycin (100-fach konzentriert) hinzugegeben.

Den Medien der resistenten PCa-Zelllinien wurde darüber hinaus 12,5 nM Docetaxel, bzw. 10 nM Cabazitaxel, zugesetzt.

Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert.

4.2.1.2 Kultivierung von Zellen

Bei einer ausreichenden Konfluenz von rund 80 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst vorsichtig das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 8 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen vom Untergrund und das Lösen der Zell-Zell-Verbände. Es wurden dazu 2 ml Trypsin/EDTA auf den Zellrasen gegeben und die Zellkulturflasche für 5 Minuten in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von mindestens 4 ml Kulturmedium wieder gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein

steriles Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen konnten nun entweder gezählt und für die Versuche ausgesät oder in geeigneter Verdünnung zur weiteren Kultivierung in neue Zellkulturflaschen überführt werden.

4.2.1.3 Kryokonservierung von Zellkulturen

Die Zellen wurden wie unter 4.2.1.2 beschrieben abgelöst und abzentrifugiert. Das Einfriermedium wurde aus 70 % Basismedium ohne weitere Zusätze, 20 % FCS, sowie 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, wodurch eine Eiskristallbildung und damit die Beschädigung der Zellen verhindert wurde. Die Zellen wurden im Einfriermedium aufgenommen und je 1 ml der Lösung in ein Kryoröhrchen überführt. Zur Schonung der Zellen erfolgte das Einfrieren dann in 1°C-Schritten pro Minute. Die Zellen wurden dazu in einem Einfrierbehälter für mindestens 24 Stunden bei -80° C eingefroren und konnten anschließend zur längerfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

4.2.1.4 Rekultivierung kryokonservierter Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch. Dazu wurden die Kryoröhrchen für etwa 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad erwärmt, die Zellen in ein steriles Zentrifugenröhrchen mit Kulturmedium überführt und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und anschließend in eine Zellkulturflasche überführt.

4.2.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat

Die Zellzahlbestimmung wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung durchgeführt. Es wurde eine Zellsuspension, wie unter 4.2.1.2 beschrieben, hergestellt. Anschließend wurden 10 µl der Suspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt und 10 µl in eine Zählkammer gegeben. Die Zellzählung erfolgte automatisiert mit Hilfe des LUNA™ Automated Cell Counter. Im Anschluss konnte die Zellsuspension auf eine gewünschte, von Versuch, Well-Größe und Zellreihe abhängige Zellzahl eingestellt werden.

4.2.2 Proliferationsassay - Resistenznachweis

5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon, welches von proliferierenden Zellen während der S-Phase des Zellzyklus an dessen Stelle in die DNA eingebaut

wird. Die Detektion des inkorporierten BrdUs erfolgt anschließend mit Hilfe spezifischer, enzymgekoppelter Antikörper. Das BrdU-Assay wird zur Proliferationsbestimmung vitaler Zellen genutzt und ist ein anerkanntes Verfahren zur Quantifizierung medikamenteninduzierter Zytotoxizität und Beeinflussung des Zellzyklus (139). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Proliferationsassays der Resistenznachweis der untersuchten Zellen, durch Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC50-Werte), erbracht. Um die IC50-Werte zu bestimmen, wurden die erhobenen Daten logarithmiert und Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt.

Die Zellen wurden dazu in Kulturflaschen kultiviert und, wie unter 4.2.1.5 beschrieben, die Zellzahl bestimmt und eine definierte Zellzahl in 50µl Vollmedium auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und mit Docetaxel bzw. Cabazitaxel behandelt (Tabelle 4). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Es wurde durchgängig mit Triplikaten gearbeitet.

Tabelle 4: Übersicht über die genutzten Zellzahlen sowie Konzentrationen von Docetaxel und Cabazitaxel für die Bestimmung der Zellproliferation (BrdU) . DR=docetaxelresistent, CR=cabazitaxelresistent

Zelllinie	Zellzahl	Docetaxel/ Cabazitaxel
DU145	3*10 ³	1 µM, 333 nM, 100 nM, 33 nM, 10 nM, 3,33 nM, 1 nM, 0,33 nM, 0,1 nM, 0,033 nM, 0,01 nM
DU145-DR	3*10 ³	
DU145-CR	3*10 ³	
LNCaP	1*10 ⁴	
LNCaP-DR	5*10 ³	
LNCaP-CR	5*10 ³	
PC3	3*10 ³	
PC3-DR	3*10 ³	

Die Zellen wurden für 48 Stunden unter der jeweiligen Behandlung bei 37°C inkubiert, dann erfolgte die Zugabe von 10 µl 100 µM BrdU-Arbeitslösung pro Well mit anschließender erneuter Inkubation für 24 Stunden. Das Medium wurde durch vorsichtiges Abgießen entfernt und 50 µl Fix-Denat-Lösung in jedes Well pipettiert, um die Zellen auf der Platte zu fixieren und die DNA zu denaturieren. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Fixierlösung wieder verworfen und 50 µl Anti-BrdU-POD-Lösung pro Well hinzugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit jeweils 100 µl Waschlösung. 50 µl Substrat-Lösung wurden pro Well hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch die

Zugabe von 25 µl 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt, die Mikrotiterplatte für 1 Minute bei 300 rpm homogenisiert und die Absorption anschließend mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Readers (Tecan US Inc. Spark 10M) bei 450 nm bestimmt (Referenzwellenlänge 650 nm).

4.2.3 Western Blot Analyse

4.2.3.1 Gesamtproteinextraktion von Zellen

Die Zellen (500.000 Zellen in 2.000 µl) wurden 48 Stunden vor der Proteinextraktion in Vollmedium auf einer 6-Well-Platte ausgesät und bei einer Konfluenz von 80 % geerntet. Alle Arbeiten wurden unter Kühlung auf Eis durchgeführt. Das Medium wurde verworfen und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in ein Mikroreaktionsröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 500 g (Hereaus Fresco 21) und 4°C zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen, das Pellet je nach Größe in 50-100 µl Extraktionspuffer (Tabelle 5 und Tabelle 6) resuspendiert und für die Dauer von 30 Minuten bei 4°C und einer Vibrationsgeschwindigkeit von 1.500 (ThermoCell MixingBlock) homogenisiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und mit 21.000 g (Hereaus Fresco 21). Der Überstand enthielt die gelösten Proteine und wurde in ein neues Mikroreaktionsröhrchen überführt. Mit Hilfe des Bradford-Assays (4.2.3.2) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Danach konnten die Proben auf eine Proteinkonzentration von 20 µg pro Probe eingestellt und mit Laemmli-Puffer (siehe Standardmethode nach Laemmli (140) für die Elektrophorese verdünnt werden. Die Proben wurden anschließend auf einem Heizblock 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Lagerung erfolgte je nach geplanter Lagerungsdauer bei -20°C oder -80°C.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Extraktionspuffers

Extraktionspuffer	
940 µl	RIPA-Puffer (1x)
10 µl	DTT
10 µl	Protease Inhibitor Cocktail
10 µl	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
10 µl	PMSF
10 µl	Triton X-100

Tabelle 6: Zusammensetzung des RIPA-Puffers

RIPA-Puffer (10x)	
50 mM	TRIS
150 mM	NaCl
0,1 %	SDS
0,5 %	Sodium desoxycholate
5 mM	EDTA, pH 8,0
84 ml	Aqua dest.

4.2.3.2 Bradford Assay

Das Bradford Assay ist eine quantitative Proteinbestimmungsmethode, welche auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G 250 im sauren Milieu nach der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm beruht (141).

Um eine Standardkurve zu erstellen, wurde eine Verdünnungsreihe mit den BSA-Konzentrationen 0 ng/µl, 100 ng/µl, 200ng/µl, 400 ng/µl, 800 ng/µl und 1.000 ng/µl mit PBS erstellt und in einem Dreifachansatz je 10 µl in einer 96-Well-Mikrotiterplatte auspipettiert. Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 pro Well verdünnt, ebenfalls jeweils in einem Dreifachansatz auf der Mikrotiterplatte auspipettiert und zu jedem Well 300 µl Bradfordreagenz (Tabelle 7) gegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Absorption mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Readers (Tecan US Inc. Spark 10M) bei 595 nm bestimmt. Die so ermittelten Werte der Proben wurden mit der Standardkurve verrechnet und der Proteingehalt ermittelt.

Tabelle 7: Zusammensetzung Bradfordreagenz in fünffacher Konzentration

Bradfordreagenz (5x)	
300 mg	Coomassie Brilliant Blue G250
150 ml	Methanol
150 ml	Aqua dest.
300 ml	85 % Phosphorsäure

Ansatz anschließend filtrieren und bei 4°C im Dunkeln lagern

4.2.3.3 Herstellung von Bis-Acrylamid-Gelen und Proteinauftrennung mit Hilfe der SDS-Page

4.2.3.3.1 Herstellung von Bis-Acrylamid-Gelen

Das Gießen der Gele erfolgte unter dem Abzug nach den angegebenen Pipettierschemata (Tabelle 8 bis Tabelle 11).

Tabelle 8: Zusammensetzung Trenngel

Trenngel (10 %)	
2,6 ml	Aqua dest.
100 µl	10 % SDS
2,5 ml	Trenngelpuffer
3,2 ml	Acrylamid A
1,6 ml	Bisacryl B
100 µl	10 % APS
10 µl	TEMED

Tabelle 9: Zusammensetzung Trenngelpuffer

Trenngelpuffer	
68,1 g Tris	
400 ml Aqua dest.	
pH-Wert auf 8,8 mit HCl einstellen mit Aqua dest. Auf 500 ml auffüllen	

Tabelle 10: Zusammensetzung Sammelgel

Sammelgel (4 %)	
5,4 ml	Aqua dest.
100 µl	10 % SDS
2,5 ml	Sammelgelpuffer
1,3 ml	Acrylamid A
0,6 ml	Bisacryl B
100 µl	10 % APS
20 µl	TEMED

Tabelle 11: Zusammensetzung Sammelgelpuffer

Sammelgelpuffer
68,1 g Tris
400 ml Aqua dest.
pH-Wert auf 6,8 mit HCl einstellen mit Aqua dest. Auf 500 ml auffüllen

Ammoniumperoxodisulfat (APS) dient als Initiator und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator der Polymerisationsreaktion. Nach Herstellung des Trenngels wurden ca. 7 ml in die Gelkammer gefüllt und danach mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu vermeiden und beim Auspolymerisieren zu unterstützen. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol wieder abgegossen und die Kammer mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss erfolgte die Herstellung des Sammelgels, welches auf das Trenngel pipettiert und in das dann der Kamm für die Formung der Beladungstaschen eingesteckt wurde. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels konnten die Gele direkt verwendet oder zur späteren Verwendung in einem feuchten Tuch eingeschlagen für einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

4.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – Auftrennung der Proteine

Mit Hilfe der *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-Page) erfolgt die Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekülgröße. Hier wurde das diskontinuierliche Elektrophoreseverfahren des TRIS-Chlorid/TRIS-Glycin-Puffersystems (Laemmli-System) verwendet (140).

Trenn- und Sammelgel im vertikal orientierten Polyacrylamidgel unterscheiden sich in Porengröße, pH-Wert und Leitfähigkeit. Das Sammelgel ist dabei grobporiger, hat

einen niedrigeren pH-Wert (6,8 vgl. 8,8) und eine geringere Leitfähigkeit, es dient der Aufkonzentrierung der Proteine an der Lauffront. Die Gele enthalten als Gegenion zur Puffersubstanz Chloridionen, zu dem das Gel umgebende Glycin im Elektrophoresepuffer (Tabelle 12). Nach dem Anlegen der Spannung bewegen sich die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld in Richtung Anode und werden auf Grund der siebartigen Struktur des Polyacrylamidgels ihrer Größe nach aufgetrennt.

Es wurden dabei pro Geltasche 20 µg Proteinprobe geladen. Als Größenstandard für den sich anschließenden Western Blots dient ein vorgefärbter Marker (Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards, Bio-Rad, Abbildung 3). Die Gelelektrophorese lief zunächst bei 80 V für 15 Minuten, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten und anschließend bei 150 V für weitere ca. 90 Minuten zur Auftrennung der Proteine, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Tabelle 12: Einfachkonzentrierter Laufpuffer der SDS-Page

SDS-Laufpuffer (1x)

100 ml Rotiphorese® 10x SDS-PAGE

900 ml Aqua dest.

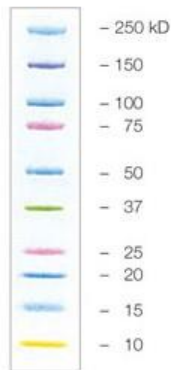


Abbildung 3: Der in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendete Größenstandard Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ von Bio-Rad

4.2.3.5 Western Blot

Die Western Hybridisierung („Blot-Vorgang“) dient der Übertragung der in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine

Trägermembran. Der Proteintransfer erfolgt durch das Anlegen eines senkrecht zur Membran ausgerichteten elektrischen Feldes (142).

Zu diesem Zweck wurde das Tank-Blotting-System von Bio-Rad verwendet. Als Trägermembran diente eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF) Membran, die vor dem Blotvorgang mit Methanol aktiviert wurde. Das Polyacrylamidgel wurde auf die PVDF Membran gelegt und beidseitig (4 pro Seite) durch mehrere Lagen transferpuffergetränkten Filterpapiers und Schwämme (1 pro Seite) umschlossen. Diese Schichtung wurde in eine Haltervorrichtung gelegt, welche dann in die mit Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer eingesetzt wurde (Tabelle 13). Die Membran befand sich dabei auf der zur Anode gerichteten Seite des Gels. Eine Übersicht über den Aufbau des Western Blot zeigt Abbildung 4. Der Transfer erfolgte dann über 2 Stunden bei 100 V.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Tank-Blot-Puffers der SDS-Page

TANK-BLOT-Puffer	
30,3g	TRIS
144,1g	Glycin
auf 1L mit Aqua dest. auffüllen	

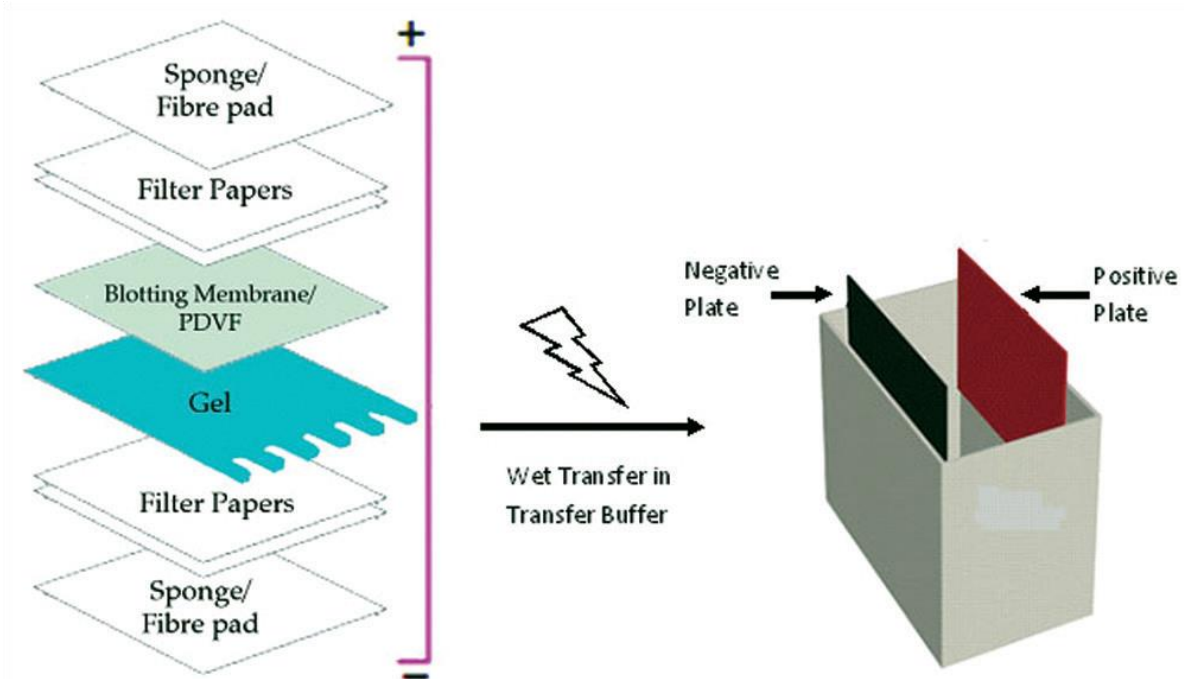


Abbildung 4: Aufbau der Western Blot Apparatur für die Western Hybridisierung(142)

4.2.3.6 Immunfärbung und Detektion

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach spezifischer Antigen-Antikörper (AK)-Bindung durch Chemilumineszenz-Färbung.

Nach Beendigung des Blotvorganges wurde die Membran für 30 Minuten mit TRIS-*buffered saline* (TBS)-Puffer (Tabelle 14) gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit einem Blockierpuffer aus TBST (Tabelle 15) und fünfprozentigem Magermilchpulver geblockt, um unspezifische AK-Bindungsstellen abzudecken. Dann wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 17), welcher das gewünschte Protein bindet, im Antikörperpuffer (TBST mit 0,5 % Magermilchpulver) über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen und die Membran daraufhin für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (*Horseradish Peroxidase* (HRP)-gekoppelt, siehe Tabelle 18) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimal für 10 Minuten mit TBST-Puffer und einmal 10 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen und danach 2 ml *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Detektionslösung aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des FluorChem E System (Biocompare), die Analyse der erhobenen Daten mit der Software Image Studio lite (Licor, Version 5.2.).

Bei der Etablierung einer geeigneten Ladekontrolle zeigte sich weder für das Haushaltsgen GAPDH, noch für β -Aktin ein konstantes Expressionsniveau zwischen parentalen und taxanresistenten Zellen (Etablierung der Ladekontrolle im Anhang unter 9.3). Als Verrechnungsreferenz wurde daher das Gesamtprotein der jeweiligen Proben genutzt (143). Um den Gesamtproteingehalt bestimmen zu können, erfolgte die Färbung der Membranen mit Coomassie Brilliant Blue G 250. Die Entfärbung der Membran erfolgte mit Hilfe der Coomassie-Entfärbe-Lösung (Tabelle 16).

Tabelle 14: Zusammensetzung des TBS-Puffers

TBS (10x)	
12,1 g	TRIS
90 g	NaCl
600 ml	Aqua dest. lösen
pH-Wert mit HCL auf 7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 1L auffüllen	

Tabelle 15: Zusammensetzung des TBS-T-Puffers

TBS-T	
1.000 ml	TBS (1x)
1 ml	Tween20 (0,1 %)

Tabelle 16: Zusammensetzung der Coomassie-*Destaining-Solution*

<i>Coomassie-Destaining-Solution</i>	
250 ml	Aqua dest.
200 ml	Methanol
50 ml	100 % Essigsäure

Tabelle 17: Primäre Antikörper Western Blot

Name	Verdünnung	Herkunft	Hersteller	Firmensitz
Androgen Receptor (D6F11) XP	1:5.000	Rabbit	CellSignaling	Cambridge, U.K.
Stat5 (C-17)	1:500	Rabbit	Santa Cruz	Dallas, Texas, U.S.
PSA/KLK3 (D6B1) XP	1:2.000	Rabbit	CellSignaling	Cambridge, U.K.
Purified Mouse Anti-E-Cadherin	1:10.000	Mouse	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, U.S.
Purified Mouse Anti-Vimentin	1:2.000	Mouse	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, U.S.
Glucocorticoid Receptor (D8H2) XP	1:1.000	Rabbit	CellSignaling	Cambridge, U.K.
GAPDH	1:50.000	Mouse	EMD Millipore	Burlington, Massachusetts, U.S.
β -Actin (13E5)	1:1.000	Rabbit	CellSignaling	Cambridge, U.K.

Tabelle 18: Sekundäre Antikörper Western Blot

Name	Verdünnung	Herkunft	Hersteller	Firmensitz
Peroxidase-Conjugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins	1:2.000	Rabbit	Dako	Santa Clara, California, U.S.
Peroxidase-Conjugated Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins	1:2.000	Mouse	Dako	Santa Clara, California U.S.

4.2.4 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time quantitative PCR*)

4.2.4.1 RNA Extraktion

Zur Isolierung der RNA wurde die von Chomczynski und Sacchi entwickelte Single-Step Guanidiniumisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion genutzt (144). Mit Hilfe von Guanidiniumthiocyanat wurden die Zellen lysiert, die Proteine denaturiert und so auch Ribonukleasen inaktiviert. Durch die Zugabe von Phenol und Chloroform sowie

anschließende Zentrifugation erfolgte eine Phasenauftrennung. Aus der oberen Phase wurde die RNA selektiv mit Hilfe von Isopropanol gefällt.

48 Stunden vor der RNA-Isolation wurden 500.000 Zellen/Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Dann wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. In jedes Well wurde jeweils 1 ml TRIzol-Reagenz hinzugegeben und durch mehrmaliges Resuspendieren eine homogene Lösung erzeugt, welche in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und anschließend für 10 Minuten bei 10.000 rpm (Hereaus Fresco 21) zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß pipettiert und mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Die Lösung wurde für 15 Sekunden auf dem Vortexer geschüttelt, dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 10.000 rpm (Hereaus Fresco 21) zentrifugiert. Die obere klare Phase, welche die RNA enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden nun 0,5 ml Isopropanol zu den jeweiligen Ansätzen hinzugegeben und der Inhalt nach dem Verschließen des Reaktionsgefäßes durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 10.000 rpm (Hereaus Fresco 21). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit 75-prozentigem Ethanol gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschsritten erfolgte jeweils eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 10.000 rpm (Hereaus Fresco 21). Nach Abnahme des Ethanols trocknete das Pellet für die Dauer von 10 Minuten und wurde abschließend in 50 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und auf Eis gestellt.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mittels Mikrovolumen-Spektrometers (NanoDrop) bestimmt. Zur Beurteilung der RNA-Reinheit erfolgte die Bestimmung der 260/230 und 260/280 Ratio. War dieser Quotient kleiner als 1,8, erfolgt die RNA-Fällung. Zur Probe wurden 5 µl 3 M Natriumacetat sowie 150 µl Ethanol gegeben und für die Dauer von mindestens 1 Stunde bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 10.000 rpm (Hereaus Fresco 21) zentrifugiert und das Pellet, entsprechend den letzten Schritten der RNA-Isolation, dreimal mit 75-prozentigem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 30 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und abschließend erneut die RNA-Konzentration und -Reinheit bestimmt.

