

Cyclin K-CDK12/CDK13-Komplexe
im Prostatakarzinom
-Prognostische Bedeutung und Therapierelevanz-

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Katharina Maria Frei
geb. am 19.10.1991 in Lindenfels

Mainz, 2024

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Mai 2025

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... V

ABSTRACT 1

ZUSAMMENFASSUNG..... 3

1 EINLEITUNG..... 5

1.1 Prostatakarzinom..... 5

 1.1.1 Histologie und Funktion der Prostata.....5

 1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie7

 1.1.3 Molekulare Pathogenese.....7

 1.1.3.1 Rolle des Androgenrezeptors 8

 1.1.4 Klinisches Management des PCas..... 9

 1.1.4.1 Symptome des PCas 9

 1.1.4.2 Früherkennung, Diagnose und Staging des PCas10

 1.1.4.3 Behandlung und Therapieresistenzen des PCas.....12

1.2 Cyclin K-CDK12/CDK13-Komplexe.....14

 1.2.1 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen 14

 1.2.2 Struktureller Aufbau und Funktion der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe15

 1.2.3 Wirkmechanismus des CDK12/CDK13-Inhibitors THZ531.....18

 1.2.4 Expression und Funktion der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe in malignen
Erkrankungen.....19

1.3 DNA-Schadensantwort..... 22

 1.3.1 DNA-Reparaturmechanismen 24

 1.3.2 DDR- und DNA-Reparaturmechanismen als Zielstrukturen in der klinischen
Anwendung 25

1.4 Ziele der Arbeit..... 27

2 MATERIAL 28

2.1 Zelllinien 28

2.2 Zellkulturmedien.....29

2.3 Nukleinsäuren.....30

 2.3.1 siRNA-Oligonukleotide.....30

 2.3.2 Primer für die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)30

2.4 Proteine.....31

 2.4.1 Antikörper 31

 2.4.1.1 Primärantikörper.....31

2.4.1.2	Sekundärantikörper.....	32
2.4.2	Proteingrößenstandard für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.4.3	Sonstige Enzyme und Proteine	32
2.5	Puffer und Lösungen.....	33
2.5.1	Verwendete Puffer und Lösungen zur Immunblot-Analyse	33
2.5.2	Verwendete Puffer und Lösungen für die durchflusszytometrische Analyse	34
2.5.3	Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung.....	35
2.5.4	Verwendete Puffer und Lösungen für die Gewebekultur	35
2.6	Chemikalien und Reagenzien	36
2.6.1	Inhibitoren.....	36
2.6.2	Kits.....	36
2.6.3	Reagenzien	37
2.7	Verbrauchsartikel	39
2.8	Geräte und Software	40
3	METHODEN.....	42
3.1	Zellbiologische Methoden.....	42
3.1.1	Kultivierung der humanen PCa-Zelllinien	42
3.1.2	Kryokonservierung der humanen PCa-Zelllinien.....	42
3.1.3	Transiente Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden	43
3.1.4	Behandlung der humanen PCa-Zelllinien	43
3.1.4.1	Inhibitoren.....	43
3.1.5	Zellproliferations-Assay	44
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	45
3.2.1	Reverse Transkription von RNA.....	45
3.2.2	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	45
3.2.2.1	Qualitätsprüfung der Primer-Effektivität	47
3.3	Biochemische und physikalische Methoden.....	48
3.3.1	Isolierung von RNA	48
3.3.1.1	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	48
3.3.2	Herstellung von Gesamtzellextrakten	48
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration und Probenvorbereitung.....	49
3.3.4	SDS-PAGE.....	50
3.3.5	Semi-dry-Western-Transfer	51
3.3.6	Immunblot-Analyse	51
3.3.7	Durchflusszytometrische Analyse.....	52
3.3.7.1	Bestimmung der Apoptoserate mittels Annexin V	52

3.3.7.2	Zellzyklusanalyse mittels BrdU	53
3.3.8	Immunfluoreszenzfärbung.....	53
3.3.9	<i>In vivo</i> -Chorioallantoismembran-Modell des Hühnereies.....	55
3.3.10	<i>Ex vivo</i> -Gewebekulturmodell.....	56
3.3.11	Immunhistochemische Analyse von Zellpellets, Gewebe und Tissue Microarray	57
3.3.11.1	Herstellung von Zellpellets.....	57
3.3.11.2	Immunhistochemische Färbung von FFPE-Zellpellets und Gewebe.....	57
3.3.11.3	Etablierung der immunhistochemischen Färbung unterschiedliche Biomarker....	58
3.3.11.4	Evaluierung der CycK- und CDK12-Expression in einem Tissue Microarray.....	59
3.4	Software-basierte und Statistische Analysen.....	60
3.4.1	Digitale Bildgebungsanalyse mit QuPath.....	60
3.4.1.1	Auswertung der Gewebekulturschnitte und Tumorxenografts des CAM-Modells	60
3.4.1.2	Auswertung des TMA – Quantifizierung der CycK- und CDK12-Expression	61
3.4.2	Statistische Analyse der <i>in vitro</i> -Daten.....	61
3.4.3	Statistische Analyse der <i>ex vivo</i> -Daten	61
3.4.4	Statistische Analyse der <i>in vivo</i> -Daten des CAM-Modells.....	62
3.4.5	Statistische Analyse der TMA-Auswertung.....	62
4	ERGEBNISSE	63
4.1	Charakterisierung der PCa-Zelllinien	63
4.2	Auswirkungen der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition	64
4.2.1	Nachweis der Inhibitor-Aktivität von THZ531.....	64
4.2.2	Effekte von THZ531 auf die Proliferation und das Überleben von PCa-Zelllinien.....	65
4.2.3	Effekte von THZ531 auf Tumorxenografts im CAM-Modell des Hühnereies – <i>in vivo</i>	69
4.2.4	Molekulare Mechanismen der THZ531-bedingten Effekte.....	72
4.2.4.1	Effekte von THZ531 auf die Transkription von DDR-Genen und die Entstehung von DNA-Schäden.....	73
4.2.4.2	Effekte von THZ531 auf die DDR.....	77
4.3	Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe in Kombination mit verschiedenen Therapieformen des PCas.....	79
4.3.1	Effekte der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Olaparib.....	79
4.3.2	Effekte der kombinierten Behandlung mit THZ531 und der ADT – <i>in vitro</i>	81
4.3.2.1	Effekte der kombinierten Behandlung mit THZ531 und der ADT – <i>ex vivo</i>	98
4.4	Klinische Relevanz des CycK-CDK12-Komplexes im PCa.....	107
4.4.1	Etablierung der immunhistochemischen Färbung von CDK12 in Zellpellets und Gewebe.....	107

4.4.2	Evaluierung von CycK und CDK12 als prognostische Biomarker	110
5	DISKUSSION	118
5.1	Funktionelle Rolle der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe im PCa	118
5.1.1	Einfluss der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf die Phosphorylierung der CTD der RNAP II	118
5.1.2	Einfluss der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf die Expression von DNA-Reparaturgenen, die Induktion von DNA-Schäden und die DDR	121
5.1.3	Zelllinienabhängige Auswirkungen der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf die Proliferation und das Überleben	124
5.2	Bedeutung der divergenten Funktionen von CDK12 und CDK13 für die antitumorogene Wirkung von THZ531	127
5.3	Eignung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als therapeutische Zielstrukturen in Kombination mit Standardtherapieformen des PCa	129
5.3.1	Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe sensitiviert PCa-Zellen für Olaparib	129
5.3.2	Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe erhöht die Effektivität der ADT in PCa-Zellen und im -Gewebe	131
5.3.2.1	Funktionelle Effekte der Kombinationsbehandlung in AR-positiven Zelllinien	131
5.3.2.2	Funktionelle Effekte der Kombinationsbehandlung in AR-negativen Zelllinien	132
5.3.2.3	Funktionelle Effekte der Kombinationsbehandlung an frischem humanem PCa-Gewebe	133
5.4	Präklinische Evaluierung des CycK-CDK12-Komplexes als Biomarker	136
5.4.1	Prognostische Relevanz der CycK- und CDK12-Expression im humanen PCa-Gewebe	136
5.4.2	Relevanz der CycK- und CDK12-Expression für die Karzinogenese und Metastasierung	140
5.5	Klinische Relevanz der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition	144
6	LITERATUR	X
7	ANHANG	XXIII
7.1	Abbildungsverzeichnis	XXIII
7.2	Tabellenverzeichnis	XXV
7.3	Veröffentlichungen	XXVI
	DANKSAGUNG	XXVII
	EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG	XXXI

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
53BP1	<i>Tumor protein p53 binding protein 1</i>
7-ADD	7-Aminoactinomycin D
ADT	Androgendeprivationstherapie
AKT	Proteinkinase B
ALE	Alternatives Spleißen des letzten Exons
APEX2	<i>Apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ARE	<i>Androgen Response Elements</i>
AS	Aminosäure
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>Bcl-2-like 1</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar
BRCA1/2	<i>Breast cancer gen 1/2</i>
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAK	CDK-aktivierende Kinase
CAM	Chorioallantoismembran
Caspasen	<i>Cysteine aspartic acid-specific proteases</i>
Cdc25	<i>Cell division cycle 25</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Komplementäre DNA
CE	Kryptisches Exon
CHK1/2	Zellzykluskontrollpunkt-Kinase 1/2
CRPC	Kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CSC	Tumorstammzellen
C _t	<i>Cycle threshold</i>
CTD	C-terminale Domäne
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
CycK	Cyclin K
CYP17	Cytochrom P450 17
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DDR	DNA-Schadensantwort

dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAJB6	<i>DNAJ Heat Shock Protein Family Member B6</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
DTX	Docetaxel
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
ERG	<i>Erythroblast transformation-specific (ETS) Transcription Factor</i>
ESA	<i>Epithelial surface antigen</i>
ESC	Embryonale Stammzellen
et al.	<i>et alii</i> , und andere
EWS	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FANCD2	<i>Fanconi anemia group D2</i>
FANCI	<i>Fanconi anemia complementation group I</i>
FBS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFPE	Formalin-fixiertes-Paraffin-eingebettetes Gewebe
FITC	<i>Fluorescein</i>
FLI	<i>Friend leukemia integration 1 transcription factor</i>
FOXA1	<i>Forkhead Box A1</i>
gDNA	Genomische DNA
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HGSOC	<i>High-grade seröses Ovarialkarzinom</i>
HR	Homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase
H-Score	Histo-Score
IB	Immunblot-Analyse
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitor
ICL	<i>Interstrand-DNA-crosslinks</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>

JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
KDM5D	Lysin-Demethylase 5D
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
KLK3	<i>Kallikrein Related Peptidase 3</i>
LBD	Liganden-Bindedomäne
LHRH	<i>Luteinizing hormone-releasing hormone</i>
Mat1	<i>CDK-activating kinase assembly factor MAT1</i>
Mcl-1	<i>Myeloid cell leukemia-1</i>
mCRPC	Metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MDM2	<i>Human p53 binding protein homolog</i>
MMR	Fehlpaarungsreparatur
mPD-L1	Membrangebundenes PD-L1
MRN	<i>MRE11-RAD50-NBS1-complex</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung
NKX3-1	<i>NK3 Homeobox 1</i>
NTD	N-terminale Domäne
OD	Optische Dichte
OGG1	<i>8-Oxoguanin DNA-Glycosylase 1</i>
PAK1	p21-aktivierenden Kinase 1
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
Pn	Perineurale Infiltration
PNKP	<i>Polynukleotide-kinase-3'-phosphatase</i>
PRM	Prolinreiche Motive
PSA	Prostataspezifisches Antigen
PSMA	Prostataspezifisches Membranantigen
P-TEFb	<i>Positive transcription elongation factor b</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Puma	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

R1881	Metribolone
RAD50	<i>RAD50 Double Strand Break Repair Protein</i>
RAD51	<i>RAD51 recombinase</i>
RAD9A	<i>RAD9 checkpoint clamp component A</i>
RB1	Retinoblastoma 1
RFC5	<i>Replication factor C subunit 5</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP II	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replikationsprotein A
rpm	Rotation pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RS	Arginin- /serinreichen
SCF	<i>Skp, Cullin, F-box containing complex</i>
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SF3B1	<i>Splicing factor 3b subunit 1</i>
SH3	<i>Src-homology 3</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
sPD-L1	Lösliches PD-L1
SPOP	<i>Speckle-type POZ protein</i>
SR	Serinreichen
SSB	Einzelstrangbruch
ssDNA	Einzelsträngige DNA
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease serine subtype 2</i>
TNBC	Triple-negatives Mammakarzinom
TP53	Tumorprotein 53
tRNA	Transfer-RNA
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
Wee1	<i>WEE1 G2 checkpoint kinase</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the prognostic significance and therapeutic relevance of the Cyclin K-CDK12/CDK13 complexes in prostate cancer, one of the most common diagnosed cancer types in men worldwide. Despite an initial therapeutic response, treatment failure and recurrences often occur, emphasizing the urgent need for effective targeted therapies. While the Cyclin K-CDK12/CDK13 complexes are well-known for their essential role in maintaining genome stability, cell proliferation, and tumor cell survival, their specific function and therapeutic potential in prostate cancer are not yet fully understood.

In this study, the inhibition of the Cyclin K-CDK12/CDK13 complexes by the covalent CDK12/CDK13 inhibitor THZ531 decreased the viability of prostate cancer cells either through induction of cell cycle arrest in the G2/M phase or apoptotic cell death in a cell line-dependent manner. These anti-tumorigenic effects were associated with THZ531-mediated downregulation of the expression of DNA damage response and DNA repair genes, resulting in the accumulation of DNA damage. In addition, THZ531 treatment in tumor xenografts of the chorioallantoic membrane model of the chicken egg led to reduced tumor viability, accompanied by an increased rate of apoptosis.

Based on these findings, investigations were conducted to determine whether the anti-neoplastic potential of THZ531 could sensitize prostate cancer cells to PARP inhibition with olaparib or the anti-androgens enzalutamide and abiraterone. The combined treatment with olaparib and THZ531 synergistically induced apoptosis in one of the cell lines used in this study. The combination of THZ531 and anti-androgens led to an increase in the anti-tumoral effects, particularly in androgen-sensitive prostate cancer cells. Furthermore, the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of this combination therapy were also confirmed *ex vivo* in vital human prostate cancer tissue.

Regarding the prognostic significance, the analysis of a tissue microarray comprising tissue samples from prostate cancer patients showed that Cyclin K, but not CDK12 expression, correlated with a more aggressive type of prostate cancer.

In sum, the findings of this study demonstrate the clinical relevance of the Cyclin K-CDK12/CDK13 complexes as promising therapeutic targets, especially in combination with an anti-androgen therapy, as well as the importance of Cyclin K as a prognostic biomarker for patients with prostate cancer.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die prognostische Bedeutung und Therapierelevanz der Cyclin K-CDK12/CDK13-Komplexe im Prostatakarzinom, einer der weltweit häufigsten malignen Neoplasien bei Männern, untersucht. Trotz eines anfänglichen therapeutischen Ansprechens kommt es häufig zu einem Therapieversagen und einer Rezidiventwicklung, was die Notwendigkeit effektiver und zielgerichteter Therapien unterstreicht. Obwohl die Cyclin K-CDK12/CDK13-Komplexe aufgrund ihrer essenziellen Rolle für die Genomstabilität, Proliferation und das Überleben maligner Zellen bereits Gegenstand zahlreicher Studien sind, ist über ihre funktionelle Rolle und ihr therapeutisches Potenzial beim Prostatakarzinom bisher noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Cyclin K-CDK12/CDK13-Komplexe durch den kovalenten CDK12/CDK13-Inhibitor THZ531 die Viabilität von Prostatakarzinomzellen vermindert, was entweder auf eine zelllinienabhängige Induktion eines Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase oder auf den apoptotischen Zelltod zurückzuführen war. Diese antitumorigenen Effekte waren mit einer THZ531-vermittelten Reduktion der Expression essenzieller Genen der DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur assoziiert, was die Akkumulation von DNA-Schäden verursachte. Darüber hinaus führte die THZ531-Behandlung von Tumorexografts im Chorioallantoismembran-Modell des Hühnereies zu einer Abnahme der Tumorviabilität, die mit einer erhöhten Apoptoserate einherging.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde untersucht, ob die antineoplastische Wirkung von THZ531 die Prostatakarzinomzellen gegenüber einer PARP-Inhibition mit Olaparib oder den Antiandrogenen Enzalutamid und Abirateron sensibilisieren kann. In Kombination mit Olaparib löste THZ531 synergistisch Apoptose in einer der untersuchten Zelllinien aus. Die kombinierte Behandlung aus THZ531 und den Antiandrogenen führte speziell bei androgensensitiven Prostatakarzinomzelllinien zu einer Verstärkung der antitumoralen Auswirkungen. Zudem konnten die anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekte dieser Kombinationstherapie auch *ex vivo* im frischen humanen Prostatakarzinomgewebe verifiziert werden.

Im Hinblick auf die prognostische Bedeutung konnte in einem Tissue Microarray mit Gewebeproben von Prostatakarzinompatienten gezeigt werden, dass die Cyclin K-, nicht aber die CDK12-Expression mit einem aggressiveren Prostatakarzinom-Typ korrelierte.

Zusammenfassend verdeutlichen die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit die klinische Relevanz der Cyclin K-CDK12/CDK13-Komplexe als vielversprechende therapeutische Zielstrukturen, insbesondere in Kombination mit einer Antiandrogen-Therapie, sowie die Bedeutung von Cyclin K als prognostischer Biomarker bei Patienten mit einem Prostatakarzinom.

1 EINLEITUNG

1.1 Prostatakarzinom

Beim Prostatakarzinom (PCa) handelt es sich um eine maligne, glanduläre Neoplasie, die vom Drüsengewebe der Prostata ausgeht [1]. Gemäß der *World Health Organization* (WHO) werden Prostatatumore in unterschiedliche Entitäten subklassifiziert, um zuverlässige und klinisch aussagekräftige Diagnosen zu erstellen und folglich eine optimale Therapie zu ermöglichen. Die häufigste maligne Neoplasie ist hierbei das azinäre Adenokarzinom der Prostata, das etwa 90 – 95 % der neoplastischen Erkrankungen darstellt. Neben dem azinären Adenokarzinom definiert die WHO-Klassifikation seltenere Subtypen, wie neuroendokrine, mesenchymale, hämatolymphoide und maligne Neoplasien nicht-epithelialen Ursprungs [2, 3].

1.1.1 Histologie und Funktion der Prostata

Die humane Prostata, die auch als Vorsteherdrüse bezeichnet wird, gehört zu den inneren Geschlechtsorganen des Mannes. Ihre wichtigste Funktion ist die Produktion eines sauren Sekrets (pH-Wert von 6,4), das ca. 30 % der Samenflüssigkeit ausmacht und zudem Enzyme wie die prostataspezifische saure Phosphatase und das prostataspezifische Antigen (PSA) enthält [4]. Die Prostata ist zur Differenzierung, zum Wachstum und zur Aufrechterhaltung ihrer strukturellen und funktionellen Integrität auf die männlichen Geschlechtshormone, die sogenannten Androgene, angewiesen [5]. Das Prostatagewebe besteht aus vielen Einzeldrüsen, die sich im Wesentlichen aus drei verschiedenen Zelltypen zusammensetzen: luminalen, basalen und neuroendokrinen Zellen (Abbildung 1-1). Luminale Zellen, auch sekretorische Epithelzellen genannt, stellen mit einem Anteil von ca. 60 % den primären Zelltyp des Prostataepithels dar. Sie exprimieren hohe Mengen des Androgenrezeptors (AR) und sezernieren AR-abhängig das PSA und weitere Bestandteile des Prostatasekrets. Umgeben sind sie von einer Schicht aus Basalzellen, die die Basalmembran bilden. Dazwischen befinden sich vereinzelt neuroendokrine Zellen, die mit ca. 1 % den geringsten Anteil der drei Zelltypen ausmachen. Das Prostataepithel ist in einem derben, kontraktile, teils bindegewebsartigen Stroma verankert, das überwiegend aus glatten Muskelzellen und Fibroblasten besteht, aber auch Endothel- und Immunzellen enthält [6-8].

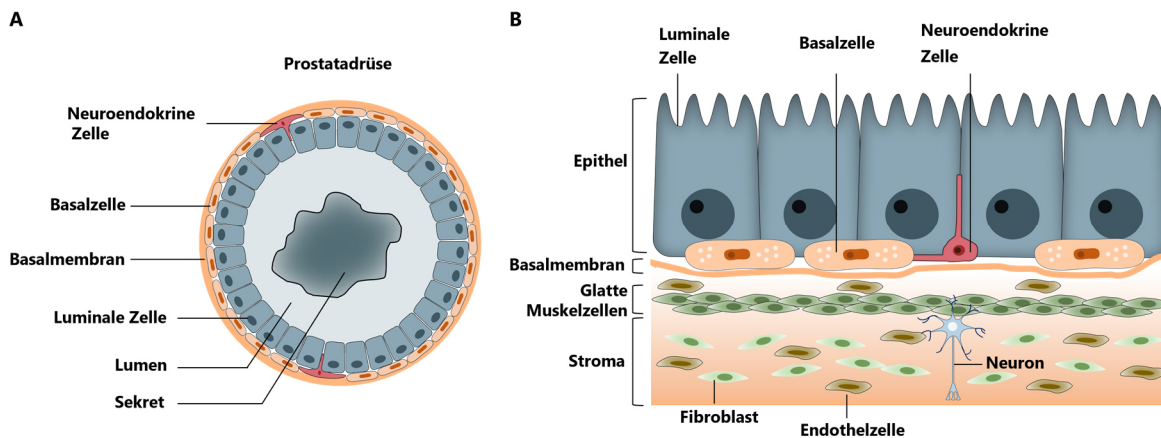


Abbildung 1-1 Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Prostata. (A) Die normale Prostata besteht aus drei verschiedenen Zelltypen. (B.) Die mikroskopische Vergrößerung der Prostata veranschaulicht die Unterteilung in die verschiedenen Zellschichten. Das Drüsenepithel ist in ein bindegewebsartiges Stroma eingebettet, das aus glatten Muskelzellen, Fibroblasten und einer dichten extrazellulären, kollagenen Matrix besteht, aber auch Endothel- und Immunzellen enthält. Zwischen diesen beiden Schichten befindet sich die Basalmembran, die die Basalzellen vom Stroma trennt. Modifiziert nach Rebello *et al.* [6].

Im Vergleich zu normalen Prostata zeigen azinäre Proliferate des Adenokarzinoms meist deutliche morphologische Unterschiede auf, wie z. B. atypische und unregelmäßig verzweigte Drüsen oder gar den vollständigen Verlust der Drüsenbildung, ein infiltratives Wachstum und den Verlust der Basalzellschicht. Neben den architekturellen Unterschieden sind neoplastische Zellen durch eine verschobene Kern-Plasma-Relation gekennzeichnet, die meist mit diversen zytologischen Atypien wie überdimensionierten oder hyperchromatischen Kernen und multiplen Nukleolen einhergeht [2, 9]. Adenokarzinome der Prostata sind des Weiteren häufig durch ein multifokales Wachstum gekennzeichnet und zeigen innerhalb der einzelnen Tumorherde diverse histologische und genetische Unterschiede [10, 11]. Die einzige anerkannte, morphologisch diagnostizierbare Vorläuferläsion des PCa ist die hochgradige prostatiche intraepitheliale Neoplasie (*high-grade PIN*). Die *high-grade PIN* beschreibt eine Dysplasie innerhalb des Drüsenepithels mit überwiegend normaler Drüsenarchitektur, das jedoch mit atypischen Zellen ausgekleidet ist. Das wichtigste diagnostische Merkmal einer *high-grade PIN* ist hierbei das Vorkommen von vergrößerten Kernen mit teils multiplen Nukleolen in den luminalen Epithelzellen. Die Basalzellschicht als Merkmal einer konservierten Drüsenarchitektur ist im Gegensatz zum PCa immer präsent, kann aber auch diskontinuierlich oder fragmentiert vorliegen und nur wenige Basalzellen enthalten [3, 12, 13].

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Im Jahr 2020 erkrankten 18,1 Millionen Menschen weltweit an malignen Erkrankungen, ohne Berücksichtigung des nicht melanozytäre Hautkrebs. Das PCa ist hierbei mit ca. 1,2 Millionen Neuerkrankungen (7,1 %) die zweithäufigste maligne Neoplasie und mit 358.989 Todesfällen (3,8 % aller Krebstodesfälle bei Männern) die fünfthäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern [14, 15]. In Deutschland ist das PCa laut Robert Koch-Institut im Jahr 2018 mit ca. 25 % die häufigste Tumorneuerkrankung bei Männern und weist nach dem Lungenkarzinom die zweithöchste Mortalitätsrate (12 %) auf [16]. Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines PCas ist das Alter. Verglichen mit der geringen Inzidenzrate (2 %) der PCa-Diagnose bei Männern unter 50 Jahren liegt diese bei Männern über 65 Jahren mit ca. 60 % deutlich höher [17]. Da die Mehrzahl an PCas in einem frühen Stadium entdeckt wird, liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 89 % [16]. Darüber hinaus geht eine erbliche genetische Veranlagung mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher und macht etwa 5 % des Erkrankungsrisikos aus. Neben einer polygenetischen Erkrankung spielen in diesen Fällen selten auch Erkrankungen, die nur durch ein einzelnes mutiertes Gen ausgelöst werden, eine Rolle. Hierbei erhöhen hereditäre Mutationen, vor allem im *BRCA2*-Gen, das Risiko für die Entwicklung eines PCas um das 8,5-Fache bei Männern über 65 Jahren [18, 19]. Neben diesen nicht veränderbaren Risikofaktoren beeinflusst der zunehmende westliche Lebensstil mit Übergewicht, Bewegungsmangel und Ernährungsfaktoren nachweislich das Risiko der Entstehung eines PCas [15].

1.1.3 Molekulare Pathogenese

Komplexe Interaktionen zwischen angeborenen Keimbahnvarianten, erworbenen somatischen Mutationen, dem Mikromilieu der Prostata und anderen Umweltfaktoren haben Einfluss auf die Entstehung und die Progression eines PCas [20]. Die Komplexität des PCas wird insbesondere durch die intratumorale Heterogenität und Multiklonalität dominiert, was die eindeutige Identifizierung der verantwortlichen molekularen Mechanismen der Tumorentstehung erschwert. Die häufigste genetische Aberration, die bei etwa 40 - 60 % der PCa-Patienten beobachtet wird und für die Karzinogenese verantwortlich ist, ist die Genfusion zwischen *TMPRSS2* und dem onkogenen Transkriptionsfaktor *ERG* [6, 20, 21]. Während *ERG* in normalen Prostataepithelzellen nicht exprimiert wird, kann in PCa-Zellen hingegen in Gegenwart von Androgenen durch die androgensensitiven Elemente des *TMPRSS2*-Promotors eine *ERG*-Überexpression beobachtet werden [22, 23]. Eine Überexpression von *ERG*, das eine entscheidende Rolle bei der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) spielt und somit ein treibendes Ereignis beim Übergang vom PIN zum Karzinom darstellt, ist mit einem aggressiveren PCa-Phänotyp assoziiert [24]. Darüber hinaus gehören Mutationen in den folgenden Genen zu den häufigsten genomischen Aberrationen im frühen invasiven Stadium des PCa: *SPOP*, *FOXA1*, *NKX3-1* und *MYC* [6, 21, 25].

Im metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom (mCRPC) gehört das Tumorsuppressorgen *PTEN* zu den am häufigsten mutierten Genen. Eine homozygote Deletion des *PTEN*-Gens oder eine *loss-of-function*-Mutation sind mit einer verstärkten Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs assoziiert, was malignes Zellwachstum und -proliferation fördert und somit die Karzinogenese und Tumorprogression vorantreibt [6, 20, 26]. Mutationen des Tumorsuppressors *RBI* und des Transkriptionsfaktors *TP53* können zu einer dysfunktionalen Aktivität dieser Zellzyklusregulatoren und damit zu einem aberranten Zellzyklus beitragen, wodurch die genetische Instabilität erhöht wird. Diese Mutationen treten gehäuft bei mCRPC-Patienten auf und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert [26-29]. Amplifikationen und Überexpressionen des Proto-Onkogens *MYC* führen ebenfalls zu einer gesteigerten Zellzyklusprogression und tragen durch Interaktion mit dem AR-abhängigen Transkriptionsprogramm zur Progression des mCRPCs bei [27, 30, 31]. Beim mCRPC sind somatische Defekte in Genen der DNA-Schadensantwort (DDR), die vorherrschend an der homologen Rekombinationsreparatur beteiligt sind (z. B. *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51D* und *CDK12*), ebenfalls weit verbreitet [27, 32, 33].

1.1.3.1 Rolle des Androgenrezeptors

Der AR ist ein nukleärer Steroidhormonrezeptor, der in seiner Funktion als androgenabhängiger Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle für die Entwicklung und Funktion der Prostata, aber auch für die Entstehung und Progression des PCAs spielt [34, 35]. Das *AR*-Gen umfasst 8 Exons, die ein 110 kDa großes Protein codieren, das vier funktionell unterschiedliche Domänen aufweist: eine N-terminale Domäne (NTD), eine DNA-Bindedomäne (DBD), eine *Hinge*-Region, die das nukleäre Lokalisierungssignal beinhaltet, und die Liganden-Bindedomäne (LBD) (Abbildung 1-2) [36].

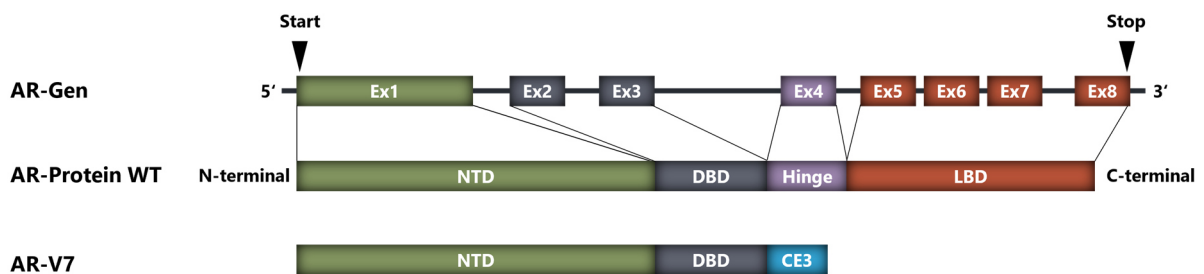


Abbildung 1-2 Schematischer Aufbau des humanen *AR*-Gens, des Wildtyp (WT) AR-Proteins und einer AR-Spleißvariante (AR-V7). (Oben) Das *AR*-Gen besteht aus 8 Exons (Ex). Das AR-Protein setzt sich aus der N-terminalen Domäne (NTD), der DNA-Bindedomäne (DBD), der *Hinge*-Region und der Liganden-Bindedomäne (LBD) zusammen. (Unten) Dargestellt ist die Proteinstruktur der AR-V7-Variante ohne LBD und mit integriertem kryptischen Exon (CE), die durch alternatives Spleißen verkürzt wurde. Modifiziert nach Messner *et al.* [37].

In Abwesenheit von Androgenen liegt der AR in einer inaktiven Konformation im Zytoplasma vor, die zur Ligandenbindung fähig ist [37, 38]. Die Aktivierung des AR kann einerseits durch Testosteron, das hauptsächlich in den Hoden und in geringen Mengen in den Nebennieren gebildet wird, und andererseits durch seine aktivierte Form, das Dihydrotestosteron (DHT), ausgelöst werden. Dabei hat das DHT eine größere Affinität zu der LBD des ARs als Testosteron [37-39]. Anschließend erfolgt die Translokation des ARs in den Nukleus, wo er durch physikalische Interaktion mit der DBD an die Promotorregion der *Androgen Response Elements* (ARE) der DNA von AR-abhängigen Genen bindet. Nach der Bindung an die AREs erfolgt die Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie und die Rekrutierung bestimmter Koregulatoren [34, 38]. Zu den AR-abhängigen Genen zählen z. B. *KLK3*, das PSA codiert, und *TMPRSS2* [34-37].

Verschiedene epigenetische und genetische Mechanismen, die zu Veränderungen der AR-Signaltransduktion und des AR selbst führen, treten während der Progression zum kastrationsresistenten Prostatakarzinom (CRPC) oder mCRPC auf und ermöglichen so das Wachstum unter Androgendeprivation [37, 40]: Die häufigste genetische Aberration ist die AR-Amplifikation, die zu einer Überexpression des ARs führt, wodurch die Zellproliferation unter einem reduzierten Androgenspiegel aufrechterhalten wird [34, 38, 41]. Mutationen des *AR*-Gens treten in allen Rezeptordomänen auf, am häufigsten aber in der LBD [42-44]. Sie können zu einer verminderten Spezifität der Ligandenbindung und zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung führen, wodurch die AR-Aktivität durch AR-Agonisten eher gefördert als gehemmt wird und damit zur Progression des mCRPCs beiträgt [36]. AR-Spleißvarianten (z. B. AR-V7) sind typischerweise verkürzt und haben keine LBD, während DBD und NTD noch vorhanden sind (Abbildung 1-2) [37, 45]. PCa-Zellen, die AR-Varianten aufweisen, sind resistent gegenüber der Androgendeprivations-therapie (ADT) und AR-Inhibitoren und werden mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert [46, 47]. Neben direkten Veränderungen des ARs kann die Wiederherstellung der AR-Signaltransduktion nach einer ADT durch eine gesteigerte tumorautonome Androgensynthese erfolgen, die auf eine Hochregulation von Schlüsselenzymen des Steroidsynthese-Signalwegs zurückzuführen ist und *de novo* Testosteron oder DHT produzieren kann [37, 48].