4.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA wurde mit Hilfe des „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ von Biorad synthetisiert. Dieses enthält einen Reaktionspuffer, die Reverse Transkriptase sowie nukleasefreies Wasser zur Verdünnung der Proben. Von jeder Probe wurden 500 ng RNA eingesetzt, 4 µl Reaktionspuffer und 1 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben. Der Ansatz wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Proben wurden kurz an zentrifugiert und die PCR im Thermocycler nach dem Hersteller-Protokoll durchgeführt.

4.2.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die Real-time quantitative PCR wurde das *Probe qPCR Kit* von Biozym verwendet. Der für jede Probe verwendete Ansatz ist in Tabelle 19 dargestellt. Die Proben wurden vor dem Einsetzen 1:2 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Es wurde die Expression von STAT5A und STAT5B untersucht. Als Haushaltsgene dienten HPRT1 und TBP. Zur Amplifikation wurde der Magnetic Induction Cycler der Firma Bio Molecular Systems genutzt. Die relative Quantifizierung erfolgte durch Berechnung nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (145).

Tabelle 19: Standardansatz für die qPCR

Reagenz	Volumen in µl
MM	5
H ₂ O	2
GOI	0,5
HK	0,5
Probe	2

Anmerkungen. MM = Master Mix, GOI = *gene of interest*, HK = *housekeeping gene*

4.2.5 Evaluation der funktionellen Relevanz von STAT5

4.2.5.1 siRNA-Blockade gegen STAT5 mittels Transfektion

Die Transfektion beschreibt den Prozess des Einbringens von fremden Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. Die Transfektion kann auf chemischen, physikalischen oder biologischen Prozessen beruhen. In dieser Arbeit wurde die Lipofektion genutzt, um gezielt mit Hilfe von spezifischer *small interfering RNA* (siRNA) die Expression von Genen auf RNA-Ebene zu unterbinden. Der Prozess zur Minderung der

Genexpression durch RNA-Interferenz oder kompetitive Inhibition wird auch *Knock-down* genannt.

Vorversuche

Im Rahmen der Etablierung des Transfektionsprotokolls fiel insgesamt eine hohe Toxizität der Transfektionsreagenzien auf. Das Ausmaß dieser Effekte war für jede Zellart unterschiedlich. Daher musste für die in dieser Arbeit untersuchten Zellen ein geeignetes Transfektionsschema gefunden werden. Ziel war die Etablierung eines Protokolls, welches einen möglichst geringen Einfluss auf die Vitalität der untersuchten Zellen bei gleichzeitig hoher Transfektionsqualität hat. Zu diesem Zweck wurden Versuche sowohl mit Lipofectamine® RNAiMAX Reagent, als auch mit Lipofectamine® 3000 Reagent der Firma Thermo Fischer Scientific durchgeführt. Die Etablierung der Methode zur Transfektion ist im Anhang unter 9.4 genauer erläutert. Da Lipofectamine® 3000 im Zuge dessen die besten Ergebnisse zeigte, wurde es für alle weiteren Versuche verwendet, wie im folgenden Transfektionsprotokoll beschrieben.

Versuchsdurchführung

Die Zählung und Aussaat der Zellen erfolgten wie unter 4.2.1.5 beschrieben. Für die Zelllinien PC3 und DU145 wurden 2.000 Zellen, für LNCaP 10.000 Zellen pro Well ausgesät (96-Well-Mikrotiterplatte). Die Transfektion erfolgte 24 Stunden nach Aussaat. Eine Übersicht über alle verwendeten Reagenzien und Volumina findet sich in Tabelle 20. Das Lipofectamine 3000® Reagenz, sowie die siRNA, wurden jeweils in serumfreiem Medium (RPMI-1640) verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:1 vermischt. Diese Suspension wurde für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 µl der RNA-Lipid-Komplexe in jedes Well pipettiert. Nach weiteren 4 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium vollständig abgenommen und durch 50 µl frisches Medium pro Well ersetzt. 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Durchführung eines Wachstumsassays (MTT-Assay).

Tabelle 20: Transfektionsansatz mit Lipofectamine 3000. Angabe der Volumina der Transfektionsreagenzien in Abhängigkeit zur Wellgröße

Platte	96-Well	6-Well
Reagenzien		
RPMI	5 µl	125 µl
Lipofectamine® 3000 Reagent	0,3 µl	7,5 µl
RPMI	5 µl	125 µl
siRNA (10µM)	0,1 µl	2,5 µl
Volumen pro Well	10 µl	250 µl

4.2.5.2 Evaluation des Tumorzellwachstums nach siRNA-Blockade gegen STAT5 mittels MTT-Zellviabilitätsassay

Das MTT ((3, (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetra-zoliumbromid)-Assay dient der Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen und kann so Rückschlüsse auf die Zellviabilität bzw. das Wachstum zulassen. Das namensgebende gelbe, wasserlösliche, Tetrazoliumsalz MTT wird in vitalen Zellen unter Beteiligung von NADH und NADPH zu blauem, wasserunlöslichem Formazan reduziert (146, 147). Da sich die metabolische Aktivität für viele Zelllinien proportional zur Anzahl der vitalen Zellen verhält, findet das MTT-Assay unter anderem Anwendung in der *in vitro*-Testung von Pharmaka, beispielsweise bei der Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven (148). Nach Homogenisierung der Formazankristalle mit Hilfe des Solubilisierungspuffers kann das umgesetzte Formazan bei einer Wellenlänge von 570 nm spektrometrisch detektiert und quantifiziert werden.

Die Zellen wurden für den Versuch in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert und wie unter 4.2.1.5 beschrieben die Zellzahl bestimmt. Für jede Zelllinie wurde für jeden der zu untersuchenden Zeitpunkte eine definierte Zellzahl in 100 µl Medium pro Well auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und es erfolgte die Transfektion (siehe 4.2.5). Die Platten wurden für 24, 48, 72 respektive 96 Stunden im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 10 µl MTT-Reagenz (0,5 % MTT in PBS) in jedes Well gegeben und die Platten erneut bei 37°C für weitere 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden pro Well jeweils 100 µl Solubilisierungspuffer (Tabelle 21) hinzu pipettiert und die Platten über Nacht erneut bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die photometrische Bestimmung bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 700 nm mittels eines Mikrotiterplatten-Readers (Tecan US Inc. Spark 10M).

Tabelle 21: Zusammensetzung des für den MTT-Assay genutzten Solubilisierungspuffers

Solubilisierungspuffer

10 % SDS

0,01 N HCl

in Aqua dest.

4.2.6 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden in einer Excel[®]-Datenbank (Microsoft[®]) tabellarisch erfasst.

Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism Version 7.0. Als Grundlage der Auswertung wurde ein biologisches System und damit eine Normalverteilung angenommen. Genutzt wurden t-Test (Western Blot), sowie einfache (qPCR, Western Blot) und zweifache (MTT) Varianzanalysen (one-/two-way-ANOVA).

Das Signifikanzniveau α wurde für alle genutzten Testverfahren bei 95 % definiert. Des Weiteren wurde ein p-Wert $p \leq 0,05$ als ein signifikantes Ergebnis, $p \leq 0,01$ als ein hoch signifikantes und $p \leq 0,001$ ein höchst signifikantes Ergebnis definiert. Alle Versuche wurden jeweils mit mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Resistenznachweis der Zellen: Proliferation unter Docetaxel oder Cabazitaxel - Bestimmung des IC50-Wertes in den parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen

Um die Sensitivität bzw. Resistenz der verwendeten PCa-Zellen gegen die Chemotherapeutika Docetaxel und Cabazitaxel nachzuweisen, wurde mit allen Zelllinien Proliferationsassays unter Behandlung mit den genannten Chemotherapeutika durchgeführt. Die getesteten Wirkstoffkonzentrationen lagen zwischen 0,01 nM und 1000 nM.

Für die Dosis-Wirkungs-Kurven unter Behandlung mit Docetaxel bzw. Cabazitaxel wurden jeweils die parentalen den resistenten Zellen gegenübergestellt. Die PCa-Zelllinien zeigten dosis- und zeitabhängig eine deutliche Verstärkung der Proliferationsinhibition nach Gabe der Chemotherapeutika (Abbildung 5). Insgesamt zeigten sich die parentalen Zelllinien deutlich sensitiver gegenüber der Behandlung als deren resistente Subkulturen. Diese Beobachtung lässt sich anhand der ermittelten IC50-Werte verifizieren (Tabelle 22 und Tabelle 23).

Für PC3-Zellen zeigte der IC50-Wert von Docetaxel einen Anstieg von 89,02 nM bei den parentalen Zellen auf 187,4 nM Docetaxel bei den docetaxelresistenten PC3-Zellen (Abbildung 5a, Tabelle 22). Der IC50-Wert hat sich hier somit mehr als verdoppelt. Eine zwanzigfache Erhöhung war bei den LNCaP-Zellen zu beobachten, hier lag der IC50 für parentale LNCaP-Zellen bei 8,25 nM Docetaxel und erhöhte sich für docetaxelresistente LNCaP-Zellen auf 166,8 nM (Abbildung 5d, Tabelle 22). Der IC50-Wert für parentale DU145-Zellen betrug 30,68 nM Docetaxel (Tabelle 22). Docetaxelresistente DU145-Zellen zeigten nach Wiederbehandlung mit Docetaxel im gewählten Testbereich keine signifikante Proliferationsinhibition, erst bei sehr hohen Konzentrationen resultierte die Docetaxelgabe in einem leichten Abfall der Proliferation (Abbildung 5b). Der IC50-Wert lag hier damit oberhalb des untersuchten Testbereiches und war somit nicht zu erfassen. Von allen untersuchten Zelllinien war die Docetaxelresistenz somit für docetaxelresistente DU145-Zellen am stärksten ausgeprägt. Mit einem Anstieg von 5,06 nM Cabazitaxel auf 16,5 nM zeigte sich der IC50-Wert für die cabazitaxelresistente DU145-Zellen fast um das Dreifache erhöht (Abbildung 5c, Tabelle 23). Mit IC50-Werten von 1,18 nM Cabazitaxel für parentale LNCaP-Zellen und 27,81 nM für cabazitaxelresistente LNCaP-Zellen weisen letztere

Ergebnisse

eine ähnlich stark ausgeprägte Resistenz gegenüber Cabazitaxel auf wie die docetaxelresistenten LNCaP-Zellen gegenüber Docetaxel (Abbildung 5e, Tabelle 23).

Die Daten belegen die Therapieresistenz aller chronisch mit den Taxanen Docetaxel oder Cabazitaxel behandelten PCa-Zellen.

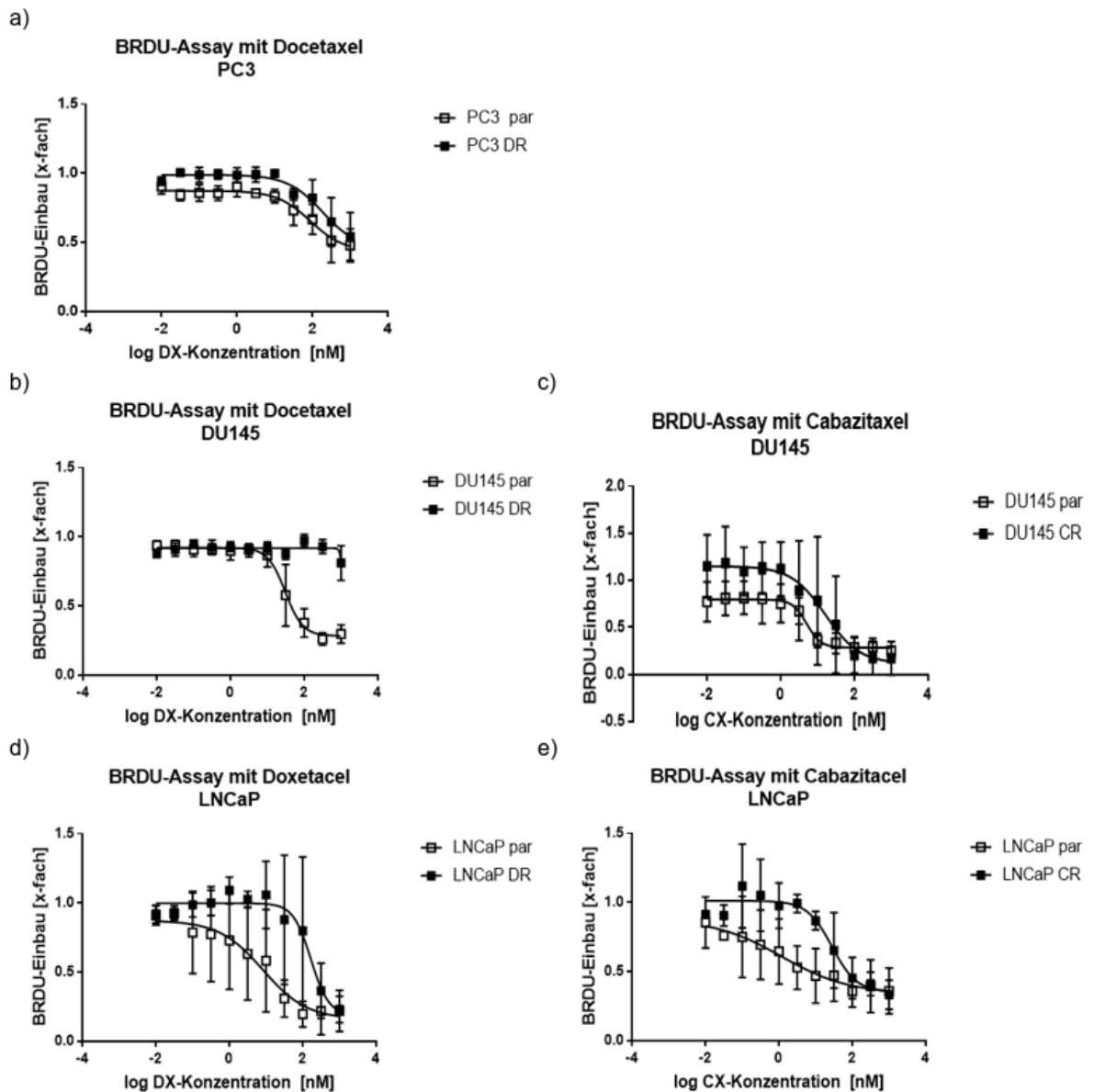


Abbildung 5: Dosis-Wirkungs-Kurven der Prostatakarzinom-Zelllinien unter Behandlung mit Docetaxel/Cabazitaxel. Proliferation parentaler (par) und resistenter (DR oder CR) PCa-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von Docetaxel (1 μ M-0,01 nM) oder Cabazitaxel (1 μ M-0,01 nM). Jeweils unbehandelte Zellen dienen als Kontrollen (als Referenzwert definiert). a) PC3 par und PC3-DR unter Docetaxelbehandlung (n = 3). b) DU145 par und DU145-DR unter Docetaxelbehandlung (n = 3). c) DU145 par und DU145-CR unter Cabazitaxelbehandlung (n = 3). d) LNCaP par (n = 6) und LNCaP-DR (n = 5) unter Docetaxelbehandlung. e) LNCaP par (n = 4) und LNCaP-CX (n = 3) unter Cabazitaxelbehandlung. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD).

Ergebnisse

Tabelle 22: Ermittelte IC50-Werte der parentalen (par) und docetaxelresistenten (DR) Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP unter Docetaxelbehandlung. Behandlungszeitraum von 72 Stunden, Docetaxelkonzentrationen zwischen 1000 nM und 0,01 nM.

Zelllinie	par	DR
PC3	89,02	187,4
DU145	30,68	-
LNCaP	8,25	166,8

Abkürzungen. par = parental, DR = docetaxelresistent

Tabelle 23: Ermittelte IC50-Werte parentaler (par) und cabazitaxelresistenter (CR) Zelllinien DU145 und LNCaP unter Cabazitaxelbehandlung. Behandlungszeitraum von 72 Stunden, Cabazitaxelkonzentrationen zwischen 1000 nM und 0,01 nM.

Zelllinie	par	CR
DU145	5,06	16,5
LNCaP	1,18	27,81

Abkürzungen. par = parental, CR = cabazitaxelresistent

5.2 Charakterisierung parentaler versus therapieresistenter PCa-Zellen

Zur Charakterisierung der parentalen versus der therapieresistenten PCa-Zelllinien wurden die Proteinexpressionsprofile der Differenzierungsmarker E-Cadherin und Vimentin, des AR und Prostataspezifischen Antigens (PSA), des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) und der STAT5-Proteine analysiert. Da die androgensensitiven LNCaP-Zellen hohe Passagen (größer 300) aufwiesen, wurde zusätzlich eine niedrige Passage (nP) der parentalen LNCaP (kleiner 50) in die Untersuchungen im Western Blot einbezogen, um mögliche passagebedingte Unterschiede aufzuzeigen. Weiterhin wurde vertiefend die Expression von STAT5 auf RNA-Ebene evaluiert.

5.2.1 Proteinexpression der Differenzierungsmarker E-Cadherin und Vimentin in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen

Alle parentalen PCa-Zelllinien exprimierten E-Cadherin, wohingegen die Expression in den resistenten Zellen variierte (Abbildung 6). In den PC3-Zellen war dabei die E-Cadherin-Expression insgesamt schwächer ausgeprägt. In den docetaxelresistenten-Zellen der DU145 und LNCaP sank die Expression von E-Cadherin, einem epithelialen Differenzierungsmarker, im Vergleich zu den parentalen Zellen, höchst signifikant ab ($p < 0,0001$, Abbildung 6c und d). In den docetaxelresistenten PC3-Zellen war hingegen eine schwach signifikante E-Cadherin-

Ergebnisse

Zunahme zu beobachten ($p < 0,0199$, Abbildung 6a und b). In den cabazitaxelresistenten DU145-Zellen wurde die E-Cadherin-Expression bis unter die Nachweisgrenze reduziert (Abbildung 6a und c). In den cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen wurde die E-Cadherin-Expression hingegen nicht signifikant verändert (Abbildung 6a und d). Innerhalb der beiden untersuchten LNCaP-Passagen (parentale Zellen hoher versus niedriger Passage) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der E-Cadherin-Expression und damit keine passagebedingte Änderung der E-Cadherin-Expression.

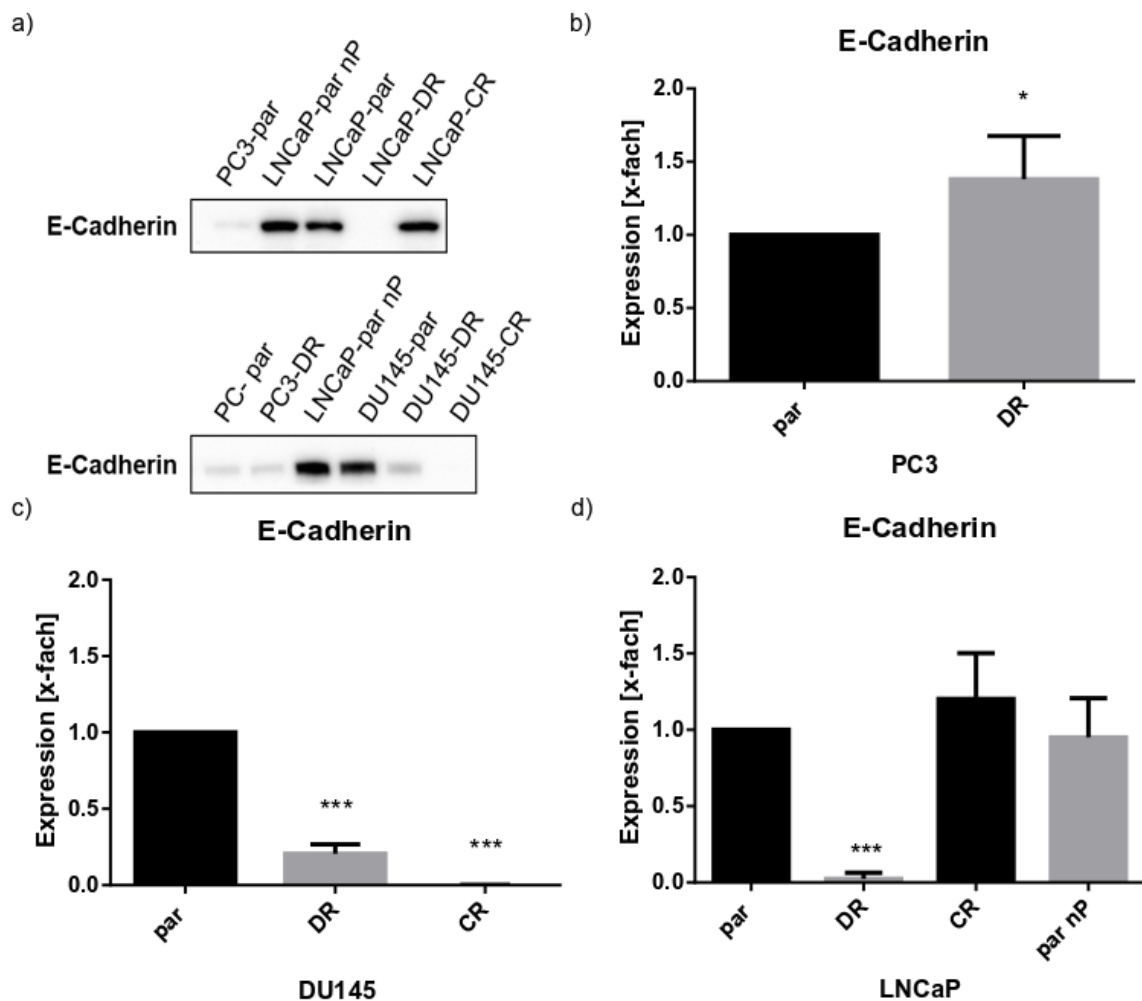


Abbildung 6: Western Blot Analyse: E-Cadherin-Expression in parentalen und docetaxel- bzw. cabazitaxelresistenten PCa-Zellen. a) Repräsentative Western Blots der E-Cadherin-Expression in parentalen und therapieresistenten LNCaP, PC3 und DU145. par = parental, DR = docetaxelresistent, CR = cabazitaxelresistent, nP = niedrige Passage. Pixelanalyse der Western Blot Analyse von therapieresistenten versus parentalen (als Referenzwert definiert) b) PC3, c) DU-145 und d) LNCaP-Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede resistenter zu parentalen PCa-Zellen: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, $n = 5$.

Die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin nahm in den docetaxelresistenten PC3-Zellen sowie docetaxelresistenten und cabazitaxelresistenten DU145-Zellen zu (Abbildung 7). Dieser Anstieg zeigte sich signifikant im Vergleich zwischen parentalen und docetaxelresistenten PC3-Zellen ($p = 0,0285$, Abbildung 7a und b). Die parentalen LNCaP-Zellen exprimierten kein Vimentin, die docetaxelresistenten Formen zeigten hingegen eine deutliche Vimentin-Expression (Abbildung 7a). In den cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen konnte wie in den parentalen LNCaP-Zellen hingegen keine Expression von Vimentin nachgewiesen werden (Abbildung 7a). Die taxanresistenten Zellen der Zelllinie DU145 zeigten einen starken, jedoch nicht-signifikanten Anstieg der Vimentin-Expression.

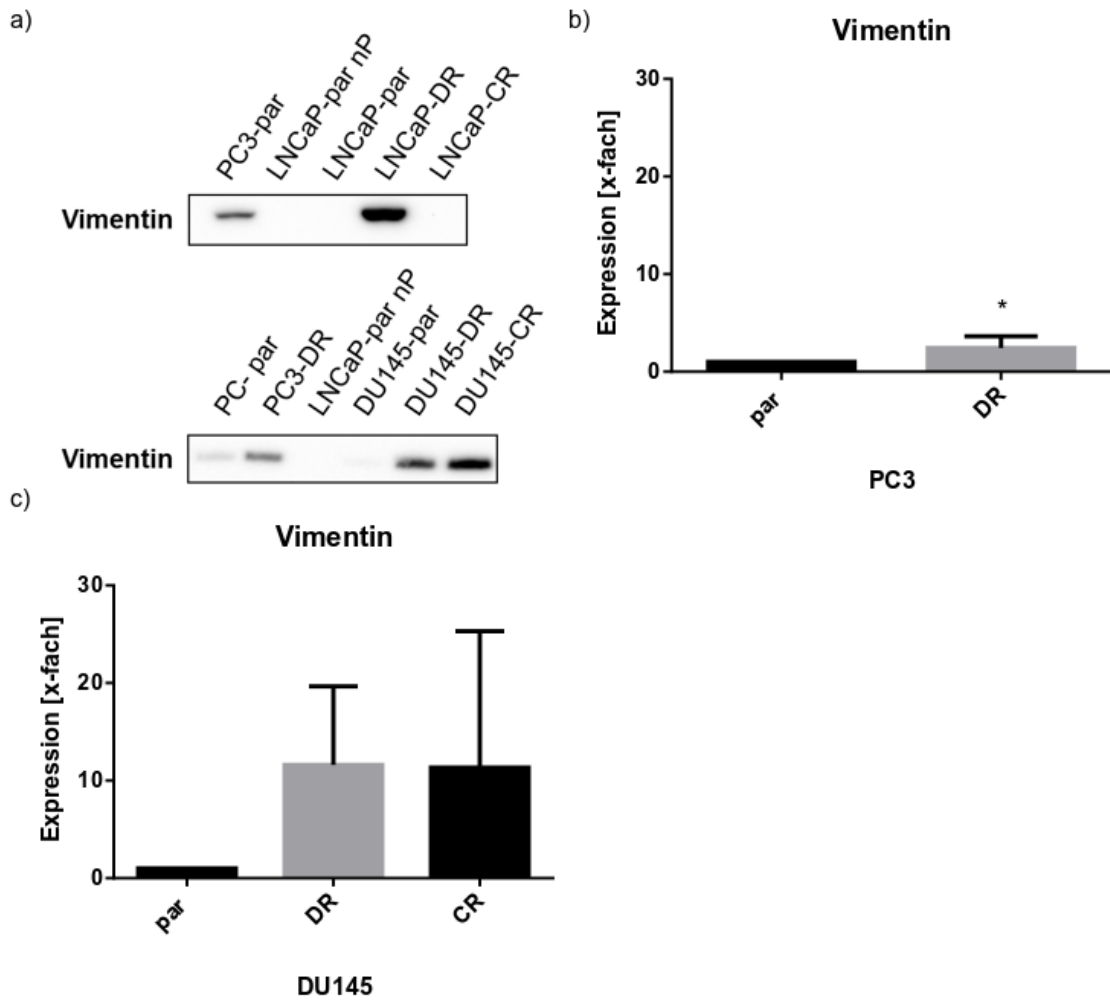


Abbildung 7: Western Blot Analyse: Vimentin-Expression. a) Repräsentative Western Blots der Vimentin-Expression in parentalen und therapiereisistenten LNCaP, PC3 und DU145. par = parental, DR = docetaxelresistent, CR = cabazitaxelresistent, nP = niedrige Passage. Pixelanalyse der Western Blot Analyse von therapiereisistenten versus parentalen (als Referenzwert definiert) b) PC3 und c) DU145-Zellen. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikanz: * $p \leq 0,05$, $n = 5$.

5.2.2 Evaluation der Expression von Proteinen des Androgen-Signalwegs in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen

Ausschließlich für die androgensensitiven LNCaP-Zellen konnte eine Expression des AR nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine AR-Expression der parentalen LNCaP-Zellen sowohl bei hohen als auch niedrigen Passagen, sowie bei cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen. Die docetaxelresistenten LNCaP-Zellen exprimierten hingegen keinen AR mehr.

Für das Prostata-spezifische Antigen (PSA) zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster. Auch hier exprimierten nur die LNCaP-Zellen PSA. Innerhalb der höheren Passagen der LNCaP-Zellen ging dieses jedoch verloren (Abbildung 8). Auch in den docetaxelresistenten LNCaP-Zellen war kein PSA mehr detektierbar. In den cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen konnte hingegen noch PSA nachgewiesen werden (Abbildung 8).

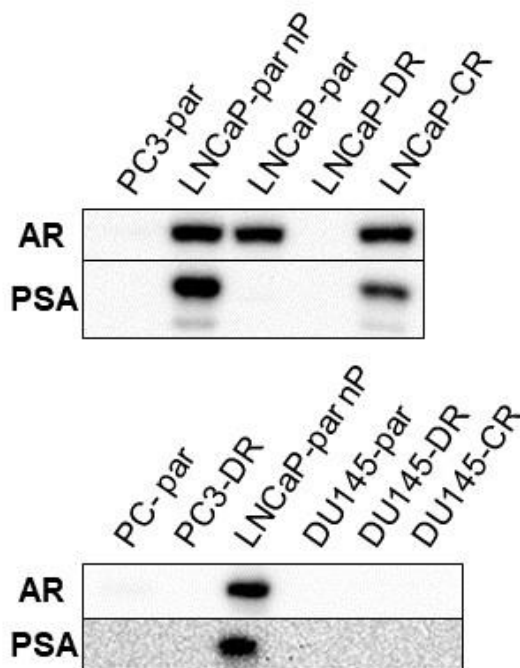


Abbildung 8: Western Blot Analyse: AR- und PSA-Expression. Repräsentative Western Blots der Vimentin-Expression in parentalen und therapieresistenten LNCaP, PC3 und DU145. par = parental, DR = docetaxelresistent, CR = cabazitaxelresistent, nP = niedrige Passage. Zwei repräsentative Western Blots aus n = 5.

5.2.3 Proteinexpression des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen

Basal exprimierten die parentalen PC3 und DU145 Zellen den Glukokortikoid-Rezeptor (GR) (Abbildung 9). In docetaxelresistenten PC3-Zellen konnte im Vergleich zum parentalen Pendant sogar höchst signifikant mehr GR gemessen werden (Abbildung 9a und b, $p < 0,001$). Signifikante Unterschiede der GR-Expression zwischen parentalen und taxanresistenten DU145-Zellen konnten jedoch nicht identifiziert werden (Abbildung 9a und c). Die parentalen und cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen exprimierten keinen GR, in den docetaxelresistenten LNCaP-Subkulturen konnte jedoch eine distinkte GR-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 9a).

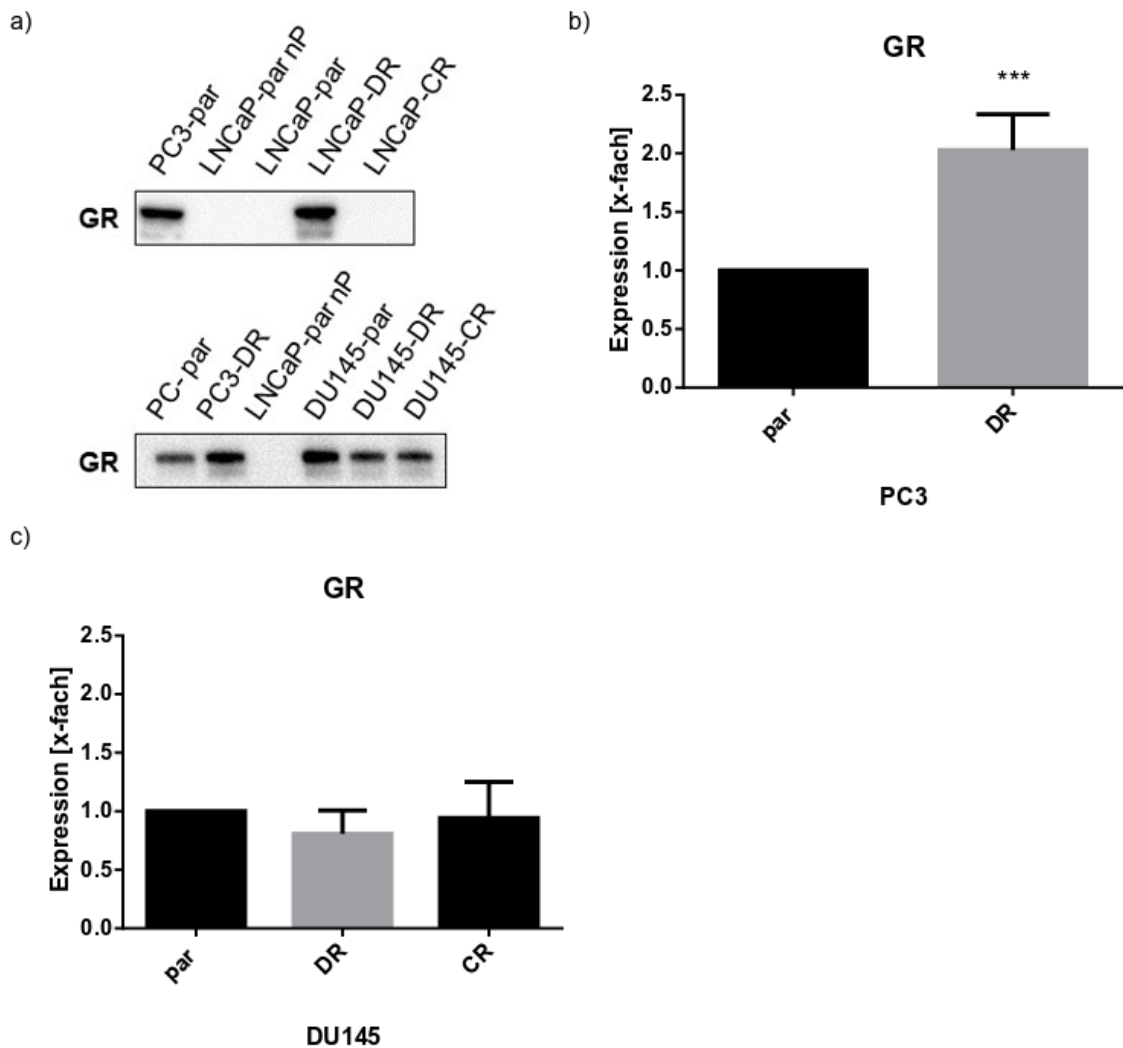


Abbildung 9: Western Blot Analyse: Glukokortikoid-Rezeptor-Expression. a) Repräsentative Western Blots der Glukokortikoid-Rezeptor-Expression in parentalen und therapieresistenten LNCaP, PC3 und DU145. Par = parental, DR = docetaxelresistent, CR = cabazitaxelresistent, nP = niedrige Passage. Pixelanalyse der Western Blot Analyse von therapieresistenten versus parentalen (als Referenzwert definiert) b) PC3 und c) DU145-Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede resistenter zu parentalen PCa-Zellen: *** $p \leq 0,001$, $n = 5$.

5.2.4 Die Signalwandler und Aktivator der Transkription 5 (STAT5)-Expression auf Protein-Ebene von parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen

Die parentalen DU145- und LNCaP-Zellen wiesen eine basale STAT5-Expression auf. Parentale PC3-Zellen exprimierten kein STAT5, docetaxelresistente PC3-Zellen zeigten hingegen eine deutliche STAT5-Expression (Abbildung 10a). Innerhalb der DU145-Zelllinie stieg die STAT5-Expression in den docetaxelresistenten und cabazitaxelresistenten Zellen deutlich an, der Anstieg für cabazitaxelresistente DU145 war dabei statistisch hoch signifikant (Abbildung 10b, $p = 0,0069$). Für die LNCaP

zeigte sich zwischen parentalen und taxanresistenten Zellen hingegen keine deutliche Varianz der STAT5-Expression. Es fiel jedoch eine, mit steigender Passage, signifikante Verringerung der STAT5-Expression innerhalb der parentalen LNCaP-Zelllinie auf (Abbildung 10c, $p = 0,319$).

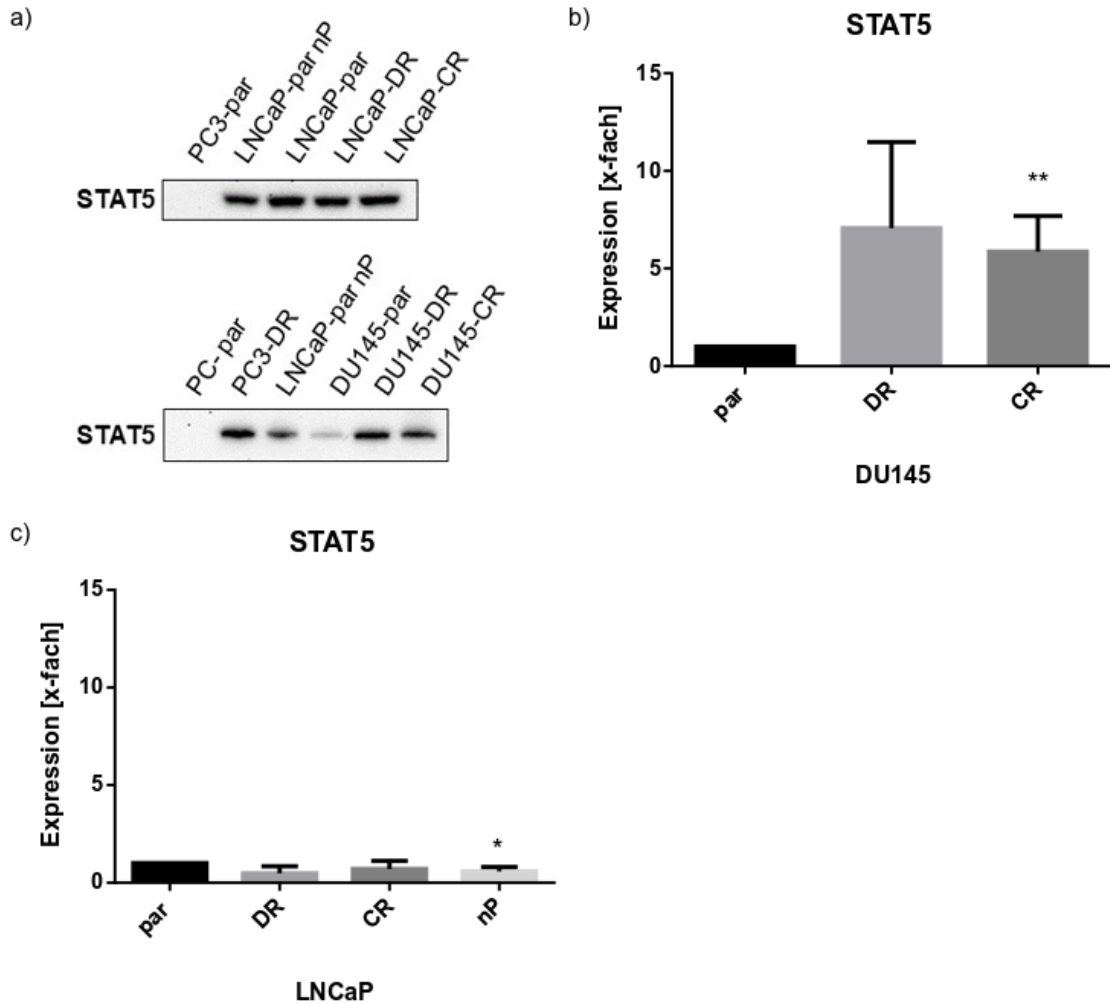


Abbildung 10: Western Blot Analyse: STAT5-Expression. a) Repräsentative Western Blots der STAT5-Expression in parentalen und therapieresistenten LNCaP, PC3 und DU145. par = parental, DR = docetaxelresistent, CR = cabazitaxelresistent, nP = niedrige Passage. Pixelanalyse der Western Blot Analyse von therapieresistenten versus parentalen (als Referenzwert definiert) b) DU145 und c) LNCaP-Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede resistenter zu parentalen PCa-Zellen: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, $n = 5$.

5.2.5 Die STAT5-Expression auf RNA-Ebene von parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen

Um Veränderungen auf Ebene der genetischen Expression differenzieren zu können, erfolgte darüber hinaus die Untersuchung der STAT5-Expression auf RNA-Ebene. Hier wurde die Expression der Isoformen STAT5A und STAT5B differenziert erfasst (Abbildung 11). Die parentalen PC3-Zellen exprimierten keine der STAT5-Isoformen. Docetaxelresistente PC3-Zellen hingegen exprimierten auf RNA-Ebene sowohl STAT5A (Abbildung 11a), als auch STAT5B (Abbildung 11b). Die Differenz zur parentalen Kontrolle war für beide Isoformen höchst signifikant ($p \leq 0,001$, Abbildung 11). Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen aus dem Western Blot. Auch innerhalb der Zelllinie DU145 stieg die STAT5-Expression an, für STAT5A war dieser Anstieg in den docetaxelresistenten DU145-Zellen signifikant ($p = 0,0234$). Cabazitaxelresistente DU145-Zellen zeigten hingegen keinen signifikanten Anstieg der STAT5-Expression. Damit unterscheidet sich dieses Untersuchungsergebnis von den im Western Blot erhobenen Daten, welche einen signifikanten Anstieg der STAT5-Expression für die cabazitaxelresistenten, nicht jedoch für docetaxelresistenten, DU145-Zellen aufwiesen (Abbildung 11b). Innerhalb der LNCaP-Zellen zeigten sich, wie auch im Western Blot, keine signifikanten Unterschiede in der STAT5-Expression zwischen den parentalen und den docetaxelresistenten bzw. cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen. Insgesamt exprimierten die PC3- und DU145-Zellen mehr Protein der Isoform STAT5A, die Zellen der Zelllinie LNCaP dagegen mehr STAT5B auf der RNA-Ebene.

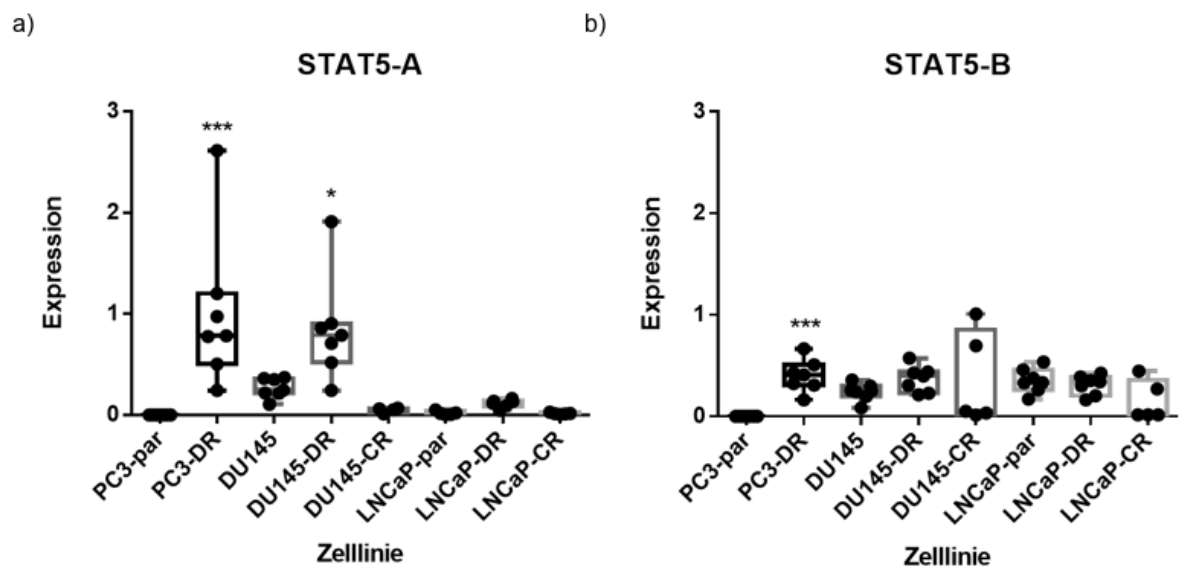


Abbildung 11: STAT5A- und STAT5B-Expression auf RNA-Ebene.

Expression von a) STAT5A und b) STAT5B der Zelllinien PC3, DU145, sowie LNCaP. Die *Whiskers* erstrecken sich vom Minimum zum Maximum. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikanz der resistenten zu den jeweiligen parental Zellen: * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, $n = 7$, für PC3-par, PC3-DR, DU 145, DU145-DR, LNCaP, LNCaP-DR, $n = 5$ für DU145-CR und LNCaP-CR. DR = docetaxelresistent, CR = cabazitaxelresistent.

5.3 Der Einfluss des STAT5-Knock-downs auf das Wachstumsverhalten parentaler und taxanresistenter PCa-Zellen

Mittels *siRNA-Knock-down* wurde die funktionelle Relevanz von STAT5 auf das Wachstumsverhalten der PCa-Zellen untersucht. Das Wachstum zeigte sich über den gesamten untersuchten Zeitraum unter dem Einfluss der getesteten Behandlungen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen konstant. Weder die Kontrollbehandlungen mit *MOCK* oder Kontroll-siRNA noch die Behandlung mit siRNA gegen STAT5A oder STAT5B resultierte in einer statistisch signifikanten Abweichung des Wachstumsverhaltens. Dies trifft sowohl für die parentalen als auch die docetaxel- und cabazitaxelresistenten PCa-Zelllinien zu (Abbildung 12). Die funktionelle Blockade von STAT5A und STAT5B hat damit keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der PCa-Zellen.