1.1.4 Klinisches Management des PCas

1.1.4.1 Symptome des PCas

In den meisten Fällen ist ein PCa asymptomatisch, selbst wenn sich bereits Metastasen gebildet haben. Miktionsbeschwerden, Hämaturie oder Schmerzen im Bereich des unteren Rückens, des Beckens oder der Hüfte der Betroffenen treten häufig erst in fortgeschrittenen Stadien des PCas auf. Die Beschwerden sind jedoch nicht PCa-spezifisch, sondern können teilweise auch von anderen Krankheitsbildern wie z. B. einer benignen Prostatahyperplasie verursacht werden [49].

1.1.4.2 Früherkennung, Diagnose und Staging des PCas

Zu den Standard-Früherkennungsmethoden des PCas gehören die digitale rektale Untersuchung, eine Palpation der Prostata zur Feststellung von strukturellen Anomalien, und die Bestimmung des PSA-Wertes im Blutserum [50]. Erst die Entnahme einer Gewebebiopsie mit anschließender histopathologischer Untersuchung bei auffälligem Tastbefund und erhöhtem PSA-Wert trägt zur endgültigen Diagnose bei [50, 51]. Die pathologische Beurteilung der Biopsie orientiert sich hierbei an den klassischen Diagnosekriterien wie z. B. der Architektur der Drüsen, den Kernatypien und dem Fehlen der Basalzellen [52, 53]. Sowohl nach der Stanzbiopsie als auch nach radikaler Prostatektomie erfolgt die histologische Beurteilung des Tumorgrades nach dem überarbeiteten Gleason-Graduierungssystem der *International Society of Urological Pathology* (ISUP) von 2014 durch einen Pathologen [54]. Das Gleason-Graduierungssystem umfasst hierbei fünf Grade, die sich in ihrem Wachstumsmuster hinsichtlich der Drüsenmorphologie bzw. Entdifferenzierung unterscheiden und nach steigender Abweichung vom Normalgewebe von 1 (gering) bis 5 (stark) definiert werden (Abbildung 1-3). Der Tumorgrad eines Karzinoms in einem Prostatektomiepräparat, bei dem das gesamte Tumorgewebe untersucht werden kann, wird durch Addition des vorherrschenden (z. B. 4) und des zweithäufigsten (z. B. 5) Wachstumsmusters als Gleason-Score ermittelt (z. B. Gleason-Score 9 = 4 + 5). Basierend auf dem Gleason-Score erfolgt die Einteilung in die fünf morphologischen Gradgruppen (1-5), die eine präzisere Stratifizierung des Tumors gemäß des neuen ISUP 2014/WHO 2016 Graduierungssystem gewährleisten [54, 55].

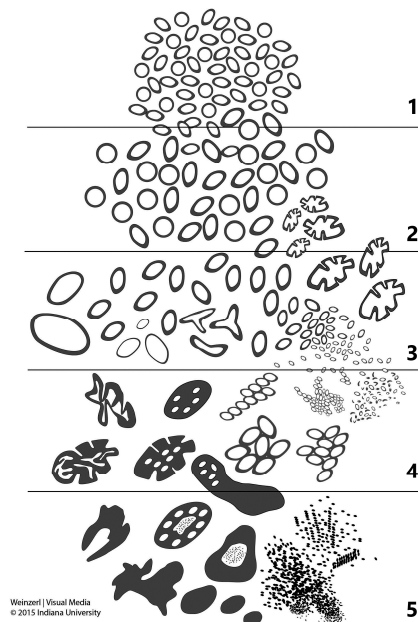


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung des histologischen Gleason-Wachstumsmuster des PCas, das als Grundlage für das ISUP 2014/WHO 2016 Graduierungssystem verwendet wird. Die Grade 1-5 klassifizieren das PCa nach ihrem Differenzierungsstatus. Eine geringe Entdifferenzierung und ein niedriger Malignitätsgrad liegen vor, wenn das Tumorgewebe nicht stark vom gesunden Gewebe abweicht. Umgekehrt wird einem morphologisch stark entdifferenzierten Gewebe, das dem ursprünglichen Gewebe nur noch marginal oder gar nicht mehr ähnelt, ein hoher Malignitätsgrad zugeordnet. Modifiziert nach Epstein *et al.* [2, 54].

Neben der Einstufung des Malignitätsgrades des Resektats gemäß dem Gleason-Graduierungssystem wird in der Routinediagnostik die TNM-Klassifikation zur Bestimmung der anatomischen Tumorausdehnung maligner Tumoren eingesetzt. Dies beinhaltet die Beurteilung der Größe und Ausbreitung des Primärtumors (T), das Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen (N) und die Anwesenheit von Fernmetastasen (M) (Tabelle 1-1).

Tabelle 1-1 TNM-Klassifikation des PCas [56, 57].

Kriterien	Definition
T	Ausbreitung des Primärtumors
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T2	Tumorwachstum auf Prostata begrenzt
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel und/oder Infiltration der Samenblase(n)
T4	Tumor infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblase(n)
N	Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionale Lymphknotenmetastase
N1	Regionale Lymphknotenmetastase
M	Anwesenheit von Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

In diesem Kontext hat sich die perineurale Invasion (Pn) ebenfalls als diagnostisches Kriterium für ein PCa etabliert (Pn0: keine perineurale Infiltration, Pn1: perineurale Infiltration), die als Tumorzellinvasion in, um und durch die drei Schichten der Nervenbündel definiert ist [58, 59]. Die Perineuralscheideninfiltration ist ebenso wie eine lymphatische (L) oder vaskuläre (V) Invasion ein Hinweis für eine bevorstehende Metastasierung und somit ein Mechanismus der Tumorprogression [60]. Allerdings ist diese auch ein Prädiktor für ein lokales Rezidiv [61]. Basierend auf dem ISUP 2014/WHO 2016 Graduierungssystem, der TNM-Klassifikation und dem PSA-Wert erfolgt daraufhin die prognostische Evaluation und Festlegung des PCa-Stadiums durch den behandelnden Urologen in ein mehrstufiges System (z. B. dreistufig nach D'Amico *et al.* [62, 63]), auf dessen Grundlage die Risikostratifizierung geeigneter Therapiemaßnahmen eingeleitet werden kann. Allerdings erschwert die große morphologische und molekulargenetische Heterogenität des PCas eine zuverlässige Prognose des Krankheitsverlaufs und Therapieansprechens. Daher ist die Identifizierung neuer prognostischer und prädiktiver Biomarker von entscheidender Bedeutung [64, 65].

1.1.4.3 Behandlung und Therapieresistenzen des PCas

Für das PCa gibt es zahlreiche Behandlungsmöglichkeiten, wobei die Therapieentscheidung von Tumorstadium und -grad abhängig ist. Patienten mit der Diagnose eines risikoarmen PCas werden zunächst aktiv überwacht, um den Krankheitsverlauf abzuwarten und eine Überbehandlung zu vermeiden [50]. Ein weiteres konservatives Behandlungskonzept ist das *watchful waiting*, das bei Patienten mit einer geringen Lebenserwartung von weniger als 10 Jahren angewandt wird, da die Risiken der Therapie den tatsächlichen Nutzen meist übersteigen [50]. Die radikale Prostatektomie und die perkutane Strahlentherapie sind, die am häufigsten angewandten Therapieformen des lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen PCas [50, 66]. Als zusätzliche Option vor (neoadjuvant) oder als ergänzende Therapie nach einer Prostatektomie (adjuvant) wird meist die ADT eingesetzt. Bei der ADT wird die Androgenabhängigkeit des PCas ausgenutzt, um dessen Wachstum zu unterdrücken, indem der Androgenspiegel durch chirurgische (bilaterale Orchiektomie) oder medikamentöse Kastration (LHRH-Analogen oder GnRH-Blocker) gezielt gesenkt wird oder die Funktion des ARs mittels Antiandrogenen blockiert wird [67-69].

Nach anfänglichem Ansprechen auf die ADT kommt es jedoch häufig nach längerer Remission zum Wiederauftreten einer aggressiveren Form des PCas (CRPC oder mCRPC). Bei Patienten mit einem mCRPC wird die ADT zunächst mit dem zytotoxischen Chemotherapeutikum Docetaxel (DTX) und/oder neuen Hormonpräparaten kombiniert [69]. Trotz verlängerter Überlebenszeit der Patienten durch das DTX, werden fast alle Patienten aufgrund der Resistenzentwicklung gegenüber DTX refraktär [70, 71]. Als neue Hormonpräparate kommen in diesem Zusammenhang der AR-Inhibitor Enzalutamid (MDV3100) oder der selektive CYP17 (Cytochrom P450 17) -Inhibitor Abirateron zum Einsatz [34, 69, 72]. Durch die Inhibition von CYP17 wird das Schlüsselenzym der Androgensynthese durch Abirateron gehemmt und damit die Produktion von Testosteron und DHT in den Nebennieren, Testikeln und die *de novo* intratumorale Androgensynthese im Prostatagewebe blockiert (Abbildung 1-4) [73]. Im Gegensatz dazu bindet Enzalutamid mit einer 5- bis 8-fach höheren Affinität an die LBD des ARs als bisher verwendete AR-Inhibitoren wie z. B. Bicalutamid [74]. Dadurch verhindert Enzalutamid kompetitiv die Bindung von Testosteron oder DHT, den nukleären Transport des AR, die Bindung an die hormonempfindlichen Bereiche der DNA und die Rekrutierung von Koaktivatoren (Abbildung 1-4) [72, 74]

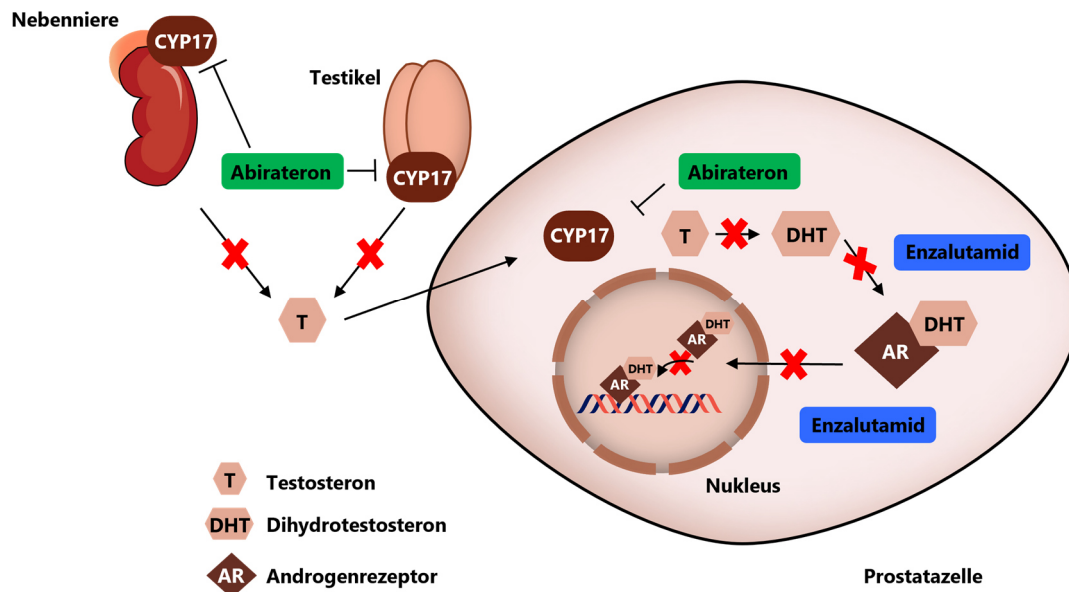


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der Androgen-Signalkaskade und der Wirkmechanismen von Enzalutamid (AR-Inhibitor) und Abirateron (CYP17-Inhibitor). Testosteron, das in Testikeln und Nebennieren produziert wird, wird durch die 5 α -Reduktase in seine aktive Form, das DHT, umgewandelt. Daraufhin binden in der Regel die Androgene an den AR, woraufhin die Translokation des ARs in den Zellkern erfolgt. Dort interagiert der AR mit den *Androgen response elements* (ARE) der DNA von AR-abhängigen Zielgenen und aktiviert deren Transkription. Abirateron hemmt die Androgensynthese durch die Inhibition des Enzyms CYP17, das im Gewebe der Testikel, der Nebennieren und der Prostata exprimiert wird. Der AR-Inhibitor Enzalutamid verhindert irreversibel die Bindung von Testosteron oder DHT an den AR, den nukleären Transport sowie die Bindung an die AREs. Modifiziert nach Conteducta *et al.* [75, 76].

Bei Patienten mit einem mCRPC wird die zielgerichtete Therapie mit Poly-ADP-Ribose-Polymerasen-(PARP) -Inhibitoren ebenfalls häufig eingesetzt. PARP ist ein multifunktionales Enzym, das an mehreren biologischen Prozessen beteiligt ist und eine wesentliche Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden und der genomischen Stabilität spielt [77]. Entscheidend für die Anwendung von PARP-Inhibitoren ist das Auftreten von klinisch relevanten somatischen Mutationen in DDR-assoziierten Genen, insbesondere von *BRCA2*, die bei mCRPC-Patienten häufig vorkommen und meist mit einer dysfunktionalen homologen Rekombinationsreparatur (HR) einhergehen [32, 78, 79]. Der PARP-Inhibitor Olaparib wurde bereits für die klinische Anwendung beim mCRPC zugelassen. Dieser unterdrückt die PARP1-vermittelte Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen und verursacht Replikationsschäden in den Zellen, die wiederum durch eine intakte HR-Reparatur beseitigt werden können. Tumorzellen, die BRCA1- oder BRCA2-Defekte aufweisen, können diese Schäden jedoch nicht mehr fehlerfrei beheben, was zur Induktion des Zelltods führt [80, 81]. PARP-Inhibitoren wirken somit bei BRCA-mutierten Tumoren nach dem Prinzip der synthetischen Letalität [82]. Obwohl der klinische Einsatz von PARP-Inhibitoren in Kombination mit Standardtherapien beim PCa einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellt, treten in den meisten Fällen Rezidive aufgrund erworbener Resistenzen auf [77].

1.2 Cyclin K-CDK12/CDK13-Komplexe

1.2.1 Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen

Die Proteinfamilie der Cycline wurde erstmals 1983 in den Eiern wirbelloser Meerestiere identifiziert [83]. Sie wurden ursprünglich nach ihrer Eigenschaft benannt, dass sich ihre Proteinkonzentrationen zellzyklusabhängig während und nach jedem Zellzyklus verändern [84]. Allerdings unterliegen nicht alle Cycline diesen Proteinschwankungen, sondern können auch durch andere Protein-Protein-Interaktionen oder Mechanismen reguliert werden. Die Mehrzahl der Cycline besitzt zwei charakteristische Cyclin-Boxen: Eine N-terminale Box für die Komplexbildung und Aktivierung von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und eine C-terminale Box, die für die korrekte Faltung der Cycline erforderlich ist [85]. Die Zusammensetzung der Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums der Box-Domänen vermittelt die jeweilige Substratspezifität [86].

CDKs sind Serin/Threonin-Kinasen, die abhängig von ihrer zugehörigen regulatorischen Untereinheit (Cyclin) die Kontrolle des Zellzyklus oder der Transkription steuern können. Die Cyclin-abhängige Aktivierung der CDKs verläuft dabei wie folgt: In der Cyclin-freien monomeren Form ist der katalytische Spalt der CDK durch die Aktivierungsschleife (*T-loop*) verschlossen, wodurch die enzymatische Aktivität verhindert wird. Nach der Bindung des Cyclins kommt es zur Konformationsänderung innerhalb des katalytischen Spalts, wodurch das Threonin innerhalb des *T-loops* durch CDK7, die als CDK-aktivierende Kinase (CAK) agiert, phosphoryliert werden kann, was zur Aktivierung der Kinase führt [85].

Derzeit sind ca. 30 Cycline und 20 CDKs im Menschen identifiziert worden, denen jeweils unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden [83]. Die kanonischen Cycline A, B, D und E mit ihren assoziierten Kinasen (CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6) gehören zu den klassischen Zellzyklus-Regulatoren, die den Eintritt der Zelle in die einzelnen Zellzyklusphasen steuern. Die nicht-kanonischen Cycline C, H, K, L, Q und T mit ihren zugehörigen Kinasen (CDK7, CDK8, CDK9, CDK11, CDK12, CDK13 und CDK19) regulieren durch die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (RNAP II) sowie anderer Transkriptionsfaktoren den koordinierten Übergang zwischen den einzelnen Phasen der Transkription [83, 85]. Neben diesen beiden Cyclin-Subgruppen wurden zusätzlich die atypischen Cycline (Cyclin G1, G2, I, O, P und Y) sowie Cyclin F identifiziert. Diese weisen im Vergleich zu den kanonischen und nicht-kanonischen Cyclinen Abweichungen in der Aminosäuresequenz innerhalb ihrer einzigen Cyclin-Box-Domäne auf. Es ist jedoch noch unklar, ob und mit welchen CDKs sie interagieren und welche Funktionen charakteristisch sind [83, 87, 88]. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass sie an der Regulation des Metabolismus, der Spermatogenese, der Selbsterneuerung und der Differenzierung von Stammzellen sowie an epigenetischen Mechanismen beteiligt sind [88]. Das Cyclin F hingegen wird aufgrund einer zusätzlichen F-Box-Domäne auch der F-Box-Proteinfamilie zugeordnet. Es interagiert nicht mit CDKs, sondern rekrutiert Substrate für die Ubiquitinierung an den

SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplex, wodurch Cyclin F an der Kontrolle der proteolytischen Degradation von Zellzyklusproteinen involviert ist [83, 87-89].

Zahlreiche genetische und epigenetische Ereignisse in malignen Zellen führen zur Dysregulation von Cyclin-CDK-Komplexen, was unter anderem eine unkontrollierte Zellproliferation zur Folge hat und zur Karzinogenese beiträgt. Cycline mit ihren zugehörigen CDKs stellen daher vielversprechende Angriffspunkte für neue zielgerichtete Therapien dar, da ihre pharmakologische Hemmung sowohl den Zellzyklus beeinträchtigen als auch den Zelltod induzieren kann. Darüber hinaus könnte die Bestimmung ihres Aktivitätsniveaus genutzt werden, um den Krankheitsverlauf oder das Therapieansprechen der Patienten zu prognostizieren [90]. Angesichts der kritischen Rolle bei malignen Erkrankungen stehen zielgerichtete Therapien der Cyclin-CDK-Komplexe schon seit längerer Zeit im Mittelpunkt der onkologischen Forschung [91, 92]. Die *Food and Drug Administration* (FDA) hat bereits einige CDK4/CDK6-Inhibitoren für die Behandlung aggressiver Varianten des Mammakarzinoms zugelassen [93]. Zusätzlich werden derzeit weitere spezifische CDK-Inhibitoren, z. B. gegen CDK2, CDK7 und CDK9, in klinischen Studien untersucht [92, 94].

1.2.2 Struktureller Aufbau und Funktion der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe

Das transkriptionsassoziierte Cyclin K (CycK) wurde erstmals 1998 von Edwards *et al.* beschrieben [95]. Das humane Protein CycK wurde zunächst als ein 40 kDa und 357 Aminosäuren (AS) großes Protein identifiziert, das einerseits als Bindepartner der RNAP II charakterisiert und später zusammen mit Cyclin T1 und Cyclin T2 als Bindepartner von CDK9 assoziiert wurde [95, 96]. In neueren Studien wurde jedoch eine weitere CycK-Isoform entdeckt, die ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa aufweist, aus 580 AS besteht und als regulatorische Untereinheit von CDK12 und CDK13, aber nicht von CDK9 fungiert. Die Kinasen CDK12 und CDK13 assoziieren jeweils mit CycK zu zwei separaten Komplexen [97-101]. Das CycK-Gen *CCNK* ist auf Chromosom 14p32.2 lokalisiert, während sich die codierende Region für CDK12 und CDK13 auf Chromosom 17q12 bzw. 7p14.1 befindet [100, 102, 103]. Neuere Studien konnten die Existenz der ursprünglich entdeckten CycK-Isoform (40 kDa) nicht mehr nachweisen, sondern identifizierten die 70 kDa Isoform als vorherrschendes CycK-Protein [97, 100, 104]. Das CycK-Protein (70 kDa) besitzt zwei aufeinanderfolgende N-terminale Cyclin-Box-Domänen und eine C-terminale prolinreiche Domäne (Abbildung 1-5), die von anderen Proteindomänen (z. B. SH3 und WW) erkannt wird und die Regulation intrazellulärer Signalwege vermitteln kann [97, 98, 100, 105].

CDK12 und CDK13 haben im Vergleich zu anderen CDKs ein relativ großes Molekulargewicht von 164 kDa (1490 AS) bzw. 165 kDa (1512 AS) und weisen eine 43 %ige Sequenzhomologie sowie eine hohe Sequenzidentität von 93 % der AS zwischen ihren Kinase-Domänen auf. Im Gegensatz zu anderen transkriptionsassoziierten CDKs besitzen sie mehrere funktionelle Regionen, wie eine erweiterte N-terminale Domäne mit zusätzlichen arginin-/serinreichen (RS) Motiven und prolinreiche Motive innerhalb der CTD [97, 98, 101]. RS-Motive können als Andockstellen für

Proteine der SR-Familie fungieren, die an der Prozessierung von RNA und prä-mRNA beteiligt sind [106]. Beide Kinasen weisen eine C-terminale Verlängerung ihrer Kinase-Domäne auf. Diese Verlängerung ist charakteristisch für transkriptionsassoziierte CDKs und kann sowohl mit der Kinase-Domäne als auch mit gebundenem ATP interagieren. Für die katalytische Aktivität der Kinase ist sie daher essenziell [98]. Zusätzlich enthält CDK13 eine C-terminale serinreiche Domäne und zwei alaninreiche Domänen, die in CDK12 nicht vorkommen (Abbildung 1-5) [99, 101].

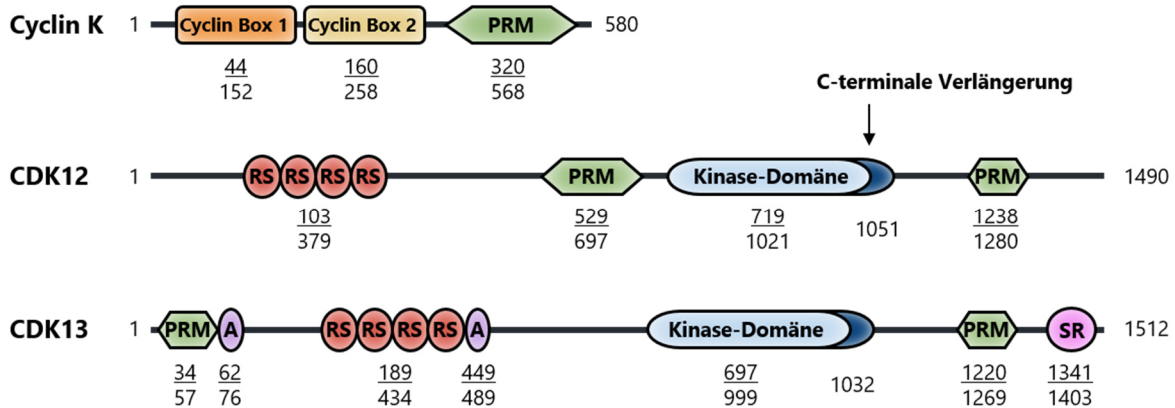


Abbildung 1-5 Schematische Darstellung der Domänenzusammensetzung der humanen CycK, CDK12 und CDK13 Proteine. Die prolinreichen (PRM), alaninreichen (A), arginin-/serinreichen (RS) und serinreichen (SR) Domänen sind entsprechend gekennzeichnet. Die Zahlen unterhalb der jeweiligen Domäne geben die Aminosäurepositionen an. Modifiziert nach Pilarova *et al.* [107].

Sowohl CycK als auch CDK12 und CDK13 werden im humanen Gewebe ubiquitär exprimiert und spielen darüber hinaus eine essenzielle Rolle in der murinen Embryonalentwicklung [95, 102, 103]. Dabei führt die genetische Inaktivierung von CycK, CDK12 oder CDK13 bei Mäusen zur embryonalen Letalität [97, 108, 109]. Außerdem werden der CycK-CDK12- und der CycK-CDK13-Komplex auch in embryonalen murinen Stammzellen (ESC) stark exprimiert und spielen dort eine essenzielle Rolle für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung dieser ESCs [104, 108].

Neben ihrer Bedeutung für die Entwicklung nehmen die beiden Komplexe aus CycK mit CDK12 bzw. CDK13 eine Schlüsselfunktion bei der Transkription ein, indem sie die Phosphorylierung der CTD der RNAP II regulieren [97, 99, 100]. Die CTD besteht aus 52 Tandem-Wiederholungen eines Heptapeptids (Konsensus-Sequenz Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇), die neben der Phosphorylierung auch weiteren kovalenten Modifikationen (z. B. Methylierungen) ausgesetzt ist. Diese Modifikationen erzeugen unterschiedliche Phosphorylierungsmuster, die für eine effiziente und fehlerfreie Transkription entscheidend sind [110]. Die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe können primär die Aminosäure Serin an Position 2 (Ser2) phosphorylieren und damit direkt die Transkriptionsinitiation, -Elongation und die Prozessivität der RNAP II beeinflussen. Zusätzlich können CDK13 und CDK12 auch Ser5 phosphorylieren, während Ser7 nur in geringem Maße von CDK12 phosphoryliert wird [97, 98, 101, 111, 112]. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die Beeinflussung (z. B. Inaktivierung,

Suppression oder Hemmung) des jeweiligen CycK-CDK12- oder CycK-CDK13-Komplexes zu verminderten Expressionsniveaus bestimmter Gen-Subgruppen führt [97, 101, 111, 113]. Der CycK-CDK12-Komplex kontrolliert dabei in erster Linie die Expression langer Gene, die viele Exons und intronische Polyadenylierungsstellen besitzen. Dazu gehören Gene, die Proteine codieren, die an der DDR, DNA-Reparatur, DNA-Replikation, RNA-Prozessierung sowie dem Spleißen beteiligt sind. Besonders hervorzuheben sind hierbei DNA-Reparaturproteine wie BRCA1, ATR, FANCI und FANCD2, die essenziell für die HR-Reparatur sind und CycK-CDK12-abhängig reguliert werden [97, 111, 113-116]. Durch die Regulation der Transkription von DDR-Genen spielt der CycK-CDK12-Komplex eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität [97]. Im Gegensatz dazu sind die Gene, die durch den CycK-CDK13-Komplex reguliert werden, vermehrt an posttranskriptionalen Modifikationen der rRNA oder an verschiedenen extrazellulären und wachstumsfördernden Signalwegen beteiligt [97, 111, 114].

Die Lokalisation der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe in den sogenannten nuklearen „*Speckles*“ und das Vorhandensein mehrerer RS-Motive in der N-terminalen Kinase-Domäne weisen zudem auf eine Beteiligung an der RNA-Prozessierung hin. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass CDK12 mit verschiedenen RNA-Prozessierungsfaktoren wie z. B. Spleißfaktoren (SF3B1), interagieren kann [102, 111, 116-118]. Diese Interaktion wird durch die RS-Motive von CDK12 vermittelt [119]. Darüber hinaus ist CDK12 am alternativen Spleißen des letzten Exons von Genen mit langen Transkripten beteiligt und vermittelt indirekt die Rekrutierung bestimmter Faktoren für die Polyadenylierung der prä-mRNA [114-116]. CDK13 ist ebenfalls in der Lage, das konstitutive und alternative Spleißen über die RS-Domäne zu beeinflussen und spielt zusätzlich eine besondere Rolle beim prä-mRNA-Spleißen viraler mRNA [117, 120].

In der Literatur wurde den CycK-CDK12/CDK13-Komplexen ebenfalls eine regulatorische Funktion bei der Translation zugeordnet. Der CycK-CDK12-Komplex phosphoryliert zusammen mit mTORC1 das 4E-BP1 und fördert dadurch die Translation von mTORC1-abhängigen mRNAs. Diese mTORC1-abhängigen mRNAs codieren unter anderem Untereinheiten von mitotischen und Zentromer-Komplexen, die für den regulären Ablauf der Mitose erforderlich sind [121]. Der CycK-CDK13-Komplex ist zudem durch eine direkte Phosphorylierung von 4E-BP1 und eIF4E an der Translation von MYC beteiligt [122].

1.2.3 Wirkmechanismus des CDK12/CDK13-Inhibitors THZ531

Während die Funktionen der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe lange Zeit hauptsächlich durch genetische Inaktivierung oder Suppression der Proteinexpression untersucht wurden und sich die Analysen daher lediglich auf die Auswirkung einer Abschaltung oder Verminderung des Proteins beschränkten, blieb die spezifische Rolle der Kinaseaktivität bei der Regulation zellulärer Prozesse größtenteils unklar. Durch die Entwicklung eines spezifischen CDK12/CDK13-Inhibitors ist es gelungen, die funktionelle Aktivität der Kinasen aufzuklären und gleichzeitig das therapeutische Potenzial der Komplexe zu beleuchten [113]. Basierend auf der Proteinzusammensetzung und -struktur der CycK-CDK12- bzw. CycK-CDK13-Komplexe [98, 101] entwickelten Zhang *et al.* den ersten spezifischen CDK12/CDK13-Inhibitor THZ531 [113]. THZ531 bindet selektiv und kovalent an ein Cystein-Molekül von CDK12 (Cys-1039) und CDK13 (Cys-1017), das sich an der C-terminalen Verlängerung der Kinase-Domäne befindet, die die ATP-Bindungsstelle kreuzt. Dadurch wird die Enzymaktivität der beiden CDKs irreversibel gehemmt, ohne die Komplexbildung mit CycK zu beeinträchtigen (Abbildung 1-6) [113].

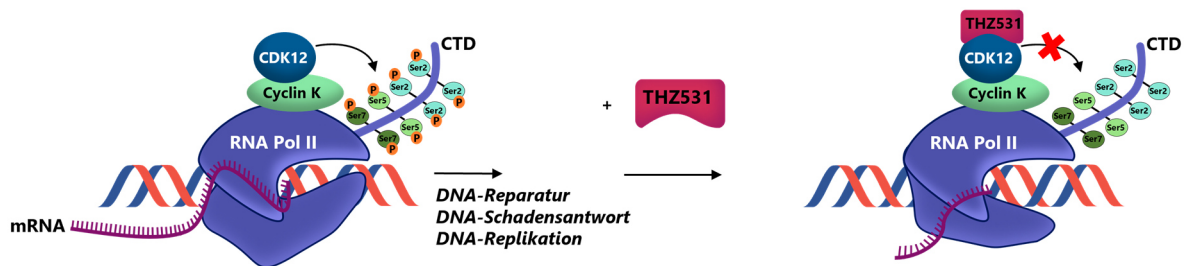


Abbildung 1-6 Schematische Darstellung des Wirkmechanismus des CDK12/CDK13-Inhibitors THZ531. THZ531 bindet selektiv und kovalent an CDK12 und hemmt dessen Kinaseaktivität, sodass die Aminosäuren Ser2, Ser5 und Ser7 innerhalb der CTD der RNA-Polymerase II (RNA Pol II) nicht mehr phosphoryliert werden. Dadurch wird der Elongationsprozess und die Prozessivität der RNA Pol II beeinträchtigt, was hauptsächlich die Expression von Genen negativ beeinflusst, die für die DDR, DNA-Reparatur und DNA-Replikation essenziell sind. Modifiziert nach Blazek *et al.* [75, 123].

Die funktionellen Auswirkungen der pharmakologischen Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe mittels THZ531 wurden an verschiedenen Tumorzelllinien, wie beispielsweise Jurkat-, Neuroblastom-, Ewing-Sarkom- und multiplen Myelomzelllinien, untersucht [113, 114, 124, 125]. Dabei wurde festgestellt, dass die Behandlung mit THZ531 zu einer dosisabhängigen Verminderung der Elongation von der RNAP II sowie dessen CTD-Phosphorylierung von Ser2 in der Nähe der 3'-Enden bestimmter Gene führt [113]. Darüber hinaus konnten THZ531-bedingte Elongationsdefekte beobachtet werden, die von der Genlänge abhängig sind. Besonders davon betroffen sind prä-mRNAs langer Gene (>45 kb) mit vielen intronischen Polyadenylierungsstellen. In Abwesenheit oder Hemmung der CycK-CDK12-Aktivität werden diese intronischen Polyadenylierungsstellen anstatt der kanonischen Stellen bevorzugt genutzt, was eine frühzeitige Termination und somit verkürzte Transkripte verursacht, die mit einem Expressionsverlust einhergehen [107, 114, 115].

Gleichzeitig zeigen diese Studien, dass die Abnahme der CTD-Phosphorylierung und die beobachteten Elongationsdefekte mit einer dosisabhängigen Reduktion der Expression bestimmter Gen-Subgruppen nach der THZ531-Behandlung einhergehen [113, 114, 124, 125]. Gene, die an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt sind, reagieren besonders empfindlich auf eine niedrige Dosis von THZ531 (50 nM) und zeigen eine stark verminderte Expression [113, 114, 124]. Bei höheren THZ531-Konzentrationen (> 200 nM) waren hingegen hauptsächlich Gene negativ reguliert, die zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren gehören und mit Super-Enhancern assoziieren. Globale Transkriptionsdefekte wurden jedoch nicht festgestellt [113]. Zusätzlich zur Beeinträchtigung der Transkription induziert die Behandlung mit THZ531 *in vitro* erhebliche anti-proliferative und apoptotische Effekte [113, 114, 124, 126]. Angesichts dieser Beobachtungen stellt THZ531 ein innovatives und effektives Werkzeug zur Untersuchung der CycK-CDK12/CDK13-abhängigen zellulären Prozesse dar. Die erhöhte Sensitivität von Tumorzelllinien gegenüber THZ531 eröffnet zudem neue, vielversprechende und zielgerichtete Therapiemöglichkeiten für maligne Erkrankungen, bei denen die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als potenzielle Angriffsziele genutzt werden können.

1.2.4 Expression und Funktion der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe in malignen Erkrankungen

Auch wenn CycK, CDK12 und CDK13 ubiquitär im humanen Gewebe exprimiert werden, unterscheidet sich das Expressionsniveau des CycK-CDK12-Komplexes je nach Gewebetyp. So ist die Expression des CycK-CDK12-Komplexes in Testikeln, insbesondere in den spermatogonialen Stammzellen, am höchsten [127, 128]. Folglich kann eine Störung der Homöostase der CycK-CDK12-Expression zu unterschiedlichen pathologischen Zuständen führen [94]. Aberrante Expressionsmuster oder Dysfunktionen des CycK-CDK12-Komplexes wurden bereits in zahlreichen *in vitro*-Studien sowie in Patientenproben nachgewiesen und eindeutig mit der Tumorprogression assoziiert. In diesem Zusammenhang zeigen Xiang *et al.*, dass CycK in Keimzelltumoren des Mannes überexprimiert wird und für die Zellproliferation dieser Entität entscheidend ist [127]. Darüber hinaus korreliert eine CycK-Überexpression in Mamma-, Lungen- und Prostatakarzinomen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium [75, 129-131]. In ähnlicher Weise deutet eine erhöhte CDK12-Expression bei Patienten mit Mamma- oder Magenkarzinom auf einen malignen Phänotyp sowie einen schlechteren Verlauf der Erkrankung hin [116, 132, 133].

Im Gegensatz zu CycK werden genomische Veränderungen des *CDK12*-Gens, wie *loss-of-function*-Mutationen oder Amplifikationen, häufig bei verschiedenen Tumorentitäten wie z. B. Ovarial-, Mamma- und Prostatakarzinomen beobachtet. Diese Veränderungen manifestieren sich hauptsächlich in der Kinase-Domäne und haben einen wesentlichen Einfluss auf deren Aktivität [134-136].

Aufgrund der regulativen Rolle des CycK-CDK12-Komplexes bei der Transkription von Genen, die an essenziellen zellulären Prozessen wie der DDR, DNA-Reparatur, DNA-Replikation und mRNA-Prozessierung beteiligt sind, hat ein Funktionsverlust des Komplexes erhebliche Auswirkungen auf die Zelle [97, 99, 137]. Tumorentitäten mit CDK12-*loss-of-function*-Mutationen sind im Wesentlichen durch zwei unterschiedliche genomische Charakteristika gekennzeichnet. Zum einen werden Defekte in der HR-Reparatur beobachtet, die mit einer reduzierten Expression von DDR-Genen einhergehen [134, 136, 138]. Zum anderen zeigen diese Tumore einen weiteren speziellen Phänotyp genomischer Instabilität, der auf einen erhöhten Chromatingehalt durch fokale Tandemduplikationen zurückzuführen ist [139-141]. Eine Mutation oder Dysfunktion des CycK-CDK12-Komplexes hat somit einen direkten Einfluss auf die Zunahme genomischer Instabilität, die als klassisches „*Hallmark*“ von malignen Erkrankungen beschrieben ist und zur malignen Transformation oder Progression beitragen kann [142]. Umgekehrt kann eine gesteigerte Aktivität infolge einer Überexpression von CycK oder CDK12 die Genomstabilität durch eine effiziente Genexpression erhöhen und neoplastischen Zellen dadurch einen Wachstums- und Überlebensvorteil verschaffen [143, 144]. Verschiedene Beobachtungen in der Literatur führen daher zu der Annahme, dass der CycK-CDK12-Komplex sowohl die Rolle eines Tumorsuppressors einnehmen kann als auch an mehreren onkogenen Signalwegen beteiligt ist [143, 145, 146].

Die tumorsuppressive Funktion des CycK-CDK12-Komplexes ist eng mit seiner Fähigkeit verknüpft, die Genomstabilität durch die Regulation der Expression von DDR- und DNA-Reparaturgenen aufrechtzuerhalten. Eine Beeinträchtigung des Komplexes führt daher zum Verlust seiner Enzymaktivität und seiner tumorsuppressiven Eigenschaften, was eine Abnahme der DDR-Genexpression in verschiedenen Tumorzelllinien verursacht. Dies führt zu Defekten in der HR-Reparatur und folglich zur Akkumulation von DNA-Schäden, was die genomische Instabilität begünstigt [97, 113-115, 134]. Außerdem weisen Tumorzellen nach CycK- oder CDK12-Suppression schwere mitotische Defekte wie z. B. chromosomale Fehlanordnungen oder eine mitotische Katastrophe auf, die die genomische Instabilität verstärken [121, 131].

Ferner wird in der Literatur eine potenzielle onkogene Aktivität des CycK-CDK12-Komplexes beschrieben, die ebenfalls auf dessen Rolle als Transkriptionsregulator zurückzuführen ist. Insbesondere schnell proliferierende Tumorzellen, die durch onkogene Transkriptionsfaktoren wie MYC, AR und Ewing-Sarkom-Fusionsproteine (EWS/FLI) angetrieben werden, sind von einer hohen Effizienz der Transkriptionsmaschinerie abhängig, um die damit verbundenen erhöhten Transkriptionsraten sowie eine schnelle und fehlerfreie Replikation zu ermöglichen [124, 144, 145, 147]. Dieser Zustand, in dem neoplastische Zellen eine hohe Abhängigkeit von dysregulierten Transkriptionsprogrammen aufweisen, wird auch als Transkriptionssucht bezeichnet [91]. Demnach kann eine vermehrte CycK-CDK12-Aktivität die Expression essenzieller DDR-Gene hochregulieren und damit die Fitness von Krebszellen verbessern [144, 145].

Verglichen mit CDK12 werden Mutationen von CDK13 seltener mit malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Eine CDK13-bedingte Erkrankung führt häufig bei den Betroffenen zu kongenitalen Herzfehlern, Gesichtsdysmorphien und geistigen Entwicklungsstörungen [148, 149]. Allerdings zeigen jüngste Studien, dass die CycK-CDK13-Komplexe möglicherweise auch eine spezifische Funktion bei malignen Erkrankungen einnehmen können. In diesem Zusammenhang weisen Wu *et al.* darauf hin, dass der CycK-CDK13-Komplex eine onkogene Rolle bei der Tumorentstehung spielen könnte, da die Translation von MYC einer CDK13-abhängigen Regulation unterliegt [122]. Zusätzlich wurde eine tumorsuppressive Funktion von CDK13 im Melanom beschrieben. CDK13 ist dabei entscheidend für die Rekrutierung der RNA-Abbaumaschinerie, welche für den Abbau verkürzter oder instabiler nukleärer RNAs verantwortlich ist. Bei einer CDK13-Mutation kommt es zur Akkumulation dieser verkürzten Transkripte, die in trunke Proteine translatiert werden und zur Karzinogenese beitragen [150]. Diese Erkenntnisse deuten daher auf eine mögliche therapeutische Anwendung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als Biomarker oder potenzielle Zielstrukturen für neue zielgerichtete Therapien zur Bekämpfung maligne Erkrankungen hin.

1.3 DNA-Schadensantwort

Das menschliche Genom ist permanent der Entstehung von DNA-Läsionen ausgesetzt, die auf verschiedene endogene zelluläre Prozesse (z. B. die Entstehung von Replikationsfehlern oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch Stoffwechselprozesse) und exogene Einflüsse (z. B. UV- und ionisierende Strahlung oder genotoxische Medikamente) zurückzuführen sind [151-153]. Diese Läsionen können sowohl die DNA-Replikation als auch die Transkription beeinträchtigen, was in der Folge zu Mutationen oder schweren Chromosomenaberrationen führen kann, die die Lebensfähigkeit der Zellen oder Organismen gefährden [151]. Um dem breiten Spektrum und der Häufigkeit von DNA-Schäden entgegenzuwirken und die genomische Integrität zu erhalten, haben Zellen ein komplexes System biochemischer Signalwege entwickelt, das als DNA-Schadensantwort (DDR) bezeichnet wird [152-154]. Als unmittelbare Reaktion auf den vorliegenden DNA-Schaden initiiert die DDR die Signaltransduktion, koordiniert die DNA-Reparatur (siehe Abschnitt 1.3.1) und interagiert mit Kontrollpunkten des Zellzyklus, sodass eine Reihe aufeinanderfolgender Prozesse verschiedener Proteine in Gang gesetzt wird, um den DNA-Schaden möglichst schnell und fehlerfrei zu beheben. Dazu gehören die Detektion von DNA-Schäden durch verschiedene Sensorproteine, die Rekrutierung und Akkumulation von DNA-Reparaturproteinen am Ort der Läsion, das Arretieren des Zellzyklus und die Reparatur der Schäden. Sind die zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen nicht in der Lage, die DNA-Schäden zu beheben, oder ist der Schaden zu groß, kann die Zelle den apoptotischen Zelltod einleiten oder den irreversiblen Stillstand des Zellzyklus (Seneszenz) auslösen. Dadurch verhindert die DDR die Akkumulation von DNA-Läsionen und schützt die Zellen so vor Mutationen und genomischer Instabilität [80, 151, 153, 155, 156].

Im Mittelpunkt der DDR stehen die Proteinkinasen ATM und ATR, die als initiale Komponenten über die Aktivierung der zwei DDR-Signalwege ATM-CHK2 und ATR-CHK1 das Schicksal der Zelle bestimmen (Abbildung 1-7) [151, 157]. DNA-Schadenssensoren wie der MRN-Komplex, bestehend aus den Proteinen MRE11, RAD51 und NBS1, der DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) erkennt, oder das Replikationsprotein A (RPA), das exponierte Bereiche einzelsträngiger DNA (ssDNA) identifizieren kann, rekrutieren ATM und ATR zur jeweiligen Stelle des DNA-Schadens [156, 158]. Daraufhin phosphorylieren beide Kinasen das Histon H2AX an Ser139, was als γ H2AX bezeichnet wird. Hierbei ist ATM einer der wichtigsten Mediatoren der H2AX-Phosphorylierung als Reaktion auf DSB, während ATR H2AX als Antwort auf Einzelstrangbrüche (SSB) und DNA-Replikationsstress phosphoryliert [159, 160]. Die lokale Chromatinmodifikation des γ H2AX am DSB erzeugt makroskopische Strukturen, die in der Immunfluoreszenz als sogenannte γ H2AX-Foci angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden können und somit als spezifischer Marker für DSB genutzt werden [161, 162]. Durch γ H2AX wird die Rekrutierung zusätzlicher DDR-Mediatoren und Chromatin-modifizierender Komponenten einschließlich BRCA1, MDC1 und

53BP1 initiiert, die die DDR-Signaltransduktion verstärken und die DNA-Reparatur fördern sollen [151, 156]. Anschließend aktivieren ATM und ATR die Zellzykluskontrollpunkt-Kinasen CHK2 und CHK1, die einen Zellzyklusarrest induzieren, um ausreichend Zeit für die Reparatur von DNA-Läsionen zu schaffen. Dies wird vor allem durch die Signalübertragung auf nachgeschaltete Effektormoleküle wie p53 und p21 bzw. Cdc25 und Wee1 erreicht [156, 163, 164]. Abhängig vom Ausmaß des Schadens führt die Aktivierung von CHK1 oder CHK2 zur Induktion des apoptotischen Zelltods, einem transienten Zellzyklusarrest mit anschließender DNA-Reparatur und Wiederaufnahme der Proliferation oder zu einem endgültigen Zellzyklusarrest aufgrund des irreparablen DNA-Schadens [156].

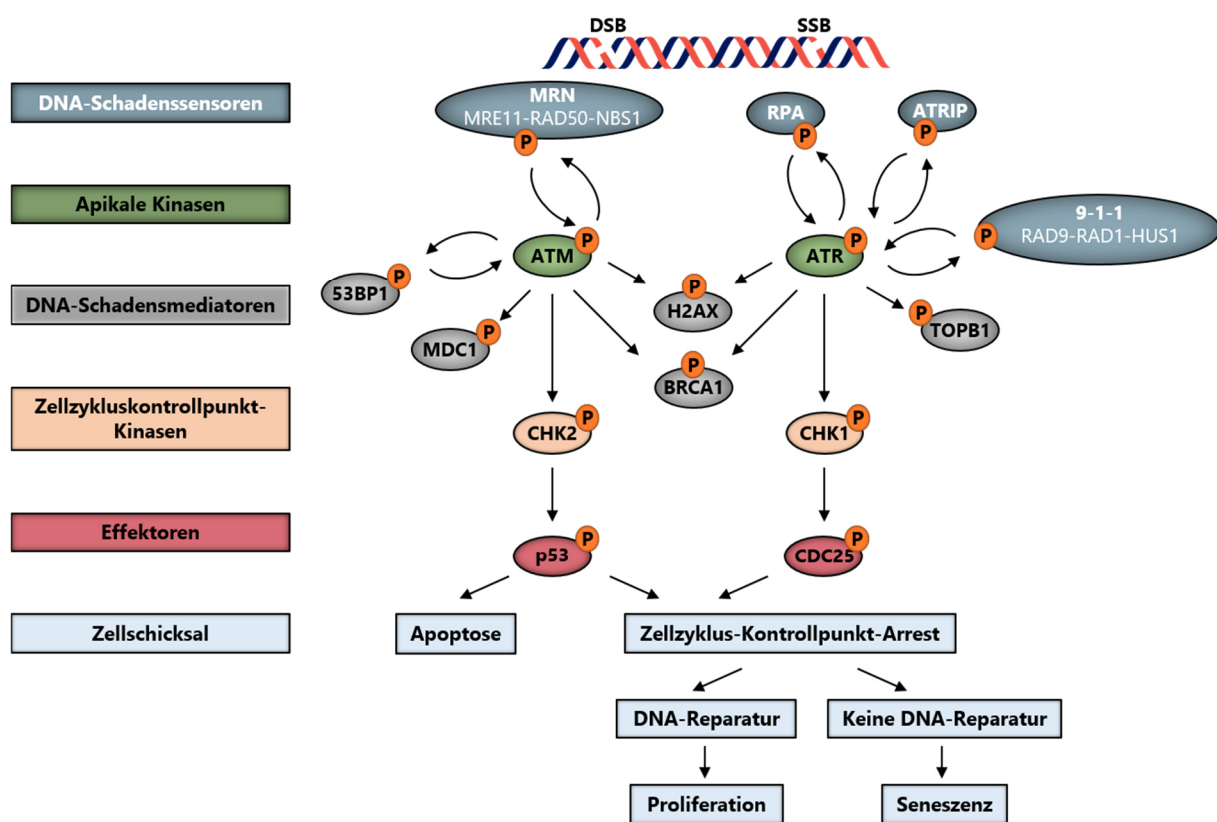


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung der DDR. Die DNA-Schadenssensoren lokalisieren den DNA-DSB (MRN) oder exponierte Bereiche einzelsträngiger DNA (RPA) und rekrutieren die apikalen Kinasen ATM bzw. ATR. Die beiden Kinasen aktivieren durch Phosphorylierung (P) verschiedene DNA-Schadensmediatoren (H2AX, BRCA1) sowie die Zellzykluskontrollpunkt-Kinasen CHK2 bzw. CHK1. Das Zellschicksal wird dann über die jeweiligen Effektoren bestimmt. Modifiziert nach Sulli *et al.* [156].

1.3.1 DNA-Reparaturmechanismen

Die zahlreichen endogenen und exogenen Faktoren sowie DNA-schädigende Agenzien verursachen verschiedene Arten von DNA-Läsionen, die kontinuierlich repariert werden müssen. Abhängig von der Art der Schäden werden spezialisierte und komplexe DNA-Reparaturmechanismen aktiviert, um die Läsion zu beheben [164, 165]. Im Folgenden werden die häufigsten DNA-Schäden sowie die entsprechenden Reparaturwege in einer kurzen Übersicht dargestellt: Fehlgepaarte Basen, Insertions- oder Deletionsschleifen, die während der Replikation entstehen oder durch ROS verursacht werden, werden von der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) entfernt [166, 167]. Die meisten kleinen Basenmodifikationen wie z. B. eingebaute Uracil-Basen, N-Alkylierungen der Purine oder SSB, die infolge einer Alkylierung, Desaminierung, Oxidation oder ionisierender Strahlung erzeugt werden, können durch die Basenexzisionsreparatur (BER) eliminiert werden [167, 168]. Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behebt hauptsächlich UV-induzierte Schäden, die eine Deformation der DNA-Helix (*bulky lesions*) verursachen, wie z. B. Thymin-dimere. Geschädigte DNA-Bereiche werden ausgeschnitten und der fehlende Abschnitt durch den Replikationsapparat neu synthetisiert [167, 169].

Findet die Reparatur von SSB durch die genannten Mechanismen nicht rechtzeitig statt, entweder aufgrund einer sehr hohen Frequenz der DNA-SSB, z. B. nach einer Genotoxin-Exposition, oder wegen eines Defekts dieser Reparaturmechanismen, kann es beispielsweise während der DNA-Replikation zur Entstehung von DNA-DSB kommen. Trifft eine replizierende Polymerase hierbei auf einen DNA-SSB, *bulky lesions* oder andere ungewöhnliche DNA-Sekundärstrukturen im Templatestrang, kann dies zum Kollaps der DNA-Replikationsgabel und folglich zur Bildung von DNA-DSB führen [170, 171]. DNA-DSB zählen zu den schwerwiegendsten und toxischsten DNA-Schäden, da sie Genommutationen und Chromosomenumlagerungen verursachen, was den Zelltod oder die Karzinogenese begünstigen kann. In humanen Zellen werden DNA-DSB über zwei verschiedene DNA-Reparaturwege repariert: die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) und die HR-Reparatur. Die Entscheidung, welcher Reparaturmechanismus verwendet wird, hängt von der Verfügbarkeit einer homologen DNA-Matrize ab [172-174]. Die NHEJ ist der vorherrschende Mechanismus zur Reparatur von DNA-DSB, da dieser schnell DNA-DSB entfernen kann und in allen Zellzyklusphasen agiert. Allerdings ist er sehr fehleranfällig, weil er zur Ligation der Strangenden keine Sequenzhomologien verwendet [175, 176]. Im Gegensatz zur NHEJ nutzt die HR-Reparatur einen intakten DNA-Strang mit homologen Sequenzen, um die fehlende oder geschädigte Stelle fehlerfrei zu kopieren und wiederherzustellen. Folglich operiert die HR-Reparatur hauptsächlich in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus, in denen das homologe Schwesterchromatid zur fehlenden Sequenz verfügbar ist [174, 177, 178]. Die zentralen Schritte der HR-Reparatur umfassen die Prozessierung der DNA-DSB zu einzelsträngigen 3'-Überhängen, die Bildung von RAD51-Proteinfilamenten zur Suche des homologen Schwesterchromatids sowie die Stranginvasion des resezierten einzelsträngigen DNA-Abschnitts in die intakte homologe DNA-Matrize unter

Ausbildung eines sogenannten *Displacement-Loops*. Anhand des homologen Abschnitts erfolgt daraufhin die DNA-Synthese über die Bruchstelle hinweg, sodass überkreuzte Holliday-Strukturen entstehen, die nach der Ligation des DNA-Stranges wieder aufgelöst werden. Zu weiteren Mediatorproteinen, die für den korrekten Ablauf der HR-Reparatur notwendig sind, gehören BRCA1, BRCA2 und PALB2. Vor allem BRCA2 ist essenziell, da es den Austausch von RPA am einzelsträngigen 3'-Überhang mit RAD51 vermittelt und die Bildung der Proteinfilamente fördert [172, 174, 179, 180].

Neben SSB und DSB können auch zytotoxische DNA-Läsionen wie *interstrand-DNA-crosslinks* (ICLs) auftreten, die durch Alkylierungsmittel entstehen. ICLs erzeugen kovalente Bindungen zwischen zwei Basen der komplementären DNA-Stränge und verhindern deren Trennung, die eine Voraussetzung für die Replikation und Transkription darstellt und in einer Blockade dieser zellulären Prozesse resultiert [181]. Der komplexe Mechanismus der ICL-Reparatur ist bisher noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist bekannt, dass viele DNA-Reparaturmechanismen (MMR; BER, NER und HR) und Proteine der Fanconi-Anämie-Familie daran beteiligt sind [182, 183].

1.3.2 DDR- und DNA-Reparaturmechanismen als Zielstrukturen in der klinischen Anwendung

Konventionelle Standardtherapien (z. B. Chemotherapie oder Strahlentherapie) maligner Erkrankungen zielen darauf ab, die DNA von Tumorzellen zu schädigen. Bei den entstehenden DNA-Schäden handelt es sich meist um replikationsassoziierte Schäden, die zu DNA-DSBs und damit zum Absterben maligner Zellen führen. Tumorzellen sind jedoch in der Lage, die Läsionen durch diverse Reparaturmechanismen zu beheben, wodurch die antitumorale Effektivität der Zytostatika und der ionisierenden Strahlung abnimmt. Allerdings weisen diese Zellen sehr häufig Mutationen oder epigenetische Modifikationen in Genen auf, die essenzielle Faktoren der DDR, der DNA-Reparatur oder von Zellzykluskontrollpunkten darstellen. Kommt es zu einem Verlust oder Defekt dieser Faktoren, greifen Tumorzellen auf kompensatorische DNA-Reparatur- und Überlebenssignalwege zurück, um den Schaden zu beheben [152, 184, 185]. Eine daraus resultierende vermehrte Aktivität der DNA-Reparaturmaschinerie kann folglich zur Entwicklung von Therapieresistenzen beitragen oder zum Wiederauftreten eines Tumorrezidiv führen. Obwohl Mutationen in Genen der DDR und der DNA-Reparaturmechanismen die Entstehung bestimmter Tumorarten begünstigen können, stellen diese gleichzeitig eine Vulnerabilität für Tumorzellen dar, die aus klinischer Sicht ein großes therapeutisches Potential birgt [154, 163, 172].

Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Wirksamkeit der Strahlen- und Chemotherapie zu verbessern und Therapieresistenzen zu überwinden, indem gezielt die Schwachstellen der Tumorzellen ausgenutzt und DNA-Schäden induziert werden. Da DNA-DSBs für die Zelle toxischer sind als DNA-SSBs und somit eine schnelle Reparatur erfordern, konzentrieren sich die meisten DDR-basierten Therapien auf Signal- und Reparaturwege, die mit

DNA-DSB assoziiert sind. Dabei liegt der Fokus auf der Entwicklung effektiver molekularer Wirkstoffe, die die funktionelle Aktivität von Schlüsselfaktoren der DDR oder der DNA-Reparaturmaschinerie beeinträchtigen. In Kombination mit bestehenden Therapieformen könnten diese Wirkstoffe potenziell synergistische oder synthetisch letale Effekte erzielen [186]. Die synthetische Letalität beschreibt eine Interaktion zwischen zwei Genen, bei dieser der Verlust eines bestimmten Gens toleriert wird, während der gleichzeitige Verlust eines anderen Gens für die Zelle tödlich ist. Dieses Konzept stellt daher einen vielversprechenden Ansatz für neue zielgerichtete Therapien dar, da der gezielte Angriff ausschließlich auf die mutationstragende Zelle beschränkt ist und gesundes Gewebe unbeschädigt bleibt [82, 187, 188].

PARP-Inhibitoren (z. B. Olaparib) sind in diesem Zusammenhang die am besten untersuchte Klasse sogenannter DDR-Inhibitoren, die in BRCA1/BRCA2-defizienten Tumorzellen die synthetische Letalität induzieren und so die Tumorprogression aufhalten können. Durch die Inhibition von PARP wird die Funktionalität der BER unterdrückt, sodass es zu einer Akkumulation von DNA-SSB kommt, die sich während der S-Phase in DNA-DSB umwandeln. Da BRCA1/BRCA2 unerlässlich für die HR-Reparatur ist, können BRCA1/BRCA2-defiziente Zellen die DNA-DSB nicht über diesen Reparaturweg eliminieren, sondern nutzen das fehleranfällige NHEJ, was letztendlich zum apoptotischen Zelltod führt. Bei Patienten mit Ovarial-, Mamma- oder Prostatakarzinom mit BRCA1/BRCA2-Mutationen befinden sich PARP-Inhibitoren bereits als Mono- oder Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika in der klinischen Anwendung [81, 189, 190].

Darüber hinaus konnten weitere niedermolekulare Inhibitoren entwickelt werden, die gegen essenzielle DDR-Faktoren gerichtet sind, wie z. B. ATM, ATR oder CHK1. Diese werden derzeit sowohl als Mono- als auch in Kombination mit etablierten DNA-schädigenden Therapien in klinischen Studien getestet [154]. Die zielgerichtete Hemmung von DDR-Faktoren in Kombination mit DNA-schädigenden Substanzen stellt daher eine vielversprechende Strategie dar, um die Effektivität der konventionellen Therapien zu verbessern.

Allerdings hat der Therapieerfolg von PARP-Inhibitoren bei Patienten mit BRCA1- und BRCA2-Defekten auch gezeigt, dass ihr klinischer Nutzen hauptsächlich auf der Etablierung von Biomarkern beruht, die zur Stratifizierung von Patienten verwendet wurden, die von dieser Therapie profitieren. Demnach bleibt die Identifizierung genetischer und funktioneller Biomarker, die festlegen, welche Patienten auf die Therapie ansprechen und weniger Nebenwirkungen aufweisen, eine zentrale Herausforderung auf dem Gebiet der personalisierten DDR-basierten Therapie [191]. Zudem traten bei einigen Patienten mit HR-defizienten Tumoren trotz anfänglicher klinischer Erfolge der PARP-Inhibitoren erhebliche Nebenwirkungen oder Resistenzentwicklungen auf, deren Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind [77, 192]. Diese Herausforderungen heben die Notwendigkeit für weitere Studien hervor, die neue, spezifischere Strategien zur Behandlung von DDR-assoziierten Tumoren entwickeln.

1.4 Ziele der Arbeit

Trotz anfänglicher Therapieerfolge bei Patienten mit einem PCa kommt es häufig zur Entwicklung von Rezidiven, wie dem CRPC und mCRPC, die durch Therapieresistenzen gekennzeichnet sind [6, 70, 71]. Deshalb stellt die Überwindung dieser Resistenzen gegenüber konventionellen Therapien eine zentrale Herausforderung für die Behandlung von PCa-Patienten dar. Die Entwicklung effektiver und zielgerichteter Strategien oder Kombinationstherapien ist daher dringend erforderlich. Zusätzlich ist die Evaluierung von neuen gewebebasierten Biomarkern von entscheidender Bedeutung, um die Vorhersage des Krankheitsverlaufs sowie das Ansprechen auf eine Therapie zu verbessern.

Die humanen transkriptionsassoziierten CycK-CDK12/CDK13-Komplexe spielen eine zentrale Rolle bei grundlegenden zellulären Prozessen, einschließlich der DDR und der DNA-Reparatur, und sind sowohl für die Genomstabilität als auch für das Zellwachstum und -überleben von essenzieller Bedeutung [94, 97, 107, 146]. Die gezielte Inhibition der beiden Komplexe durch den selektiven CDK12/CDK13-Inhibitor THZ531 zeigte in verschiedenen präklinischen Studien ein anti-neoplastisches Potenzial und erhöhte zudem die Wirksamkeit DNA-schädigender Therapien sowie von PARP-Inhibitoren in verschiedenen Tumorentitäten [113, 124, 193]. Allerdings sind die antitumorigenen Effekte einer CycK-CDK12/CDK13-Inhibition im PCa noch weitestgehend ungeklärt.

Als Ziel dieser Arbeit sollte daher zunächst die Eignung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als therapeutische Zielstrukturen analysiert werden. Zu diesem Zweck sollten die funktionellen Auswirkungen einer Monotherapie mit THZ531 im Hinblick auf die Proliferation und das Überleben *in vitro* und *in vivo* (Chorioallantoismembran-Modell) untersucht werden. Im Anschluss daran sollten weitere Experimente durchgeführt werden, die die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der THZ531-vermittelten Wirkung auf PCa-Zellen identifizieren.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte daraufhin überprüft werden, ob eine Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe auch als Kombinationstherapie mit Standardtherapieformen des PCas geeignet ist. In diesem Zusammenhang sollte die kombinierte Anwendung von THZ531 mit dem PARP-Inhibitor Olaparib oder den Antiandrogenen Enzalutamid und Abirateron untersucht werden. Dabei sollte festgestellt werden, inwieweit die antitumorigenen Effekte der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition die Sensitivität von PCa-Zellen oder humanem PCa-Gewebe gegenüber der jeweiligen Therapieform verstärken können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung von CycK und CDK12 als prognostische Biomarker für PCa-Patienten. Zu diesem Zweck sollten die CycK- und CDK12-Expressionen in einem Tissue Microarray, bestehend aus den Tumorgewebeproben von 300 PCa-Patienten, evaluiert und potenzielle Assoziationen mit klinisch-pathologischen Parametern analysiert werden.

2 MATERIAL

2.1 Zelllinien

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die folgenden adhärennten humanen PCa-Zelllinien verwendet:

Tabelle 2-1 Ursprung der PCa-Zelllinien.

Zelllinien	Ursprung	Quelle
DU-145	Metastase des zentralen Nervensystems, kaukasischer Mann	[194]
PC-3	Knochenmetastase, kaukasischer Mann	[195]
LNCaP	Lymphknotenmetastase, kaukasischer Mann	[196]
C4-2B	Murine Knochenmetastase, Derivat der LNCaP-C4-2 Subzelllinie, PCa-Xenotransplantat-Modell in kastrierten SCID-Mäusen	[197, 198]
LAPC4	Lymphknotenmetastase, humanes PCa-Xenotransplantat-Modell in SCID-Mäusen	[199]

SCID: *severe combined immunodeficiency*

Die Zelllinien DU-145, LNCaP und PC-3 gehören zu den klassischen und am besten charakterisierten humanen PCa-Zelllinien. Zusätzlich wurden die Zelllinien C4-2B und LAPC4 verwendet, um das therapeutische Potenzial der Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe beim PCa unter Einbeziehung des AR-Signalwegs *in vitro* zu untersuchen. Ein Überblick über das unterschiedliche genetische Profil dieser Zelllinien ist in Tabelle 2-2 aufgeführt.

Tabelle 2-2 Charakterisierung der verwendeten PCa-Zelllinien [200-202].

Zelllinien	AR	AR-Sensitivität	PSA	p53	PTEN
DU-145	-	AI	-	mut	WT
PC-3	-	AI	-	del	del
LNCaP	+ (mut)	AS	+	WT	mut/del
C4-2B	+ (mut)	AS	+	WT	mut/del
LAPC4	+ WT	AD	+	mut	WT

AD: androgenabhängig

AI: androgenunabhängig

AS: androgensensitiv

WT: Wildtyp, del: deletiert, mut: mutiert

+: positiv, -: negativ

Die Zelllinien DU-145, PC-3 und LNCaP wurden aus Tumoren von Patienten isoliert, die sich zuvor einer Chemotherapie und einer chirurgischen Kastration unterzogen hatten. Im Falle der Zelllinie LNCaP wurde der Patient zusätzlich mit Östrogenen behandelt [203]. Die Zelllinie LAPC4 stammt ursprünglich von einem Patienten mit einem metastasierten PCa (Stadium D), das sich unter Androgentherapie entwickelt hatte [199]. Das entnommene Material eines metastasierten Lymphknotens dieses Patienten wurde unmittelbar nach der chirurgischen Entfernung in

SCID-Mäuse implantiert. Aus den entstandenen Tumoren wurde dann die Zelllinie LAPC4 isoliert [199]. Bei der Zelllinie C4-2B handelt es sich um ein Derivat der Zelllinie LNCaP-C4-2, die aus kastrierten SCID-Mäusen gewonnen wurde [197, 198, 204]. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmen mit Hilfe des MycoAlert™ Mycoplasmen Detection Kit von Lonza Bioscience (LT07-118, Köln, Deutschland) getestet und die Authentizität der humanen PCa-Zelllinien wurde mittels STR-Profilung von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bestätigt [205].