Ergebnisse

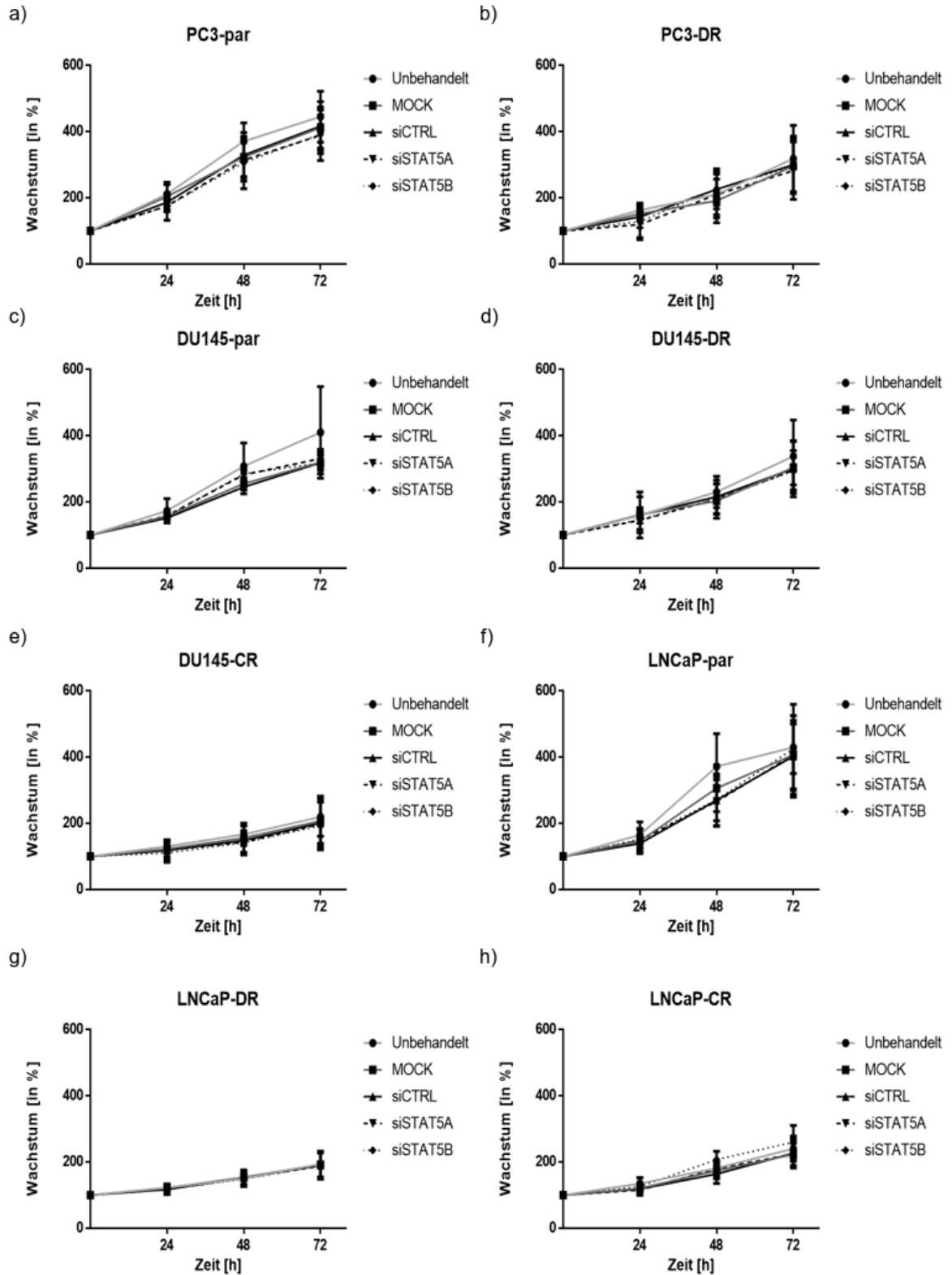


Abbildung 12: Wachstumskinetiken der PCa-Zelllinien nach siRNA-Knock-down von STAT5. Wachstumskinetiken der a) parentalen (par) PC3, b) docetaxelresistenten (DR) PC3, c) parentalen (par) DU145, d) docetaxelresistenten (DR) DU145, e) cabazitaxelresistenten (CR) DU145, f) parentalen (par) LNCaP, g) docetaxelresistenten (DR) LNCaP und h) cabazitaxelresistenten (CR) LNCaP nach siRNA-Blockade mit siSTAT5A und siSTAT5B. Unbehandelt, MOCK (nur mit Transfektionsreagenz behandelt), siCTRL (Kontroll-siRNA)-behandelte Zellen dienten als Kontrollen. Die Ausgangswerte zum Zeitpunkt null wurden auf 100 % gesetzt. X-Achse: zeitlicher Verlauf in Stunden. Y-Achse: Wachstum in Prozent. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). n = 5.

6 Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung Therapieresistenzbedingter Veränderungen relevanter Signalproteine, insbesondere STAT5, in einem Panel von PCa-Zellen. Weiterhin sollte die Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT5 für das Wachstumsverhalten docetaxel- und cabazitaxelresistenter PCa-Zelllinien und ein möglicher Zusammenhang zum Tumorprogress evaluiert werden. Grundlage war die Hypothese, dass der Transkriptionsfaktor STAT5 in taxanresistenten Zellen stärker exprimiert wird, er eine tragende Rolle im Rahmen der Resistenzbildung einnimmt und damit einen Ansatzpunkt für neue Therapien darstellen könnte.

6.1 Resistenzinduktion und die daraus resultierenden Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von PCa-Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung zur Taxanresistenz beim PCa zeigen ein aggressiveres Wachstumsverhalten der taxanresistenten gegenüber den parental PCa-Zellen. Insgesamt zeigte sich der IC50-Wert aller docetaxel- bzw. cabazitaxelresistenten Subzelllinien gegenüber den parental signifikant erhöht. So musste bei den resistenten Zellen mindestens eine doppelte Dosis verabreicht werden, um eine 50-prozentige Inhibition zu erreichen. Interessanterweise antworteten die LNCaP-Zellen, welche initial am sensitivsten auf Cabazitaxel und Docetaxel ansprachen, mit einer noch robusteren Resistenz (mind. 10-fach erhöhte IC50-Dosis). Dieses Phänomen konnte bereits bei gegen den Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib resistente Nierenzellkarzinomzellen beobachtet werden (149), ohne jeglichen Bezug zur Taxantherapie und dem PCa. Ein Zusammenhang zwischen Ansprechen und Resistenz ist somit nicht auszuschließen.

Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieses therapieresistenten Phänotyps sind noch nicht abschließend geklärt. Ein ähnliches aggressives Wachstumsverhalten sowie eine Zunahme des invasiven Potentials ist jedoch auch für die therapieresistenten Formen anderer urologischer Karzinomentitäten, wie dem Harnblasenkarzinom, beschrieben (150, 151).

Wie bereits eingangs erörtert, nehmen STAT-Proteine Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse, die unter anderem mit der Tumorgenese und Metastasierung in Verbindung gebracht werden (83, 101). Eine erhöhte STAT5-Aktivität wurde in vorangegangenen

Studien mit einem erhöhtem histologischen *Grading* (102) sowie einer Verkürzung des progressionsfreien Überlebens assoziiert. Denkbar, dass sich dies aus dem beobachteten aggressiveren Wachstumsverhalten der taxanresistenten Zellen ableitet.

In der vorliegenden Arbeit und anderen Arbeiten (152, 153) zeigt sich, dass auch weitere Proteine in die Ausbildung eines aggressiveren Phänotypes der taxanresistenten Karzinomen involviert sein könnten. Es ist davon auszugehen, dass die Resistenzentstehung ein komplexer, multifaktorieller Vorgang ist.

6.2 Wandlung der Expressionsprofile taxanresistenter PCa-Zellen

Im Rahmen der hier durchgeführten Analysen der Proteinexpressionsprofile zur vertiefenden Charakterisierung parentaler versus taxanresistenter PCa-Zellen konnten wir signifikante zelltypspezifische Veränderungen sowohl von E-Cadherin, Vimentin, AR, PSA, GR als auch STAT5 nachweisen. Für STAT5 wurden auf RNA-Ebene zudem Verschiebungen der Expression in STAT5A und STAT5B beobachtet.

6.2.1 Die Veränderung der Expression der Differenzierungsmarker E-Cadherin und Vimentin in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen liefert Hinweise auf die EMT

Alle untersuchten parentalen PCa-Zellen exprimierten das Adhäsionsprotein E-Cadherin, wohingegen dessen Expression in den resistenten Zellen variierte. Eine höchst signifikante Abnahme der E-Cadherin-Expression zeigte sich in den docetaxelresistenten DU145- und LNCaP-Zellen. Die Expression innerhalb der cabazitaxelresistenten DU145-Zellen sank darüber hinaus sogar bis unter die Nachweisgrenze ab. Einzig für die docetaxelresistenten PC3- sowie cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen ließ sich keine Veränderung der Expression nachweisen. Gleichzeitig war ein Anstieg in der Vimentinexpression unter Taxanresistenz zu beobachten. Einzige Ausnahme waren die cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen, die wie die parentalen Zellen dieser Zelllinie kein Vimentin exprimierten. Insgesamt konnte damit für die Differenzierungsmarker E-Cadherin und Vimentin eine eindeutige Modulation der Expressionsmuster im Sinne der EMT nachgewiesen werden. Besonders stark war dieser Effekt bei den docetaxelresistenten PCa-Zellen zu beobachten.

Die EMT kann somit als Begleiterscheinung, möglicherweise sogar als mit ursächlich für die Transition parentaler Zellen in die Taxanresistenz angesehen werden. Hinweise

hierfür finden sich in Untersuchungen zur EMT in unterschiedlichen Karzinomentitäten unter differenten Chemotherapie- sowie Strahlentherapieregimen. So wiesen beispielsweise Yang *et al.* in oxaliplatinresistenten Zellen des kolorektalen Karzinoms die Ausbildung eines aggressiven und invasiven Phänotypes nach (126). Shintai *et al.* fanden ähnliche Belege an *Non-small Cell Lung Cancer*-Zellen (NSCLC) unter Radiochemotherapie (125). Übereinstimmend mit den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit fanden Pühr *et al.* Belege für den Prozess der EMT in PCa-Zellen unter Docetaxeleinwirkung *in vitro* und *in vivo* (6). Dabei wiesen sie ein erhöhtes migratorisches und invasives Potential der Zellen nach. In einem Patientenkollektiv von 28 Patienten konnte eine signifikant niedrigere E-Cadherin-Expression nach Docetaxeltherapie bei Vorliegen eines hohen Gleason-Scores nachgewiesen werden. Auch Gewebeproben aus Tumorrezidiven wiesen niedrigere E-Cadherin-Level auf (6). Übereinstimmende Ergebnisse finden sich auch bei Marín-Aguilera *et al.*, welche einen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor ZEB1, einem Mediator der EMT, und Docetaxelresistenz nachwiesen (154). Lu *et al.* scheinen diese Ergebnisse zu bestätigen, in dem sie zeigten, dass eine Behandlung docetaxelresistenter PCa-Zellen mit Quercetin die EMT sowie die Ausbildung Stammzell-ähnlicher Phänotypen in Teilen rückgängig machen und die Zellen wieder gegenüber Docetaxel sensibilisieren konnte (155).

6.2.2 Expression von Proteinen des Androgen-Signalwegs in parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen

Ausschließlich in den androgensensitiven LNCaP konnte basal eine AR-Expression nachgewiesen werden. Auch andere Arbeiten hatten dies bereits zeigen können (133). Interessanterweise ist die Expression des AR dabei passagenunabhängig, wie hier gezeigt. Allerdings verlieren die parentalen LNCaP-Zellen mit Ansteigen der Passage ihre Fähigkeit zur PSA-Synthese. Im Unterschied dazu zeigten die cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen, die ebenfalls eine hohe Passage aufwiesen, eine unveränderte Expression sowohl des AR als auch von PSA. Docetaxelresistente LNCaP-Zellen exprimierten hingegen keinen AR mehr und synthetisierten auch kein PSA. Sie werden offensichtlich androgeninsensitiv.

Der AR und die antiandrogene Therapie spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese sowie Therapie des PCas und der Ausbildung einer Androgenresistenz. Dabei konnte u. a. in der STAMPEDE-Studie gezeigt werden, dass eine

Kombinationstherapie mit Docetaxel und ADT das Gesamtüberleben erhöht (57). Gleichzeitig scheint eine alleinige Chemotherapie wenig effektiv im hormonsensitiven PCa (156). Damit liegt der Verdacht nahe, dass ein Zusammenhang zwischen Docetaxelsensitivität und Androgeneinwirkung vorliegt. Übereinstimmend mit dieser These erreichten Komura *et al.* in der Zellkultur eine Docetaxelresensitivierung hormonsensitiver PCa-Zellen unter Blockade des AR-Signalweges (156). Einen ähnlichen synergistischen Effekt zwischen Androgensuppression und Docetaxelwirkung beschrieben Mout *et al.* (157). Da sich die kombinierte Hormon-Chemotherapie darüber hinaus in der Behandlung des hormonsensitiven PCa als effektiver erwiesen hat als in der des CRPC, schlussfolgerten die Autoren, dass die Initiierung einer Kombinationstherapie eine Reihe unterschiedlicher transkriptionaler Änderungen nach sich zieht, welche zu einer erhöhten Docetaxelsensitivität führen (156). In diesem Zusammenhang identifizierten Komura *et al.* das Gen KDM5D, welches die Lysin-spezifische Demethylase 5D kodiert, als möglichen Sensibilisator von Docetaxel (156). Daneben gibt es auch erste Untersuchung hinsichtlich des Androgeneinflusses auf die Cabazitaxelsensitivität. Übereinstimmend mit den Untersuchungen zu Docetaxel zeigte sich auch hier eine verbesserte Sensitivität dieses Taxanes unter gleichzeitiger AR-Blockade (158, 159). Da darüber hinaus in einem sehr hohen Prozentsatz der Patienten mit CRPC Veränderungen des AR-Signalweges nachgewiesen wurden (nach Studie zwischen 62 und 85 %), findet sich hier eine mögliche Erklärung für die verminderte Taxansensitivität im CRPC (156, 158).

In mehreren Studien wurden sowohl AR-positive als auch AR-negative Zellsubpopulationen innerhalb von CRPC-Zellen nachgewiesen (160). Daher stellten Hoang *et al.* die These auf, dass über die Androgenwirkung hinaus noch zusätzliche, androgenunabhängige molekulare Mechanismen vorliegen, die die Progression des CRPC bedingen (160). Damit verbunden wären demnach pathogenetisch unterschiedliche therapeutische Ansatzpunkte und damit mehr therapeutische Optionen.

6.2.3 Die Expression des GR steigt in docetaxelresistenten, nicht jedoch in cabazitaxelresistenten, PCa-Zellen an

Glukokortikoide wie Prednisolon sind ein fester Bestandteil der Therapie des metastasierten CRPC und werden u. a. mit Docetaxel und Cabazitaxel in fester

Kombination verabreicht, um das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen zu mindern (3, 161). Gleichzeitig gibt es jedoch Hinweise darauf, dass dem GR selbst eine Bedeutung in dem Progress und der Resistenzentwicklung des PCa zukommt. Unter diesen Gesichtspunkten wurde in dieser Arbeit die Expression des GR in den PCa-Zellen untersucht. Es ließ sich eine signifikante GR-Überexpression der docetaxelresistenten PC3-Zellen nachweisen. Ein Expressionsanstieg des GR in docetaxelresistenten DU145-Zellen zeigte sich hingegen nicht. Untersuchungen der Zelllinie LNCaP zeigten eine GR-De-novo-Synthese bei gleichzeitigem Verlust der AR-Expression im docetaxelresistenten Subtyp. In der Zusammenschau der Untersuchungsergebnisse aller untersuchten Zellpopulationen fällt auf, dass der AR und der GR nie von der gleichen Subpopulation exprimiert werden. Dabei bilden androgensensitive Zellen keinen GR aus, androgeninsensitive Zellen dagegen immer. Dies spiegeln die Ergebnisse von Santer *et al.* wider und unterstützt die von ihnen postulierte These der androgenen endokrinen Funktion des GR (162).

Insgesamt zeigte sich eine eindruckliche Divergenz der Expressionsmuster des GR zwischen docetaxelresistenten und cabazitaxelresistenten Zellen. Die untersuchten cabazitaxelresistenten DU145- und cabazitaxelresistenten LNCaP-Zellen exprimieren den GR auf dem gleichen Level wie die parentalen Zellen dieser Zelllinien. Für die docetaxelresistenten PC3- und LNCaP-Zellen wurden hingegen jeweils deutlich erhöhte GR-Level detektiert.

Interessanterweise zeigt der GR im Rahmen zahlreicher Studien eine Interaktion mit STAT5A und STAT5B in verschiedenen Zelltypen (163, 164). Able *et al.* fanden in ihrer Arbeit Anhaltspunkte dafür, dass der GR in Mamma-Epithel-Zellen, Hepatozyten und Adipozyten als Koaktivator von STAT5 fungiert, in Zellen des Hippocampus und in T-Zellen jedoch eine gegensätzliche Rolle als Korepressor einnimmt (105). Pühr *et al.* zeigten einen Zusammenhang zwischen dem GR und dem Progress des PCa (165). Sie wiesen nach, dass die GR-Expression in primärem PCa-Gewebe sinkt, in Metastasen jedoch wieder ansteigt und auch unter Langzeit-ADT die GR-Expression zunimmt. Für Patienten mit einem Rezidiv, die eine hohe GR-Expression zeigten, war darüber hinaus die Dauer des progressionsfreien Überlebens verkürzt. Es wurde daher postuliert, dass dem GR eine antagonistische Rolle in der endokrinen Therapie des PCa zukommt (165). Santer *et al.* stellten die These auf, dass der GR nach Inaktivierung des AR-Signalweges eine kompensatorische Funktion übernimmt und

damit den Karzinomprogress, z. B. nach ADT, fördern könnte (162). Darüber hinaus ist der GR im hormoninsensitiven Mammakarzinom bereits als negativer prognostischer Faktor beschrieben (166). Der GR könnte somit auch eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des PCa einnehmen.

Erste Untersuchungen eines möglichen Zusammenhangs zwischen GR und Docetaxelresistenz wurden bereits durchgeführt. Kroon *et al.* zeigten, dass es in docetaxelresistenten PCa-Zellen zu einem Anstieg der GR-Expression kommt und eine Antagonisierung des GR eine Resensibilisierung gegenüber Docetaxel ermöglicht (167).

Unsere Untersuchungen untermauern die Annahme, dass dem GR eine Rolle in der Ausbildung der Docetaxelresistenz zukommt. Eine Verbindung von GR-Expression und einer Resistenz gegen Cabazitaxel konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Es ist also anzunehmen, dass die Entwicklung einer Cabazitaxelresistenz auf anderen molekularen Mechanismen beruht, was auch erklären könnte, warum Cabazitaxel bei Patienten mit Therapieversagen von Docetaxel noch erfolgreich eingesetzt werden kann.

6.2.4 Die STAT5-Expression zeigt sich in taxanresistenten PCa-Zellen vermehrt erhöht

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die STAT5-Expression in docetaxel- und cabazitaxelresistenten PCa-Zellen der Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP untersucht. Dabei wurde die Expression sowohl auf Protein-, als auch auf RNA-Ebene analysiert. Tatsächlich konnte zelltyp- und resistenzabhängig eine erhöhte Expression von STAT5 nachgewiesen werden. In vorherigen Untersuchungen von Gu *et al.* wurde bereits die Expression von STAT5 in PCa-Zelllinien dargestellt und Hinweise für einen Einfluss dieses Transkriptionsfaktors auf das Wachstum und die Metastasierung aufgezeigt (13, 168).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen zeigten parentale LNCaP und DU145 eine basale STAT5-Expression auf der Protein-Ebene. In parentalen PC3-Zellen war hingegen keine basale STAT5-Expression detektierbar. Dies konnten auch von Ahonen *et al.* zeigen (114). Im Gegensatz zu den docetaxelsensitiven Zellen zeigten die docetaxelresistenten PC3-Zellen auf Protein- sowie auf RNA-Ebene eine deutliche Expression beider STAT5-Isoformen. Die gleiche Entwicklung der STAT5-Expression zeigte sich auch innerhalb der DU145-Zelllinie, in

der die taxanresistenten Zellen ebenfalls vermehrt STAT5 exprimierten. Für LNCaP ließ sich weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene eine signifikante Änderung der STAT5-Expression zwischen parentalen und taxanresistenten Subzelllinien nachweisen.

Damit konnten wir zeigen, dass es in den androgeninsensitiven PCa-Zelllinien zu einem Anstieg der STAT5-Expression unter Taxanresistenz kommt. Dies könnte somit ein Hinweis für einen Zusammenhang zwischen STAT5-Expression und Resistenzentwicklung bei androgeninsensitiven PCa-Zellen sein.

Insgesamt zeigten die parentalen PC3- und DU145-Zellen auf RNA-Ebene eine höhere basale Expression der Isoform STAT5A, die parentalen LNCaP der Isoform STAT5B. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Frage nach der Bedeutung dieser unterschiedlichen Expression der beiden STAT-5-Isoformen. So wurde für andere Tumorentitäten bereits nachgewiesen, dass den Isoformen unterschiedliche Rollen in der Pathogenese der Erkrankung zukommen (169).

Interessanterweise fand sich in den androgensensitiven LNCaP-Zellen im Gegensatz zu den androgeninsensitiven PC3- und DU145-Zellen eine geringere STAT5-Expression, die bei den taxanresistenten LNCaP-Subkulturen unverändert blieb. In verschiedenen vorangegangenen Untersuchungen wurde ein synergistisches Zusammenwirken von STAT5 und dem AR-Signalweg beschrieben, u. a. indem die beiden Proteine gegenseitig ihre Transkriptionsaktivität erhöhen (14, 170). Daneben wiesen Tan *et al.* aktives STAT5 in 95 % der untersuchten hormonrefraktären PCa-Zellen nach. Dabei stieg die Aktivität des Transkriptionsfaktors besonders nach ablativer Androgentherapie (14). Dies weist auf eine Rolle von STAT5 in der Ausbildung der Hormonresistenz und dem damit verbundenen Tumorprogress hin. Unter anderem in Studien von Tan *et al.* sowie Thomas *et al.* wird darüber hinaus eine Korrelation zwischen AR-Expression und einer verstärkten STAT5-Expression beziehungsweise der Ausbildung einer Docetaxelresistenz postuliert (15, 171).

Cabazitaxelresistente LNCaP-Zellen, im Gegensatz zu den docetaxelresistenten, behielten die Fähigkeit zur Expression des AR sowie von PSA im Zuge der Resistenzentwicklung. Parentale LNCaP-Zellen in späten Passagen, in denen sich die Kontrollzellen parallel zur Resistenzinduktion befanden, zeigten, im Vergleich zu LNCaP in frühen Passagen, einen Verlust von PSA aber eine Zunahme von STAT5.