2.2 Zellkulturmedien

Kulturmedien für adhärent wachsende PCa-Zelllinien

Die humanen PCa-Zelllinien DU-145, LNCaP, PC-3 und LAPC4 wurden im Gibco™ RPMI 1640 Medium (RPMI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, 21875-034) und die Zelllinie C4-2B im Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland, D5671) unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) kultiviert. Den beiden Standardmedien wurden jeweils 10 % fetales Kälberserum (FBS) (Sigma Aldrich, F7524) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, P0781) zugesetzt. Für die Kultivierung der Zelllinie LAPC4 wurde dem Standardmedium zusätzlich 1 nM des synthetischen Androgens R1881 (Sigma-Aldrich, R0908), gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO), hinzugefügt.

Einfrriermedium zur Kryokonservierung:

Das Einfriermedium setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 10 % (v/v) DMSO
- 20 % (v/v) FBS
- 70 % (v/v) RPMI oder DMEM Medium

2.3 Nukleinsäuren

2.3.1 siRNA-Oligonukleotide

Tabelle 2-3 Oligonukleotide, die zur siRNA-vermittelten Reduktion der Genexpression verwendet wurden.

Zielgen	Bezeichnung	Konzentration	Hersteller	Artikelnummer
CDK12	CDK12 siRNA	1 nM	Ambion (Austin, USA)	s28622
Kontroll-siRNA (unspezifisch)	Kontroll-siRNA	1 nM	Dharmacon (Lafayette, USA)	D-001810-10-20

2.3.2 Primer für die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Alle Oligonukleotide, die als Primer für die qRT-PCR dienten, wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Tabelle 2-4 Oligonukleotide, die als Primer für die qRT-PCR verwendet wurden.

Zielgen	Primer 5'-3' sense	Primer 5'-3' antisense	Konzentration
18S	CATGGCCGTTCTTAGTTGGT	ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT	5 µM
APEX2	AGTTTACCCAAGAGGAATC	AGTACACGTTGATTAGGGTC	5 µM
BRCA1	GACTGTTTATAGCTGTTGGAAG	TTTTGGAAGTGTTCCTACC	5 µM
FANCI	GAGCTATTGGATGTTGTCAC	TTCTCTGCCTAGTTCATAGTC	5 µM
FANCD2	ACTCAGTGACCTACTGATAG	CTTCAATAGGAAGTTTGGGTC	5 µM
MDC1	AACAGGTACCCTAGATGAAC	ATGTTGGTCTCCTGGTATTG	5 µM
OGG1	CTCAGAAATCCAAGGTGTG	TGGTAGGTGACATCATCAAG	6 µM
PNKP	GAATCCCAGCCAGATACTCCG	CTTCTCCAAGTTCTCCAGCC	5 µM
PSA	TATGAGCCTCCTGAAGAATC	AGAACTCCTCTGGTTCAATG	7 µM
RFC5	GAGTTGAAAACCTCTGAAGGG	AGTCAACTCTATGCACAAAC	5 µM

2.4 Proteine

2.4.1 Antikörper

2.4.1.1 Primärantikörper

Tabelle 2-5 Primärantikörper, die in der Immunblot-Analyse (IB), Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF) eingesetzt wurden.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller ^a	Artikelnr.	Methode
Aktin	Maus	1:10000	Merck KGaA	MAB1501	IB
Androgenrezeptor	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	5153	IB
Androgenrezeptor	Maus	1:100	Agilent	M356201	IHC
BRCA1	Kaninchen	1:500	Santa Cruz	sc-642	IB
Caspase-3	Maus	1:1000	Imgenex	IMG-144A	IB
Caspase-3	Maus	1:1000	Novus Biologicals	NB100-56708	IB
Caspase-3 (<i>cleaved</i>)	Kaninchen	1:250	Cell Signaling	9579	IHC
CDK12	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	11973	IB
CDK12	Kaninchen	1:300	Invitrogen	PA5-82330	IHC
CDK13 (CDC2L5)	Kaninchen	1:500	Bethyl	A301-458A	IB
Cyclin K	Kaninchen	1:10000	Bethyl	A301-939A	IB
		1:300	Bethyl	A301-939A	IHC
FANCD2	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	16323	IB
FANCI	Kaninchen	1:1000	Bethyl	A301-254A	IB
Ki67	Maus	<i>ready to use</i>	Agilent	IR626	IHC
p53	Maus	1:1000	Cell Signaling	2524	IB
pCTD Ser2	Ratte	1:1000	Sigma-Aldrich	04-1571	IB
pCTD Ser5	Ratte	1:1000	Sigma-Aldrich	04-1572	IB
pCTD Ser7	Ratte	1:1000	Sigma-Aldrich	04-1570	IB
PSA	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	5365	IB
RFC5	Maus	1:1000	Santa Cruz	sc-376528	IB
Rpb1 NTD (D8L4Y)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	14958	IB
Vinculin	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	4650	IB
β -tubulin	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2128	IB
γ H2AX (S139)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9718	IB
γ H2AX (S139)	Kaninchen	1:200	Cell Signaling	2577	IF

^aAgilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA; Bethyl Laboratories, Montgomery, USA; Cell Signaling Technologies®, Danvers, USA; Imgenex, San Diego, USA; Invitrogen, Carlsbad, USA; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; Novus Biologicals, Wiesbaden Nordenstadt, Germany; Santa Cruz Biotechnologies Inc., Dallas, USA; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland.

Die Primärantikörper für die Immunblot-Analyse wurden mit 5 % (w/v) BSA und 0,05 % NaN₃ in TBST angesetzt oder in 5 % Magermilchpulverlösung in TBST verdünnt.

2.4.1.2 Sekundärantikörper

Die folgenden Sekundärantikörper wurden zur Immunblot-Analyse verwendet:

- Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierter Ziege- α -Kaninchen-Antikörper IgG (H+L);
Verdünnung 1:3000 in 5 % Magermilchpulverlösung in TBST (BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland, 170-6515)
- HRP-konjugierter Ziege- α -Maus-Antikörper IgG (H+L);
Verdünnung 1:3000 in 5 % Magermilchpulverlösung in TBST (BioRad, 170-6516)
- HRP-konjugierter Ratte- α -Maus-Antikörper IgG;
Verdünnung 1:5000 in 5 % Magermilchpulverlösung in TBST (Merck, AP136P)

Der folgende Sekundärantikörper wurde für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet:

- Alexa Fluor® 546 Ziege- α -Kaninchen-Antikörper IgG (H+L) (Invitrogen, A11011)

2.4.2 Proteingrößenstandard für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA, 26616) wurde zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine im Bereich von 10-180 kDa verwendet. Für größere Proteine im Bereich von 40-300 kDa wurde der Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., 26625) verwendet.

2.4.3 Sonstige Enzyme und Proteine

- Bovines Serumalbumin (BSA) (100x) (10 mg/ml) (New England Biolabs® GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland, B9001S)
- RNase inhibitor (40 U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific Inc., EO0384)

2.5 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit destilliertem H₂O (dH₂O) angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen wurde für alle Experimente entweder eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (Sigma-Aldrich, D8662-500ML) oder die PBS-Lösung ohne Mg²⁺/Ca²⁺ (Sigma-Aldrich, D8537-500ML) verwendet. Für Versuche, bei denen keine sterilen Bedingungen erforderlich waren, wurde eine nicht sterile PBS-Lösung aus einem PBS (1x Dulbecco's) Pulver (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, A0964) und dH₂O hergestellt.

2.5.1 Verwendete Puffer und Lösungen zur Immunblot-Analyse

Lysepuffer (1 ml)

- 100 µl Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x),
(Thermo Fisher Scientific Inc., 78440)
- 20 µl Zellysepuffer (10x), (Cell Signaling, 9803)

Protein-Probenpuffer mit DTT (Dithiothreitol) (6x)

- 350 mM Tris-HCl pH 6,8
- 10,28 % (w/v) SDS
- 36 % (v/v) Glycerin
- 600 mM DTT
- 0,36 % (w/v) Bromphenolblau

Der Protein-Probenpuffer mit DTT wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Sammelgelpuffer für SDS-Polyacrylamid-Gele

- 500 mM Tris-HCl pH 6,8

Der Sammelgelpuffer wurde zur besseren Haltbarkeit autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Trenngelpuffer für SDS-Polyacrylamid-Gele

- 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

SDS-PAGE-Laufpuffer (Stocklösung: 10x)

- 250 mM Tris
- 1,9 M Glycin
- 1 % (w/v) SDS

Der pH-Wert der Lösung liegt bei 8,3.

Semi-dry-Transferpuffer (Stocklösung: 10x)

480 mM	Tris
390 mM	Glycin
0,375 % (w/v)	SDS

Der pH-Wert der Lösung sollte zwischen 9 – 9,2 liegen. Zur besseren Haltbarkeit wurde der Semi-dry-Transferpuffer bei 4 °C aufbewahrt.

Semi-dry-Transferpuffer (1x)

10 % (v/v)	Semi-dry-Transferpuffer (Stocklösung: 10x)
20 % (v/v)	Methanol

TBS (Stocklösung: 10x)

1,38 M	NaCl
200 mM	Tris

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,6 eingestellt.

TBST (1x)

1 % (v/v)	TBS (10x)
0,1 % (v/v)	Tween 20

Ponceau S-Färbelösung

0,5 % (w/v)	Ponceau S
1 % (v/v)	konzentrierte Essigsäure

Detektierlösung für die ECL (*enhanced chemiluminescence*)

10 ml	Tris-HCL	(100 mM, pH 8,5)
50 µl	Luminol	(250 mM in DMSO)
25 µl	Coumarinsäure	(90 mM in DMSO)
4 µl	H ₂ O ₂	(30 % (v/v))

2.5.2 Verwendete Puffer und Lösungen für die durchflusszytometrische Analyse

Die folgenden Puffer wurden mit hitzeinaktiviertem FBS hergestellt. Zu diesem Zweck wurde das FBS 30 min lang bei 56 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert, um eine gleichmäßige Hitzeinaktivierung zu gewährleisten.

Färbepuffer für BrdU

3 % (v/v)	FBS
0,09 % (v/v)	NaN ₃

gelöst in PBS (1x)

Einfriermedium

10 % (v/v)	DMSO
90 % (v/v)	FBS

2.5.3 Verwendete Puffer und Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung**Blockierungslösung**

10 % (v/v)	PBS
10 % (v/v)	FBS
0,1 % (v/v)	Triton X-100

Zur besseren Haltbarkeit wurde die Blockierungslösung bei -20 °C aufbewahrt.

Sekundärantikörper Lösung

10 % (v/v)	PBS
1 % (v/v)	FBS
0,1 % (v/v)	Triton X-100

Zur besseren Haltbarkeit wurde die Sekundärantikörper Lösung bei -20 °C aufbewahrt.

Mounting Medium

12 ml	0,2 M Tris-HCl pH 8,5
2,4 g	Mowiol 4-88
6 g	Glycerin
6 ml	dH ₂ O

Glycerin und Mowiol 4-88 wurden gemischt und in dH₂O für 1 h bei RT gelöst. Danach wurde Tris-HCl hinzugegeben und für 2 h bei 50 °C unter kontinuierlichem Rühren aufgelöst. Zur besseren Haltbarkeit wurde das Mounting Medium bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.4 Verwendete Puffer und Lösungen für die Gewebekultur**Krebs-Henseleit-Puffer (KHB)**

Der KHB (10x) von Sigma-Aldrich (K3753) wurde in dH₂O unter kontinuierlichem Rühren aufgelöst und 0,373 g CaCl₂ sowie 2,1 g NaHCO₃ zur Lösung hinzugeben. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt und der Puffer mit einem Nalgene™ Einweg-Flaschenaufsatzfilter mit Polyethersulfonmembran steril filtriert. Zur besseren Haltbarkeit wurde der KHB bei 4 °C aufbewahrt.

2.6 Chemikalien und Reagenzien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH+Co.KG (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen AG (Carlsbad, USA), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.6.1 Inhibitoren

Tabelle 2-6 Inhibitoren.

Inhibitor	Hersteller	Artikelnr.
Abirateronacetat	Sigma-Aldrich	SML1527
Enzalutamid (MDV 3100)	Axon Medchem BV, Groningen, Niederlande	1613
Olaparib	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	10621

Der CDK12/CDK13-Inhibitor THZ531 wurde freundlicherweise von Nathanael Gray (Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA) zur Verfügung gestellt [113].

2.6.2 Kits

Tabelle 2-7 Kits.

Kit	Hersteller	Artikelnr.
BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	559619
Dako EnVision™ FLEX HRP	Agilent Technologies	DM822
+ Target Retrieval Solution Low pH (50x)		K8005
+ Target Retrieval Solution High pH (50x)		K8004
+ Peroxidase Blocking Reagent		DM821
+ Substrate Buffer		DM823
+ DAB + Chromogen		DM827
+ Antibody Diluent		DM830
+ Rabbit (Linker)		DM825
+ Mouse (Linker)		DM824
+ Hematoxylin		K8008
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences	556547
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	4368813
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Deutschland	79654
RNeasy® Plus Mini Kit (50)	Qiagen	74134

2.6.3 Reagenzien

Tabelle 2-8 Verwendete Reagenzien.

Substanz	Hersteller	Artikelnr.
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH+Co.KG	4227
2-Propanol	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	11335327
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma-Aldrich	D9542
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Biosciences	559925
Accutase	Sigma-Aldrich	A6964
Agar	Merck KGaA	05039
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH+Co.KG	T844.2
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH+Co.KG	9592.3
Annexin V-FITC	BD Biosciences	560931
Bromphenolblau für Natriumsalze	Carl Roth GmbH+Co.KG	A512.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2650
Dodecylsulfate·Na-Salz in Pellets	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany	20765
DTT BioChemica	AppliChem GmbH	A1101
Eosin	Agilent Technologies, Inc	CS701
Essigsäure Rotipuran®	Carl Roth GmbH+Co.KG	3738-1
Ethanol, absolute	Honeywell Research Chemicals, Seelze, Deutschland	32205
Eukitt® schnellhärtendes Eindeckmittel	Sigma-Aldrich	03989
Glycerol Reagent Plus™	Sigma-Aldrich	G5516
Glycin	Carl Roth GmbH+Co.KG	3790.2
Hematoxylin	Agilent Technologies, Inc.	S3309
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Invitrogen AG	11668019
Luminol	Sigma-Aldrich	A8511
Magermilchpulver	AppliChem GmbH	A0830
Matrigel® Matrix	Corning, Kaiserslautern, Deutschland	356234
Methanol	Honeywell Research Chemicals	32213
Mowiol®-488	Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, USA	475904
Natriumazid (NaN ₃)	AppliChem GmbH	A1430
Nuklease-freies Wasser	Qiagen	129115
Opti-MEM® I (1X) + GlutaMAX™-I	Thermo Fisher Scientific Inc.	51985026
Paraffin Kliniplast	Klinika Medical GmbH, Usingen, Deutschland	2501008
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich	C9008
Ponceau S	Carl Roth GmbH+Co.KG	5338.1

MATERIAL

Substanz	Hersteller	Artikelnr.
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad	5000006
Protein Block, Serum free	Agilent Technologies, Inc.	X0909
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH+Co.KG	3029.1
Salzsäure Rotipuran®	Carl Roth GmbH+Co.KG	6331.1
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA	18080093
SYBR™ Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.	4309155
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH+Co.KG	23673
Tris ultrapure	AppliChem GmbH	A1086
Tris-buffered saline 20X-Pulver	AppliChem GmbH	A500.1
Trypsin-EDTA Lösung	ThermoFisher Scientific	25200056
Tween® 20	AppliChem GmbH	A4974
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH+Co.KG	9713.5

2.7 Verbrauchsartikel

Tabelle 2-9 Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Abdeckfolie für 96-Well-Platten	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	ThermoFisher Scientific Inc.
Deckgläser Ø 13 mm	Steril, rund, 631-0150	VWR
Durchflusszytometrie-Röhrchen 12x 75 mm	Falcon™ Rundboden-Polystyrolröhrchen, steril	Falcon® Corning
Filterspitzen 10 µl, 100 µl, 1250 µl	SafeSeal SurPhob, steril, graduiert, DNA-, DNase-, RNase-, Pyrogen frei	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Gel-Blotting-Bögen	GB003, Whatman™	VWR
Kryoröhrchen 2ml	Nalgene® Cryoware, steril, RNase- und DNase-frei	Thermo Scientific™, Schwerte, Deutschland
Mikrotom-Klingen	Edelstahl, S-35	Pfm medical ag, Köln, Deutschland
Nitrozellulose-Membran	Nitrozellulose-Membran-Rolle, 0.45 µm, 30 cm x 3.5 m	BioRad
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific Inc.
Pasteurpipetten 150 mm, 230 mm	Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen, Kalk-Natron-Glas	Carl Roth GmbH+Co.KG
PCR-Platte 96-Well	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific Inc.
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Cellstar®, PP, DNA, RNase-, DNase-frei	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl	SurPhob, extra lang, Low Binding, graduiert, DNA-, DNase-, RNase-, frei	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen 1250 µl	oberflächenoptimiert, Nachfüllsystem	Nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Safe-Lock-Klappdeckel, PP	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
RNA-Schaber	Zellschaber, 2-Positionen-Klinge, 25 cm, steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Cellstar®, steril	Greiner Bio-One GmbH
Steriler Einweg-Flaschenaufsatzfilter	Nalgene™ Rapid-Flow™, PES-Membran, 0,2 µm Porengröße, Corning®, PS, TC, steril	ThermoFisher Scientific Inc. Sigma-Aldrich
Zellkulturflasche 75 cm ²		
Zellkultur-Inserts	Falcon®, für 6-Well Platten, 0.4 µm transparente PET-Membran, steril	Corning
Zellkulturplatten 6-Well	Falcon®, PS, TC, steril	Corning
Zellkulturplatten 6-Well	Cellstar®, PS, TC, steril	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturschalen 6 cm, 10 cm	Cellstar®, PS, TC, steril	Greiner Bio-One GmbH
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Cellstar® Tubes, PP, konischer Boden, Schraubverschluss, steril	Greiner Bio-One GmbH

2.8 Geräte und Software

Tabelle 2-10 Verwendete Apparate und Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Sartorius	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autostainer	LabVision 480s	Thermo Fisher Scientific Inc.
Autostainer	Dako CS100-10596	Agilent Technology Inc.
CO ₂ -beständiger Schüttler	CO ₂ -beständiger Schüttler mit Universalplattform	Thermo Fisher Scientific Inc.
CO ₂ -Inkubator	HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific Inc.
Durchflusszytometer	FACSCalibur™	BD Biosciences
Gelelektrophorese-Apparatur	Mini-PROTEAN® Tetra System	BioRad
Halbautomatisches Vibrationsmikrotom	Leica VT1200	Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Leica TCS SP8	Leica Biosystems Imaging, Wetzlar, Deutschland
Kühlzentrifuge	5427R	Eppendorf AG
Lichtmikroskop	Eclipse TS100-F	Nikon, Tokyo, Japan
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan Spark 10M	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Netzgerät	PowerPac™	BioRad
Objektträger-Scanner	NanoZoomer 2.0HT	Hamamatsu Photonics K.K., Iwata City, Japan
Objektträger-Strecktisch	OTS 40	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Orbitalschüttler	MaxQ2000 CO2 Plus, 55 rpm	Thermo Fisher Scientific Inc.
Paraffinausgießstation	EG 1160	Leica Biosystems Imaging
pH-Meter	pH-Labormessgerät inoLab®	WTW-a xylem brand, Dinslaken, Deutschland
Pipetten 0,5-1 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	eppendorf Research®	Eppendorf AG
Proteintransfersystem	Trans-Blot® Turbo™ Blotting System	BioRad
qRT-PCR-Gerät	QuantStudio 3 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific Inc.
Rotationsmikrotom	Hyrax M55	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Sicherheitswerkbank	LaminAir® HB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Thermocycler	GeneAmp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tiefkühlplatte	Tiefkühleinheit TKF 22	MEDITE Medical GmbH
Trockenschrank	Heraeus	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vakuuminfiltrationsprozessor für Gewebe	Tissue-Tek VIP	Sakura Finetek Europe B.V., Umkirch, Deutschland
Vortex Mixer	Vornado™	Benchmark Scientific, Sayreville, USA

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Western-Blot-Chemilumineszenzimager	Fusion Solo S	Vilber Lourmat, Eberhadtzell, Deutschland
Western-Blotting-Transfer-System	Trans-Blot® Turbo™	BioRad
Zählkammer	Neubauer Improved, 0,1 mm/0,0025 mm ²	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus™ Multifuge™ X3	Thermo Fisher Scientific Inc.

Tabelle 2-11 Verwendete Software.

Software	Version	Hersteller
Adobe® Photoshop® CS5	12.0	Adobe Inc., San José, USA
Aperio ImageScope	V12.2.2.5015	Aperio Technologies Inc., Vista, USA
CellQuest™ Pro	V 5.2.1	BD Biosciences
EndNote™	X9.3.3	Clarivate™, London, UK
Fusion© Software, Evolution-Capt	17.04a	Vilber Lourmat Germany GmbH, Eberhardzell, Germany
GraphPad Prism	V9.4.0	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ	1.52a	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office	Professional Plus 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ND-1000	V3.81	Thermo Fisher Scientific Inc.
NDP Scan	2.589	Hamamatsu Photonics K.K.
NDP Viewer	2.7.39	Hamamatsu Photonics K.K.
Leica Application Suite X	3.1.5.16308	Leica Biosystems Imaging
QuantStudio™ Design & Analysis Software	v1.5.1	Thermo Fisher Scientific Inc.
QuPath: Open-Source-Software für die digitale Bildanalyse in der Pathologie	0.2.0-m12	Bankhead P [206]
Spark Control	V3.1	Tecan Group

3 METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Experimente erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Es wurden ausschließlich autoklavierte oder heißluftsterilisierte Materialien und Geräte verwendet. Die Kultivierung der adhärent wachsenden PCa-Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen. Die Standardmedien wurden, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, verwendet.

3.1.1 Kultivierung der humanen PCa-Zelllinien

Zweimal wöchentlich wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 % bis 80 % passagiert, um ein optimales Zellwachstum zu gewährleisten. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt und mit PBS (1x) (ohne Mg²⁺/Ca²⁺) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Lösung oder Accutase (5 min, 37 °C) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und mit frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Je nach Zelllinie und Dichte wurden die Zellen im Verhältnis von 1:3 - 1:12 in frischem Zellkulturmedium subkultiviert.

3.1.2 Kryokonservierung der humanen PCa-Zelllinien

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-180 °C) kryokonserviert. Hierfür wurden die durch Trypsin abgelösten Zellen 5 min bei 1000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (siehe Abschnitt 2.2) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das zugegebene DMSO im Einfriermedium soll hierbei die Kristallbildung beim Einfrieren verhindern, um Zellmembranschädigungen vorzubeugen. Die befüllten Kryoröhrchen wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox langsam auf -80 °C heruntergekühlt, wodurch ein stufenweises Einfrieren (1 °C/min) der Zellen gewährleistet wurde. Alle 3 Monate wurde eine neue Charge von Zellen aufgetaut, kultiviert und für die weiteren Experimente verwendet. Das Auftauen muss, im Gegensatz zum Einfrieren, sehr schnell verlaufen, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt. Aus diesem Grund wurden die aus dem Stickstofftank entnommenen Zellen sofort bei 37 °C aufgetaut und direkt in eine Zellkulturflasche mit warmem Zellkulturmedium überführt. Nach 24 h wurde das DMSO-haltige Medium durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

3.1.3 Transiente Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Lipofectamine™ 2000 als Transfektionsreagenz und Opti-MEM als Transfektionsmedium verwendet. Die temporäre Suppression der endogenen Proteinexpression wurde mit verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden, spezifisch für verschiedene mRNAs, sowie mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA durchgeführt. Einen Tag nach der Zellaussaat in 6 cm-Schalen wurden die Zellen mit PBS (mit Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen und daraufhin für 5 h im Transfektionsansatz inkubiert. Der Transfektionsansatz enthielt die jeweilige Konzentration der siRNAs und 6 μ l Lipofectamine™ 2000 in 1,5 ml Opti-MEM. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zum Transfektionsansatz 1,5 ml Zellkulturmedium hinzugegeben. Die Experimente wurden bis zur weiteren Analyse für 72 h inkubiert. Die Effektivität der Suppression wurde mittels Immunblot-Analyse (siehe Abschnitt 3.3.6) überprüft.

3.1.4 Behandlung der humanen PCa-Zelllinien

Um ein vollständiges Anheften der Zellen auf der Kulturschale zu gewährleisten, wurden die Zellen jeweils einen Tag vor der Behandlung in 6 cm-Schalen, 6- oder 12-Well-Platten ausgesät. Die Zellzahl wurde hierbei so gewählt, dass den Zellen über den kompletten Zeitraum des Experiments ein exponentielles Wachstum möglich war. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Da alle Substanzen, die zur Behandlung der Zellen verwendet wurden, in DMSO gelöst wurden, wurde in der Kontrollbehandlung eine äquivalente Menge DMSO eingesetzt, um mögliche Auswirkungen dessen zu berücksichtigen. Einen Tag nach der Zellaussaat wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt und durch den Behandlungsansatz ersetzt. Die weitere Analyse der Zellen erfolgte 24 h bis 72 h nach der Behandlung.

3.1.4.1 Inhibitoren

Die verwendeten Inhibitoren, einschließlich der verwendeten Lösungsmittel sowie der Stamm- und Endkonzentrationen sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-1 Stammlösungs- und Endkonzentration der verwendeten Inhibitoren.

Inhibitor	Zielstruktur	Stammlösung	Endkonz.
Abirateronacetat	CYP17	10 mM in DMSO (-20 °C)	10 μ M
Enzalutamid (MDV 3100)	Androgenrezeptor	10 mM in DMSO (-80 °C)	10 μ M
Olaparib	PARP1	50 mM in DMSO (-20 °C)	40 μ M, 60 μ M
THZ531	CDK12/CDK13	10 mM in DMSO (-20 °C)	50 nM - 500 nM

3.1.5 Zellproliferations-Assay

Die Zellen wurden 24 h nach der Zellaussaat behandelt (siehe Abschnitt 3.1.4). Zur Analyse der Zellviabilität wurden die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten mit PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen, mit Trypsin geerntet und in Standard-Zellkulturmedium resuspendiert. Die Gesamtzellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Reverse Transkription von RNA

Mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits wurden die zuvor extrahierten RNA-Moleküle (siehe Abschnitt 3.3.1) mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die RNA-Konzentration auf 1 µg RNA in 10 µl nukleasefreiem H₂O eingestellt. Anschließend wurde der Transkriptions-Mastermix gemäß den Herstellerangaben (Tabelle 3-2) hergestellt und 10 µl des Mastermixes zur RNA gegeben. Danach erfolgte die Transkription der RNA in cDNA in einer dreistufigen Reaktion (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-2 Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese.

Reagenz	Menge
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (Enzymaktivität: 20 U/µl)	1 µl
RNase Inhibitor (Enzymaktivität 40 U/µl)	0,5 µl
Nukleasefreies H ₂ O	3,7 µl

Tabelle 3-3 Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zeit	10 min	120 min	5 min	∞

Nach der Synthese wurde die cDNA im Verhältnis 1:10 mit nukleasefreiem H₂O verdünnt (Endkonzentration 10 ng/µl) und direkt für weitere Experimente verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Zum quantitativen Nachweis spezifischer PCR-Amplifikate wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Bei dieser Methode wurden genspezifische Primer sowie der fluoreszierende Farbstoff SYBR™ Green eingesetzt. SYBR™ Green ist ein asymmetrischer Cyaninfarbstoff, der in die neu synthetisierte DNA interkaliert, ohne den Ablauf der PCR zu beeinträchtigen. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal nimmt mit jedem PCR-Zyklus proportional zur Menge der amplifizierten PCR-Produkte zu. Zur Quantifizierung wird die Fluoreszenzintensität der spezifischen DNA-Produkte in der exponentiellen Phase der PCR in Relation zur Fluoreszenzintensität eines Referenzgens gesetzt. Referenzgene haben die Eigenschaft, dass sich ihre Expressionsmuster in

verschiedenen Zellzyklusphasen und Zelltypen idealerweise nicht ändern. Dadurch werden beispielsweise unterschiedliche cDNA-Mengen der eingesetzten Proben normalisiert. In dieser Arbeit wurde die 18S rRNA als Referenzgen verwendet. Die relative Quantifizierung stützt sich hierbei auf die Ermittlung des Fluoreszenzschwellenwertes, des sogenannten C_t -Wert (*cycle threshold*), der die Anzahl an PCR-Zyklen, zu dem das Fluoreszenzsignal das erste Mal die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt, beschreibt. Der C_t -Wert steht somit in direktem Zusammenhang mit der Menge an cDNA in der gemessenen Probe. Je mehr cDNA in der Ausgangslösung vorhanden ist, desto schneller wird die Hintergrundfluoreszenz überschritten, was zu einem kleineren C_t -Wert führt [207]. Mit Hilfe des C_t -Wertes des Referenzgens (18S) wurden die zur Auswertung untersuchten Proben zunächst wie folgt normalisiert (ΔC_t -Wert):

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (18S)$$

Um eine Veränderung des Expressionsniveaus eines Zielgens zwischen der behandelten Probe und der entsprechenden Kontrolle feststellen zu können, wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode zur Berechnung angewandt.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Probe}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle})$$

Die endgültige Ermittlung der relativen cDNA-Menge erfolgte daraufhin nach folgender Formel, wobei der Wert 1 für die Kontroll-cDNA festgelegt wurde [208]:

$$\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Während der qRT-PCR reagiert SYBR™ Green jedoch nicht nur mit der Zielsequenz, sondern kann ebenfalls sogenannte Primer-Dimere oder unspezifische PCR-Produkte bilden, die zu falsch positiven Ergebnissen führen. Aus diesem Grund ist eine Optimierung der Primerkonzentration oder -sequenz notwendig. Zusätzlich wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, die es ermöglicht, Primer-Dimere aufgrund ihrer niedrigen Schmelztemperatur nachzuweisen [207, 208]. Im folgenden Abschnitt 3.2.2.1 wird die Validierung der Primer beschrieben. Diese wurde für jedes in dieser Arbeit verwendeten Primer-Paar vor der eigentlichen Analyse durchgeführt. Die Stockkonzentrationen und die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2-4 aufgeführt. Jede Probe wurde in Triplikaten von je 12 µl in einer 96-Well-Platte gemessen. Die Zusammensetzung des Mastermixes für ein Triplikat ist in Tabelle 3-4 dargestellt.

Tabelle 3-4 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qRT-PCR.

Reagenz	Menge
cDNA (1 ng/µl)	16,6 µl
SYBR™ Green PCR Master Mix	21 µl
Primer-Paar-Mix (<i>forward</i> und <i>reverse</i> Primer)	4,4 µl

Tabelle 3-5 Temperaturprogramm der qRT-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Anfangsdenaturierung	95 °C	10 min	1
Amplifikation			
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Annealing und Elongation	60 °C	60 s	
Schmelzkurve*	95 °C	15 s	1
	60 °C	60 s	
	95 °C	1 s	

*Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte in einem zusätzlichen Schritt im Anschluss an die qRT-PCR. Das PCR-Produkt wurde durch eine langsame Temperaturzunahme von 0,15 °C/s im Bereich von 60 – 95 °C aufgeschmolzen, während die Fluoreszenz weiterhin kontinuierlich gemessen wurde.

Die Messung wurde mit dem QuantStudio™ 3 Real Time-System (Applied Biosystems von Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt. Zur Auswertung wurde die zugehörige QuantStudio™ Design & Analysis Software verwendet.

3.2.2.1 Qualitätsprüfung der Primer-Effektivität

Jedes für die qRT-PCR Analyse verwendete Primer-Paar wurde zuvor auf seine Effektivität getestet, um die optimale Konzentration für die cDNA-Amplifikation zu finden und eine Primer-Dimerisierung während der Reaktion zu vermeiden. Dazu wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe einer Kontroll-Zelllinie (1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) erstellt. Als Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser verwendet. Die jeweiligen Primer-Paare wurden zunächst mit einer Konzentration von 5 µM, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, getestet. Mit Hilfe der QuantStudio™ Design & Analysis Software wurde eine Standardgerade erstellt. Dabei wurden die C_t -Werte gegen die relative cDNA-Expression logarithmisch aufgetragen und die entsprechende Steigung abgelesen. Idealerweise sollte die Gerade eine Steigung von -3,3 zeigen. Eine steilere Gerade deutet auf eine ineffiziente PCR aufgrund einer zu geringen Primerkonzentration hin. Im Umkehrschluss bedeutet eine zu flache Gerade eine zu hohe Effizienz, sodass die Primerkonzentration verringert werden muss. Zum Ausschluss möglicher Primer-Dimere oder unspezifischer PCR-Produkte wurden die Schmelzkurven analysiert. Für jede cDNA-Konzentration war lediglich ein Dissoziationspeak akzeptabel. In der Negativkontrolle war kein Peak zulässig.