Mit der unterschiedlichen Androgensensitivität ergibt sich ein grundlegender Unterschied in der Charakterisierung der beiden taxanresistenten Subformen der LNCaP-Zellen. Es fand sich jedoch keine direkte Korrelation zwischen Androgensensitivität und STAT5-Expression innerhalb der LNCaP-Zellen.

Die Untersuchungsergebnisse legen somit einen androgenunabhängigen Resistenzmechanismus gegen Taxane in androgeninsensitiven PCa-Zellen nahe. Eine mögliche Erklärung findet sich in einer Untersuchung von Gu *et al.*, in der die Induktion einer abnormalen Mikrotubulipolymerisierung, unter STAT5-Einfluss in PCa-Zellen beschrieben wird. Dabei kam es unter erhöhter STAT5-Aktivität zur Ausbildung eines dichten Mikrotubuli-Netzwerkes um die Nuklei (13). Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für andere Zellentitäten beschrieben (13, 172). Da wichtige zelluläre Prozesse wie der intrazelluläre Vesikeltransport oder die Mitose mikrotubuliabhängig ablaufen, ist es wahrscheinlich, dass mit dieser veränderten Mikrotubulistruktur weitreichende komplexe Auswirkungen verbunden sind. Mikrotubuli stellen darüber hinaus einen wichtigen Ansatzpunkt für die Wirkung der Taxane dar. Damit stehen diese Veränderungen der Mikrotubulipolymerisierung auch mit der Ausbildung von Taxanresistenzen in Zusammenhang. Vorangegangene Untersuchungen zeigen dabei verschiedene Veränderungen des Mikrotubulsystems, welche sowohl die tubulin- als auch mikrotubuliassoziierte Proteine betreffen, in PCa-Zellen nach Ausbildung einer Docetaxel- bzw. Cabazitaxelresistenz (76, 78, 93, 95).

6.3 Der Einfluss von STAT5 auf das Wachstumsverhalten taxanresistenter PCa-Zellen

Im Anschluss an die Evaluation der STAT5-Expression in den PCa-Zelllinien erfolgte die funktionelle Blockade des Transkriptionsfaktors, um seine Relevanz für die Zellviabilität bzw. das Wachstumsverhalten der Zellen untersuchen zu können.

Im Rahmen der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse hatte der spezifische *Knock-down* von STAT5A oder STAT5B keinen Einfluss auf die Zellviabilität bzw. das Wachstumsverhalten parentaler PCa-Zellen. Auch bei den taxanresistenten Zelllinien konnte kein Effekt des STAT5-Knock-downs nachgewiesen werden. Weder die docetaxel- noch cabazitaxelresistenten PCa-Zellen änderten nach STAT5-*knock-down* ihr Wachstumsverhalten, auch kam es zu keiner Resensibilisierung gegenüber den beiden Chemotherapeutika. Damit zeigten sich weder STAT5A noch STAT5B

allein als signifikante Einflussfaktoren auf das Wachstumsverhalten taxanresistenter PCa-Zellen.

Ein ähnliches Untersuchungsergebnis fanden Erb *et al.*, die die Rolle von STAT5 in enzalutamidresistenten PCa-Zellen untersuchten (173). Dabei wurde mit dem STAT5-Inhibitor Pimozid sowie mit dem Antiandrogen Enzalutamid gearbeitet. Auch hier führte eine alleinige STAT5-Inhibition in der Mehrzahl der untersuchten Subzelllinien zu keiner signifikanten Reduktion des Zellwachstums. Wie in der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch ebenfalls eine sehr heterogene STAT5A- und STAT5B-mRNA-Expression. Die beobachteten Auswirkungen auf das Wachstum zeigten sich dabei abhängig von der Zelllinie (173). Damit einhergehend weisen die Autoren auf die große Heterogenität des PCas insbesondere in späten Stadien hin, welche mit einer Variation von verschiedenen molekularen Adaptationsmechanismen einhergehen (162, 173). Diese bedingen zum einen, dass unterschiedliche Resistenzmechanismen in der gleichen Tumorentität vorliegen können, zum anderen können diese auch parallel auftreten. Hier findet sich eine mögliche Erklärung für die z. T. divergenten Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der STAT5-Expression sowie dem Wachstumsverhalten der Karzinomzellen unter STAT5-*knock-down*.

Ahonen *et al.* und Dagvadorj *et al.* konnten durch die Inhibition von STAT5A/B den apoptotischen Zelltod von parentalen PCa-Zellen induzieren (12, 114). Dabei nutzten Dagvadorj *et al.* Antisense-Oligonukleotide, siRNA sowie einen Adenovirus Vektor zum *Knock-down* von STAT5A/B (12). Ahonen *et al.* nutzen ebenfalls Adenovirus Vektoren (114). Es wurden dabei jeweils kollektiv STAT5A sowie STAT5B inhibiert. Dies führte zum apoptotischen Zelltod sowohl androgensensitiver als auch -insensitiver PCa-Zellen, wenn diese aktiviertes STAT5 exprimierten (114). Da dieser wachstumshemmende Effekt durch spezifische Blockade der einzelnen Isoformen im Rahmen dieser Arbeit nicht erreicht wurde, ist anzunehmen, dass STAT5A und -B die Funktion der jeweils anderen Isoform zumindest in Teilen kompensatorisch übernehmen können. Denkbar ist weiterhin, dass komplexere Interaktionen zwischen STAT5A und STAT5B existieren. Hier bieten sich Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen.

Im Zuge der Etablierung des *Knock-down*-Verfahrens fiel darüber hinaus das Fehlen eines Abfalls von STAT5 im Western Blot nach selektiver STAT5A-Blockade auf. Auf RNA-Ebene resultierte der STAT5A-*Knock-down* hingegen in einer erfolgreichen

Reduktion von STAT5A, vergleichbar dem *Knock-down* der Isoform STAT5B. Der STAT5A-*Knock-down* ist somit erfolgreich, denkbar ist jedoch, dass der unspezifisch an die A- oder B-Isoform bindende STAT5-AK eine stärkere Affinität zur Isoform STAT5B aufweist. Entsprechende Literaturangaben dazu fehlen bisher.

Die Tatsache, dass der Transkriptionsfaktor STAT5 im Rahmen der von uns durchgeführten Versuche von zwei der drei resistenten Zelllinien verstärkt exprimiert wurde, weist dennoch auf einen Einfluss von STAT5 auf den Tumorprogress bzw. die Resistenzinduktion hin. Dabei könnte die funktionelle Relevanz von STAT5 auch im Einfluss auf andere zelluläre Mechanismen in den Karzinomzellen liegen. Insbesondere ein fördernder Einfluss des Transkriptionsfaktors auf phänotypische Veränderungen der Zellen und ihres Adhäsionsverhaltens im Sinne der EMT und damit auf die Bildung von Metastasen ist denkbar. So fand eine Studie aus dem Jahr 2015 Belege dafür, dass die Aktivierung des STAT5-Signalweges den metastatischen Progress des PCa fördert, indem es in Karzinomzellen die EMT und die Ausbildung stammzellähnlicher Eigenschaften induziert (16). Übereinstimmend mit dem Untersuchungsergebnis zur Expression der Differenzierungsmarker in dieser Arbeit, stellten Talati *et al.* fest, dass aktiviertes STAT5 *in vitro* und *in vivo* die E-Cadherin-Expression herunterreguliert und gleichzeitig die Expression von Twist1, N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin fördert. So induziert STAT5 die Ausbildung eines EMT-typischen Phänotyps und die Ausbildung von Metastasen (16). Damit zeigen sich die EMT als komplexer und gleichzeitig gewichtiger Prozess mit Bedeutung sowohl für das maligne Potential als auch die Therapiesensibilität von Tumorzellen. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um dies abschließend klären zu können.

6.4 Ausblick

Auf das Wachstum der taxanresistenten PCa-Zellen hatten STAT5A und STAT5B keinen signifikanten Einfluss. Die Charakterisierung der PCa-Zellen und die Literatur deuten jedoch darauf hin, dass die erhöhte Expression von STAT5 in den androgeninsensitiven, taxanresistenten Zellen dennoch eine, den Progress fördernde, funktionelle Rolle, insbesondere auf die EMT der taxanresistenten PCa einnehmen könnte.

In der vorliegenden Arbeit finden sich Hinweise für eine Erhöhung des invasiven Potentials der Karzinomzellen und damit auf den Tumorprogress durch STAT5. Insbesondere für docetaxelresistente Zellen zeigte sich eine Veränderung der exprimierten Differenzierungsmarker im Sinne der EMT. Damit einhergehend ist von einem veränderten Adhäsionspotential auszugehen. Hierzu empfehlen sich im Folgenden vertiefende Untersuchungen zum migratorischen und invasiven Potenzial der Karzinomzellen.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit mittels Western Blot-Analyse nur die absolute Proteinmenge der Zellen bestimmt. Gu *et al.* zeigten in einer Studie 2010 allerdings, dass STAT5 vor allem zu einer Erniedrigung der E-Cadherin-Level auf der Zelloberfläche führt und nicht zwangsläufig zu einer Änderung des gesamten Expressionsniveaus (13). Eine differenziertere Untersuchung der E-Cadherinexpression wäre somit auch für die weiterführende Charakterisierung der taxanresistenten Zellen interessant. Um genauere Aussagen über die EMT in den Karzinomzellen zu ermöglichen, wäre des Weiteren zu überlegen, die Western Blot-Untersuchungen um weitere epitheliale sowie mesenchymale Marker zu erweitern.

Denkbar ist zudem, dass ein relevanter Einfluss auf das Wachstum der Karzinomzellen erst durch die umfassende funktionelle Blockade beider STAT5-Isoformen bewirkt werden kann. Dies sollte in weiterführenden Untersuchungen näher evaluiert werden.

Da sich in dieser Arbeit zwischen docetaxel- und cabazitaxelresistenten Zellen deutliche Differenzen in den Expressionsmustern verschiedener mit dem PCa assoziierter Proteine zeigten, wären weiterhin auch vergleichende Untersuchungen, gerade im Hinblick auf unterschiedliche Resistenzmechanismen, interessant.

7 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes in Deutschland. Mit 14.500 Sterbefällen jährlich stellt es in dieser Bevölkerungsgruppe die zweithäufigste karzinombedingte Todesursache dar. Die Taxane Docetaxel und Cabazitaxel kommen in verschiedenen Stadien des PCa als Chemotherapeutika zur Anwendung. In mehreren Studien konnte ein positiver Effekt entsprechender Therapien auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Ein zentrales Problem stellt jedoch die Entwicklung von Resistenzen dar, welche stark therapielimitierend wirken.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, parentale und taxanresistente PCa-Zellen zu charakterisieren und die funktionelle Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT5 zu analysieren. Dafür wurde zu Beginn mittels Proliferationsassay (BrdU) die Taxanresistenz der PCa-Zellen nachgewiesen. Anschließend wurde mit einer Western Blot-Analyse ein Proteinprofiling der parentalen und resistenten PCa-Zellen erstellt. Weiterhin wurde in der Arbeit die Expression des Transkriptionsfaktors STAT5 in taxanresistenten PCa-Zellen auf der Protein- und RNA-Ebene analysiert und evaluiert, inwiefern STAT5 Einfluss auf das Wachstum und damit die Tumorprogression sowie die Resistenzbildung in taxanresistenten PCa-Zellen nimmt. Die funktionelle Relevanz von STAT5A und STAT5B wurde mittels siRNA-Blockade und anschließenden Wachstumsanalysen ermittelt.

Eine Resistenz der chronisch mit den Taxanen Docetaxel oder Cabazitaxel behandelten PCa-Zellen konnte eindeutig nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Zellcharakterisierung zeigte sich zwischen parentalen und taxanresistenten PCa-Zellen ein Wandel der Differenzierungsmarker E-Cadherin und Vimentin, der für eine weitere Dedifferenzierung und epithelial-mesenchymale Transition (EMT) in den resistenten Zellen sprach. So nahm die E-Cadherin-Expression in der Regel ab, die Vimentin-Expression stieg hingegen an. Proteine des Androgen-Signalwegs, wie der Androgenrezeptor (AR), ließen sich ausschließlich für die androgensensitiven LNCaP-Zellen nachweisen. Cabazitaxelresistente LNCaP-Zellen behielten die Fähigkeit zur AR-Expression bei, wohingegen docetaxelresistente LNCaP keinen AR mehr exprimierten. Für das prostataspezifische Antigen (PSA) zeigte sich ein vergleichbares Expressionsmuster. Androgeninsensitive parentale

PC3- und DU145-Zellen exprimierten dafür den Glukokortikoid-Rezeptor (GR). Docetaxelresistente PC3-Zellen zeigten eine signifikante GR-Überexpression im Vergleich zu den parentalen Zellen, docetaxelresistente DU145-Zellen zeigten hingegen keinen Expressionsanstieg des GR. Interessanterweise ließ sich in dem docetaxelresistenten Subtyp der LNCaP eine GR-De-novo-Synthese beobachten, für den cabazitaxelresistenten Subtyp sowie cabazitaxelresistente DU145-Zellen konnte jedoch kein Anstieg der GR-Expression detektiert werden. Damit zeigte sich eine distinkte Divergenz in der Expression des GR zwischen docetaxel- und cabazitaxelresistenten Zellen. Hervorzuheben ist, dass keine gemeinsame Expression von GR und AR auftrat, wobei alle androgeninsensitiven Zellen einen GR exprimierten, jedoch keine der androgensensitiven Zellen. Nur parentale LNCaP- sowie DU145-Zellen wiesen eine basale STAT5-Expression auf. PC3-Zellen exprimierten STAT5 dagegen erst im docetaxelresistenten Subtyp. Im Vergleich zur parentalen Kontrolle wiesen taxanresistente DU145-Zellen eine vermehrte STAT5-Expression auf. Für LNCaP ließ sich hingegen keine signifikante Änderung der STAT5-Expression zwischen parental und taxanresistenten Zellen nachweisen. Es zeigte sich damit eine heterogene STAT5-Expression in den taxanresistenten Subzelllinien, wobei in der Regel eine Überexpression von STAT5 vorlag.

Die funktionelle Blockade von STAT5A- bzw. STAT5B mittels *siRNA* zeigte für keine der untersuchten Zelllinien eine Änderung des Wachstumsverhaltens der parental, docetaxel- sowie cabazitaxelresistenten PCa-Zellen. Damit konnte weder für STAT5A noch STAT5B allein ein signifikanter Einfluss auf das Wachstum taxanresistenter PCa-Zellen nachgewiesen werden. Denkbar ist, dass ein relevanter Einfluss erst durch die umfassende funktionelle Blockade beider STAT5-Isoformen bewirkt werden könnte.

Insgesamt zeigten sich im Rahmen der in dieser Arbeit ermittelten Proteinexpressionsprofile deutliche Veränderungen in den Expressionsmustern der docetaxel- und cabazitaxelresistenten PCa-Zellen im Vergleich zu den parental Zellen. STAT5 zeigte keinen Einfluss auf deren Wachstum. Erste Hinweise deuten jedoch darauf hin, dass STAT5 zusammen mit den Differenzierungsmarkern E-Cadherin und Vimentin an der EMT und damit dem invasiven Verhalten der Tumorzellen und dem Tumorprogress beteiligt sein könnte. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um dies näher zu klären.

8 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut GdeKiD. Krebs in Deutschland für 2015/2016. 2019;12.
2. al MWe. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Version 5.1, 2019, AWMF Registernummer: 043/022OL: Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH); 2019.
3. 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. *The New England journal of medicine*. 2004;351(15):1502-12.
4. Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(2):242-5.
5. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(15):1513-20.
6. Puhr M, Hoefler J, Schafer G, Erb HH, Oh SJ, Klocker H, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. *The American journal of pathology*. 2012;181(6):2188-201.
7. 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.
8. Bono JSD, Hardy-Bessard A-C, Kim C-S, Geczi L, Ford D, Mourey L, et al. Phase III non-inferiority study of cabazitaxel (C) 20 mg/m² (C20) versus 25 mg/m² (C25) in patients (pts) with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) previously treated with docetaxel (D). *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15_suppl):5008-.
9. Rouyer M, Oudard S, Joly F, Fizazi K, Tubach F, Jove J, et al. Overall and progression-free survival with cabazitaxel in metastatic castration-resistant prostate cancer in routine clinical practice: the FUJI cohort. *British journal of cancer*. 2019;121(12):1001-8.
10. Patterson SG, Wei S, Chen X, Sallman DA, Gilvary DL, Zhong B, et al. Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells. *Oncogene*. 2006;25(45):6113-22.
11. 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. *Prostate*. 2014;74(2):201-9.
12. 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. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1317-24.
13. Gu L, Vogiatzi P, Puhr 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.

14. Tan SH, Dagvadorj A, Shen F, Gu L, Liao Z, Abdulghani J, et al. Transcription factor Stat5 synergizes with androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(1):236-48.
15. 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. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(2):347-59.
16. 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.
17. Robert Koch-Institut ZfK, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Berlin: Robert Koch-Institut (RKI); 2019.
18. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 2018;103:356-87.
19. Perner CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2018;8(12).
20. Bott SR, Birtle AJ, Taylor CJ, Kirby RS. Prostate cancer management: (1) an update on localised disease. *Postgraduate medical journal.* 2003;79(936):575-80.
21. Beske F BE, Katalinic A. Gesundheitsversorgung 2050 - Prognose für Deutschland und Schleswig-Holstein. *Arzt und Krankenhaus.* 2007;11/2007.
22. N. Mottet (Chair) JB, E. Briers (Patient Representative), R.C.N. van den Bergh (Guidelines Associate), M. Bolla, N.J. van Casteren (Guidelines Associate), P. Cornford, S. Culine, S. Joniau, T. Lam, M.D. Mason, V. Matveev, H. van der Poel, T.H. van der Kwast, O. Rouvière, T. Wiegel. Guidelines on Prostate Cancer. (EAU) EAU, editor2015.
23. Howlader N NA, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, Section 23: Prostate Cancer. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2019, based on November 2018 SEER data submission.
24. Zeegers MP, Jellema A, Ostrer H. Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer.* 2003;97(8):1894-903.
25. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int.* 2003;91(9):789-94.
26. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. *World journal of urology.* 2012;30(2):143-8.
27. Graham S, Haughey B, Marshall J, Priore R, Byers T, Rzepka T, et al. Diet in the epidemiology of carcinoma of the prostate gland. *Journal of the National Cancer Institute.* 1983;70(4):687-92.
28. Hebert JR, Hurley TG, Olendzki BC, Teas J, Ma Y, Hampl JS. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *Journal of the National Cancer Institute.* 1998;90(21):1637-47.
29. Morton RA, Jr. Racial differences in adenocarcinoma of the prostate in North American men. *Urology.* 1994;44(5):637-45.

30. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clinical epidemiology*. 2012;4:1-11.
31. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2003;349(4):366-81.
32. Kramer BS, Hagerty KL, Justman S, Somerfield MR, Albertsen PC, Blot WJ, et al. Use of 5-alpha-reductase inhibitors for prostate cancer chemoprevention: American Society of Clinical Oncology/American Urological Association 2008 Clinical Practice Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(9):1502-16.
33. Wirth M, Fröhner M. Prostatakarzinom: Epidemiologie, Ätiologie, Prävention und Früherkennung/Screening. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 1-6.
34. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Zappa M, Nelen V, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet (London, England)*. 2014;384(9959):2027-35.
35. Hugosson J, Carlsson S, Aus G, Bergdahl S, Khatami A, Lodding P, et al. Mortality results from the Goteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(8):725-32.
36. Pinsky PF, Prorok PC, Yu K, Kramer BS, Black A, Gohagan JK, et al. Extended mortality results for prostate cancer screening in the PLCO trial with median follow-up of 15 years. *Cancer*. 2017;123(4):592-9.
37. Ilic D, Neuburger MM, Djulbegovic M, Dahm P. Screening for prostate cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013(1):Cd004720.
38. Carlsson S, Aus G, Bergdahl S, Khatami A, Lodding P, Stranne J, et al. The excess burden of side-effects from treatment in men allocated to screening for prostate cancer. The Goteborg randomised population-based prostate cancer screening trial. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2011;47(4):545-53.
39. Wirth M, Fröhner M, Platzek I, Laniado M, Kotzerke J. Prostatakarzinom: Diagnostik. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 1-20.
40. 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.
41. Gordetsky J, Epstein J. Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. *Diagn Pathol*. 2016;11:25-.
42. 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.
43. Mary K. Gospodarowicz CW, James D. Brierley *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8. Auflage ed. Chicester: Wiley-Blackwell; 2016.
44. Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H, Stark JR, Busch C, et al. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;364(18):1708-17.

45. Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *The New England journal of medicine*. 2016;375(15):1415-24.
46. Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, Reuther AM, et al. Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004;58(1):25-33.
47. Koukourakis G, Kelekis N, Armonis V, Kouloulis V. Brachytherapy for prostate cancer: a systematic review. *Advances in urology*. 2009:327945.
48. Wirth M, Fröhner M, Baumann M, Hölscher T. Prostatakarzinom: kurative Therapie. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 1-31.
49. Studer UE, Whelan P, Wimpissinger F, Casselman J, de Reijke TM, Knonagel 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. *Eur Urol*. 2014;66(5):829-38.
50. Sweeney CJ, Chen YH, 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.
51. Albertsen PC, Moore DF, Shih W, Lin Y, Li H, Lu-Yao GL. Impact of comorbidity on survival among men with localized prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(10):1335-41.
52. Huber J, Brogsitter C, Kotzerke J, Hölscher T, Baumann M, Fröhner M, et al. Prostatakarzinom: palliative Therapie. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 1-29.
53. 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. *Cancer Research*. 1941;1(4):293-7.
54. Debes JD, Tindall DJ. Mechanisms of Androgen-Refractory Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(15):1488-90.
55. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature reviews Cancer*. 2001;1(1):34-45.
56. Loblaw DA, Virgo KS, Nam R, Somerfield MR, Ben-Josef E, Mendelson DS, et al. Initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer: 2006 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(12):1596-605.
57. Vale CL, Burdett S, Rydzewska LHM, Albiges L, Clarke NW, Fisher D, et al. Addition of docetaxel or bisphosphonates to standard of care in men with localised or metastatic, hormone-sensitive prostate cancer: a systematic review and meta-analyses of aggregate data. *The Lancet Oncology*. 2016;17(2):243-56.
58. Lavelle F, Combeau C, Commerçon A. [Taxoids: structural and experimental properties]. *Bulletin du cancer*. 1995;82(4):249-64.
59. (AkdÄ) AddÄ. Jevanta® (Cabazitaxel), Neue Arzneimittel- Information der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ). Berlin 2011.
60. Bartsch V. *Das Taxol®-Buch*. 2 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004.

61. Freissmuth M. Chemotherapie von Tumorerkrankungen. Pharmakologie und Toxikologie. Springer-Lehrbuch 2016. p. 785-845.
62. Giannakakou P, Nakano M, Nicolaou KC, O'Brate A, Yu J, Blagosklonny MV, et al. Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(16):10855-60.
63. Carbonaro M, O'Brate A, Giannakakou P. Microtubule disruption targets HIF-1 α mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *The Journal of Cell Biology*. 2011;192(1):83-99.
64. Zhu M-L, Horbinski CM, Garzotto M, Qian DZ, Beer TM, Kyprianou N. Tubulin-Targeting Chemotherapy Impairs Androgen Receptor Activity in Prostate Cancer. *Cancer Research*. 2010;70(20):7992-8002.
65. Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, Levy BP, Escuin D, Zhou XK, et al. Taxane-Induced Blockade to Nuclear Accumulation of the Androgen Receptor Predicts Clinical Responses in Metastatic Prostate Cancer. *Cancer Research*. 2011;71(18):6019-29.
66. Kuroda K, Liu H, Kim S, Guo M, Navarro V, Bander NH. Docetaxel down-regulates the expression of androgen receptor and prostate-specific antigen but not prostate-specific membrane antigen in prostate cancer cell lines: implications for PSA surrogacy. *Prostate*. 2009;69(14):1579-85.
67. Gan L, Chen S, Wang Y, Watahiki A, Bohrer L, Sun Z, et al. Inhibition of the Androgen Receptor as a Novel Mechanism of Taxol Chemotherapy in Prostate Cancer. *Cancer Research*. 2009;69(21):8386-94.
68. Mistry SJ, Oh WK. New Paradigms in Microtubule-Mediated Endocrine Signaling in Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2013;12(5):555-66.
69. Bai S, Zhang B, Dong Y. Impact of taxanes on androgen receptor signaling. *Asian Journal of Andrology*. 2019;21(3):249-52.
70. Leistner E. Die Biologie der Taxane: Arzneimittel aus der Natur. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2005;34(2):98-103.
71. Tucci M, Bertaglia V, Vignani F, Buttigliero C, Fiori C, Porpiglia F, et al. Addition of Docetaxel to Androgen Deprivation Therapy for Patients with Hormone-sensitive Metastatic Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol*. 2016;69(4):563-73.
72. Domingo-Domenech J, Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Castillo-Martin M, Quinn SA, Rodriguez-Barrueco R, et al. Suppression of acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch- and hedgehog-dependent tumor-initiating cells. *Cancer cell*. 2012;22(3):373-88.
73. Seruga B, Ocana A, Tannock IF. Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011;8(1):12-23.
74. Magadoux L, Isambert N, Plenchette S, Jeannin JF, Laurens V. Emerging targets to monitor and overcome docetaxel resistance in castration resistant prostate cancer (review). *International journal of oncology*. 2014;45(3):919-28.
75. Mahon KL, Henshall SM, Sutherland RL, Horvath LG. Pathways of chemotherapy resistance in castration-resistant prostate cancer. 2011;18(4):R103.
76. Galletti E, Magnani M, Renzulli ML, Botta M. Paclitaxel and docetaxel resistance: molecular mechanisms and development of new generation taxanes. *ChemMedChem*. 2007;2(7):920-42.

-
77. Makarovskiy AN, Siryaporn E, Hixson DC, Akerley W. Survival of docetaxel-resistant prostate cancer cells in vitro depends on phenotype alterations and continuity of drug exposure. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2002;59(7):1198-211.
 78. Sekino Y, Han X, Kawaguchi T, Babasaki T, Goto K, Inoue S, et al. TUBB3 Reverses Resistance to Docetaxel and Cabazitaxel in Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(16).
 79. Zemsanova 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.
 80. Holder SL, Abdulkadir SA. PIM1 kinase as a target in prostate cancer: roles in tumorigenesis, castration resistance, and docetaxel resistance. *Current cancer drug targets*. 2014;14(2):105-14.
 81. Xie Y, Xu K, Linn DE, Yang X, Guo Z, Shimelis H, et al. The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(6):3349-56.
 82. Sallman DA, Chen X, Zhong B, Gilvary DL, Zhou J, Wei S, et al. Clusterin mediates TRAIL resistance in prostate tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(11):2938-47.
 83. Ebersbach C, Beier A-MK, Thomas C, Erb HHH. Impact of STAT Proteins in Tumor Progress and Therapy Resistance in Advanced and Metastasized Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19):4854.
 84. e.V. DGfHuMO. Cabazitaxel (Jevtana®) metastasiertes, kastrationsresistentes Prostatakarzinom, Progress während oder nach einer Docetaxel-haltigen Chemotherapie, Frühe Nutzenbewertung. 2018.
 85. Bradshaw DM, Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(11):3674-90.
 86. Mita AC, Denis LJ, Rowinsky EK, DeBono JS, Goetz AD, Ochoa L, et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of XRP6258 (RPR 116258A), a Novel Taxane, Administered as a 1-Hour Infusion Every 3 Weeks in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(2):723-30.
 87. Oudard S, Fizazi K, Sengelov L, Daugaard G, Saad F, Hansen S, et al. Cabazitaxel Versus Docetaxel As First-Line Therapy for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Randomized Phase III Trial-FIRSTANA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(28):3189-97.
 88. Lockhart AC, Sundaram S, Sarantopoulos J, Mita MM, Wang-Gillam A, Moseley JL, et al. Phase I dose-escalation study of cabazitaxel administered in combination with cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs*. 2014;32(6):1236-45.
 89. National Library of Medicine (NLM) NLoHN. Multicenter Trial of Abiraterone Acetate With or Without Cabazitaxel in Treatment of Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer [Internet]. Letzte Aktualisierung: 20.11.2019. Zitiert am: 28.05.2020. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02218606>.

90. National Library of Medicine (NLM) NLoHN. Cabazitaxel Versus the Switch to Alternative AR-targeted Agent (Enzalutamide or Abiraterone) in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer (mCRPC) Patients Previously Treated With Docetaxel and Who Rapidly Failed a Prior AR-targeted Agent (CARD) [Internet]. Letzte Aktualisierung: 29.11.2019. Zitiert am: 28.05.2020. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02485691?term=cabazitaxel&rslt=Without&type=Intr&cond=Prostate+Cancer&draw=2&rank=27>.
91. Hongo H, Kosaka T, Oya M. Analysis of cabazitaxel-resistant mechanism in human castration-resistant prostate cancer. *Cancer science*. 2018;109(9):2937-45.
92. Natsagdorj A, Izumi K, Hiratsuka K, Machioka K, Iwamoto H, Naito R, et al. CCL2 induces resistance to the antiproliferative effect of cabazitaxel in prostate cancer cells. *Cancer science*. 2019;110(1):279-88.
93. Duran GE, Wang YC, Francisco EB, Rose JC, Martinez FJ, Coller J, et al. Mechanisms of resistance to cabazitaxel. *Molecular cancer therapeutics*. 2015;14(1):193-201.
94. Armstrong CM, Gao AC. Drug resistance in castration resistant prostate cancer: resistance mechanisms and emerging treatment strategies. *Am J Clin Exp Urol* [Internet]. 2015 2015; 3(2):[64-76 pp.]. Zitiert am 29.12.2022. URL: <http://europepmc.org/abstract/MED/26309896>.
95. Galletti G, Matov A, Beltran H, Fontugne J, Miguel Mosquera J, Cheung C, et al. ERG induces taxane resistance in castration-resistant prostate cancer. *Nat Commun* [Internet]. 2014 2014/11//; 5:[5548 p.]. Zitiert am 29.12.2022. URL: <http://europepmc.org/abstract/MED/25420520>.
96. Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *European journal of biochemistry*. 1997;248(3):615-33.
97. Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R. *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2016 2016/03/09.
98. Lim CP, Cao X. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular bioSystems*. 2006;2(11):536-50.
99. 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.
100. Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 1999;17(3):138-46.
101. Loh CY, Arya A, Naema AF, Wong WF, Sethi G, Looi CY. Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication. *Frontiers in oncology*. 2019;9:48.
102. 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.
103. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev*. 1997;11(2):179-86.
104. Richard AJ, Stephens JM. The role of JAK-STAT signaling in adipose tissue function. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(3):431-9.
105. Able AA, Burrell JA, Stephens JM. STAT5-Interacting Proteins: A Synopsis of Proteins that Regulate STAT5 Activity. *Biology (Basel)*. 2017;6(1):20.

106. Akira S. Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 1999;17(3):138-46.
107. Heltemes-Harris LM, Farrar MA. The role of STAT5 in lymphocyte development and transformation. *Current Opinion in Immunology*. 2012;24(2):146-52.
108. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(15):7673-8.
109. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 2000;19(21):2474-88.
110. Schwaller J, Parganas E, Wang D, Cain D, Aster JC, Williams IR, et al. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol Cell*. 2000;6(3):693-704.
111. Liao Z, Nevalainen MT. Targeting transcription factor Stat5a/b as a therapeutic strategy for prostate cancer. *Am J Transl Res*. 2011;3(2):133-8.
112. Verhoeven Y, Tilborghs S, Jacobs J, De Waele J, Quatannens D, Deben C, et al. The potential and controversy of targeting STAT family members in cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2019.
113. 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. 2003;63(24):8757-62.
114. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(29):27287-92.
115. Gu L, Dagvadorj A, Lutz J, Leiby B, Bonuccelli G, Lisanti MP, et al. Transcription factor Stat3 stimulates metastatic behavior of human prostate cancer cells in vivo, whereas Stat5b has a preferential role in the promotion of prostate cancer cell viability and tumor growth. *The American journal of pathology*. 2010;176(4):1959-72.
116. 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.
117. 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.
118. Valkenburg KC, Williams BO. Mouse models of prostate cancer. *Prostate Cancer*. 2011;2011:895238-.
119. 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. *The American journal of pathology*. 2013;182(6):2264-75.
120. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(5-6):396-403.
121. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
122. Gravidal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(23):7003-11.

123. Wade CA, Kyprianou N. Profiling Prostate Cancer Therapeutic Resistance. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(3).
124. Kawamoto A, Yokoe T, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Yasuda H, et al. Radiation induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Oncology reports*. 2012;27(1):51-7.
125. Shintani Y, Okimura A, Sato K, Nakagiri T, Kadota Y, Inoue M, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity to chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *The Annals of thoracic surgery*. 2011;92(5):1794-804; discussion 804.
126. Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2006;12(14 Pt 1):4147-53.
127. Tsai JH, Yang J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev*. 2013;27(20):2192-206.
128. Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(12):895-902.
129. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
130. Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Molecular cancer research : MCR*. 2011;9(8):997-1007.
131. Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal transduction and targeted therapy*. 2020;5:8.
132. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
133. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 1983;43(4):1809-18.
134. 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.
135. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*. 1978;21(3):274-81.
136. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS letters*. 2006;580(9):2294-300.
137. 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.
138. 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. *Prostate*. 2011;71(15):1668-79.
139. Valiathan C, McFaline JL, Samson LD. A rapid survival assay to measure drug-induced cytotoxicity and cell cycle effects. *DNA Repair (Amst)*. 2012;11(1):92-8.
140. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

141. 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.
142. Mahmood T, Yang P-C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*. 2012;4(9):429-34.
143. Welinder C, Ekblad L. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res*. 2011;10(3):1416-9.
144. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
145. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.
146. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*. 1986;89(2):271-7.
147. 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.
148. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree IA, editor. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 237-45.
149. Markowitsch SD, Schupp P, Lauckner J, Vakhrusheva O, Slade KS, Mager R, et al. Artesunate Inhibits Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells through Cell Cycle Arrest and Induction of Ferroptosis. 2020;12(11):3150.
150. Juengel E, Natsheh I, Najafi R, Rutz J, Tsaur I, Haferkamp A, et al. Mechanisms behind Temsirolimus Resistance Causing Reactivated Growth and Invasive Behavior of Bladder Cancer Cells In Vitro. *Cancers*. 2019;11(6).
151. Juengel E, Makarević J, Reiter M, Mani J, Tsaur I, Bartsch G, et al. Resistance to the mTOR inhibitor temsirolimus alters adhesion and migration behavior of renal cell carcinoma cells through an integrin α 5- and integrin β 3-dependent mechanism. *Neoplasia*. 2014;16(4):291-300.
152. Xu Q, Lü Z, Wang X, Zhu Q, Wu H. Secreted frizzled-related protein 5 suppresses aggressive phenotype and reverses docetaxel resistance in prostate cancer. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*. 2019;67(6):1009-17.
153. Amaral CL, Freitas LB, Tamura RE, Tavares MR, Pavan IC, Bajgelman MC, et al. S6Ks isoforms contribute to viability, migration, docetaxel resistance and tumor formation of prostate cancer cells. *BMC cancer*. 2016;16:602.
154. Marín-Aguilera M, Codony-Servat J, Reig Ò, Lozano JJ, Fernández PL, Pereira MV, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Mediates Docetaxel Resistance and High Risk of Relapse in Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2014;13(5):1270-84.
155. Lu X, Yang F, Chen D, Zhao Q, Chen D, Ping H, et al. Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Biol Sci*. 2020;16(7):1121-34.
156. Komura K, Jeong SH, Hinohara K, Qu F, Wang X, Hiraki M, et al. Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(22):6259-64.

157. Mout L, Moll JM, Chen M, de Morrée ES, de Ridder CMA, Gibson A, et al. Androgen receptor signalling impairs docetaxel efficacy in castration-resistant prostate cancer. *British journal of cancer*. 2020;123(12):1715-9.
158. Mout L, van Royen ME, de Ridder C, Stuurman D, van de Geer WS, Marques R, et al. Continued androgen signalling inhibition improves cabazitaxel efficacy in prostate cancer. *EBioMedicine*. 2021;73:103681.
159. Mout L, de Wit R, Stuurman D, Verhoef E, Mathijssen R, de Ridder C, et al. Testosterone Diminishes Cabazitaxel Efficacy and Intratumoral Accumulation in a Prostate Cancer Xenograft Model. *EBioMedicine*. 2018;27:182-6.
160. Hoang DT, Iczkowski KA, Kilari D, See W, Nevalainen MT. Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms driving prostate cancer progression: Opportunities for therapeutic targeting from multiple angles. *Oncotarget*. 2017;8(2):3724-45.
161. Heidenreich A, Bracarda S, Mason M, Ozen H, Sengelov L, Van Oort I, et al. Safety of cabazitaxel in senior adults with metastatic castration-resistant prostate cancer: Results of the European compassionate-use programme. *European Journal of Cancer*. 2014;50(6):1090-9.
162. Santer FR, Erb HH, McNeill RV. Therapy escape mechanisms in the malignant prostate. *Semin Cancer Biol*. 2015;35:133-44.
163. Stocklin E, Wissler M, Gouilleux F, Groner B. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*. 1996;383(6602):726-8.
164. Biola A, Lefebvre P, Perrin-Wolff M, Sturm M, Bertoglio J, Pallardy M. Interleukin-2 inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity through a mechanism involving STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) but not AP-1. *Mol Endocrinol*. 2001;15(7):1062-76.
165. Puhr 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.
166. Pan D, Kocherginsky M, Conzen SD. Activation of the Glucocorticoid Receptor Is Associated with Poor Prognosis in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. *Cancer Research*. 2011;71(20):6360-70.
167. Kroon J, Puhr M, Buijs JT, van der Horst G, Hemmer DM, Marijt KA, et al. Glucocorticoid receptor antagonism reverts docetaxel resistance in human prostate cancer. *Endocrine-related cancer*. 2016;23(1):35-45.
168. 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. *Clin Cancer Res*. 2013;19(20):5658-74.
169. Kollmann S, Grundschober E, Maurer B, Warsch W, Grausenburger R, Edlinger L, et al. Twins with different personalities: STAT5B-but not STAT5A-has a key role in BCR/ABL-induced leukemia. *Leukemia*. 2019;33(7):1583-97.
170. 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.
171. 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.

172. Goh EL, Pircher TJ, Lobie PE. Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilizes the microtubule network and protects against colchicine-induced apoptosis. *Endocrinology*. 1998;139(10):4364-72.
173. Erb HHH, Bodenbender J, Handle F, Diehl T, Donix L, Tsaur I, et al. Assessment of STAT5 as a potential therapy target in enzalutamide-resistant prostate cancer. *PLoS One*. 2020;15(8):e0237248-e.
174. Brimo F, Montironi R, Egevad L, Erbersdobler A, Lin DW, Nelson JB, et al. Contemporary Grading for Prostate Cancer: Implications for Patient Care. *European Urology*. 2013;63(5):892-901.
175. Baretton GB, Toma M. Prostatakarzinom: Histopathologie. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. *Die Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 1321-39.

9 Anhang

9.1 Gleason-Score

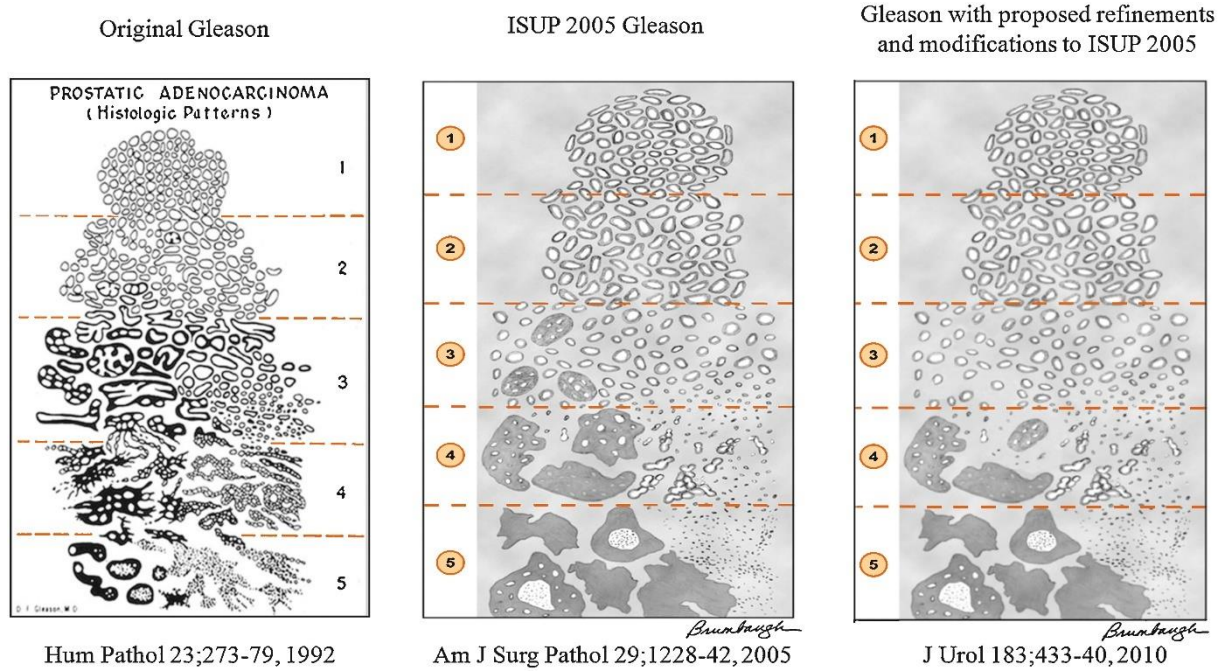


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Gleason-Scores.a) Original Gleason-Score, b) nach ISUP-Modifizierung 2005 c) aktueller Gleason-Score (174). ISUP: *International Society of Urological Pathology*

9.2 UICC-Stadien

Stadium	Beschreibung
Tx	Es kann keine Aussage zur Ausdehnung des Primärtumors getroffen werden
To	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Der Tumor ist ein zufälliger histologischer Befund in <5 % des resezierten Gewebes
T1b	Der Tumor ist ein zufälliger histologischer Befund in >5 % des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befallt die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befallt mehr die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig) einschließlich der mikroskopischen Infiltration des Blasenhalses
T3b	Tumor infiltriert die Samenblasen
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen (z. B. Sphincter externus und/oder Rektum, und/oder Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert)
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
No	Keine regionäre Lymphknotenmetastase
N1mi	Regionäre Lymphknotenmetastase, <0,2 cm messend
N1	Regionäre Lymphknotenmetastase
Mo	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nichtregionärer Lymphknoten
M1b	Knochen
M1c	Andere Lokalisationen

Abbildung 14: Aktuelle pTNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (UICC). T Tumor, N Nodulus, M Metastase (175).

9.3 Etablierung der Ladekontrolle für die Western Blot-Analyse als Verrechnungsgrundlage: Untersuchung der Haushaltsgene GAPDH, β -Aktin und des Gesamtproteins

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse wurde die Expression unterschiedlicher Proteine innerhalb der Zelllinien untersucht. Wie in Abbildung 15 und Abbildung 16 dargestellt, schwankte die Expression der beiden untersuchten Haushaltsgene GAPDH und β -Aktin zwischen den parentalen und resistenten Zellen einer Zelllinie deutlich.