3.3 Biochemische und physikalische Methoden

3.3.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA aus den PCa-Zellen erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung. Hierfür wurde das RNeasy® Plus Mini Kit der Firma QIAGEN gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Vor der Isolierung wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Zur Inaktivierung von RNasen wurden die Zellen mit einer Mischung aus Guanidiniumthiocyanat-reichem RLT-Puffer und β -Mercaptoethanol im Verhältnis 1:100 lysiert. Anschließend wurden die Zellen von der Schale geschabt und mit Hilfe der QIAshredder-Säule homogenisiert. Zur Entfernung genomischer DNA (gDNA) wurden gDNA-Eliminator-Säulen verwendet. Die RNA-Aufreinigung erfolgte mittels RNeasy-Säulen, die nur RNA-Moleküle binden, die länger als 200 bp sind. Kleinere RNAs wie beispielsweise 5.8S rRNA, 5S rRNA und tRNAs werden nicht gebunden. Zum Schluss wurde die gewonnene RNA in 30 μ l nukleasefreiem Wasser eluiert und bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.1.1 Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach der Isolierung der RNA wurde die Konzentration der Probe spektrophotometrisch mit Hilfe des NanoDrop®-Spektralphotometers bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die UV-Absorption bei 260 nm gemessen und die RNA quantifiziert. Eine gemessene Absorption von 1,0 bei 260 nm entspricht dabei 40 μ g/ml reiner RNA. Parallel dazu erfolgte eine Referenzmessung des Absorptionsmaximums von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Aus dem Quotienten (260/280) der beiden Messungen lässt sich die Reinheit der RNA bestimmen. Für eine proteinfreie RNA sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2 liegen.

3.3.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden Gesamtzellextrakte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung der Zellen hergestellt. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, in etwa 50 – 70 μ l Lysepuffer von der Zellkulturschale abgeschabt und 15 min auf Eis inkubiert. Der Lysepuffer enthält eine Mischung aus Protease- und Phosphataseinhibitoren, die eine Modifikation und Degradierung der Proteine verhindern sollen. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei 12700 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde verworfen und der Überstand mit den darin gelösten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gesamtzellextrakte wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Detektion der behandlungsinduzierten Apoptose wurde die Aktivierung der an der Todeskaskade beteiligten Enzyme, der sogenannten Caspasen nachgewiesen. Dazu wurde das Zellkulturmedium, in dem sich apoptotische Zellen befinden können, nicht verworfen, sondern in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt, die Zellkulturschale mit kaltem PBS gewaschen und

ebenfalls in dasselbe Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C. Mit den Zellkulturschalen wurde ebenfalls, wie im oberen Abschnitt beschrieben, verfahren. Der Überstand im Zentrifugenröhrchen wurde vorsichtig entfernt, das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Danach erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation (3000 rpm, 4 °C). Das überschüssige PBS wurde verworfen, das Zellpellet zusammen mit den abgeschabten Zellen resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben weiter verfahren.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration und Probenvorbereitung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode mit dem Protein-Assay-Reagenz von BioRad ermittelt. Diese Methode basiert auf dem quantitativen Nachweis der Komplexbildung zwischen dem eingesetzten Farbstoff Coomassie® Brilliant Blue G-250 und den Proteinen, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm führt. Je höher die Absorption bei 595 nm ist, desto höher ist die Proteinkonzentration [209]. Dazu wurden 798 µl ddH₂O, 200 µl des Protein-Assay-Reagenz und 2 µl des Zelllysates in einem Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurden 200 µl von jeder Probe in eine 96-Well-Platte überführt und die Absorption bei 595 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Parallel dazu wurden Standards mit definierten Proteinkonzentrationen (0, 1, 5, 10 und 15 µg/µl BSA) zur Erstellung einer Eichgerade hergestellt und ebenfalls detektiert. Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde daraufhin mit Hilfe dieser Eichgeraden ermittelt. Basierend auf den ermittelten Konzentrationen wurde die benötigte Proteinmenge (20 – 50 µg) auf ein definiertes Standardvolumen mittels des Lysepuffers eingestellt. Der SDS-haltige Protein-Probenpuffer (6x) wurde hinzugefügt und das Gemisch anschließend für 5 min bei 95 °C erhitzt. Durch das Erhitzen werden sowohl Wasserstoffbrücken gelöst als auch die Proteine denaturiert. Dies führt zu einem Verlust der tertiären oder quartären Proteinstruktur und ermöglicht dem, im Probenpuffer enthaltenen SDS, an das entfaltete Protein zu binden. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine maskiert, was zu einer negativen Gesamtladung führt. Diese Ladung ist proportional zum Molekulargewicht des Proteins, was für die korrekte Trennung der Proteine, wie im folgenden Abschnitt 3.3.4 erläutert, von entscheidender Bedeutung ist. Die vorbereiteten Proben wurden anschließend auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

3.3.4 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. In dieser Arbeit wurde die Methode nach Laemmli angewandt [210], bei der ein SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet wird, das aus einem vorangestellten Sammelgel (pH 6,8) und einem Trenngel (pH 8,8) besteht. Im Sammelgel werden die Proteine aufkonzentriert, wodurch sichergestellt wird, dass sie gleichzeitig in das Trenngel gelangen. Im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. In Abhängigkeit des Molekulargewichtes der Proteine kann die Porengröße des Gels durch unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen angepasst werden. Je kleiner das Molekulargewicht der Zielproteine ist, desto höher sollte die Konzentration des Acrylamids sein. Aus diesem Grund wurden Trenngele mit unterschiedlichen Konzentrationen (8 – 15 %) verwendet. In Tabelle 3-6 ist die genaue Zusammensetzung der für diese Arbeit benötigten SDS-Polyacrylamid-Gele aufgeführt.

Tabelle 3-6 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der SDS-Polyacrylamid-Gele.

Chemikalien	Trenngel				Sammelgel
	8 %	10 %	12 %	15 %	
ddH ₂ O	2,3 ml	2 ml	1,7 ml	1,2 ml	1,15 ml
Rotiphorese® Gel 30	1,3 ml	1,7 ml	2 ml	2,5 ml	330 µl
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	500 µl
Trenngelpuffer	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
10 % (w/v) SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
10 % (w/v) APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	20 µl
TEMED	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

Zuerst wurde das Trenngel, das zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde, mit Isopropanol überschichtet, um die Gelgrenze zu begradigen und eine Polymerisation unter Luftabschluss zu gewährleisten. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Kamm eingesetzt, der Taschen für die Proben erzeugt. Nachdem das SDS-Polyacrylamid-Gel ausgehärtet war, wurde der Kamm entfernt, das Gel mit dH₂O gewaschen und in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Apparatur wurde mit dem SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt und jede Probe zusammen mit einem Proteinmarker in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Für sehr große Proteine wurde der Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder als Größenstandard verwendet. Für alle weiteren Proteine ist der PageRuler™ Prestained Protein Ladder zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt worden. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 – 120 V, bis die blau gefärbte Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

3.3.5 Semi-dry-Western-Transfer

Mit Hilfe der Western-Transfer-Methode können die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Trenngel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Der Transfer der Proteine erfolgte durch ein elektrisches Feld, das senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung appliziert wird. Dabei bleibt das Trennungsmuster erhalten und die Proteine befinden sich nach der Übertragung aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf der Nitrozellulose-Membran. In dieser Arbeit wurde für den Semi-dry-Transfer das Trans Blot® Turbo™ Blotting System von BioRad verwendet. Zu Beginn wurden pro Gel sechs Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulose-Membran und das Trenngel in dem methanolhaltigen Transferpuffer äquilibriert. Danach wurden drei Lagen Whatman-Papier, die Nitrozellulose-Membran, das Trenngel und wiederum drei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei in die Transferkammer geschichtet. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V und einer Stromstärke von ca. 300 mA pro Gel für 30 min. Nach dem vollständigen Transfer konnten die Proteine auf der Nitrozellulose-Membran mit dem Azofarbstoff Ponceau S reversibel angefärbt werden. Durch die resultierende Rotfärbung der positiven Aminogruppe der Proteine konnte der Proteintransfer optisch bestätigt werden. Anschließend wurde die Nitrozellulose-Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5%iger Magermilchpulverlösung in TBST unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Auf diese Weise wurden freie Bindungsstellen blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden.

3.3.6 Immunblot-Analyse

Die Immundetektion der Proteine erfolgte über den indirekten Nachweis mit antigenspezifischen Primär- und speziestypischen Sekundärantikörpern. Der Sekundärantikörper ist zusätzlich an ein Reporterenzym (HRP) gekoppelt, das mittels Chemilumineszenzreaktion die Proteindetektion ermöglicht. Nach der Blockierung mit 5%iger Magermilchpulverlösung wurde die Nitrozellulose-Membran zweimal mit TBST für 5 min gewaschen und daraufhin mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Primärantikörpers wurde die Membran dreimal mit TBST für 10 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen und dann für 1 min in einer selbsthergestellten Detektierlösung für die ECL inkubiert, um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen. Die HRP katalysiert hierbei die Oxidation von Luminol in Gegenwart von H₂O₂. Durch die Zugabe der Coumarinsäure wird die Reaktion verstärkt. Dies führt dazu, dass Luminol in einen höheren energetischen Zustand übergeht. Beim Rückfall des Luminols in seinen Grundzustand werden Photonen emittiert, die dann mit einem digitalen Bildgebungssystem detektiert werden können.

3.3.7 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ermöglicht auf Einzelzellebene eine simultane, quantitative Analyse verschiedener Eigenschaften, wie z. B. die Größe, Struktur, Oberflächen- und intrazelluläre Merkmale von Zellen oder Zellpopulationen. Die Detektion der Zelleigenschaften erfolgte hierbei durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an spezifische Zellstrukturen binden oder in Nukleinsäuren interkalieren. Zur Analyse wurden die Zellen einzeln durch einen Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette gezogen und durch den so entstehenden laminaren Probenstrom an einem Laserstrahl mit geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet und detektiert. Die Größe der Zellen wird durch das Vorwärtsstreulicht gemessen, während das Seitwärtsstreulicht Aufschluss über die Granularität der Zellen gibt [211].

3.3.7.1 Bestimmung der Apoptoserate mittels Annexin V

Die Bestimmung der Apoptoserate der behandelten PCa-Zelllinien erfolgte mittels Annexin V und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD). Annexin V ist ein intrazelluläres Protein, das Ca^{2+} -abhängig mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet. In vitalen Zellen ist das Phosphatidylserin normalerweise entlang der zytosolischen Plasmamembran lokalisiert. Als Folge der Apoptose findet schon sehr früh eine Translokation des Phosphatidylserins auf die extrazelluläre Membranseite statt. [212]. Dadurch werden im weiteren Verlauf der Apoptose die entstehenden Zellfragmente für die Phagozytose markiert. Durch die Kopplung von Annexin V an den fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) können apoptotische Zellen in der Durchflusszytometrie detektiert werden. Allerdings wird in nekrotischen Zellen ebenfalls eine Translokation von Phosphatidylserin und der Verlust der Membranintegrität beobachtet, sodass auch diese Zellen im Durchflusszytometer als Annexin V-positiv erscheinen. Zur Differenzierung von früh- und spät-apoptotischen sowie nekrotischen Zellen wird eine zusätzliche Färbung mit dem Nukleinsäureinterkalator 7-AAD durchgeführt. Dieser Farbstoff kann eine intakte Zellmembran nicht überwinden, sondern dringt lediglich in Zellen in späteren Stadien der Apoptose oder Nekrose ein. Annexin V- und 7-AAD-positive Zellen werden somit als spät-apoptotisch bzw. nekrotisch definiert [213].

In dieser Arbeit wurde das FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I der Firma BD Pharmingen™ (Heidelberg, Deutschland) zur Färbung verwendet. Nach der Behandlung (siehe Abschnitt 3.1.4) wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Kulturschale abgelöst und mit dem Zellüberstand in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation (1000 rpm, 4 °C) wurde das Medium entfernt und das Zellpellet zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl Binding Buffer (1x) resuspendiert und jede Probe mit 4 µl Annexin V-FITC (90 µg/ml) und 3,5 µl 7-AAD gefärbt. Im Anschluss an eine 15-minütige lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension mit 400 µl bis 600 µl Binding Buffer (1x) versetzt und durch eine Polyamidmembran in ein

Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt. Die Messung wurde mit einem FACS Calibur™ Gerät (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen CellQuest™ Pro Software des gleichen Herstellers. Bei dieser Analyse wurde der prozentuale Anteil Annexin V-FITC-positiver apoptotischer Zellen und Annexin V-FITC/7-AAD-positiver spät-apoptotischer Zellen im Verhältnis zur Gesamtpopulation ermittelt.

3.3.7.2 Zellzyklusanalyse mittels BrdU

Die durchflusszytometrische Messung des zellulären DNA-Gehalts ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung (G1, S, G2/M) einer Zellpopulation. In Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, besteht jedes Chromosom aus nur einem Chromatid. Im Laufe der Synthese-Phase (S-Phase) wird die DNA dupliziert und liegt dann in Form von zwei Schwesterchromatiden in der G2-Phase vor, bevor die Zelle sich schließlich in der Mitose (M-Phase) teilt. Bromodeoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analog, das während der S-Phase in neu synthetisierte DNA von aktiv proliferierenden Zellen eingebaut wird [214]. Die Färbung mit dem fluoreszierenden FITC-konjugierten Anti-BrdU-Antikörper und dem Nukleinsäureinterkalator 7-AAD ermöglicht die Ermittlung der Zellzyklusposition der Zellen und des DNA-Gehalts. In dieser Arbeit wurde das BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit von BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurden die Zellen unter Standardbedingungen für 30 min mit 1 mM BrdU im Kulturmedium inkubiert. Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase des Zellzyklus befinden, bauen das BrdU in die neu synthetisierte DNA ein. Anschließend werden die Zellen, wie in Abschnitt 3.3.7.1 beschrieben, von der Zellkulturschale gelöst und in Zentrifugenröhrchen gesammelt. Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellerprotokolls. Um die Bindung des fluoreszierenden Farbstoffs FITC an das inkorporierte BrdU zu ermöglichen, wurden die fixierten Zellen 1 h bei 37 °C mit DNase inkubiert und dann mit dem Fluoreszenzantikörper FITC-Anti-BrdU und 7-AAD gefärbt. Die Zellzyklusmessung wurde mit einem FACS Calibur™ Gerät durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen CellQuest™ Pro Software. Dabei wurde der prozentuale Anteil der Zellen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt im Verhältnis zur Gesamtpopulation ermittelt.

3.3.8 Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Entstehung von DNA-Schäden, wie z. B. DNA-DSB, kommt es zur Phosphorylierung des Histons H2AX. Durch die lokale Chromatinmodifikation des γ H2AX bilden sich an den DNA-DSB die γ H2AX-Foci. Diese Foci können als Marker für DNA-Schäden verwendet werden, da sie die DNA-DSB im Verhältnis 1:1 repräsentieren [162]. Außerdem lassen sich die γ H2AX-Foci mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern leicht visualisieren und quantitativ bestimmen. In dieser Arbeit wurde hierfür eine Immunfluoreszenzfärbung, wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde ein Primärantikörper verwendet, der gegen das Zielprotein γ H2AX gerichtet ist. Im zweiten Schritt

wurde ein sekundärer Farbstoff-gekoppelter Antikörper eingesetzt, der den Antigen-Antikörper-Komplex bindet. Die fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffes ermöglichen den Nachweis der γ H2AX-Foci mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci erlaubt somit eine Aussage über das Ausmaß der induzierten DNA-Schäden.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden sterile runde Objektgläser in die Vertiefung einer 6-Well-Platte positioniert. Nachdem die Zellen, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, ausgesät und kultiviert wurden, erfolgte nach 24 h die Behandlung mit den Inhibitoren (siehe Abschnitt 3.1.4.1). Nach 48 h bzw. 72 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 10 min mit 3,7 % Formaldehyd fixiert und zur Rehydrierung dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die fixierten Zellen zur Vermeidung unspezifischer Antigenbindungen 4 h bei 37 °C mit Blocking-Puffer inkubiert. Der Primärantikörper Anti- γ H2AX wurde im Verhältnis 1:200 mit dem Blocking-Puffer verdünnt und für 30 min im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen, um ungebundene Antikörperreste zu entfernen. Danach erfolgte die gleichzeitige Gegenfärbung der DNA mit DAPI (0,5 μ g/ml) sowie die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 546 (Ziege- α -Kaninchen) für 30 min im Dunkeln. Die Zellen wurden daraufhin erneut mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen, mit dem Mounting Medium luftblasenfrei auf dem Objektträger befestigt und bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Aufnahme der Immunfluoreszenzbilder erfolgte mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Leica TCS SP8 (Leica Biosystems Imaging, Wetzlar, Deutschland).

Zur Quantifikation der γ H2AX-Foci wurden von drei verschiedenen Zellregionen drei bis fünf Bilder entlang der Z-Achse (*Z-stack*) mit einem 40x Objektiv (Auflösung: 1024x1024 Pixel, *Speed*: 400, *Line average*: 4) aufgenommen. Zur Aufnahme repräsentativer Bilder wurde analog dazu ein 63x Objektiv (Auflösung: 2048x2048 Pixel, *Speed*: 200, *Line average*: 4) verwendet. Von den aufgenommenen *Z-stacks* wurde ein *Overlay*-Bild erstellt und anschließend mittels ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) eine *Maximum Intensity Projection* durchgeführt, um ein zweidimensionales Bild zu erstellen, das die Pixel mit der höchsten Intensität aus jeder *Z-stack*-Aufnahme auswählt und zusammenfügt. Daraufhin erfolgte die Auswertung dieser Immunfluoreszenzaufnahmen mit dem frei zugänglichen *Foci Counter Tool* (<https://www.biologie.uni-konstanz.de/bioimaging-centre/service/image-analysis/bic-macro-toolkit/foci-counter/>) der Software ImageJ 1.48v [215]. Dabei wurden die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl γ H2AX-positiver Zellen bestimmt. Zellen mit ≥ 5 γ H2AX-Foci wurden hierbei als positiv gewertet.

3.3.9 *In vivo*-Chorioallantoismembran-Modell des Hühnereies

Zur Untersuchung der therapeutischen Relevanz sowie der Übertragbarkeit der *in vitro*-Beobachtungen auf *in vivo*-Modelle wurde die Wirksamkeit des CDK12/CDK13-Inhibitors THZ531 in einem Chorioallantoismembran (CAM)-Modell des Hühnereies analysiert. Dieses *in vivo*-Modell wird bereits sehr erfolgreich in der präklinischen Forschung angewandt und stellt eine Alternative zu den klassischen Mausmodellen dar [216, 217]. Die extraembryonale Chorioallantoismembran, die sich ab dem 4. Tag der Embryonalentwicklung ausbildet, dient hierbei als nährstoffreiche und stark vaskularisierte Umgebung, die eine optimale Voraussetzung für die Tumorbildung bietet. Darüber hinaus ist die CAM nicht innerviert, sodass eine schmerzfreie Tumorzelltransplantation und Tumorstadium möglich sind [218]. Zudem ist laut dem Tierschutzgesetz (TierSchG) und der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVerV) keine Genehmigung zur Durchführung des Tiermodells erforderlich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden für das CAM-Modell frisch befruchtete Eier kommerziell erworben (VALO Biomedica, Osterholz-Scharmbeck, Deutschland). Nach der Ankunft wurden die Eier mit der spitzen Seite nach unten in einen digitalen Motorbrüter (Easy 250, J. Hemel Brutgeräte, Verl-Kaunitz, Deutschland) gelegt und unter gelegentlichem Wenden bei 37 °C und etwa 45 % bis 55 % Luftfeuchtigkeit bebrütet. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Entwicklung des Kükenembryos und wird daher als Tag 0 der Embryonalentwicklung definiert [218]. An Tag 4 der Embryonalentwicklung wurde zur Vorbereitung der *in ovo*-Tumorimplantation vorsichtig ein kleines Loch in die Eierschale geschnitten und anschließend mit Leukosilk®-Streifen versiegelt. Um den 7. Tag der Embryonalentwicklung hat sich ein Netzwerk von Blutgefäßen innerhalb der CAM gebildet. An diesem Tag wurde die CAM mit Hilfe einer Kanüle eingeritzt und anschließend kleine elastische Latexringe (DENTAURUM, Ispringen, Deutschland) um diese Region gesetzt. Danach wurde zur Tumorimplantation eine Zellsuspension von 6×10^6 DU-145-Zellen pro Ei zusammen mit 25 μ l Matrigel® in die Ringe gegeben. An Tag 11 und 13 wurden die Eier mit 200 nM THZ531 oder mit einer entsprechenden Kontrolllösung behandelt. Das Experiment wurde drei Tage vor dem Schlüpfen der Küken an Tag 18 beendet. Hierzu wurden die Embryos mit 50 mg/ml Ketamin (hameln pharma, Hameln, Deutschland) pro Ei euthanasiert. Die entstandenen Tumorengrafts wurden reseziert, mit 4 %iger Formalinlösung fixiert und wie in Abschnitt 3.3.11.2 beschrieben in Paraffin eingebettet und immunhistochemisch gefärbt.

3.3.10 *Ex vivo*-Gewebekulturmodell

Eine der zahlreichen Herausforderungen in der onkologischen Forschung ist es, reproduzierbare, zuverlässige und praktikable Modelle zu finden, die in der Lage sind, das individuelle Therapieansprechen eines Patienten vorherzusagen. Ein Modell, welches die bestehende Lücke zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Modellen schließt, ist das *ex vivo*-Gewebekulturmodell. Die Anwendung eines solchen Gewebekulturmodells bietet gegenüber *in vitro*-Versuchen mehrere Vorteile, welche die Etablierung neuer Therapieansätze direkt am Patientenmaterial ermöglichen: Zum einen bleiben das ursprüngliche Tumorstroma und die dreidimensionale Tumorarchitektur erhalten, zum anderen werden die Heterogenität und die Mikroumgebung des Tumors berücksichtigt [219, 220]. In dieser Arbeit wurde Tumorgewebe von zwölf Patienten analysiert, bei denen ein PCa diagnostiziert wurde und die sich zwischen 2020 und 2023 einer radikalen Prostatektomie in der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universitätsmedizin Mainz unterzogen haben. Alle Patienten hatten vor der Operation keine neoadjuvante Therapie erhalten. Die Gewebeentnahme wurde durch das Ethikvotum der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz für die Gewebebank der Universitätsmedizin Mainz genehmigt (837.359.17 (11193), 7. August 2017). Alle Daten wurden anonymisiert ausgewertet.

Direkt nach der Operation wurde PCa-Gewebe in Form eines Zylinders (Durchmesser: 6 mm; Länge: ca. 10 mm) mit einem definierten Stanzwerkzeug (KAI Medical Biopsy Punch, Solingen, Deutschland) von der Gewebebank der Universitätsmedizin Mainz aus dem Operationspräparat entnommen und in KHB-Puffer gelagert. Um sicherzustellen, dass die Stanze Tumorgewebe enthielt, wurde vor der weiteren Bearbeitung ein Schnellschnitt durchgeführt. Bei diesem Schnellverfahren zur feingeweblichen Diagnostik erfolgte die Beurteilung des Gewebes durch einen Pathologen mittels der histologischen Standardfärbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E, Abschnitt 3.3.11.2). Daraufhin wurde das frische PCa-Gewebe mit einem Vibratom VT1200 (Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland), das mit einer Rasierklinge (Wilkinson Sword, Solingen, Deutschland) versehen war, in 300 µm dicke Scheiben geschnitten (Amplitude: 2,5; Schnittgeschwindigkeit 0,4 mm/s). Von jeder Tumorstanze wurden der erste und der letzte Schnitt sofort in 4 %iger Formalinlösung fixiert. Die übrigen Gewebeschnitte wurden randomisiert und den Kontroll- und Behandlungsgruppen zugeordnet. Danach wurden die Gewebeschnitte auf Filtermembraneinsätzen mit einer Porengröße von 0,4 µm in 6-Well-Platten gelegt und in DMEM-Medium (ATCC, Manassas, FL, USA, 30-2002) mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die 6 Well-Platten wurden unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂) auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach 1 h wurde das Medium erneuert. Anschließend wurden die Gewebeschnitte alle weiteren 24 h, wie in Abschnitt 3.1.4.1 angegeben, neu behandelt, wobei eine angepasste Konzentration von THZ531 (500 nM) verwendet wurde. Nach 72 h wurden die Gewebeschnitte mit 4 %iger Formalinlösung fixiert und wie in Abschnitt 3.3.11.2 beschrieben in Paraffin eingebettet und immunhistochemisch gefärbt.

3.3.11 Immunhistochemische Analyse von Zellpellets, Gewebe und Tissue Microarray

Bei der Immunhistochemie (IHC) handelt es sich um eine Methode zur Identifizierung und Visualisierung spezifischer Antigene. Sie wird häufig verwendet, um die Verteilung und Lokalisierung von Biomarkern in Zellen und/oder deren histologischem Kontext im Gewebe zu bewerten.

3.3.11.1 Herstellung von Zellpellets

Zur immunhistochemischen Bestimmung semiquantitativer Proteinexpressionslevel sowie zur Etablierung von IHC-Färbeprotokollen wurden Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete (FFPE) Zellpellets der PCa-Zelllinien hergestellt. Dazu wurden die Zelllinien in eine 10 cm-Schale ausgesät und unter Standardbedingungen für 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}) gewaschen und mit Accutase abgelöst. Die Accutase wurde anstelle von Trypsin-EDTA verwendet, um die Proteolyse der Zellmembran zu verhindern. Die abgelösten Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit einer 4 %igen Formalinlösung für 15 min bei 37 °C. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 500 µl Ethanol (100 %) resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Daraufhin wurden 100 µl von 30 % FBS in PBS zur Ethanol-Zelllösung gegeben. Um kompakte Zellpellets zu erhalten, wurden die Zellen bei 5000 rpm für 5 min bei 4 °C erneut zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das Zellpellet in ein mit Wasser befeuchtetes Stück Vliesstoff eingewickelt und in eine Kapsel gelegt. Die Kapsel wurde bis zur Paraffineinbettung in einer 4 %igen Formalinlösung gelagert.

3.3.11.2 Immunhistochemische Färbung von FFPE-Zellpellets und Gewebe

In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen an FFPE-Zellpellets und humanem PCa-Gewebe durchgeführt. Letzteres wurde von der Gewebebank der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt, die ebenfalls die Immunfärbungen anfertigte. Die Proben wurden zunächst in Formalin fixiert und anschließend in Paraffinwachs eingebettet. Formalin ermöglicht dabei die Erhaltung der morphologischen Details des Gewebes und gewährleistet zudem eine lange Lagerungsfähigkeit. Durch die Einbettung der Proben in Paraffinwachs wird das Schneiden von 2 µm dicken Schnitten mit einem Mikrotom erleichtert. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, getrocknet und mit Xylol entparaffiniert. Danach wurden die Proben vor der Färbung in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Bei der Verwendung von Formalin kommt es zu Vernetzungsreaktionen durch die Bildung von Methylenbrücken, die zu einer Deformation der Proteinstruktur und damit zur Maskierung der Antigene führen können [221]. Aus diesem Grund wird üblicherweise nach der Rehydrierung eine Antigen-Demaskierung angewandt. Hierfür wurde

eine hitzeinduzierte Epitop- oder Antigen-Demaskierung bei verschiedenen pH-Werten (pH 6 oder pH 9) mit der entsprechenden EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution durchgeführt. Die Antigen-Demaskierung erfolgte in der Regel bei pH 6 für 30 min. Für den Anti-PSA-Antikörper wurde die Demaskierung jedoch bei pH 9 für 20 min durchgeführt. Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit dem im Kit enthaltenen endogenen Peroxidase-Blocker. Mittels des Peroxidase-Blockers wird versucht, die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, ohne dass zusätzliche Blockierungsschritte erforderlich sind. Die Immunfärbung wurde mit einem automatisierten Färbesystem (DAKO Omnis, Agilent, Santa Clara, Kalifornien) und dem EnVision™ FLEX+ Kit gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die Schnitte 30 min lang im Primäantikörper inkubiert, mit Ausnahme des Anti-Ki67-Antikörpers (20 min). Danach folgte ein Waschschriff und eine 20-minütige Inkubation mit dem speziestypischen Sekundäantikörper bei Raumtemperatur. Für den Antikörpernachweis wurde das Nachweisreagenz EnVision™ FLEX/HRP verwendet. Diese gepufferte Lösung enthält Dextran, das die Bindung von HRP- und Sekundäantikörper-Molekülen ermöglicht. Das im Kit enthaltene Diaminobenzidin (DAB, EnVision™ FLEX DAB + Chromogen) erzeugt in Verbindung mit dem H₂O₂-haltigen EnVision™ FLEX Substratpuffer eine bräunliche Färbung an der Stelle des Zielantigens. Zur besseren Darstellung und Differenzierung der verschiedenen Gewebemorphologien wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin unter Verwendung des Dako Mayer's Hematoxylin durchgeführt. Das Hämatoxylin färbt hierbei die basophilen Strukturen wie die Zellkerne blau, während Eosin vor allem Bestandteile des Zytoplasmas magentafarben anfärbt. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden mit dem Dako Mounting Medium (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA, CS703) eingedeckt. Zur softwarebasierten Auswertung der gefärbten Schnitte wurden diese schließlich mit einem Objektträger-Scanner (NanoZoomer 2.0HT, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu) bei 20-facher Vergrößerung digitalisiert.

3.3.11.3 Etablierung der immunhistochemischen Färbung unterschiedliche Biomarker

Zur Etablierung der immunhistochemischen Färbung von CDK12 und verschiedenen Zielmoleküle sowie PCa-spezifischer Marker wurden die entsprechenden Antikörper zuerst an FFPE-Zellpellets der Wildtyp-PCa-Zelllinien getestet. Um die Antikörperspezifität zu untersuchen und optimale Färbeergebnisse zu erzielen, wurden sowohl die Gesamtexpression als auch das Expressionsniveau nach der Suppression von CDK12 berücksichtigt (Abschnitt 3.1.3). Da sich die optimale Antikörperverdünnung zwischen FFPE-Zellpellets und Gewebe unterscheiden kann, wurden die Antikörper zusätzlich an Schnitten der Gewebekultur und des Tissue Microarrays (TMA) getestet. Alle immunhistochemischen Färbungen der vorliegenden Arbeit wurden mit den evaluierten Färbebedingungen durchgeführt.

3.3.11.4 Evaluierung der CycK- und CDK12-Expression in einem Tissue Microarray

Für den TMA wurden Gewebeproben von 300 Patienten mit einem diagnostizierten PCa, von der Gewebebank der Universitätsmedizin Mainz in Übereinstimmung mit den Bestimmungen der Gewebebank und dem Ethikvotum der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (837.360.16 (10679); 28. Oktober 2016) zur Verfügung gestellt. Alle Tumorproben stammen von Patienten, bei denen zwischen 2015 und 2018 eine radikale Prostatektomie durchgeführt wurde und die keine neoadjuvante Therapie erhalten haben. Die Tumorproben wurden am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz nach dem ISUP 2014/WHO 2016 Grading-System klassifiziert und beurteilt [54, 55]. Der TMA enthält 1200 Primärtumorproben aus jeweils zwei unterschiedlichen, morphologisch repräsentativen Geweberegionen der PCa-Patienten. Zusätzlich wurden, sofern verfügbar, sowohl Metastasengewebe (n=34) als auch Gewebe von *high-grade* PINs (n=21) von denselben Patienten in die TMA-Analyse inkludiert. Für die Analyse wurden die klinisch-pathologischen Daten der Patienten einschließlich Gleason-Score, ISUP/WHO-Grading, TNM-Klassifikation und der perineuralen Invasion berücksichtigt.

Zur Bewertung von CycK und CDK12 als potenzielle Biomarker wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Anti-CycK- und einem Anti-CDK12-Antikörper, wie in Abschnitt 3.3.11.2 beschrieben, durchgeführt. Die gefärbten Objektträger wurden mit einem Objektträger-Scanner (NanoZoomer) digitalisiert und jeder Tumorcure einzeln mit der digitalen Bildanalyse-Software QuPath, wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, ausgewertet [206]. Im Vorfeld wurde zur Beurteilung der CycK- und CDK12-Expression die Intensität beider Färbungen bestimmt, um Tumorzellen als negativ, schwach, mittel oder stark positiv zu kategorisieren.

3.4 Software-basierte und Statistische Analysen

3.4.1 Digitale Bildgebungsanalyse mit QuPath

Zur Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebekulturschnitte, der resezierten Tumorxenografts und des TMAs wurde die digitale Bildanalysesoftware QuPath verwendet [206].