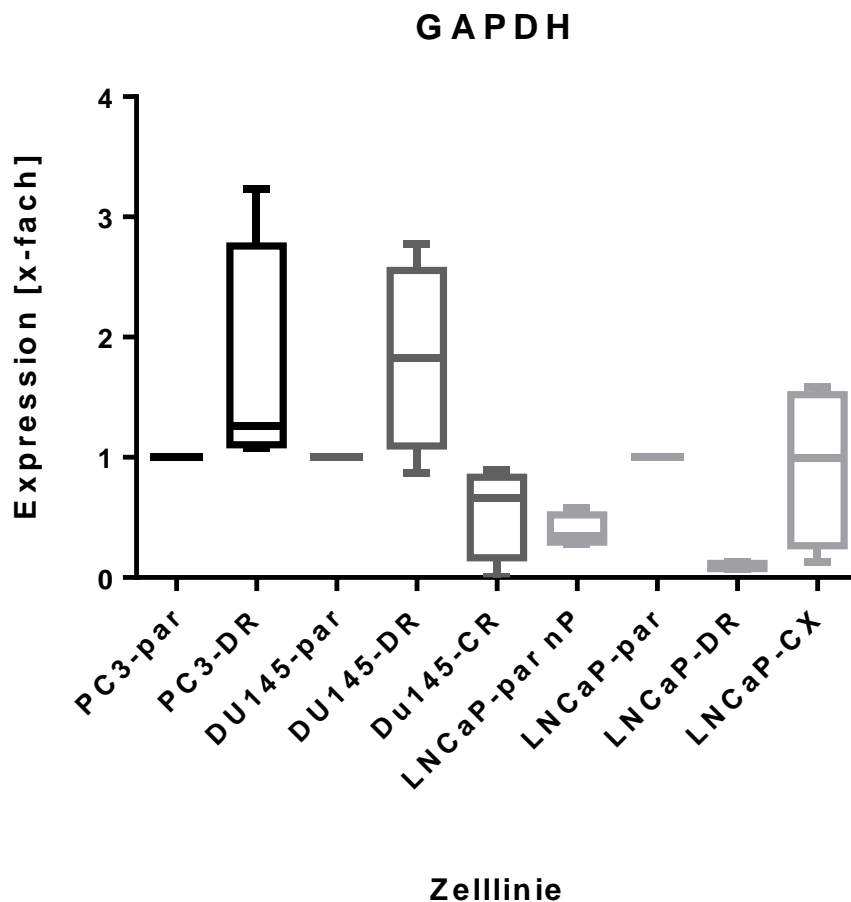


Abbildung 15: Expression des Haushaltsgens GAPDH. Pixelanalyse der Proteinexpression von GAPDH in parentalen (par), docetaxelresistenten (DR) und cabazitaxelresistenten (CR) PC3, DU145 und LNCaP. nP = niedrige Passage. Resistente und nP Zellen sind im Vergleich zur parentalen Kontrolle (=1) aufgetragen. Die Kastengrafik erstreckt sich von der 25. bis zur 75. Perzentile, der waagerechte Strich innerhalb der Box zeigt den Median an, die *Whiskers* erstrecken sich vom Minimum zum Maximum, n = 4.

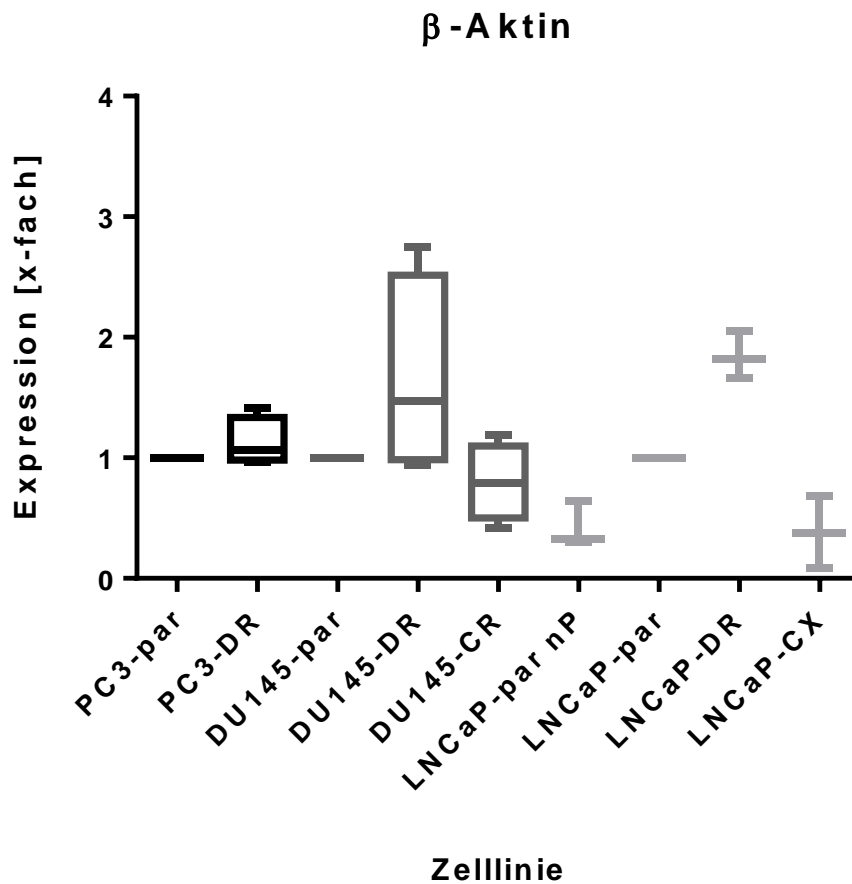


Abbildung 16: Expression des Haushaltsgens β -Aktin. Pixelanalyse der Proteinexpression von β -Aktin in parentalen (par), docetaxelresistenten (DR) und cabazitaxelresistenten (CR) PC3, DU145 und LNCaP. nP = niedrige Passage. Resistente und nP Zellen sind im Vergleich zur parentalen Kontrolle (=1) aufgetragen. Die Kastengrafik erstreckt sich von der 25. bis zur 75. Perzentile, der waagerechte Strich innerhalb der Box zeigt den Median an, die *Whiskers* erstrecken sich vom Minimum zum Maximum, n = 3.

Aus diesem Grund wurde daraufhin die Gesamtproteinmenge jeder Probe detektiert. In Abbildung 17 sind die Gesamtproteinmengen der resistenten Zellen im Verhältnis zur jeweiligen parentalen Zelllinie dargestellt. Hier zeigte sich eine Konstanz der geladenen Proteinmengen pro Probe, was es ermöglichte, diese zur Quantifizierung der Proteinexpression zu nutzen. Zur weiteren Auswertung wurde daher die Gesamtproteinmenge als Verrechnungsgrundlage genutzt.

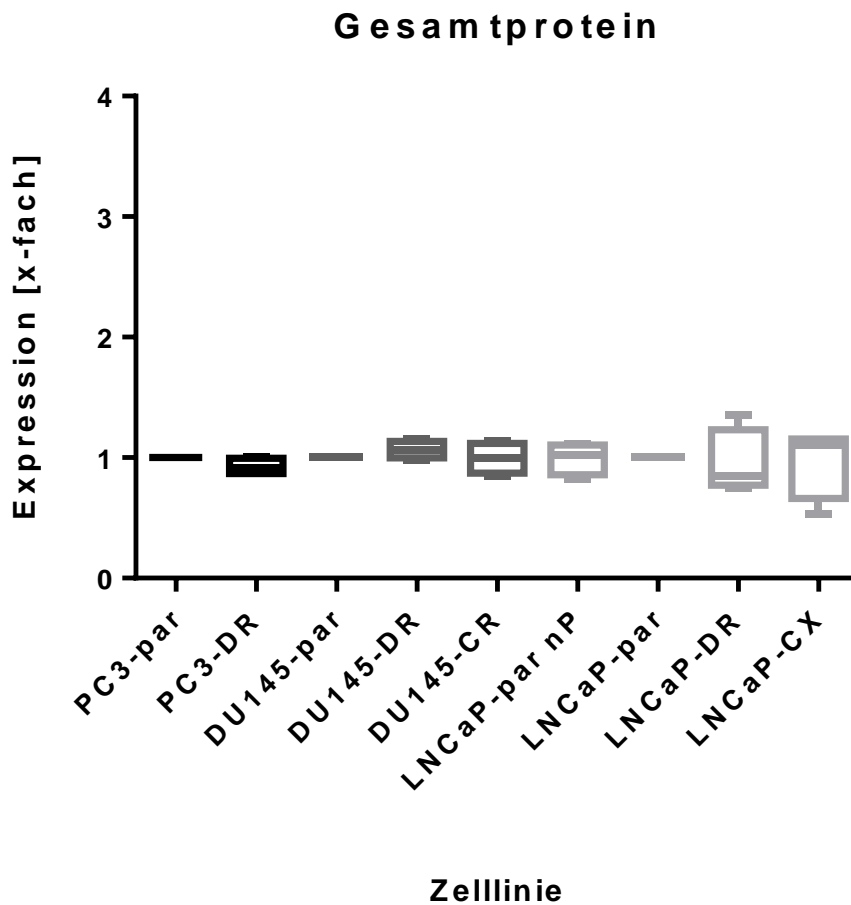


Abbildung 17: Gesamtproteinmenge im Western Blot. Pixelanalyse der geladenen Gesamtproteinmenge pro Probe in parentalen (par), docetaxelresistenten (DR) und cabazitaxelresistenten (CR) PC3, DU145 und LNCaP. nP = niedrige Passage. Resistente und nP Zellen sind im Vergleich zur parentalen Kontrolle (=1) aufgetragen. Die Kastengrafik erstreckt sich von der 25. bis zur 75. Perzentile, der waagerechte Strich innerhalb der Box zeigt den Median an, die *Whiskers* erstrecken sich vom Minimum zum Maximum, n = 3.

9.4 Etablierung der siRNA-Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX[®] und Lipofecatmine 3.000[®] Reagent

Um ein geeignetes Protokoll zum genetischen *Knock-down* mittels siRNA zu etablieren, wurden verschiedene Transfektionsreagenzien (Lipofectamine 3.000[®], Lipofectamine RNAiMAX[®]) verwendet.

9.4.1 Etablierung einer siRNA-Transfektion unter Verwendung von Lipofectamine RNAiMAX[®]

Eine Übersicht über die verschiedenen getesteten Ansätze zur Etablierung eines Transkriptionsprotokolls mit RNAiMAX[®] findet sich in Abbildung 18 und Abbildung 19.

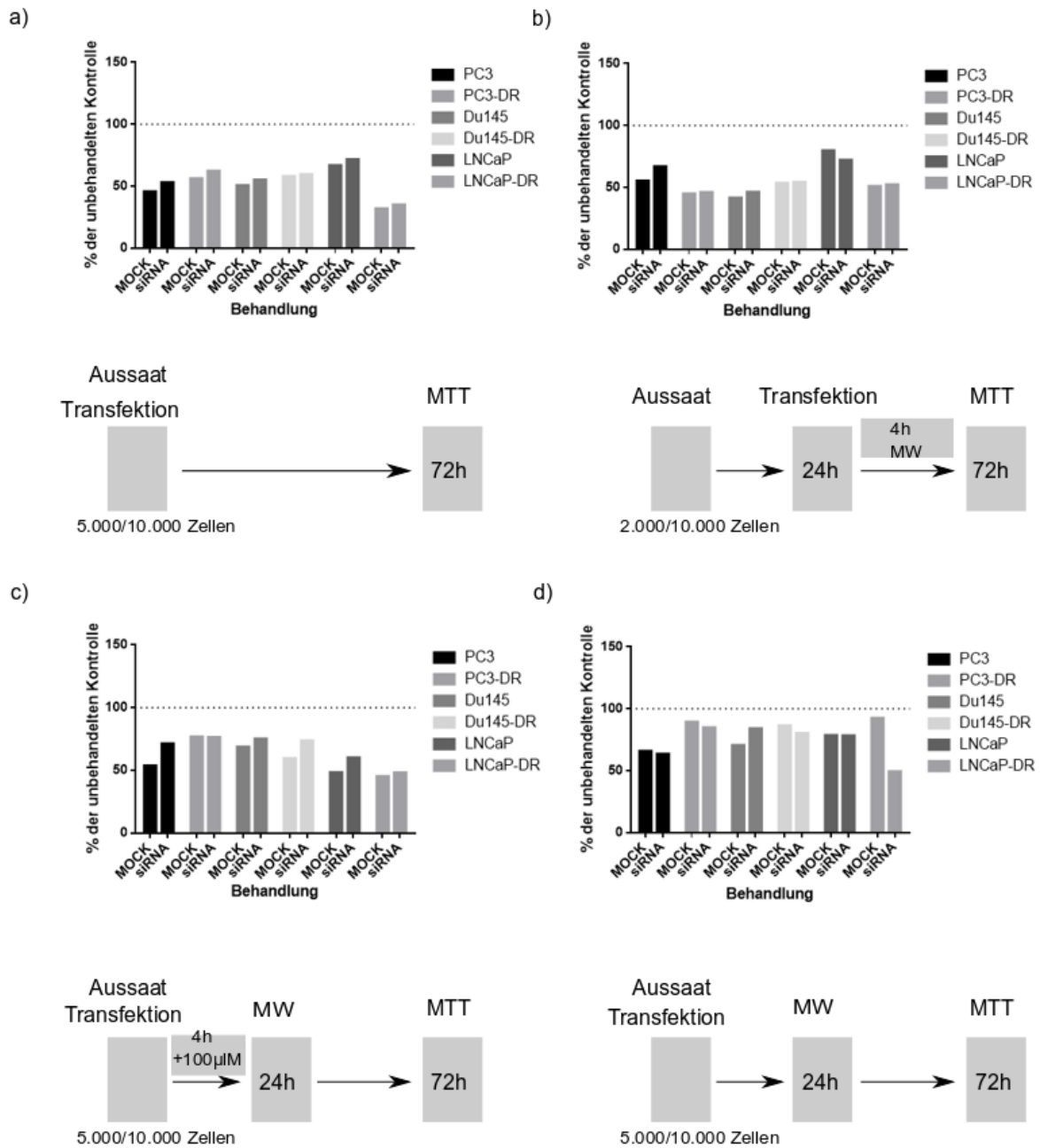


Abbildung 18: Etablierung des Transfektionsprotokolls für Lipofectamine® RNAiMAX Reagent. Übersicht über den Ablauf und Erfolg der Transfektion in parentalen PC3, Du145, LNCaP sowie ihrer resistenten Subformen. a) Übersicht über den Ablauf des Transfektionsprotokolls. Aussaat mit direkter Transfektion, hoher Zellzahl (5.000 bzw. 10.000 Zellen/Well), Wachstumsassay 72 Stunden nach Transfektion. b) Übersicht über den Ablauf des Transfektionsprotokolls. Aussaat einer niedrigen Zellzahl (2.000/10.000), Transfektion nach 24 Stunden, Mediumwechsel nach 4 Stunden. c) Aussaat mit direkter Transfektion, hohe Zellzahl, Zugabe von 100 µl Medium nach 4 Stunden, sowie anschließendem Mediumwechsel nach 24 Stunden. d) Aussaat mit direkter Transfektion, hohe Zellzahl, Mediumwechsel nach 24 Stunden. Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich immer auf die unbehandelte Kontrolle (100 %). DR = docetaxelresistent, CR = cabazitaxelresistent, MOCK = nur mit Transfektionsreagenz (Lipofectamine® RNAiMAX Reagent) behandelt, siRNA = Transfektionsreagenz + fluoreszenzmarkierte Doppelstrang-RNA, MW = Mediumwechsel.

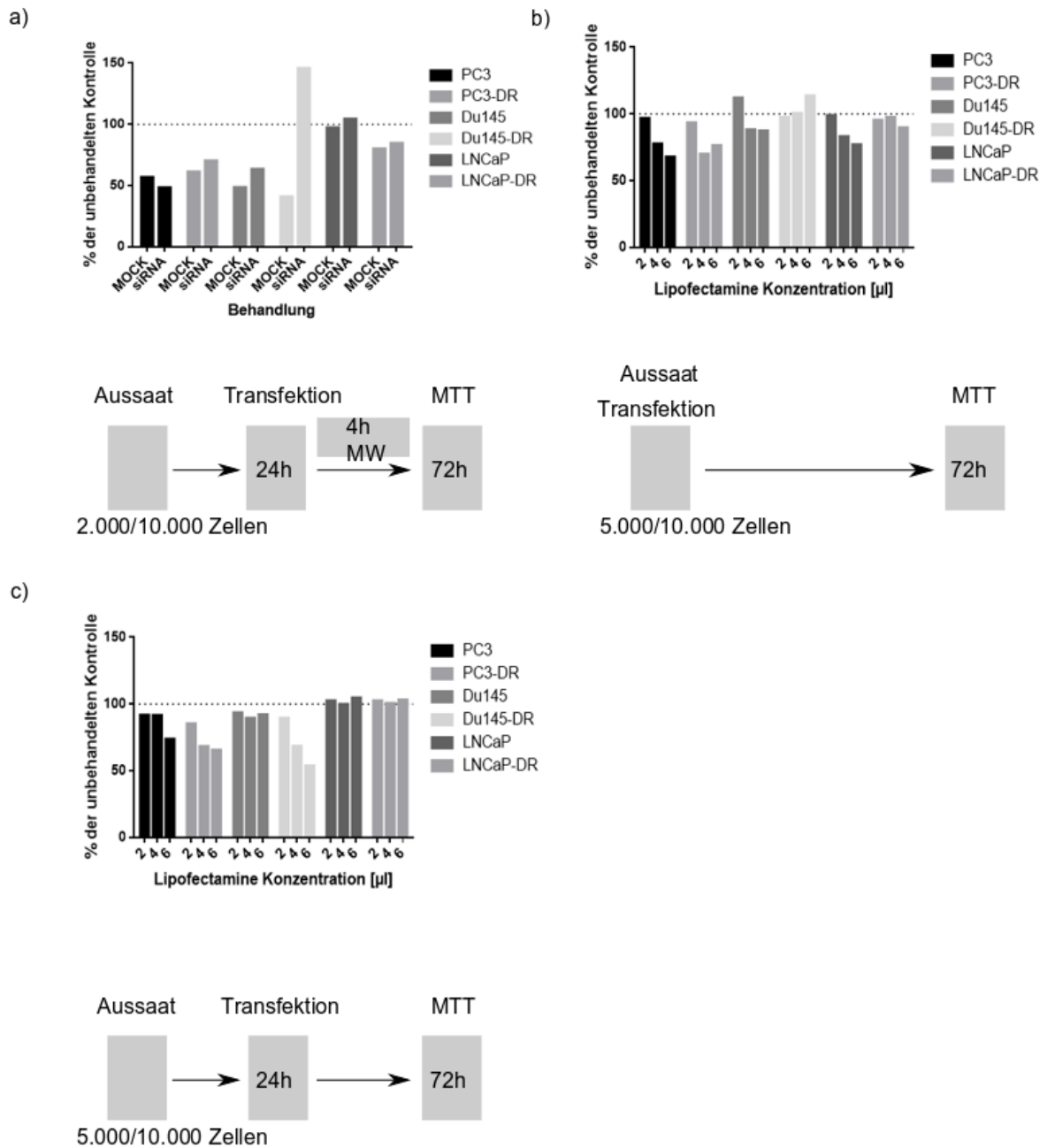


Abbildung 19: Etablierung des Transfektionsprotokolls für Lipofectamine® RNAiMAX Reagent. Übersicht über den Ablauf und Erfolg der Transfektion in parentalen PC3, Du145, LNCaP sowie ihrer resistenten Subformen. a) Übersicht über den Ablauf des Transfektionsprotokolls. Aussaat einer niedrigen Zellzahl (2.000/10.000) mit Transfektion nach 24 Stunden, anschließend erfolgte ein Mediumwechsel nach 4 Stunden. b) Übersicht über den Ablauf des Transfektionsprotokolls. Aussaat mit direkter Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen des Transfektionsreagenzes (0,5, 1 und 1,5µl), hoher Zellzahl (5.000 bzw.10.000 Zellen/Well). c) Übersicht über den Ablauf des Transfektionsprotokolls. Aussaat einer hohen Zellzahl, Transfektion nach 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des Transfektionsreagenzes (0,5, 1 und 1,5µl). Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich immer auf die unbehandelte Kontrolle (100 %). DR = docetaxelresistent, CR = cabazitaxelresistent, MOCK = nur mit Transfektionsreagenz (Lipofectamine® RNAiMAX Reagent) behandelt, siRNA = Transfektionsreagenz +fluoreszenzmarkierte Doppelstrang-RNA, MW = Mediumwechsel.

Die Transfektion erfolgte nach Standardprotokoll von Invitrogen, anstelle des Opti-MEM Mediums wurde RPMI ohne weitere Zusätze verwendet. Die genutzten Reagenzien und Transfektionsvolumina sind in Tabelle 24 und Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 24: Transfektionsansatz für die Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX

Platte	96-Well
Reagenz	
RPMI	25 µl
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	1,5 µl
RPMI	25 µl
siRNA (10 µM)	0,5 µl
Volumen pro Well	10 µl

Die Zellen wurden wie unter 4.2.1 beschrieben gezählt und in einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellzahl pro Well variierte zelllinienabhängig. Für PC3 und DU145 wurden 5.000, für LNCaP 10.000. Zellen ausgesät. Wie in der graphischen Abbildung des Wachstumsassays dargestellt (Abbildung 18a), war die Viabilität der mit Transfektionsreagenz behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um rund 50 % reduziert. Daraus ließ sich ein hoher toxischer Effekt des Transfektionsreagenzes ableiten, woraufhin versucht wurde, das Transfektionsprotokoll weiter anzupassen, um die Viabilität der transfizierten Zellen bei gleichzeitig guter Transfektionseffizienz zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden Versuchsansätze gewählt, die sich in Zellzahl, Konzentration des Transfektionsreagenzes, Zeitpunkt der Transfektion nach Zellaussaat und Zeitraum der Inkubation mit dem Transfektionsreagenz unterschieden. Diese sind im Folgenden beschrieben.

Zunächst wurden 2.000 bzw. 10.000 Zellen ausgesät und für 24 Stunden auf der Mikrotiterplatte in normalem Medium inkubiert. Danach erfolgte die Transfektion nach Standardprotokoll. Nach 4 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Auch in diesem Transfektionsansatz zeigte sich die Viabilität der behandelten Zellen im Durchschnitt um fast die Hälfte verringert (Abbildung 18b).

Daher wurde in weiteren Testansätzen der Medienwechsel zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, um eine weitere Reduktion der Toxizität zu erreichen. Die Transfektionen wurde auch hier entweder direkt nach Aussaat oder mit 24-stündiger

Latenz durchgeführt. Die jeweiligen Zellzahlen entsprachen dabei den in den beiden vorherigen Ansätzen beschriebenen.

Auch bei Zugabe von 100 µl Medium 4 Stunden nach direkter Transfektion in Kombination mit einem Mediumwechsel nach 24 Stunden (Abbildung 18c) oder alleinigem Wechsel des Mediums 24 Stunden nach direkter Transfektion (Abbildung 18d) zeigten keine Verbesserung der Zellviabilität.

In einem weiteren Testansatz erfolgte die Transfektion 24 Stunden nach der Aussaat und ein Mediumwechsel 4 Stunden nach Transfektion. Auch hier war jedoch das Wachstum deutlich eingeschränkt (Abbildung 19a).

Daraufhin wurden weitere Ansätze mit niedrigeren Konzentrationen des Transfektionsreagenzes (0,5; 1 und 1,5 µl) getestet, die Transfektion erfolgte weiterhin entweder direkt (Abbildung 19b) oder nach 24-stündiger Latenz (Abbildung 19c). Für die niedrigere Konzentration von 0,5 µl zeigte sich die Zellviabilität nach direkter Transfektion deutlich verbessert.

9.4.2 siRNA-Transfektion unter Verwendung von Lipofectamine 3000® Reagent

Die Zählung und Aussaat der Zellen erfolgten, wie unter 4.2.1.5 beschrieben, bei 80 % Konfluenz. Die Zellzahl pro Well variierte zelllinienabhängig. Für PC3 und DU145 wurden 5.000, für LNCaP 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Eine Übersicht über alle verwendeten Reagenzien und Volumina findet sich in Tabelle 25.

Tabelle 25: Transfektionsansatz mit Lipofecamine 3000. Angabe der Volumina der Transfektionsreagenzien in Abhängigkeit zur Plattenart

Platte	96-Well	6-Well
Reagenzien		
RPMI	5 µl	125 µl
Lipofectamine® 3000 Reagent	0,1/0,3 µl	7,5 µl
RPMI	5 µl	125 µl
siRNA (10µM)	0,1 µl	2,5 µl
Volumen pro Well	10 µl	250µl

Die Transfektion erfolgte direkt im Anschluss an die Aussaat nach dem Protokoll von ThermoFisher mit 0,15 µl (Konz. 1) bzw. 0,3 µl (Konz. 2) Transfektionsreagenz. Das Lipofectamine 3000® Reagent sowie die siRNA wurden jeweils in serumfreiem Medium (RPMI) verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:1 vermischt. Diese Suspension wurde für 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 µl der entstandenen RNA-Lipid-Komplexe in jedes Well pipettiert. Zur Etablierung der Methode wurde fluoreszenzmarkierte Doppelstrang-RNA nach Standard-Transfektionsprotokoll verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Effizienz fluoreszenzmikroskopisch kontrolliert (Abbildung 20b).

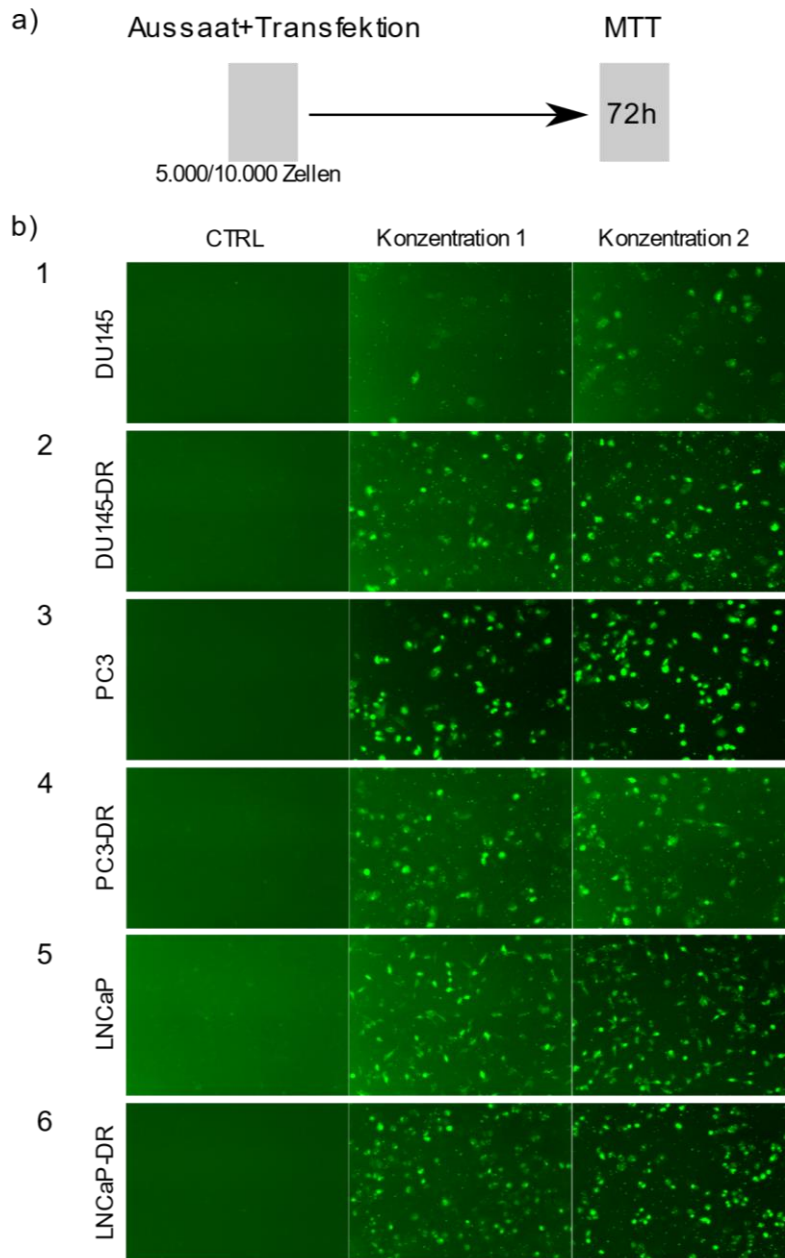


Abbildung 20: Ablaufschema und Erfolg der STAT5-siRNA-Transfektion mit Lipofectamine® 3000 Reagent. Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz wurde fluoreszenzmarkierte Doppelstrang-RNA nach Standardprotokoll transfiziert und mittels Fluoreszenzmikroskopie anschließend die intrazelluläre Anreicherung detektiert. a) Ablaufschema der Transfektion. b) Fluoreszenzbilder der Zellreihen 1 DU 145, 2 DU145-DR, 3 PC3, 4 PC3-DR, 5 LNCaP und 6 LNCaP-DR jeweils als unbehandelte Negativkontrolle (CTRL) und nach Behandlung mit 0,15 µl (Konz. 1) bzw. 0,3 µl (Konz. 2) Transfektionsreagenz 24 Stunden nach Transfektion bei 100-facher Vergrößerung des Mikroskops aus n = 3. DR = docetaxelresistent.

Nach 72 Stunden wurde weiterhin ein Wachstumsassay zur Quantifizierung der Zellviabilität durchgeführt (Abbildung 21).

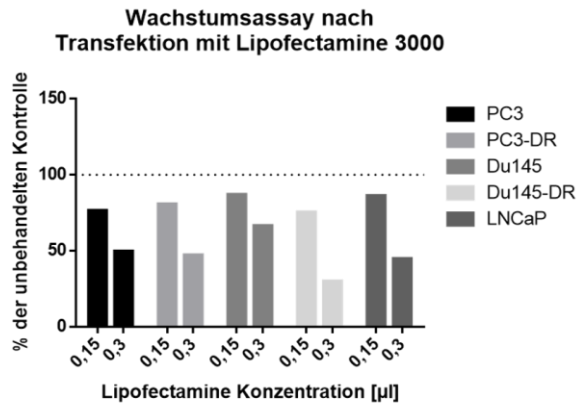


Abbildung 21: Dosis-Wirkungsanalysen nach Transfektion mit Lipofectamine® 3000 Reagent. Wachstumsassays der parentalen und docetaxelresistenten PCa-Zellen. PC3, DU145, LNCaP 72 Stunden nach Transfektion. Hierbei wurden 0,15 µl bzw. 0,3 µl Transfektionsreagenz genutzt. Es erfolgte die direkte Transfektion nach Zellaussaat, das Wachstumsassay wurde nach 72 Stunden durchgeführt. Die Daten wurden jeweils ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt (gepunktete Linie, 100 %). n = 1. DR = docetaxelresistent.

Im Wachstumsassay zeigte sich ein deutlicher Abfall der Zellviabilität besonders der Zellen, die mit der höheren Lipofectamine 3000-Konzentration von 0,3 µl (Konz. 2) behandelt wurden (Abbildung 21). In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich unter der höheren Konzentration Lipofectamine 3000 im Vergleich ein größerer Transfektionserfolg.

Das Transfektionsprotokoll mit Lipofectamine 3000 wurde weiter angepasst, um den toxischen Effekt des Transfektionsreagenzes auf ein Minimum zu reduzieren. Die Transfektion wurde 24 Stunden nach Aussaat durchgeführt. Es erfolgte eine Anpassung der Zellzahl, für PC3 und DU145 wurden 2.000, für LNCaP 10.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 4 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium vollständig abgenommen und durch 50 µl frisches Medium pro Well ersetzt. 72 Stunden nach der Transfektion erfolgte die Durchführung eines Wachstumsassays (Abbildung 23). Es zeigte sich eine mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbare Vitalität der transfizierten Zellen (Abbildung 23) bei ausreichendem Transfektionserfolg (Abbildung 22b). Insgesamt zeigte sich Lipofectamine 3.000® aufgrund der geringeren Toxizität und höheren Transfektionseffizienz im Vergleich zum ebenfalls getesteten Lipofectamine RNAiMAX® (Abbildung 18 , Abbildung 19) überlegen und wurde im

Weiteren nach dem beschriebenen Transfektionsprotokoll für den STAT5-*Knock-down* verwendet.

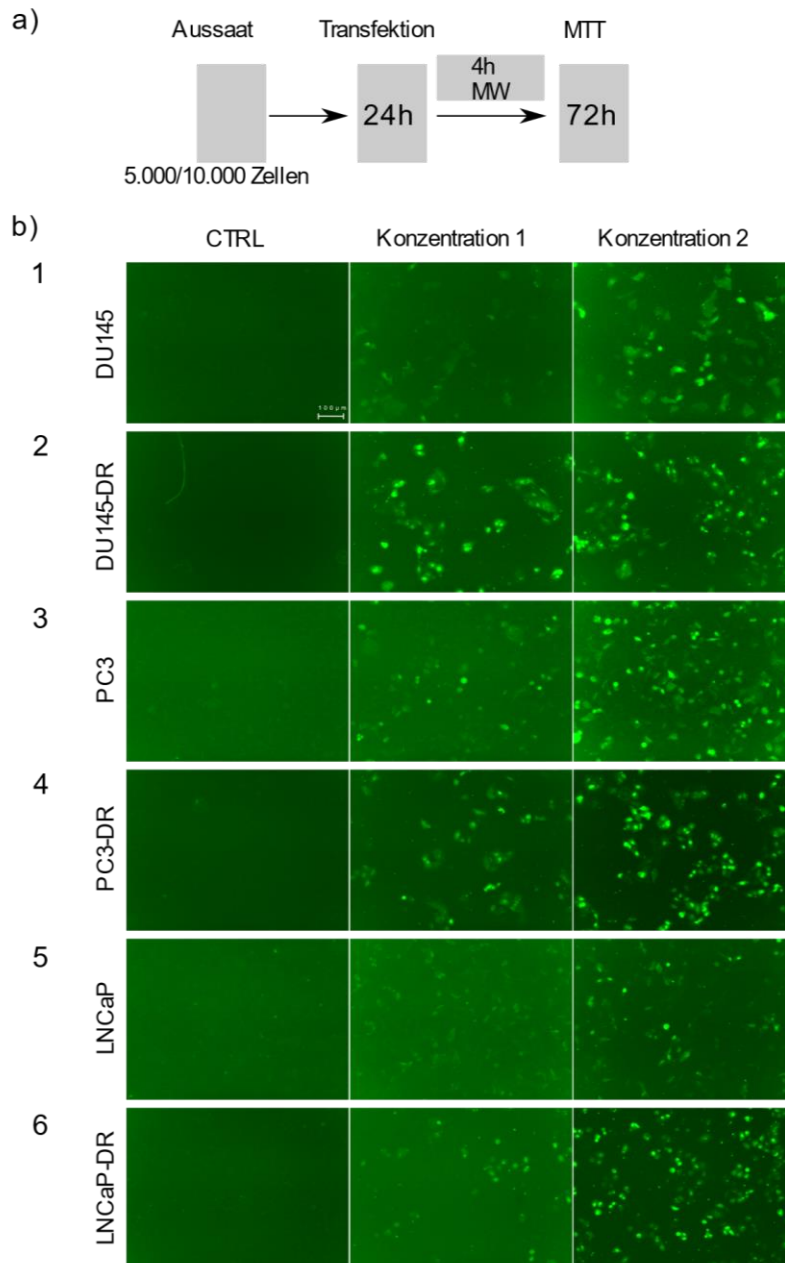


Abbildung 22: Ablaufschema und Erfolg der STAT5-siRNA-Transfektion mit Lipofectamine® 3000 Reagent. Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz wurde fluoreszenzmarkierte Doppelstrang-RNA 24 Stunden nach Aussaat nach Standardprotokoll transfiziert. 4 Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend wurde 24 Stunden nach Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie die intrazelluläre Anreicherung detektiert. a) Ablaufschema der Transfektion. b) Fluoreszenzbilder der Zellreihen 1 DU145, 2 DU145-DR, 3 PC3, 4 PC3-DR, 5 LNCaP und 6 LNCaP-DR jeweils als unbehandelte Negativkontrolle (CTRL) und nach Behandlung mit 0,15 µl (Konz. 1) bzw. 0,3 µl (Konz. 2) Transfektionsreagenz 24 Stunden nach Transfektion bei 100-facher Vergrößerung des Mikroskops aus n = 3. DR = docetaxelresistent.

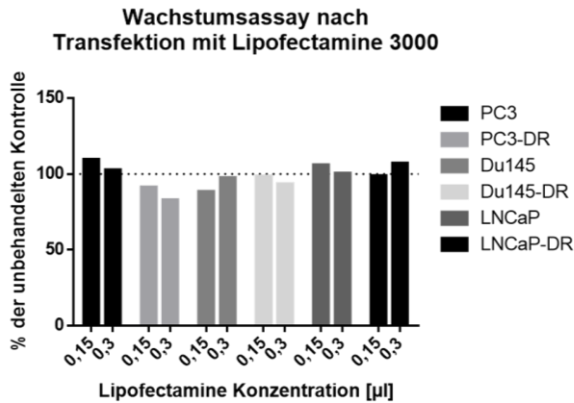


Abbildung 23: Wirkungsanalysen nach Transfektion mit Lipofectamine® 3000 Reagent. Zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz wurde fluoreszenzmarkierte Doppelstrang-RNA 24 Stunden nach Aussaat nach Standardprotokoll transfiziert. 4 Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierbei wurden 0,15 µl bzw. 0,3 µl Transfektionsreagenz genutzt. 72 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden Wachstumsassays der parentalen und docetaxelresistenten PCa-Zellen der Zellreihen PC3, DU145 und LNCaP durchgeführt. Die Daten wurden jeweils ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle gesetzt (gepunktete Linie, 100 %). Aus n = 1. DR = docetaxelresistent.

9.4.3 Nachweis der siRNA-Blockade (Transfektionskontrolle) auf Protein- und RNA-Ebene

Um den Erfolg der STAT5-Inhibition durch die Transfektion zu zeigen, wurden die STAT5- bzw. STAT5A- und STAT5B- Expression der DU145 evaluiert.

9.4.3.1 Nachweis der siRNA-Blockade (Transfektionskontrolle) von STAT5 auf Protein-Ebene

Die Zellen wurden mit Kontroll-siRNA sowie siRNA der beiden STAT5-Isoformen, STAT5A und STAT5B, behandelt und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Eine Übersicht über den Inhibitionserfolg ist in Abbildung 24 dargestellt. Es zeigte sich eine Reduktion der Proteinexpression von STAT5 um ca. 50 % nach Transfektion von STAT5B-siRNA, wohingegen das erfasste Expressionsniveau von STAT5 nach *Knock-down* von STAT5A mit dem der Kontrollgruppe vergleichbar war.

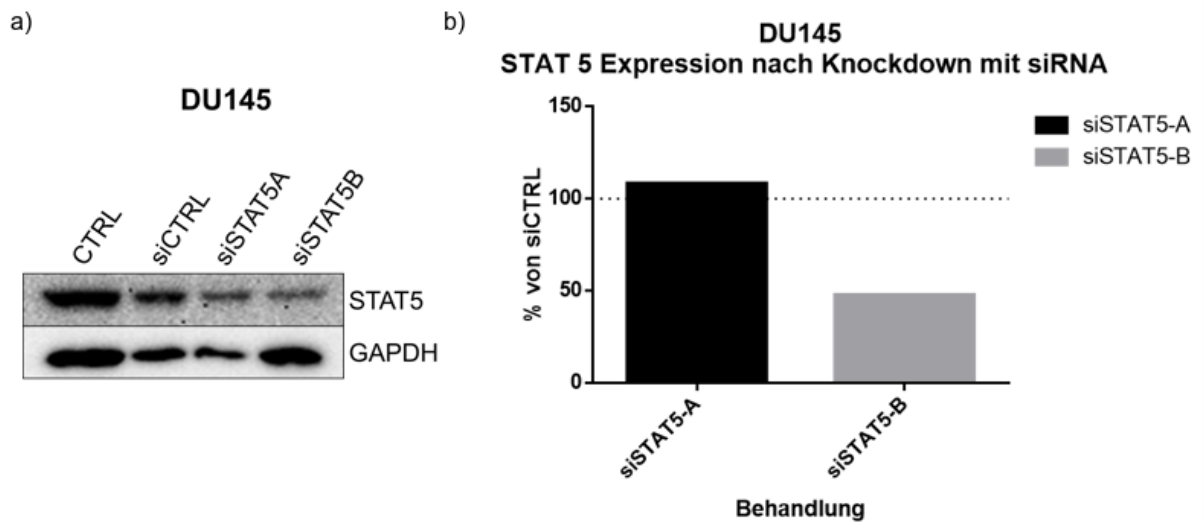


Abbildung 24: Nachweis des STAT5A- bzw. STAT5B-Knock-down mittels siRNA in DU145 anhand der STAT5-Expression auf Protein-Ebene. a) Repräsentativer Western Blot von STAT5A und STAT5B sowie des Haushaltsgens GAPDH der Zelllinie DU145 nach STAT5-Knock-down. Aus n=1. b) Pixelanalyse der STAT5A und STAT5B-Expression in DU145 nach STAT5A- und STAT5B-Knock-down mittels siRNA. Die Daten der siRNA-Blockade wurden dabei ins Verhältnis zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen dargestellt (gepunktete Linie, 100 %. n = 1. CTRL = unbehandelte Kontrolle, siCTRL = Kontroll-siRNA, siSTAT5-A = STAT5A komplementäre siRNA, siSTAT5-B = STAT5B komplementäre siRNA.

9.4.3.2 Nachweis der siRNA-Blockade (Transfektionskontrolle) auf mRNA-Ebene

Zunächst wurden die Zellen ebenfalls mit Kontroll-siRNA sowie siRNA der beiden STAT5-Isoformen, STAT5A und STAT5B, behandelt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der jeweiligen STAT5 mRNA-Expression mittels qPCR. In Abbildung 25 sind die mRNA-Expressionen der beiden STAT5-Varianten nach *Knock-down* in parental, docetaxel- und cabazitaxelresistenten DU145-Zellen dargestellt. Es zeigte sich ein deutlicher inhibitorischer Effekt auf die mRNA-Expression aller behandelten Zellen mit einer verminderten Expression von STAT5-mRNA zwischen 55-70 % im Vergleich zur Kontrolle. Hierbei stellte sich der durch die Transfektion erzielte inhibitorische Effekt des STAT5A- und STAT5B-Knock-downs für beide Isoformen gleichwertig dar.

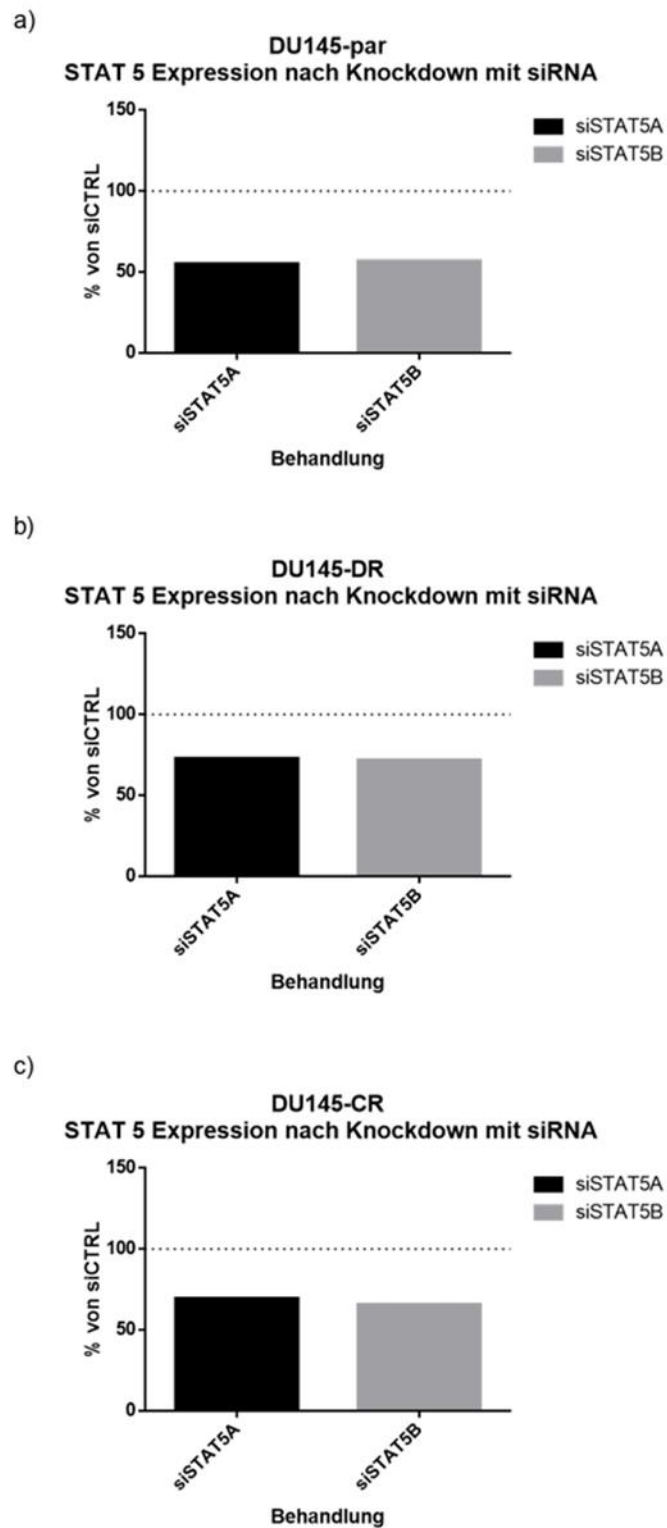


Abbildung 25: Nachweis des STAT5-Knock-downs in DU145 auf RNA-Ebene. STAT5A- und STAT5B-mRNA-Expression nach Behandlung mit den entsprechenden siRNAs in a) parentalen DU145, b) docetaxelresistenten DU145 und c) cabazitaxelresistente DU145-Zellen. Die Daten der siRNA-Blockade wurden dabei ins Verhältnis zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen gesetzt (gepunktete Linie; 100 %). n = 1.

10 Danksagung

11 Curriculum Vitae