3.4.1.1 Auswertung der Gewebekulturschnitte und Tumorxenografts des CAM-Modells

Um die Auswirkungen der Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und des AR-Signalwegs zu untersuchen, wurde die immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 und der Spaltprodukte der Caspase-3 als Apoptosemarker wie folgt ausgewertet: Im ersten Schritt wurden die Tumorareale der Gewebeschnitte oder der resezierten Tumorxenografts manuell markiert und nekrotisches oder nicht-neoplastisches Gewebe ausgeschlossen. Daraufhin wurden zur korrekten Identifizierung der Tumorzellen mehrere Klassifizierungsschritte mit Hilfe von Trainings- und automatisierten Algorithmen durchgeführt. Der Befehl *Cell detection* wurde verwendet, um die Zellen innerhalb der markierten Areale zu detektieren. QuPath erkennt dabei sowohl Zellgrenzen als auch Konturen der Zellkerne und erstellt für jede „Zelle“ eine Datensammlung mit Parametern zur Größe, Kantenlänge, Anzahl der Kanten und Färbeintensitäten von Zellkern und Zytoplasma sowie von abhängigen Größen wie Fläche und durchschnittlicher Färbeintensität. Diese gesammelten Daten werden genutzt, um mit Hilfe des *Cell classification* Tools einen sogenannten *Random trees classifier* manuell zu trainieren, was eine Differenzierung von Tumor-, Stroma- oder Immunzellen ermöglicht. Im Anschluss daran wurden die einzelnen Tumorzellen anhand eines manuell festgelegten Intensitätsschwellenwerts, der auf die mittlere optische Dichte (OD) der DAB-induzierten Braunfärbung angewandt wurde, als positiv oder negativ eingestuft. Die OD gibt in diesem Zusammenhang ein Maß für die Extinktion eines Objekts bei einer bestimmten Anzahl von Pixeln an. Der prozentuale Anteil Ki67- oder Caspase-3-positiver-Tumorzellen eines jeden Gewebeschnittes und der Tumorxenograftschnitte wurden zur Auswertung verwendet.

Zur Analyse der Zellviabilität der Tumorxenografts erfolgte die Quantifizierung der vitalen und nekrotischen Tumorbereiche anhand der H&E-gefärbten Schnitte. Hierzu wurden zunächst die Tumorareale manuell markiert und entsprechend ihrer Charakteristik als vital oder nekrotisch klassifiziert. Daraufhin wurde der prozentuale Anteil des vitalen und nekrotischen Bereichs der detektierten Fläche (mm²) des Tumorxenografts zur Auswertung herangezogen.

3.4.1.2 Auswertung des TMA – Quantifizierung der CycK- und CDK12-Expression

Zunächst wurde das automatisierte *TMA dearrayer* Tool bei allen digitalisierten Schnitten des TMAs angewandt, um die jeweiligen Gewebe-Cores zu identifizieren. Das daraus resultierende TMA-Raster wurde manuell überprüft und gegebenenfalls angepasst, um fehlende oder fehlerhafte Cores, Cores ohne neoplastisches Gewebe oder auffällige Artefakte wie Gewebefalten auszuschließen. Daraufhin wurden zur korrekten Identifizierung der Tumorzellpopulation mehrere Klassifizierungsschritte mit Hilfe von Trainings- und automatisierten Algorithmen, wie bereits in Abschnitt 3.4.1.1 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden manuell mehrere Intensitätsschwellenwerte festgelegt, um die Tumorzellen nach ihrer Färbeintensität anhand der mittleren OD der DAB-induzierten Braunfärbung zu klassifizieren. Die Färbeintensität jedes Tumorcors und die Anzahl positiv-gefärbter Tumorzellen wurden als sogenannter Histo-Score (H-Score) wie folgt berechnet [206]:

$$[1x (\% \text{ schwach gefärbte Tumorzellen}) + 2x (\% \text{ mäßig gefärbte Tumorzellen}) \\ + 3x (\% \text{ stark gefärbte Tumorzellen})]$$

Die Ergebnisse des H-Score lagen hierbei im Bereich von 0 (100 % negative Tumorzellen) bis 300 (100 % stark positive Tumorzellen).

3.4.2 Statistische Analyse der *in vitro*-Daten

Die statistische Analyse der *in vitro*-Daten wurde mittels der GraphPad Prism Software, Version 9.4.0 für Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA; USA) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem gepaarten zweiseitigen Student's t-Test ausgewertet. Für die Analyse wurden der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (\pm s.d.) von drei oder vier biologischen Replikaten verwendet. Die p-Werte ab $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.4.3 Statistische Analyse der *ex vivo*-Daten

Die statistische Analyse der *ex vivo*-Daten wurde ebenfalls mit der GraphPad Prism Software, Version 9.4.0 für Windows durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde hierbei mit dem Wilcoxon signed-rank Test ausgewertet. Für die Analyse wurden der Mittelwert und die Standardabweichung des Mittelwerts (\pm s.d.) von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten verwendet. Die p-Werte ab $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.4.4 Statistische Analyse der *in vivo*-Daten des CAM-Modells

Die statistische Analyse der *in vivo*-Daten wurde ebenfalls mit der GraphPad Prism Software, Version 9.4.0 für Windows durchgeführt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt, um die Signifikanz des Anteils der nekrotischen Areale des Tumorxenografts zu ermitteln. Der ungepaarte Welch's t-Test wurde für die statistische Analyse der Ki67- und gespaltenen Caspase-3-positiven Tumorzellen verwendet. Die p-Werte ab $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet ($*p < 0,05$).

3.4.5 Statistische Analyse der TMA-Auswertung

Um die Korrelation der CycK- und CDK12-Expression mit verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen im Hinblick auf die Verwendung als prognostische Biomarker zu beurteilen, wurden unterschiedliche statistische Analysen mit der Statistiksoftware R (Version 4.2.2, 10/2022) durchgeführt [222]. Der Kruskal-Wallis-Test wurde für die statistische Analyse der CycK- oder CDK12-Expression des ISUP/WHO-Gradings verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt, um die Unterschiede der CycK- oder CDK12-Expression zwischen den weiteren klinisch-pathologischen Merkmalen zu vergleichen. Die p-Werte ab $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der PCa-Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die nachfolgenden Analysen zur Ermittlung der funktionellen Rolle der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe im PCa anhand fünf verschiedener PCa-Zelllinien, die sich hinsichtlich ihres genomischen Profils unterscheiden, durchgeführt. Hierbei gehören die Zelllinien DU-145, LNCaP und PC-3 zu den am besten charakterisierten und am häufigsten verwendeten Zelllinien. Ergänzend dazu wurde die C4-2B-Zelllinie, ein Derivat der LNCaP-Zelllinie und LAPC4, die beide aus Xenograft-Modellen von SCID-Mäusen gewonnen wurden, ebenfalls in die Analysen inkludiert [197, 199, 202]. Eine Übersicht des genetischen Profils dieser Zelllinien ist in der Tabelle 2-2 dargestellt.

Zunächst wurden die genetischen Merkmale der PCa-Zellen, einschließlich des endogenen Expressionsstatus des ARs, des PSAs sowie des Transkriptionsfaktors p53 durch eine eigene Immunblot-Analyse verifiziert. Es ist deutlich zu erkennen, dass die androgenunabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 keinen funktionsfähigen AR besitzen. Zusätzlich konnte in diesen Zelllinien auch keine PSA-Expression detektiert werden, da das PSA ein Zielgen des AR ist und androgenabhängig exprimiert wird. Im Gegensatz dazu exprimieren die androgensensitiven Zelllinien LNCaP und C4-2B sowie die androgenabhängige LAPC4-Zelllinie sowohl den AR als auch das PSA. Die Expression des p53-Proteins wurde nur in den Zelllinien DU-145 und LAPC4 nachgewiesen werden (Abbildung 4-1 A). Dies ist darauf zurückzuführen, dass in beiden Zelllinien das *TP53*-Gen mutiert ist (Tabelle 2-2) [200]. Durch eine Mutation im *TP53*-Gen kommt es zu einer verminderten Ubiquitinierung, was zu einer verlängerten Halbwertszeit des Proteins führt und dessen Detektion in der Immunblot-Analyse ermöglicht [223]. In den Zelllinien LNCaP und C4-2B wurde keine p53-Proteinexpression detektiert, da beide Zelllinien ein Wildtyp-*TP53*-Gen besitzen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Zelllinie PC-3 eine Deletion im *TP53*-Gen aufweist, die zu einer Leserastermutation führt und ein Stoppcodon verursacht. Daher ist die Zelllinie PC-3 nicht in der Lage, das p53-Protein zu exprimieren (Tabelle 2-2) [224].

Zur weiteren Charakterisierung der PCa-Zelllinien wurde die endogene Proteinexpression von CycK und der assoziierten Kinasen CDK12 und CDK13 bestimmt. In allen untersuchten Zelllinien konnte eine Expression der genannten Proteine mittels Immunblot-Analyse nachgewiesen werden. C4-2B-Zellen wiesen hierbei die geringste CycK-Proteinexpression auf. Die niedrigste CDK12-Expression konnte in der Zelllinie DU-145 beobachtet werden, während CDK13 am geringsten in LAPC4-Zellen exprimiert wurde (Abbildung 4-1 B).

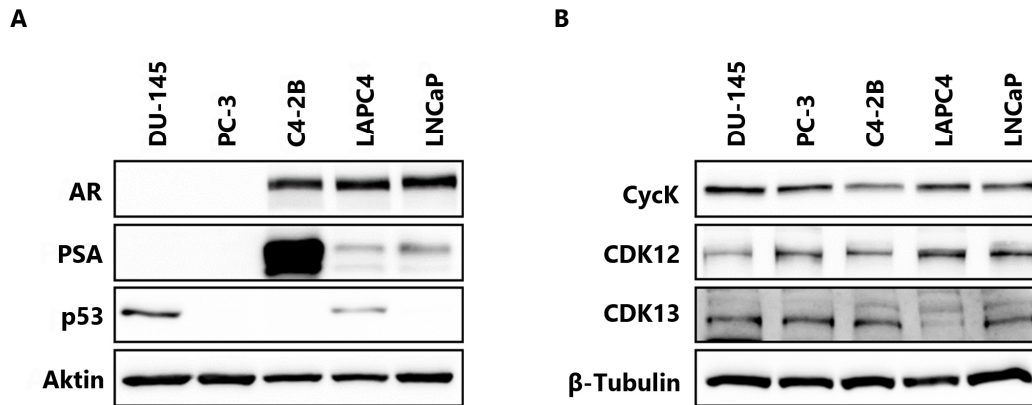


Abbildung 4-1 Endogene Proteinexpression von AR, PSA, p53, CycK, CDK12 und CDK13 in verschiedenen PCa-Zelllinien. Die Immunblot-Analyse der endogenen Proteinexpression von (A) AR, PSA und p53 und (B) CycK, CDK12 und CDK13 wurde an Gesamtzellextrakten der Zelllinien DU-145, PC-3, C4-2B, LAPC4 und LNCaP durchgeführt. 40 µg Gesamtprotein wurde auf einem 10 bzw. 8 %igen SDS-PAGE Gel analysiert. Aktin und β-Tubulin dienten als Ladekontrollen. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

4.2 Auswirkungen der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition

Die CycK-CDK12- und CycK-CDK13-Komplexe spielen eine entscheidende Rolle bei der Transkription, indem sie die Phosphorylierung der CTD der RNAP II regulieren können. Dabei phosphorylieren sie vorwiegend Ser2, Ser5 und Ser7 der Konsensus-Sequenz (Y₁S₂P₃T₄S₅P₆S₇). Dies beeinflusst sowohl den Initiations- als auch den Elongationsprozess sowie die Prozessivität der RNAP II, was unterschiedliche transkriptionelle Prozesse zur Folge hat [111, 113, 137]. Zur funktionellen Analyse der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe in PCa-Zelllinien wurde der Inhibitor THZ531 verwendet [113]. Dieser bindet selektiv und kovalent an die beiden Kinasen CDK12 und CDK13 und hemmt deren Enzymaktivität (Abschnitt 1.2.3).

4.2.1 Nachweis der Inhibitor-Aktivität von THZ531

Zum Nachweis der Inhibitor-Aktivität wurden die Phosphorylierungsstellen Ser2, Ser5 und Ser7 innerhalb der CTD der RNAP II mittels Immunblot-Analyse nach der Behandlung mit THZ531 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (6 h und 12 h) untersucht. Eine dosisabhängige Beeinflussung der CTD-Phosphorylierung der RNAP II konnte nach der Behandlung mit THZ531 in allen PCa-Zelllinien beobachtet werden. Der größte Effekt von THZ531 wurde bei Ser2 festgestellt. Hier konnte die geringste Phosphorylierung nachgewiesen werden. Nach einer 12-stündigen Behandlung mit der höchsten Konzentration von THZ531 konnte ebenfalls eine deutlich verminderte Phosphorylierung an Ser5 und Ser7 beobachtet werden. Die Proteinexpression der RNAP II wurde durch THZ531 nicht beeinflusst (Abbildung 4-2).

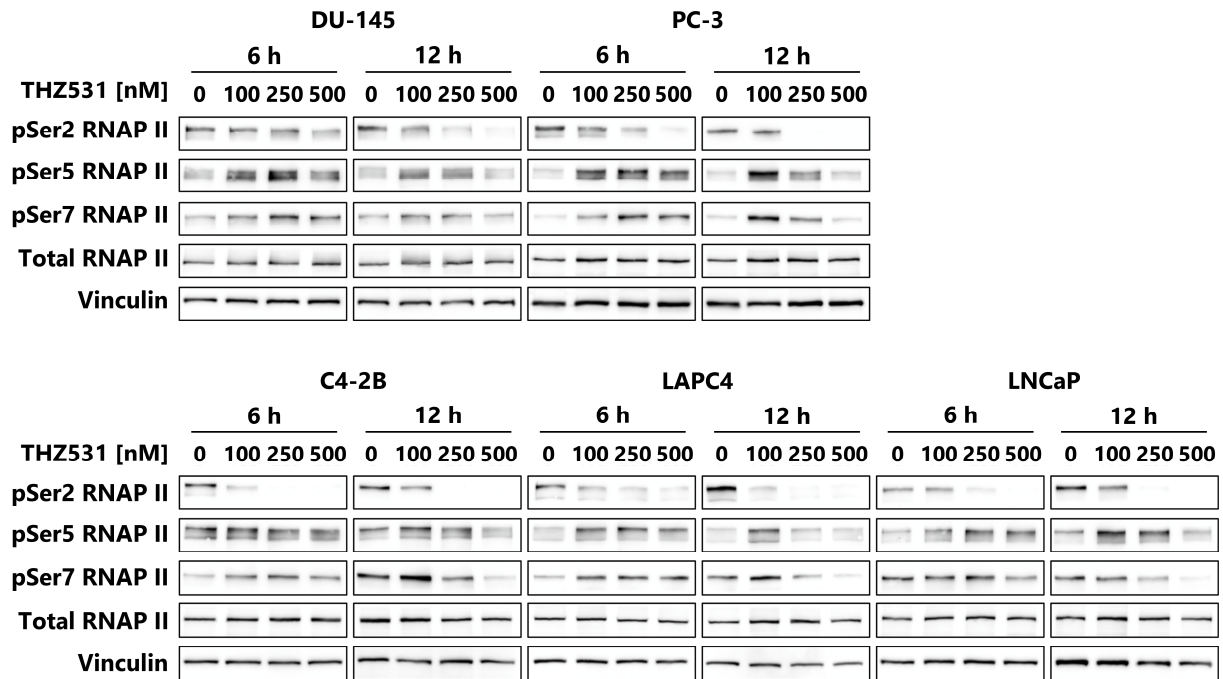


Abbildung 4-2 THZ531 beeinflusst die Phosphorylierung der CTD der RNAP II in den PCa-Zelllinien. Die Zelllinien DU-145 und PC-3 (oben) sowie C4-2B, LAPC4 und LNCaP (unten) wurden für 6 h und 12 h mit THZ531 (100, 250, 500 nM) behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Immunblot-Analyse der Phosphorylierung von Serin an Position 2 (pSer2 RNAP II), 5 (pSer5 RNAP II) und 7 (pSer7 RNAP II) der CTD sowie die Proteinexpression der RNAP II wurden an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 20 µg Gesamtprotein wurde auf einem 8%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Vinculin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

4.2.2 Effekte von THZ531 auf die Proliferation und das Überleben von PCa-Zelllinien

Im vorherigen Abschnitt konnte die spezifische inhibitorische Wirkung von THZ531 auf die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe in allen PCa-Zelllinien verifiziert werden. Anschließend erfolgte die funktionelle Analyse der Auswirkungen von THZ531. Zu diesem Zweck wurden die PCa-Zelllinien DU-145, PC-3, C4-2B, LAPC4 und LNCaP zunächst für 72 h mit steigenden Konzentrationen von THZ531 (0 – 100 nM) behandelt. Um die Zellviabilität zu ermitteln, wurde anschließend die Gesamtzellzahl an vitalen Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Mit steigender THZ531-Konzentration zeigten alle Zelllinien eine signifikante Abnahme der Zellzahl. Lediglich die LNCaP-Zelllinie wies eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber der Behandlung auf (Abbildung 4-3).

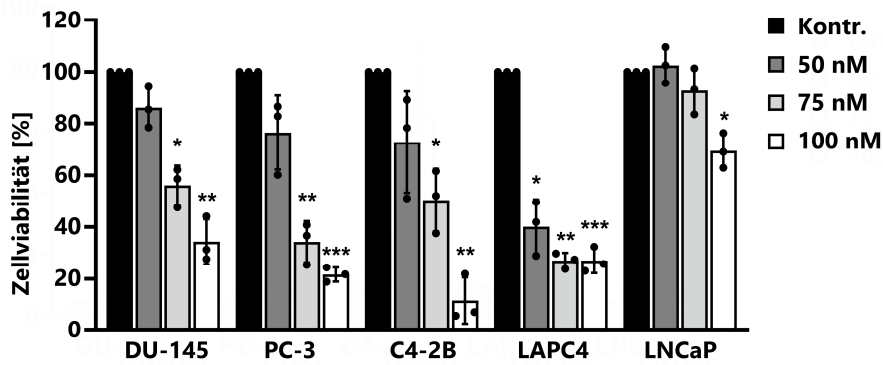


Abbildung 4-3 THZ531 reduziert die Zellviabilität der PCa-Zelllinien. PCa-Zellen wurden mit THZ531 (50, 75, 100 nM) behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) verglichen. Zur Ermittlung der Zellviabilität wurde 72 h nach der Behandlung die Zellzahl bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Behandlung versus Kontrolle). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Um zu untersuchen, ob die verminderte Zellviabilität nach der THZ531-Behandlung auf die Induktion des apoptotischen Zelltods zurückzuführen ist, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Dazu wurden die mit THZ531 (0 - 100 nM) behandelten PCa-Zellen mit der Annexin V/7-AAD-Färbung spezifisch markiert und anschließend die Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die gleichzeitige Färbung mit Annexin V und 7-AAD ermöglichte es, sowohl früh- als auch spät-apoptotische Zellen zu identifizieren, sodass der prozentuale Anteil Annexin V/7-AAD-positiver apoptotischer Zellen im Verhältnis zur Gesamtpopulation bestimmt wurde. Die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe mit der höchsten THZ531-Konzentration (100 nM) verursachte eine erhöhte Apoptoserate in DU-145- und C4-2B-Zellen (Abbildung 4-4 A). Zusätzlich wurde die Induktion des apoptotischen Zelltods durch die Detektion der charakteristischen Caspase-3-Spaltung mittels Immunblot-Analyse untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse konnten die Caspase-3-Spaltprodukte dosisabhängig in DU-145- und C4-2B-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-4 B). In der Zelllinie PC-3 wurden die Caspase-3-Spaltprodukte nur sehr schwach detektiert. Im Gegensatz dazu konnte in LAPC4-Zellen, trotz einer signifikanten Abnahme der Zellzahl, keine Apoptoseinduktion in der Durchflusszytometrie sowie in der Immunblot-Analyse beobachtet werden. Verglichen mit den anderen PCa-Zelllinien wies die Zelllinie LNCaP keinerlei Anzeichen der Apoptose als Reaktion auf die THZ531-Behandlung auf (Abbildung 4-4).

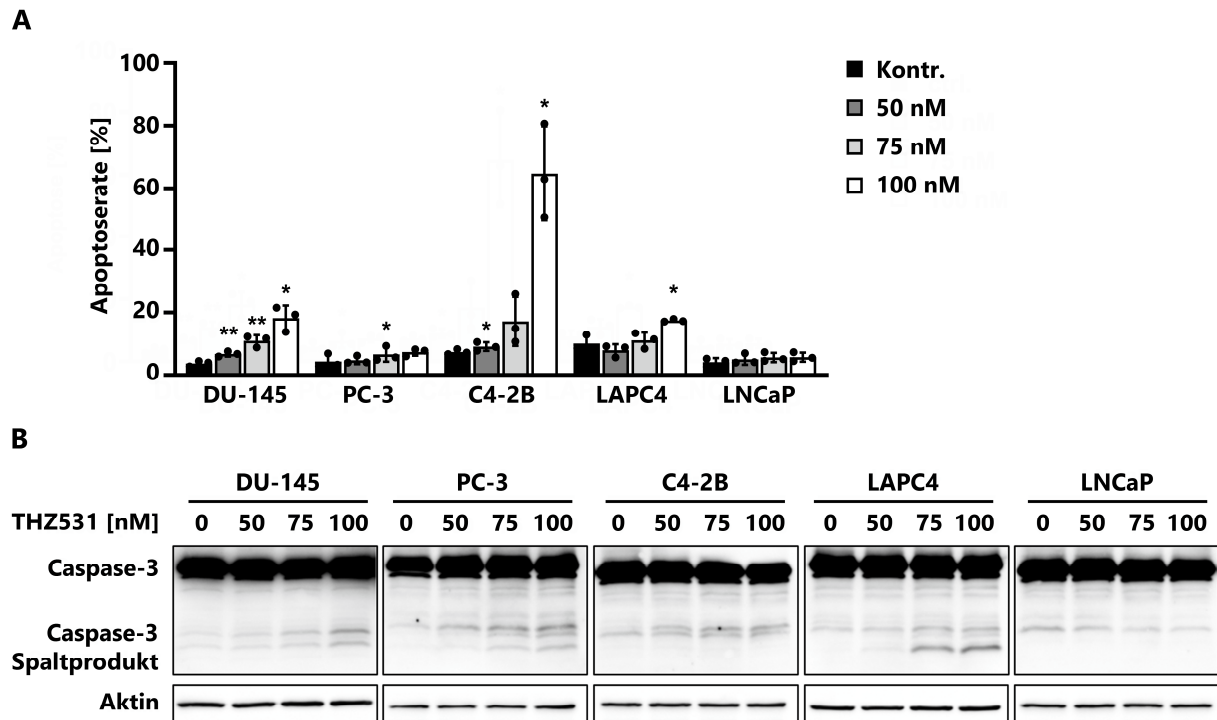


Abbildung 4-4 THZ531 induziert Apoptose in DU-145- und C4-2B-Zellen. (A-B) PCa-Zellen wurden für 72 h mit THZ531 (50, 75, 100 nM) behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) verglichen. **(A)** Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und die Apoptoserate anschließend mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; Behandlung versus Kontrolle). **(B)** Zum Nachweis der Apoptose wurde eine Immunblot-Analyse von Caspase-3 (p32) und der Caspase-3-Spaltprodukte (p19/17) an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 μ g Gesamtprotein wurde auf einem 15%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Da nach der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition lediglich vereinzelt die Apoptoseinduktion in den PCa-Zelllinien beobachtet werden konnte, wurde als Nächstes untersucht, ob die THZ531-vermittelte Abnahme der Zellviabilität durch einen veränderten Ablauf der einzelnen Zellzyklusphasen bedingt sein könnte. Um die Zellzyklusverteilung der PCa-Zelllinien zu analysieren, wurden diese 72 h nach der THZ531-Behandlung mit BrdU inkubiert, das während der S-Phase in neu synthetisierte DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird. Die anschließende Färbung mit einem fluoreszierenden FITC-konjugierten Anti-BrdU-Antikörper und der Gegenfärbung mit 7-AAD ermöglichten die durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusphasen (G1, S und G2/M) der jeweiligen Zelllinien. Zur Quantifizierung der einzelnen Zellzyklusphasen der PCa-Zellen wurde der prozentuale Anteil an Zellen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt im Verhältnis zur Gesamtpopulation ermittelt.

In den Zelllinien PC-3 und LAPC4, die zuvor keine bis schwache THZ531-induzierte Apoptose gezeigt hatten, konnte ein deutlicher Arrest des Zellzyklus beobachtet werden. THZ531 verursachte in beiden Zelllinien eine signifikante Zunahme des Anteils an Zellen in der G2/M-Phase sowie eine Abnahme der Zellpopulation in der G1-Phase. Parallel dazu wurde bei LAPC4-Zellen eine signifikante Reduktion der Zellen in der S-Phase nach der THZ531-Behandlung

nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass die durch THZ531 verursachte verminderte Zellviabilität die Zellproliferation hemmt. Bei der Betrachtung der Zellzyklusverteilung in den Zelllinien DU-145, C4-2B und LNCaP konnte keine signifikante Änderung nach der Behandlung mit THZ531 festgestellt werden (Abbildung 4-5).

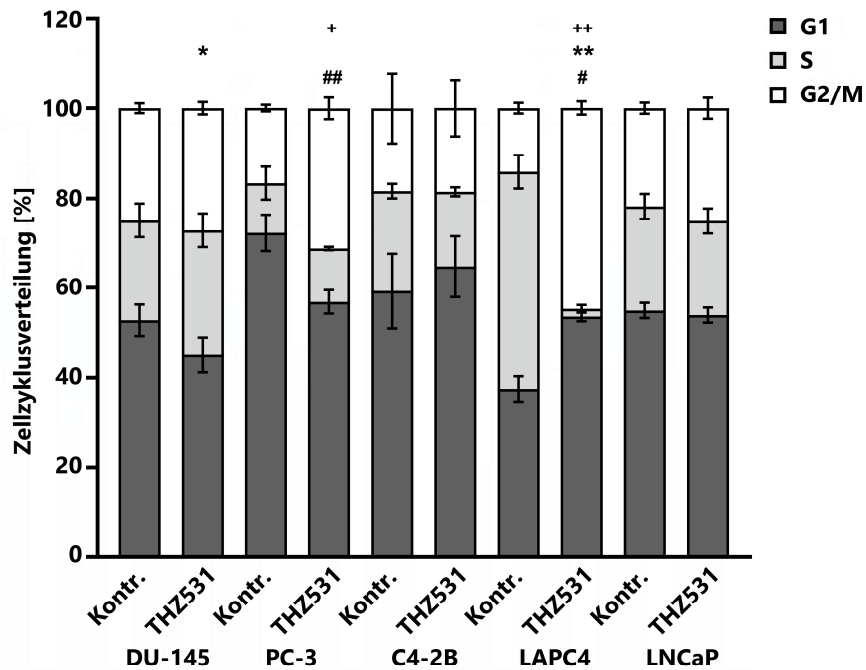


Abbildung 4-5 THZ531 verursacht einen Zellzyklusarrest in PC-3- und LAPC4-Zellen. PCa-Zellen wurden für 72 h mit 100 nM THZ531 behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) verglichen. Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurden die Zellen nach der Behandlung für 30 min mit BrdU inkubiert und anschließend mit einem FITC-konjugierten Anti-BrdU-Antikörper gefärbt. Der DNA-Gehalt wurde mit der 7-AAD-Färbung und nachfolgender durchflusszytometrischen Analyse bestimmt. Danach erfolgte die entsprechende Quantifizierung der einzelnen Zellzyklusphasen (G1, S und G2/M) der Zellpopulation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, G1 versus Kontrolle ($\#p < 0,05$; $\#\#p < 0,01$); S versus Kontrolle ($*p < 0,05$; $*p < 0,01$) und G2/M versus Kontrolle ($+p < 0,05$; $++p < 0,01$)). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

4.2.3 Effekte von THZ531 auf Tumorxenografts im CAM-Modell des Hühnereies – *in vivo*

In den vorherigen Abschnitten konnte beobachtet werden, dass die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe mit THZ531 sowohl anti-proliferative als auch pro-apoptotische Effekte in den PCa-Zelllinien verursachte. Als Nächstes wurde überprüft, ob sich die Auswirkungen der THZ531-Behandlung ebenfalls auf *in vivo*-Experimente übertragen lassen. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit das Hühnerei-CAM-Modell verwendet, das bereits als *in vivo*-Modell in der präklinischen Forschung angewandt wird [216, 217]. In früheren Studien konnte das CAM-Modell erfolgreich zur Analyse des Tumorwachstums, der Tumordinvasion, der Angiogenese und der Metastasierung von verschiedenen Tumorzelllinien und Geweben eingesetzt werden. Darüber hinaus wurde es ebenfalls zur Testung neuartiger Medikamente gegen maligne Erkrankungen verwendet [217, 225-227]. Die namensgebende extraembryonale Chorioallantois-membran bildet sich ab dem 4. Tag der Embryonalentwicklung, indem sich die Allantoisblase des Kükenembryos vergrößert und mit der angrenzenden mesodermalen Schicht des Chorions zur CAM verschmilzt. Die stark vaskularisierte CAM ist durch zwei Arterien und eine Vene mit dem embryonalen Kreislauf verbunden. Diese einzigartige, nährstoffreiche und stark durchblutete Umgebung bietet optimale Bedingungen für die Tumorbildung und erhöht damit die Effizienz der Tumorzelltransplantation [225].

Um die Auswirkungen von THZ531 im CAM-Modell zu analysieren, wurden am 7. Tag der Embryonalentwicklung des Hühnereies DU-145-Zellen auf die CAM implantiert. An den Tagen 11 und 13 wurden die Eier mit 200 nM THZ531 oder mit einer entsprechenden Kontrolllösung behandelt. Nach Versuchsende wurden die entstandenen Xenograft-Tumore extrahiert, in Paraffin eingebettet und mit einer 4%igen Formalinlösung fixiert. Die Auswirkungen der THZ531-Behandlung auf die Proliferationsfähigkeit und die Induktion des apoptotischen Zelltods wurden anhand der resezierten Xenograft-Tumore analysiert. Hierzu wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 und der gespaltenen Caspase-3 als Apoptosemarker durchgeführt. Zusätzlich wurden mittels H&E-Färbung sowohl die vitalen als auch die nekrotischen Tumorregionen ermittelt. Im Anschluss daran wurden die Färbungen mit Hilfe der digitalen Bildanalyse-Software QuPath ausgewertet [206].

Innerhalb der resezierten Xenograft-Tumore (n=28) wurde in den mit THZ531 behandelten Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen eine deutliche Zunahme des Zelltodes beobachtet (Abbildung 4-6 B-C). In Abbildung 4-6 A ist repräsentativ die H&E-Färbung eines Kontroll- und eines mit THZ531 behandelten Tumorxenografts abgebildet. Dabei sind sowohl die vitalen Bereiche (grün) als auch die nekrotischen Bereiche (rot) farblich markiert. Die immunhistochemische Analyse des Apoptosemarkers ergab eine erhöhte Anzahl an Tumorzellen, in denen die THZ531-induzierte Caspase-3-Spaltung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4-7 A, C).

Im Gegensatz dazu wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Ki67-positiven Tumorzellen als Folge der Behandlung mit THZ531 beobachtet (Abbildung 4-7 B, D). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die THZ531-Behandlung *in vivo* zu einer Reduktion der Tumorviabilität führte, die mit einer erhöhten Apoptoserate assoziiert war. Somit konnte die pro-apoptotische Wirkung der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition durch THZ531, die in den vorangegangenen *in vitro*-Versuchen beobachtet wurde, im CAM-Modell verifiziert werden.

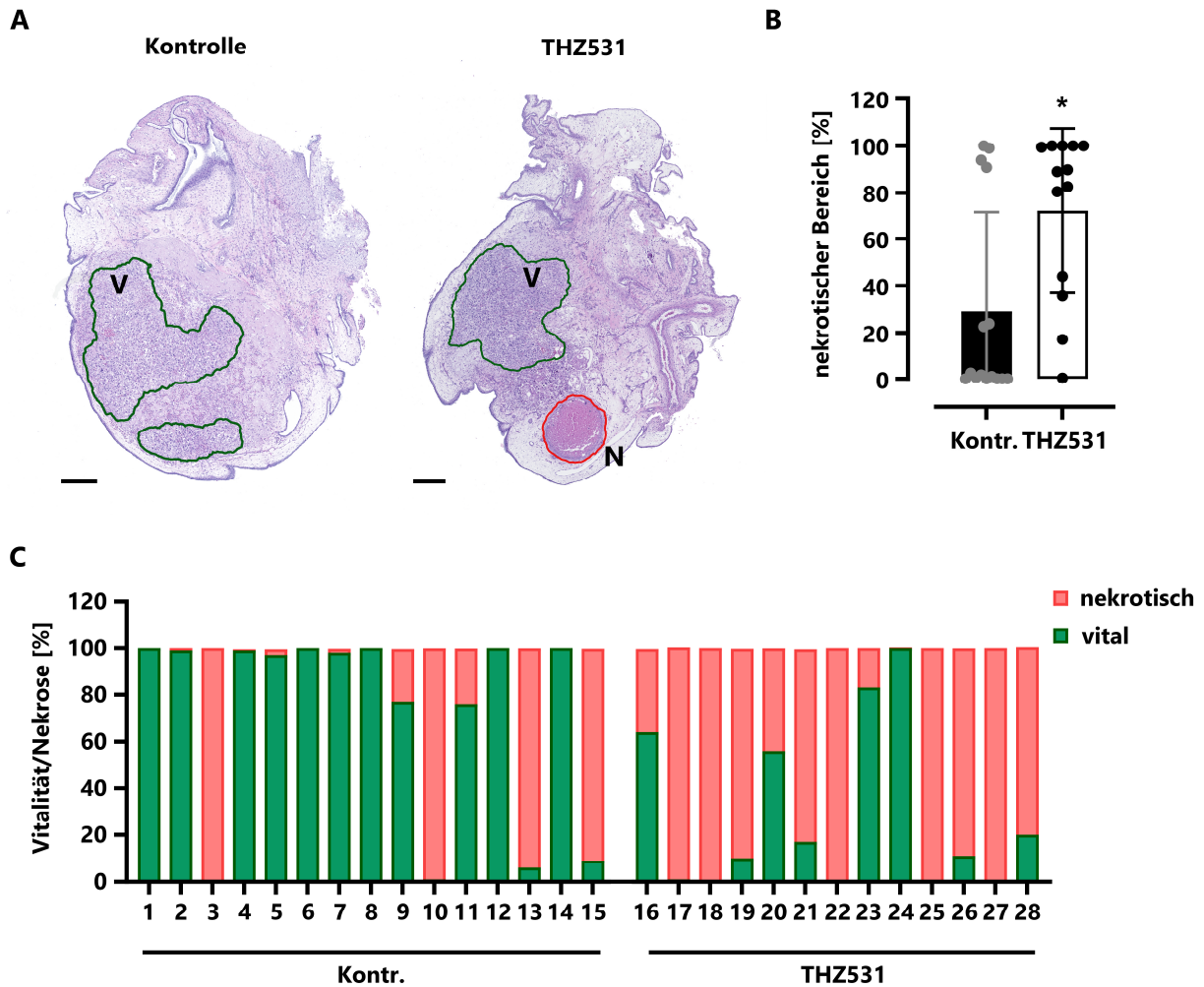


Abbildung 4-6 THZ531 erhöht die Menge des Zelltods in Tumorxenografts des CAM-Modells. (A-C) DU-145-Zellen wurden auf die CAM von befruchteten Hühnereiern implantiert. Die Tumorxenografts wurden an den Tagen 11 und 13 zweimal mit 200 nM THZ531 behandelt und mit unbehandelten Kontrollen (Kontr.) verglichen. (A) Repräsentative Bilder der H&E-Färbung eines Kontroll- und eines mit THZ531 behandelten resezierten Tumorxenografts (vitale Tumorregionen (V) sind grün markiert; nekrotische Tumorregionen (N) sind rot markiert; Maßstab = 250 µm). (B) Dargestellt ist die Quantifizierung des prozentualen Anteils nekrotischer Bereiche der resezierten Xenograft-Tumore (Kontr.: n=15; THZ531: n=13± s.d., Mann-Whitney U-Test, *p < 0,05). (C) Dargestellt ist der prozentuale Anteil vitaler und nekrotischer Tumorregionen der resezierten Xenograft-Tumore. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

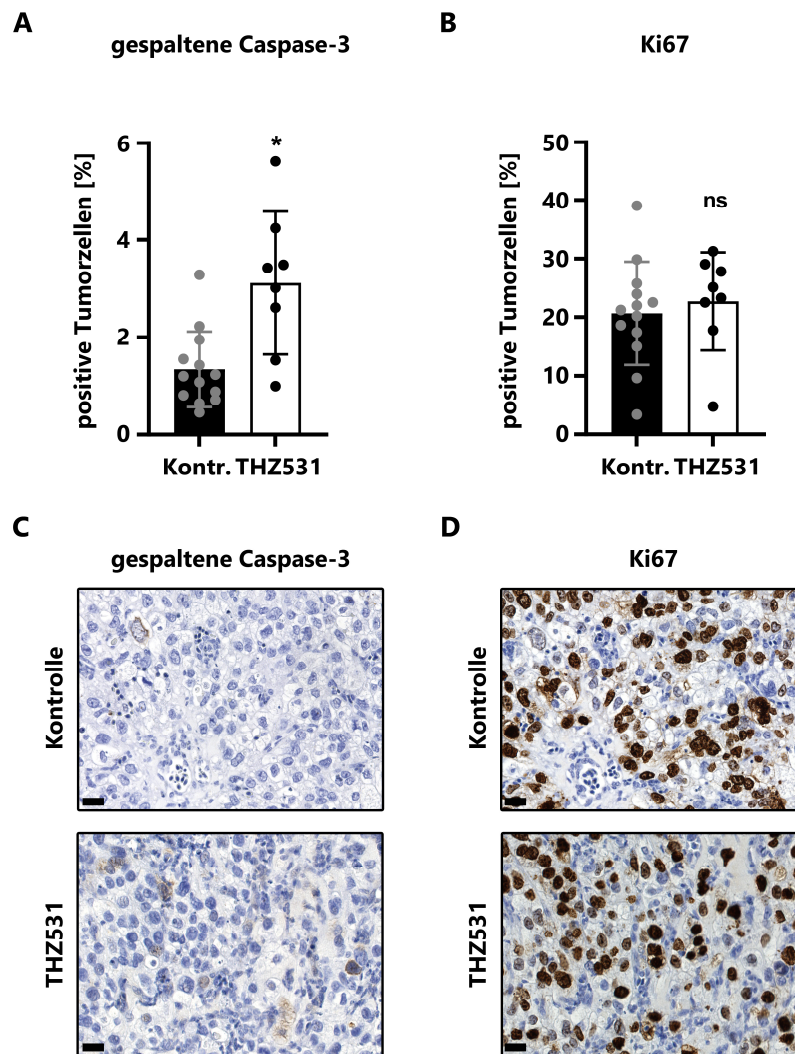


Abbildung 4-7 THZ531 induziert antitumorale Effekte in Tumorxenografts des CAM-Modells. **(A-D)** DU-145-Zellen wurden auf die CAM von befruchteten Hühnereiern implantiert. Die Tumorxenografts wurden an den Tagen 11 und 13 zweimal mit 200 nM THZ531 behandelt und mit unbehandelten Kontrollen (Kontr.) verglichen. **(A-D)** Eine immunhistochemische Färbung der resezierten Tumorxenografts wurde nach der Behandlung mit einem Anti-aktive (gespaltene) Caspase-3-Antikörper und einem Anti-Ki67-Antikörper durchgeführt und mittels digitaler Bildanalyse-Software analysiert. **(A-B)** Dargestellt ist die Quantifizierung des prozentualen Anteils **(A)** gespaltener Caspase-3-positiver und **(B)** Ki-67-positiver Tumorzellen der resezierten Tumorxenografts (Kontr.: n=13, THZ531: n=8± s.d., ungepaarter Welch's t-Test, *p < 0,05; ns, nicht signifikant). **(C-D)** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen (Maßstab = 20 µm). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

4.2.4 Molekulare Mechanismen der THZ531-bedingten Effekte

Im vorangegangenen Abschnitt 4.2.2 wurde gezeigt, dass die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe mit THZ531 in einigen PCa-Zelllinien sowohl den apoptotischen Zelltod verursacht als auch einen Zellzyklusarrest induziert. Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen, die diesen antitumoralen Effekten zugrunde liegen, wurde im nächsten Abschnitt die regulatorische Rolle der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe bei der Transkription näher analysiert. In früheren Studien konnte bereits demonstriert werden, dass insbesondere der Komplex aus CycK-CDK12 maßgeblich zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beiträgt, indem er die Expression essenzieller Gene der DDR reguliert [97, 113, 137]. Dieser CycK-CDK12-abhängigen Regulation unterliegen in erster Linie Gene, die an der HR-Reparatur beteiligt sind, wie z. B. BRCA1, FANCI und FANCD2. Eine veränderte Expression dieser zentralen DDR-Gene kann zur Akkumulation von DNA-Schäden führen [97, 113, 126, 134]. Für die folgende Analyse der Auswirkungen von THZ531 auf die DNA-Reparatur wurden daher acht DDR-Gene ausgewählt, deren CycK-CDK12-abhängige Regulation bereits in anderen Studien nachgewiesen wurde [97, 113, 114]: Das Gen *APEX2* codiert APE2, ein multifunktionales Enzym, das sowohl eine 3'-Phosphodiesterase-Aktivität zur Prozessierung beschädigter 3'-DNA-Enden als auch eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität aufweist, die die Entfernung von fehlgepaarten 3'-Nukleotiden unterstützt. Zudem verfügt es ebenfalls über eine schwache apurinische/apyrimidinische Endonuklease-Aktivität [228, 229].

BRCA1 ist ein Protein, das durch die Regulation der HR-Reparatur eine zentrale Rolle bei der Reparatur von DNA-DSB einnimmt. BRCA1 interagiert dabei mit anderen essenziellen HR-Faktoren wie z. B. BRAC2, RAD51 und 53BP1. Es ist ebenfalls bekannt, dass BRCA1 auch an der Regulation des NHEJ beteiligt ist. Dadurch trägt es maßgeblich zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität bei und agiert gleichzeitig als Tumorsuppressor [230]. Weiterhin sind Keimbahnmutationen im *BRCA1*-Gen ein Merkmal des hereditären Mamma- oder Ovarialkarzinoms und begünstigen die Entstehung des Krankheitsbildes. BRCA1-Mutationen erhöhen zudem auch das Risiko, an einem Prostata- oder Pankreaskarzinom zu erkranken [231].

Die beiden Proteine FANCI und FANCD2 gehören zur Fanconi-Anämie-Familie und spielen eine wesentliche Rolle bei der Reparatur von DSB durch die HR-Reparatur sowie bei der ICL-Reparatur. Ein entscheidender Schritt des Fanconi-Anämie-Reparatursignalwegs ist die Monoubiquitinierung von FANCD2 und FANCI, die die Lokalisation der DNA-Reparaturstellen ermöglicht und Nukleasen sowie Polymerasen an die Schadensstelle rekrutiert [183, 232].

Das Protein MDC1 weist sowohl eine C-terminale BRCA1- als auch eine *Forkhead*-Box-Domäne auf. Dadurch kann es zusammen mit γ H2AX die DNA-Reparaturproteine an Stellen mit DNA-DSB rekrutieren. Darüber hinaus ist MDC1 für die Regulation des Zellzyklus notwendig, da es die S- und G2/M-Phase-Kontrollpunkte als Reaktion auf DNA-Schäden aktiviert [233].

OGG1 ist eine spezifische DNA-Glykosylase, die oxidativ geschädigte Läsion von Guanin, wie 8-Oxoguanin, erkennen und entfernen kann und somit ein wesentlicher Bestandteil der BER ist. Hierbei schneidet OGG1 die entsprechende Läsion heraus und hinterlässt dabei apurine/apyrimidine Stellen, die anschließend durch die 3'-Endonukleaseaktivität des Enzyms entfernt werden. Dadurch wird eine Fehlpaarung von 8-Oxoguanin mit Adenin im nachfolgenden Replikationszyklus verhindert [167, 234].

PNKP spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur, da es sowohl 5'-Kinase- als auch 3'-Phosphatase-Aktivität besitzt, die für die Reparatur von DNA-DSB und DNA-SSB benötigt werden. PNKP katalysiert dadurch die Wiederherstellung kompatibler Enden, die wiederum von anderen Enzymen verknüpft werden können [235].

RFC5 codiert die kleinste Untereinheit (36 kDa) des Replikationsfaktor-C-Komplexes, der sich aus insgesamt fünf Untereinheiten zusammensetzt und für die DNA-Replikation erforderlich ist. Während der S-Phase interagiert RFC5 mit dem PCNA-DNA-Komplex und ermöglicht diesem die Beladung und Öffnung der DNA [236, 237].

4.2.4.1 Effekte von THZ531 auf die Transkription von DDR-Genen und die Entstehung von DNA-Schäden

Um die Auswirkungen der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf die Expression ausgewählter DDR-Gene zu untersuchen, wurden die PCa-Zelllinien mit THZ531 behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse der mRNA- und Proteinexpressionen der DDR-Gene mittels qRT-PCR und Immunblot-Analyse. Die Behandlung mit THZ531 führte dabei zu signifikant niedrigeren mRNA- und Proteinexpressionen der Mehrzahl der ausgewählten DDR-Gene in allen PCa-Zelllinien (Abbildung 4-8). Die stärkste Reduktion der mRNA-Expression nach der THZ531-Behandlung wurde in der Zelllinie LAPC4 beobachtet (Abbildung 4-8 D). Im Gegensatz dazu wies die Zelllinie LNCaP die geringste Sensitivität gegenüber der Behandlung mit THZ531 auf (Abbildung 4-8 E).

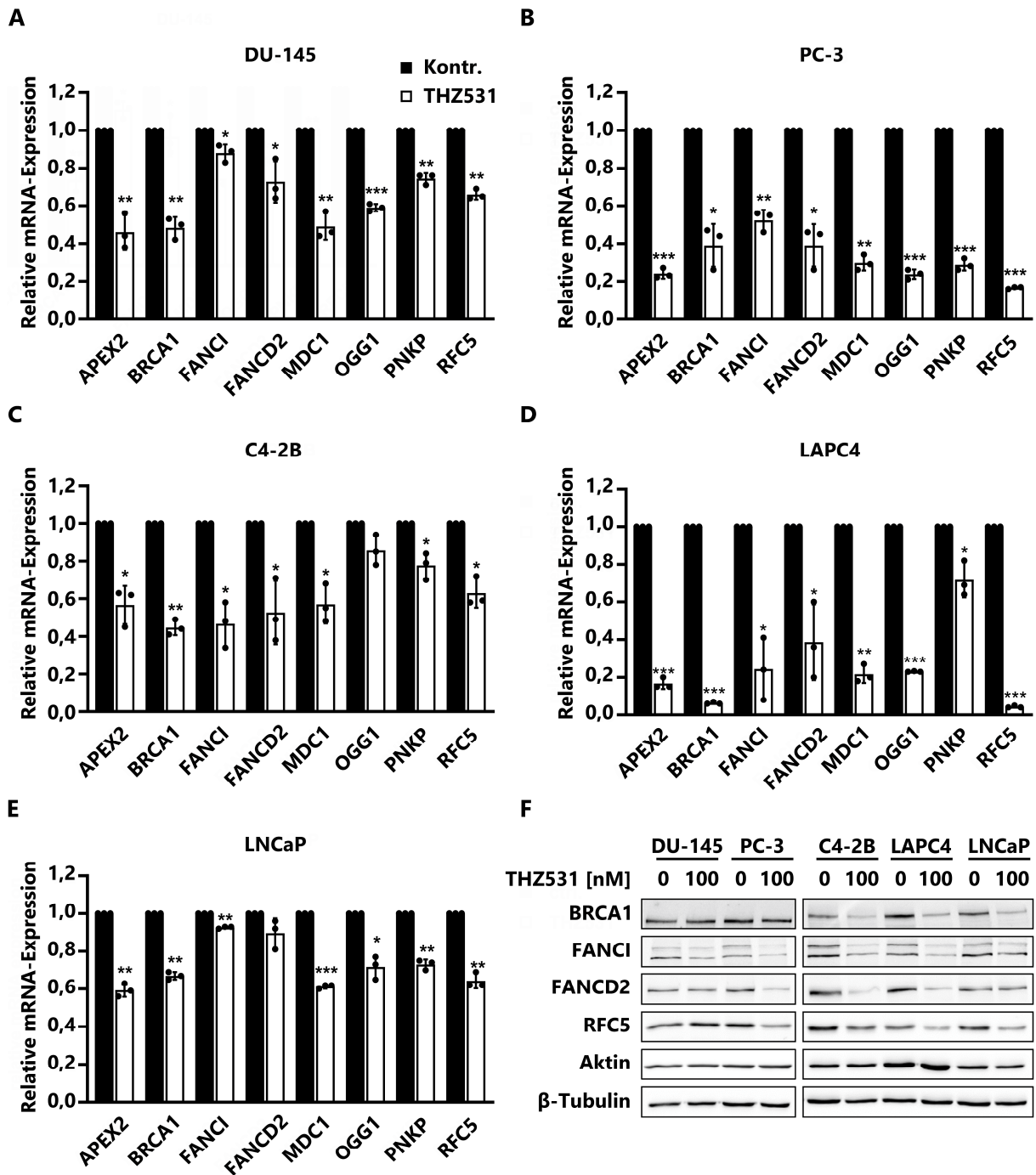


Abbildung 4-8 CycK-CDK12/CDK13-Komplexe regulieren die Expression essenzieller DDR-Gene. (A-F) PCa-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) verglichen. **(A-E)** RNA wurde 24 h nach der Behandlung isoliert und die mRNA-Expressionslevel der DNA-Reparaturgene (APEX2, BRCA1, FANCI, FANCD2, MDC1, OGG1, PNKP, RFC5) mittels qRT-PCR bestimmt und auf die internen 18S rRNA-Level normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; Behandlung versus Kontrolle). **(F)** Die Immunblot-Analyse der DNA-Reparaturgene (BRCA1, FANCI, FANCD2, RFC5) wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 μ g Gesamtprotein wurde auf einem 8%- bzw. 10%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin und β -Tubulin dienten als Ladekontrollen. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Um zu überprüfen, ob die THZ531-vermittelte Reduktion der mRNA- und Proteinexpressionen der DDR-Gene die DNA-Reparaturmechanismen der PCa-Zellen beeinträchtigt und dadurch zur Ansammlung von DNA-Schäden führt, wurde das Ausmaß der Schäden untersucht. Die Detektion der DNA-Schäden erfolgte in den folgenden Analysen mittels des DNA-Doppelstrangbruchmarkers γ H2AX. Unmittelbar nach der Entstehung eines DNA-DSB wird die Phosphorylierung des Histons H2AX an Ser139 durch die Proteinkinasen ATM und ATR initiiert. Die Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX stellt somit den ersten Schritt zur Rekrutierung weiterer Reparaturproteine an die Stelle des DNA-Schadens dar. Die resultierenden lokalen Chromatinmodifikationen des Histons H2AX werden auch als γ H2AX-Foci bezeichnet und repräsentieren den entstandenen DNA-Schaden im Verhältnis 1:1 [162]. Basierend auf diesen Eigenschaften wurden die DNA-Schäden in Form von γ H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert und quantifiziert. Hierzu erfolgten 48 h und 72 h nach der THZ531-Behandlung die Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper und die Färbung der DNA mit DAPI. Im Anschluss daran wurden die γ H2AX-Foci mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops detektiert. Zum besseren Vergleich des Ausmaßes der induzierten DNA-Schäden wurde die Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen mittels der Software ImageJ quantifiziert [215]. Eine Zelle wurde als γ H2AX-positiv bewertet, wenn sie ≥ 5 γ H2AX-Foci pro Nukleus aufwies.

In allen PCa-Zelllinien konnte die THZ531-induzierte Akkumulation von DNA-Schäden nachgewiesen werden. In Abbildung 4-9 sind repräsentative Aufnahmen der Zellkerne (blau) und der γ H2AX-Foci (rot) 72 h nach der Behandlung mit THZ531 dargestellt. Die Quantifizierung der γ H2AX-positiven Zellen erfolgte für jede Behandlung an drei repräsentativen Regionen. Die Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen war in PC-3- und C4-2B-Zellen 72 h nach der Behandlung mit THZ531 im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten die Zelllinien DU-145 und LNCaP nur eine marginale Zunahme an γ H2AX-positiven Zellen, die nach der Inhibitorbehandlung nicht signifikant war (Abbildung 4-10 A).

Zusätzlich zur Immunfluoreszenzfärbung wurde die Proteinexpression von γ H2AX mittels Immunblot-Analyse untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung wurde nach der THZ531-Behandlung keine γ H2AX-Expression in den LNCaP-Zellen nachgewiesen. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung wurde eine deutliche Proteinexpression von γ H2AX nach der THZ531-Behandlung in der Zelllinie DU-145 detektiert. Alle anderen Zelllinien zeigten ebenfalls eine THZ531-vermittelte Zunahme der γ H2AX-Expression (Abbildung 4-10 B).

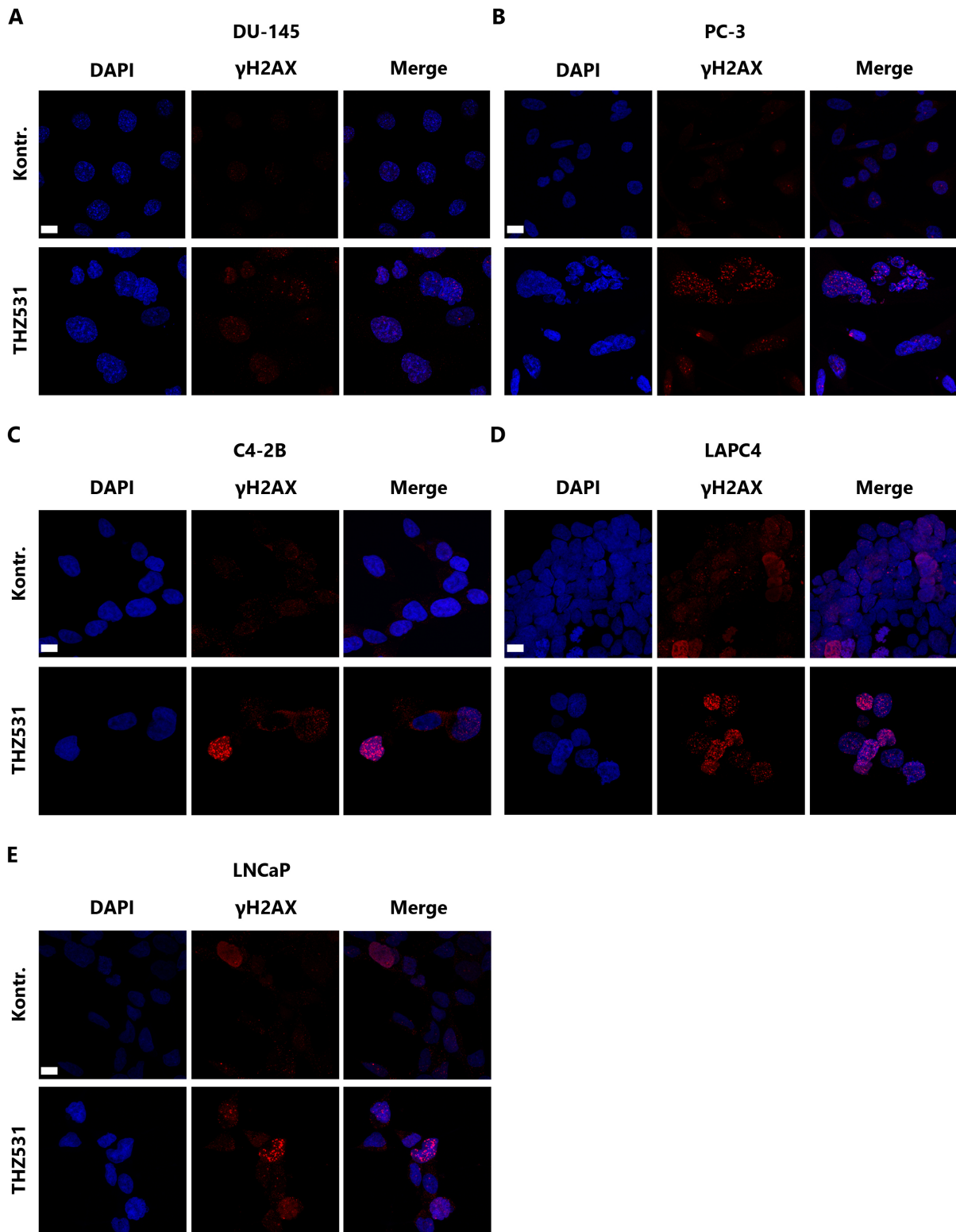


Abbildung 4-9 Repräsentative Aufnahmen der THZ531-induzierten DNA-Schäden der PCa-Zelllinien. (A-E) PCa-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) verglichen. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen 72 h nach der Behandlung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper angefärbt und die DNA mit DAPI gegengefärbt. Repräsentative *Z-stack*-Aufnahmen der Kontroll- und behandelten Zellen mit γ H2AX-Foci (rot), DAPI (blau) und der überlagerten Farbkanäle (Merge) sind dargestellt. Jede Aufnahme wurde aus drei Bildern entlang der Z-Achse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit 63-facher Vergrößerung aufgenommen (Maßstab = 10 μ m). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

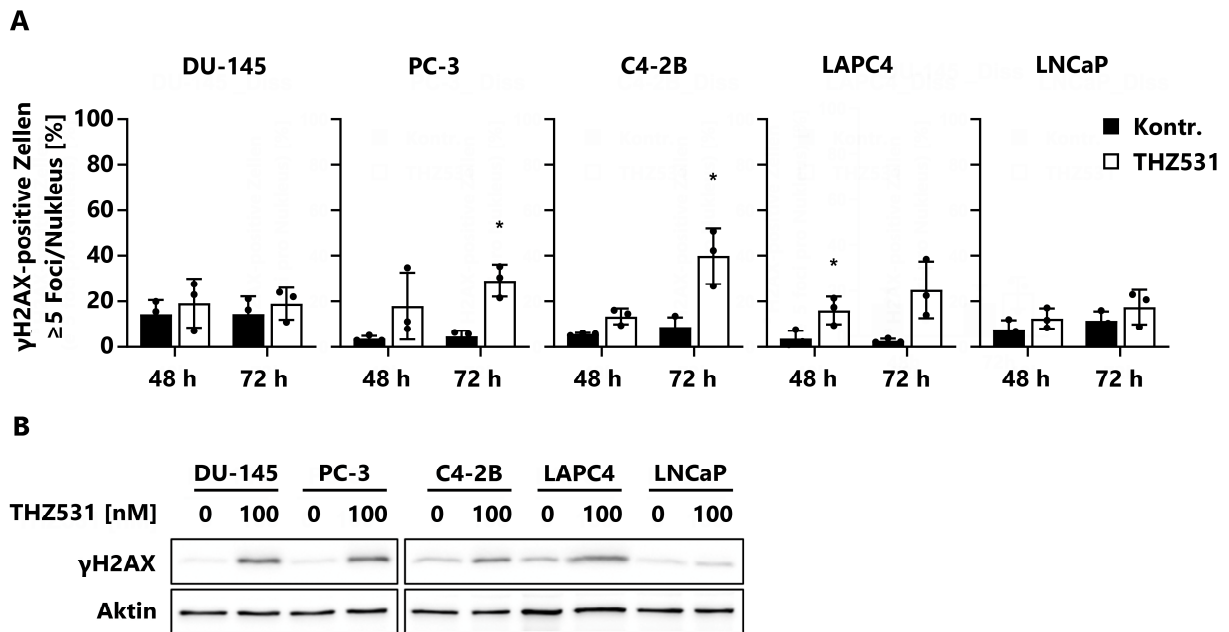


Abbildung 4-10 THZ531 verursacht die Akkumulation von DNA-Schäden in den PCa-Zelllinien. (A-B) PCa-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) verglichen. **(A)** Die Immunfluoreszenzfärbungen der PCa-Zellen wurden 48 h und 72 h nach der Behandlung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper durchgeführt. Der prozentuale Anteil an γ H2AX-Foci (≥ 5 pro Nucleus) wurde quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, $*p < 0,05$; Behandlung versus Kontrolle). **(B)** Die Immunblot-Analyse von γ H2AX wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 μ g Gesamtprotein wurde auf einem 15%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

4.2.4.2 Effekte von THZ531 auf die DDR

Die zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden wird in erster Linie durch das komplexe System der DDR koordiniert. Als initiale Komponenten fungieren die beiden Kinasen ATM und ATR, die über die Aktivierung der zwei Signalwege ATM-CHK2 und ATR-CHK1 das Schicksal der Zelle beeinflussen [151, 156]. Dabei vermitteln die Zellzykluskontrollpunkt-Kinasen CHK2 und CHK1 über verschiedene Effektoren den Stopp des Zellzyklus (Abschnitt 1.3). Um weitere Erkenntnisse darüber zu gewinnen, welche Mechanismen und Signalwege durch die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe ebenfalls beeinflusst werden und möglicherweise den Proliferationsarrest (Abbildung 4-5) verursachen, wurde die Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte untersucht. Zu diesem Zweck wurden die PCa-Zelllinien mit THZ531 behandelt und die Expressionslevel der Kinasen CHK1 und CHK2 sowie deren aktivierte, phosphorylierte Formen zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Immunblot-Analyse detektiert.

In allen Zelllinien konnten die phosphorylierten Formen pCHK1 und pCHK2 nach der THZ531-Behandlung nachgewiesen werden, was auf eine Aktivierung der beiden Signalwege ATM-CHK2 und ATR-CHK1 hindeutet. 32 h und 48 h nach der Behandlung wurde in allen PCa-Zelllinien, mit Ausnahme der LAPC4-Zelllinie, ein pCHK1-Expressionspeak beobachtet, gefolgt von einer Abnahme der pCHK1-Expression zu späteren Zeitpunkten. Im Gegensatz dazu wurde die Aktivierung von pCHK2 zeitversetzt festgestellt, also 56 h nach der Behandlung mit THZ531.

Zudem war auffällig, dass nach 48 h ausschließlich in den LAPC4-Zellen die Expression von CHK1 stark vermindert war und folglich auch die aktivierte Form nicht eindeutig ermittelt werden konnte (Abbildung 4-11).

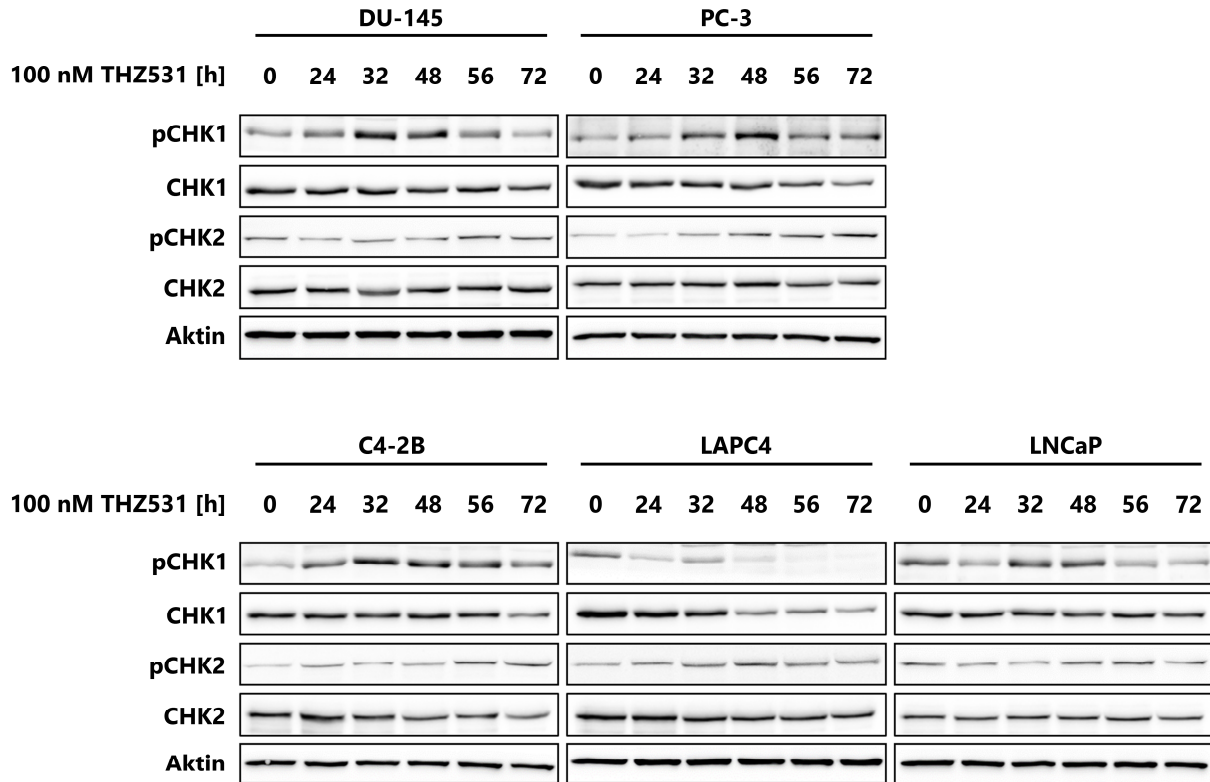


Abbildung 4-11 THZ531 beeinflusst die Aktivierung der DDR-Signalwege. PCa-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (0 h) verglichen. Die Immunblot-Analyse der Kinasen CHK1 und CHK2 sowie ihre aktivierten Formen (pCHK1 und pCHK2) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 32 h, 48 h, 56 h und 72 h) nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 µg Gesamtprotein wurde auf einem 12%- bzw. 10%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

4.3 Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe in Kombination mit verschiedenen Therapieformen des PCas

Im vorangegangenen Abschnitt 4.2 wurde sowohl in den *in vitro*-Versuchen als auch *in vivo* gezeigt, dass die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe durch THZ531 antineoplastische Effekte in den PCa-Zelllinien verursacht. Dabei wurden sowohl ein Proliferationsarrest als auch die Induktion des apoptotischen Zelltods beobachtet. Diese zellulären Effekte sind wahrscheinlich auf eine THZ531-vermittelte Akkumulation von DNA-Schäden zurückzuführen, die durch eine verringerte Expression von DNA-Reparaturgenen und eine beeinträchtigte DDR ausgelöst wurden. In den einzelnen PCa-Zelllinien wurde in diesem Zusammenhang ein heterogenes Therapieansprechen festgestellt, wobei die LNCaP-Zellen die stärkste Therapieresistenz aufwiesen.

Im folgenden Kapitel wurde untersucht, inwieweit THZ531 die antitumoralen Effekte verschiedener State of the Art-Therapieformen des PCas durch die kombinierte Behandlung verstärken kann. Zu diesem Zweck wurde die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe mit THZ531 einerseits mit dem PARP-Inhibitor Olaparib und andererseits mit zwei Antiandrogenen, Enzalutamid und Abirateron, kombiniert. Anschließend wurden die funktionellen Auswirkungen dieser Kombinationsbehandlung untersucht.

4.3.1 Effekte der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Olaparib

Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die CycK-CDK12/CDK13-Inhibition mit THZ531 zur Reduktion der BRCA1-Expression führte und eine Anhäufung von DNA-Schäden in den PCa-Zelllinien verursachte (siehe Abschnitt 4.2.4). Diese funktionellen Auswirkungen der THZ531-Behandlung deuten auf eine dysfunktionale HR-Reparatur in den PCa-Zellen hin. In malignen Zellen, die Mutationen in den BRCA-Genen aufweisen, induzieren PARP-Inhibitoren eine synthetische Letalität und lösen den Zelltod aus, wodurch die Tumorprogression verhindert werden kann [79, 82]. Aus diesem Grund wurde als Nächstes untersucht, inwieweit die Behandlung mit THZ531 die PCa-Zellen sensibilisiert, um möglicherweise durch die kombinierte Anwendung des PARP1-Inhibitors Olaparib eine synthetische Letalität zu induzieren.

Zu diesem Zweck wurden die PCa-Zelllinien gleichzeitig mit THZ531 und Olaparib (40 μ M und 60 μ M) behandelt. Anschließend wurde die Apoptoserate mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Kombinationsbehandlung von THZ531 mit Olaparib führte in den LNCaP-Zellen zu einem synergistischen Effekt, der durch die signifikante Zunahme der Apoptoserate gekennzeichnet war. Darüber hinaus zeigten sowohl die Zelllinie DU-145 als auch C4-2B nach der kombinierten Behandlung von THZ531 und Olaparib eine signifikant höhere Apoptoserate im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (Abbildung 4-12).

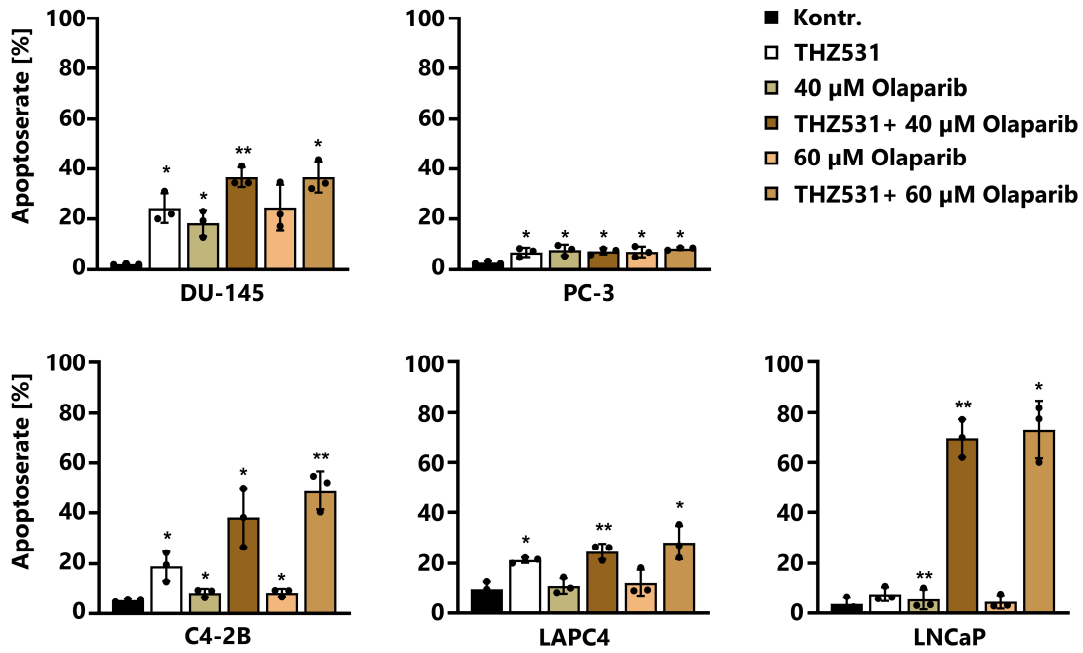


Abbildung 4-12 Die kombinierte Behandlung aus THZ531 und Olaparib erhöht die Apoptoserate in DU-145- und C4-2B-Zellen und verursacht die Apoptoseinduktion in LNCaP-Zellen. PCa-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 (C4-2B mit 75 nM THZ531) und 40 µM bzw. 60 µM Olaparib behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und die Apoptoserate anschließend mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Behandlung versus Kontrolle). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

4.3.2 Effekte der kombinierten Behandlung mit THZ531 und der ADT – *in vitro*

Wie bereits in Abschnitt 4.1 und in Tabelle 2-2 dargestellt, unterscheiden sich die verwendeten PCa-Zelllinien in verschiedenen genetischen Merkmalen, darunter auch in der endogenen Expression des ARs (Abbildung 4-1 A). Die Zelllinie LAPC4 ist die einzige der androgensensitiven PCa-Zelllinien, die ein intaktes Wildtyp-*AR*-Gen aufweist, während die Zelllinie LNCaP und ihr Derivat C4-2B Mutationen im *AR*-Gen besitzen [200]. Die androgenunabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 exprimieren hingegen keinen funktionsfähigen AR (Abbildung 4-1 A). Der AR vermittelt als nukleärer Transkriptionsfaktor die Wirkung der Androgene und ist maßgeblich an der Entwicklung, Differenzierung und dem Wachstum der Prostata beteiligt. Aufgrund des androgenabhängigen Wachstums hat sich die ADT als Erstlinientherapie bei Patienten mit einem fortgeschrittenem PCa in der klinischen Anwendung etabliert [69]. Darüber hinaus haben frühere Studien gezeigt, dass eine Verbindung zwischen der AR-Signalübertragung und der DDR besteht, die einen regulativen Einfluss auf die Expression von DNA-Reparaturgenen hat [238-240].

Zur Analyse, ob die antitumorogene Wirkung der ADT durch die Behandlung mit THZ531 in den PCa-Zellen verstärkt werden kann, wurden im folgenden Abschnitt die Effekte der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition in Kombination mit der Hemmung der AR-abhängigen Signalübertragung untersucht. Hierbei wurden sowohl der AR-Inhibitor Enzalutamid [72] als auch der CYP17-Inhibitor Abirateron, der die adrenale Androgensteroidsynthese reduziert und damit die Hormonproduktion senkt [73], mit THZ531 kombiniert.

Um die Wirksamkeit der beiden Inhibitoren Enzalutamid und Abirateron zu untersuchen, wurde zunächst die androgenabhängige Expression von PSA in den PCa-Zellen analysiert. Hierzu wurden die androgensensitiven Zelllinien LNCaP, C4-2B und LAPC4 einzeln mit THZ531, Enzalutamid und Abirateron sowie THZ531 in Kombination mit Enzalutamid oder Abirateron behandelt und die PSA-Expression mittels qRT-PCR und Immunblot-Analyse überprüft. Die Inhibition des ARs- und der Androgensynthese führte in den drei androgensensitiven Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der mRNA-Expression von PSA (Abbildung 4-13 A-B). Zusätzlich führte die alleinige Behandlung mit THZ531 in der androgenabhängigen Zelllinie LAPC4 ebenfalls zu einer verminderten PSA-Expression. Analog dazu konnte die Reduktion von PSA auf Proteinebene in allen Zelllinien nach der Behandlung mit Enzalutamid und Abirateron beobachtet werden. Die kombinierte Behandlung mit THZ531 hatte keinen Einfluss auf die inhibitorische Wirkung von Enzalutamid und Abirateron, außer in der Zelllinie C4-2B. In dieser Zelllinie war nach der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Enzalutamid sowie mit THZ531 und Abirateron die Proteinexpression von PSA deutlich nachweisbar (Abbildung 4-13 C).

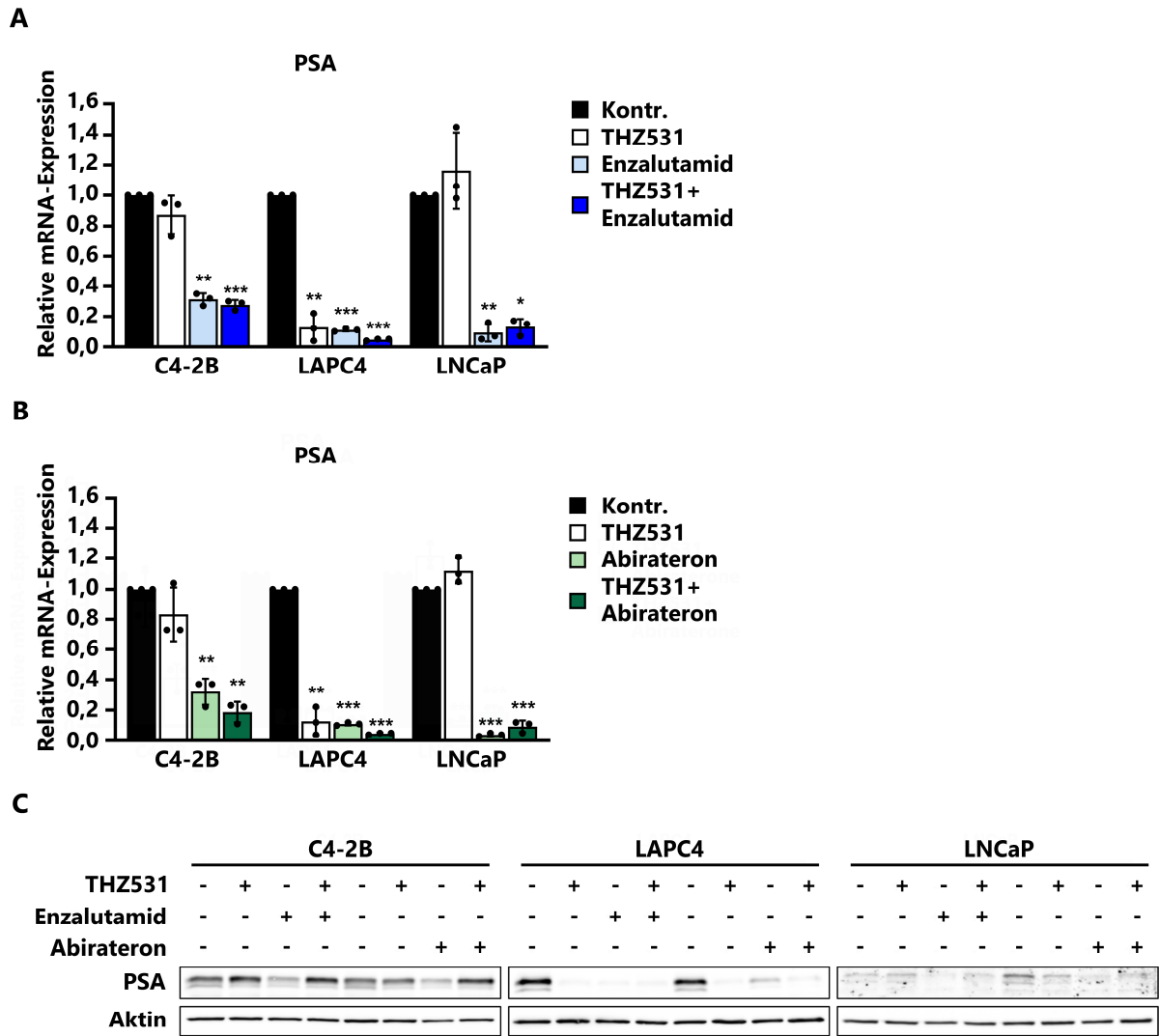
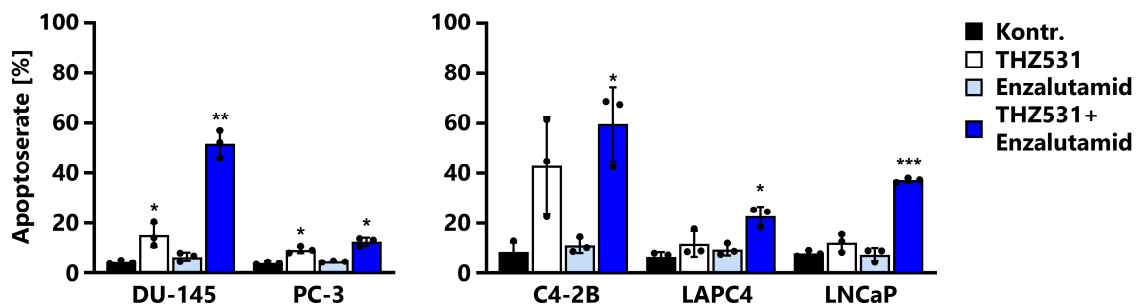


Abbildung 4-13 Enzalutamid und Abirateron verursachen die Abnahme der androgenabhängigen PSA-Expression. (A-C) C4-2B-, LAPC4- und LNCaP-Zellen wurden mit 100 nM THZ531, 10 µM Enzalutamid oder 10 µM Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. (A-B) RNA wurde 24 h nach der Behandlung isoliert und die mRNA-Expressionslevel des PSA mittels qRT-PCR bestimmt und auf die internen 18S rRNA-Level normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Behandlung versus Kontrolle). (C) Die Immunblot-Analyse von PSA wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 µg Gesamtprotein wurde auf einem 15%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Zur funktionellen Analyse der Auswirkungen der Kombinationsbehandlung wurden sowohl die androgensensitiven als auch die androgenunabhängigen PCa-Zelllinien mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron behandelt. Um zu untersuchen, ob die Kombinationsbehandlung möglicherweise einen stärkeren Effekt auf die Apoptoseinduktion hat, wurde nach der Behandlung die Apoptoserate mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt und die charakteristische Caspase-3-Spaltung mittels Immunblot-Analyse detektiert. Hierbei konnte eine erhöhte Apoptoserate nach der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid (Abbildung 4-14 A) oder Abirateron (Abbildung 4-15 A) verglichen mit den Einzelbehandlungen in C4-2B- und LAPC4-Zellen festgestellt werden. In der Zelllinie LNCaP, die keine THZ531-induzierte Apoptose

zeigte, führten die Kombinationsbehandlungen zur Auslösung der Apoptose (Abbildung 4-14, Abbildung 4-15). Zudem wies die androgenunabhängige Zelllinie DU-145 ebenfalls eine verstärkte Apoptoserate nach der Kombinationsbehandlung auf (Abbildung 4-14 A, Abbildung 4-15 A). In Übereinstimmung mit der durchflusszytometrischen Analyse konnte die behandlungsinduzierte Apoptose durch den Nachweis der Caspase-3-Spaltung sowohl in den androgensensitiven als auch in der Zelllinie DU-145 bestätigt werden (Abbildung 4-14 B, Abbildung 4-15 B).

A



B

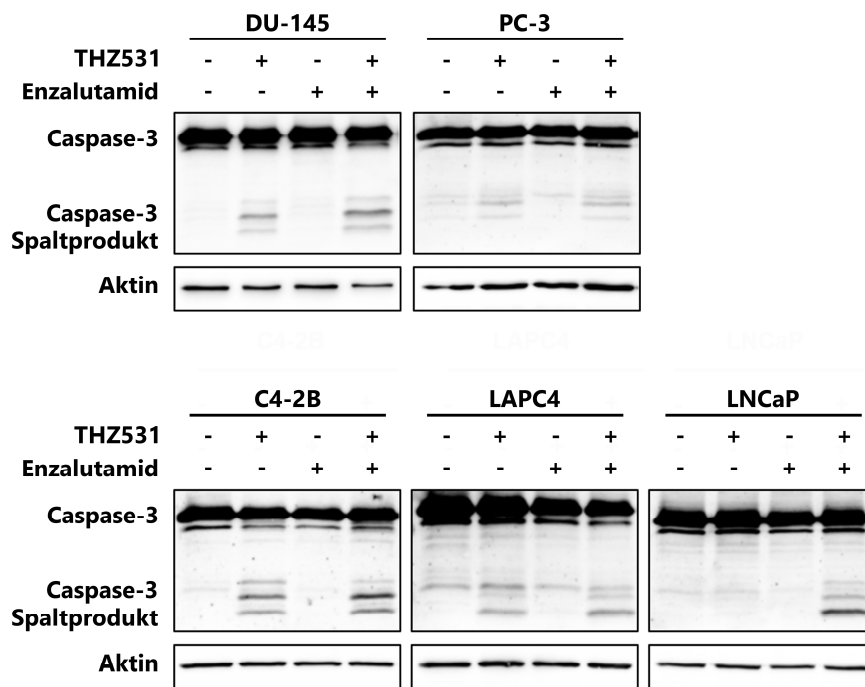
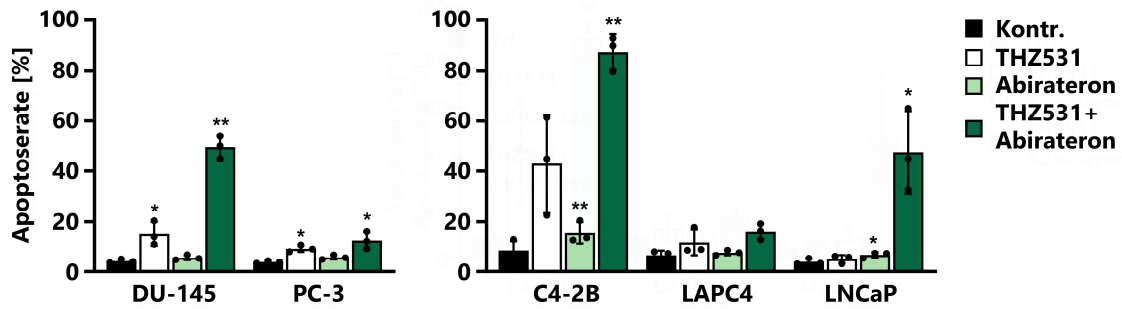


Abbildung 4-14 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid induziert Apoptose in den androgensensitiven PCa-Zellen und erhöht die Apoptoserate in DU-145-Zellen. (A-B) PCa-Zellen wurden für 72 h mit 100 nM THZ531 und 10 µM Enzalutamid behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. (A) Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und die Apoptoserate anschließend mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Behandlung versus Kontrolle). (B) Zum Nachweis der Apoptose wurde eine Immunblot-Analyse von Caspase-3 (p32) und der Caspase-3-Spaltprodukte (p19/17) an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 µg Gesamtprotein wurde auf einem 15%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

A



B

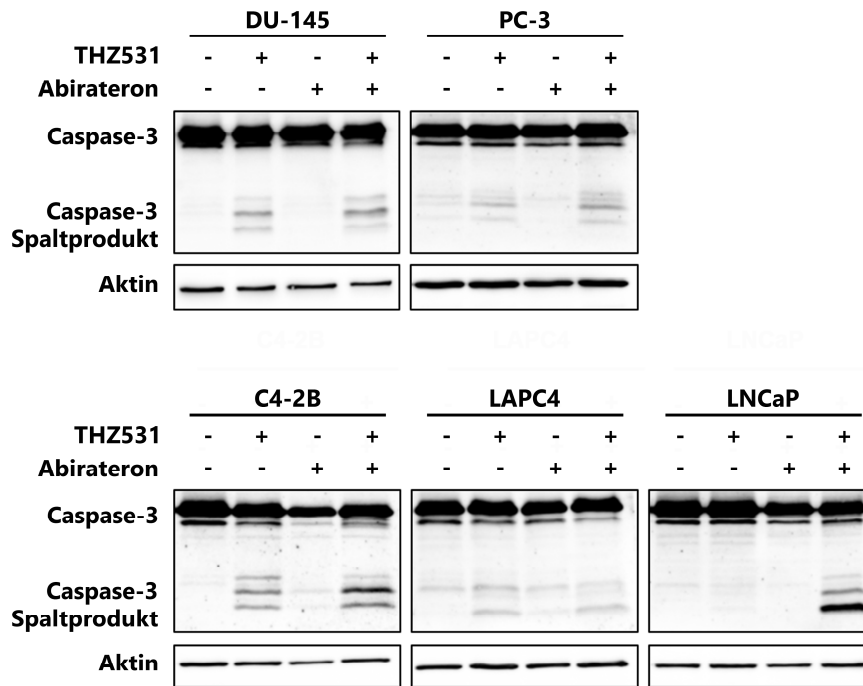


Abbildung 4-15 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Abirateron induziert Apoptose in den androgensensitiven PCa-Zellen und erhöht die Apoptoserate in DU-145-Zellen. (A-B) PCa-Zellen wurden für 72 h mit 100 nM THZ531 und 10 µM Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. (A) Nach der Behandlung wurden die Zellen mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und die Apoptoserate anschließend mittels durchflusszytometrischer Analyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; Behandlung versus Kontrolle). (B) Zum Nachweis der Apoptose wurde eine Immunblot-Analyse von Caspase-3 (p32) und der Caspase-3-Spaltprodukte (p19/17) an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 µg Gesamtprotein wurde auf einem 15%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen, die zur verstärkten Apoptoseinduktion durch die parallele Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und des AR-Signalweges führen, wurden als Nächstes Expressionsanalysen ausgewählter DNA-Reparaturgene durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die PCa-Zelllinien mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron behandelt und anschließend die mRNA- und Proteinexpressionslevel der DNA-Reparaturgene mittels qRT-PCR und Immunblot-Analyse bestimmt. Die gleichzeitige Hemmung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und des ARs verursachte in den androgensensitiven PCa-Zelllinien eine verstärkte Abnahme der mRNA- und Proteinexpressionslevel (Abbildung 4-16). In der Zelllinie LNCaP verursachte die Kombinationsbehandlung eine deutlich reduzierte Expression der DNA-Reparaturgene, was nach der Einzelbehandlung mit THZ531 nicht beobachtet wurde (Abbildung 4-16 C, D). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Abirateron ebenfalls eine verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpressionslevel der DNA-Reparaturgene in den androgensensitiven PCa-Zelllinien (Abbildung 4-17).

Analog dazu wurden die androgenunabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 ebenfalls mit der Kombinationsbehandlung aus THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron behandelt. Verglichen mit der THZ531-Behandlung konnte bei diesen Zelllinien lediglich eine minimal stärkere Abnahme der Expressionslevel der DNA-Reparaturgene durch die Kombinationsbehandlung beobachtet werden (Abbildung 4-18, Abbildung 4-19). Die Zelllinie DU-145 zeigte jedoch nach beiden Kombinationsbehandlungen eine verstärkte Reduktion der Proteinexpression der DNA-Reparaturgene im Vergleich zur Einzelbehandlung mit THZ531 (Abbildung 4-18 C, Abbildung 4-19 C).

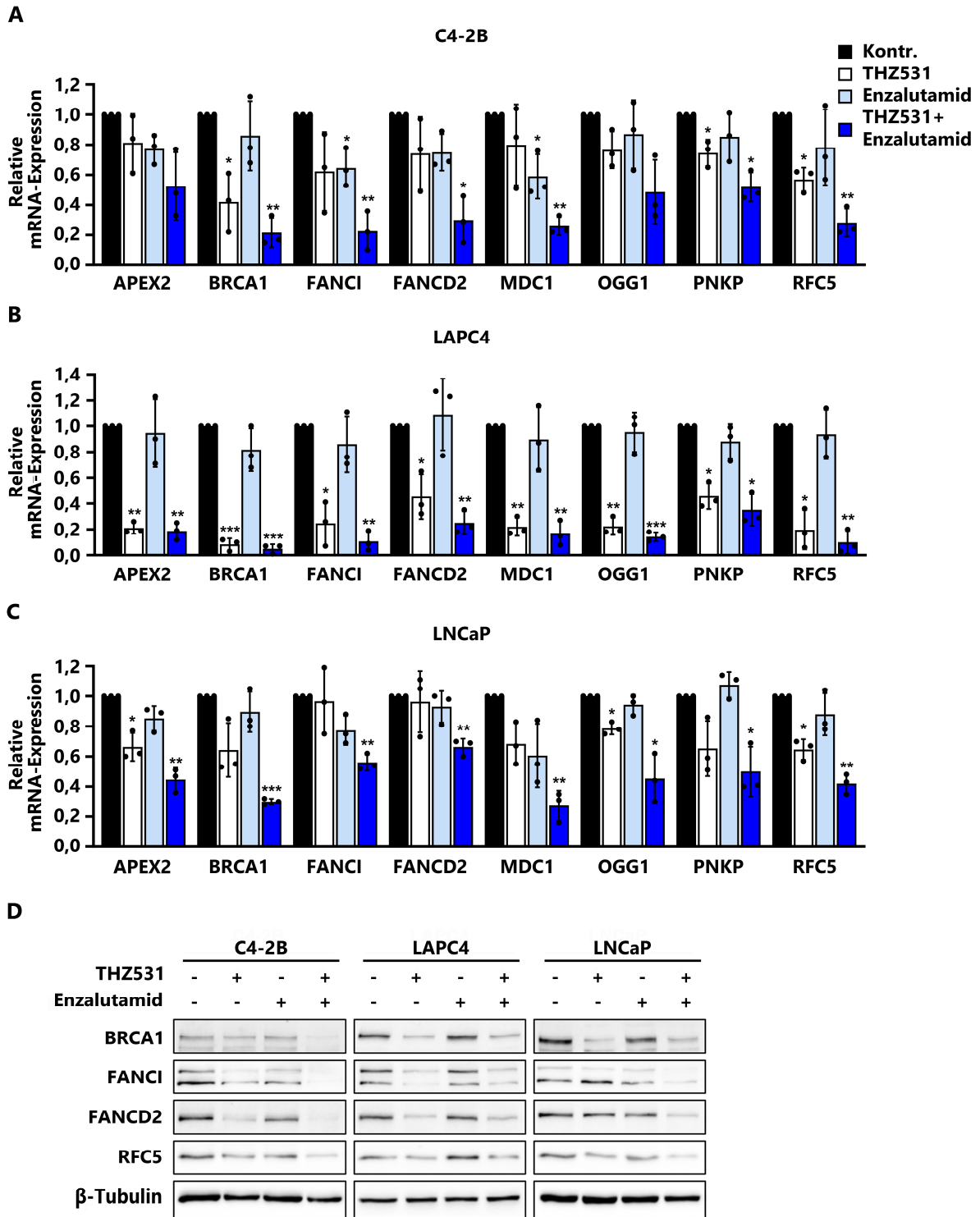


Abbildung 4-16 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid verursacht eine verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpression der DNA-Reparaturgene in den androgensensitiven Zelllinien. (A-D) C4-2B-, LAPC4- und LNCaP-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 μ M Enzalutamid behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. (A-C) RNA wurde 24 h nach der Behandlung isoliert und die mRNA-Expressionslevel der DNA-Reparaturgene (APEX2, BRCA1, FANCI, FANCD2, MDC1, OGG1, PNKP, RFC5) mittels qRT-PCR bestimmt und auf die internen 18S rRNA-Level normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Behandlung versus Kontrolle). (D) Die Immunblot-Analyse der DNA-Reparaturgene (BRCA1, FANCI, FANCD2, RFC5) wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzell-extrakten durchgeführt. 30 μ g Gesamtprotein wurde auf einem 8%- bzw. 10%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. β -Tubulin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

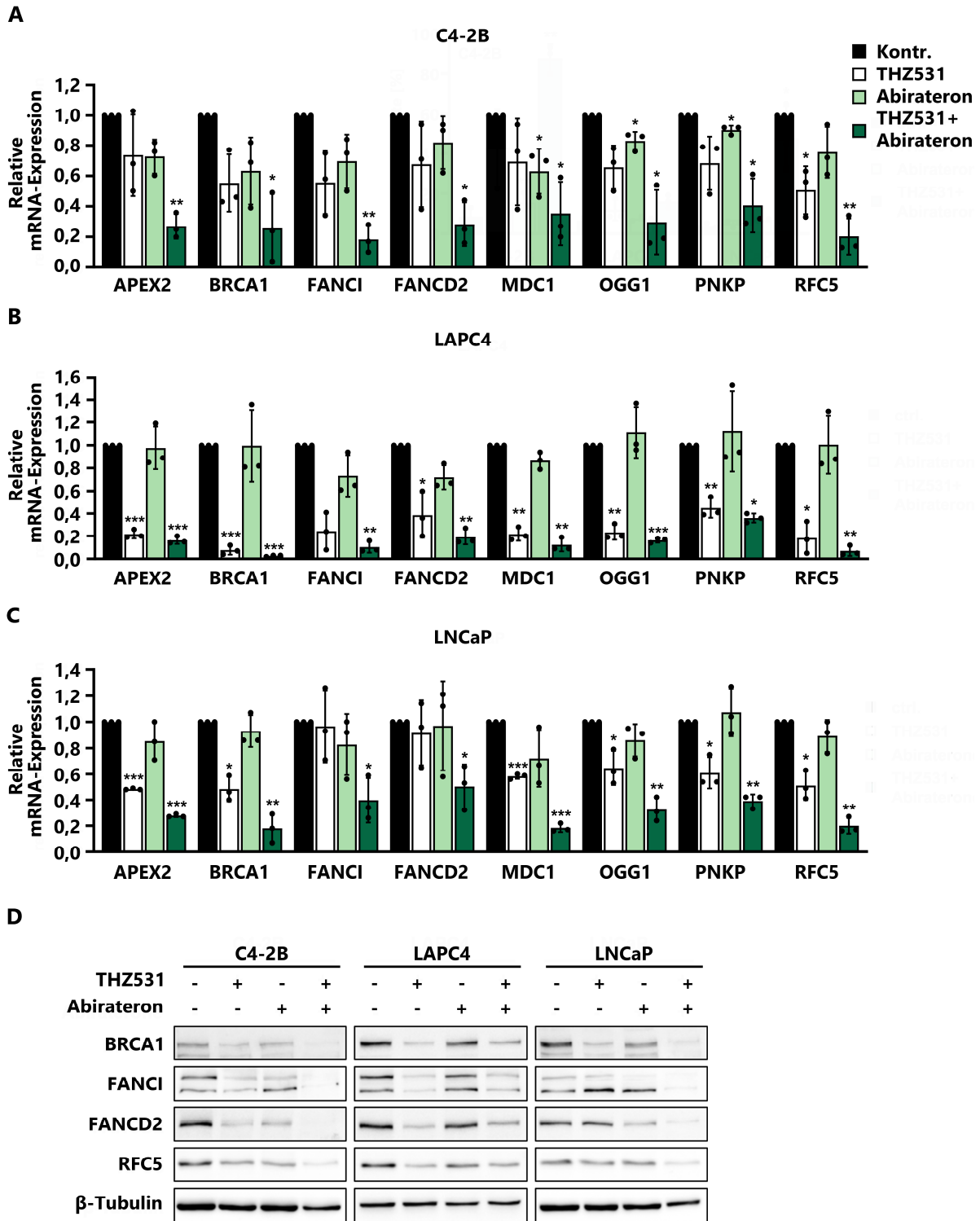


Abbildung 4-17 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Abirateron verursacht eine verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpression der DNA-Reparaturgene in den androgensensitiven Zelllinien. (A-D) C4-2B-, LAPC4- und LNCaP-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 µM Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. (A-C) RNA wurde 24 h nach der Behandlung isoliert und die mRNA-Expressionslevel der DNA-Reparaturgene (APEX2, BRCA1, FANCI, FANCD2, MDC1, OGG1, PNKP, RFC5) mittels qRT-PCR bestimmt und auf die internen 18S rRNA-Level normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Behandlung versus Kontrolle). (D) Die Immunblot-Analyse der DNA-Reparaturgene (BRCA1, FANCI, FANCD2, RFC5) wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 µg Gesamtprotein wurde auf einem 8%- bzw. 10%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. β-Tubulin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

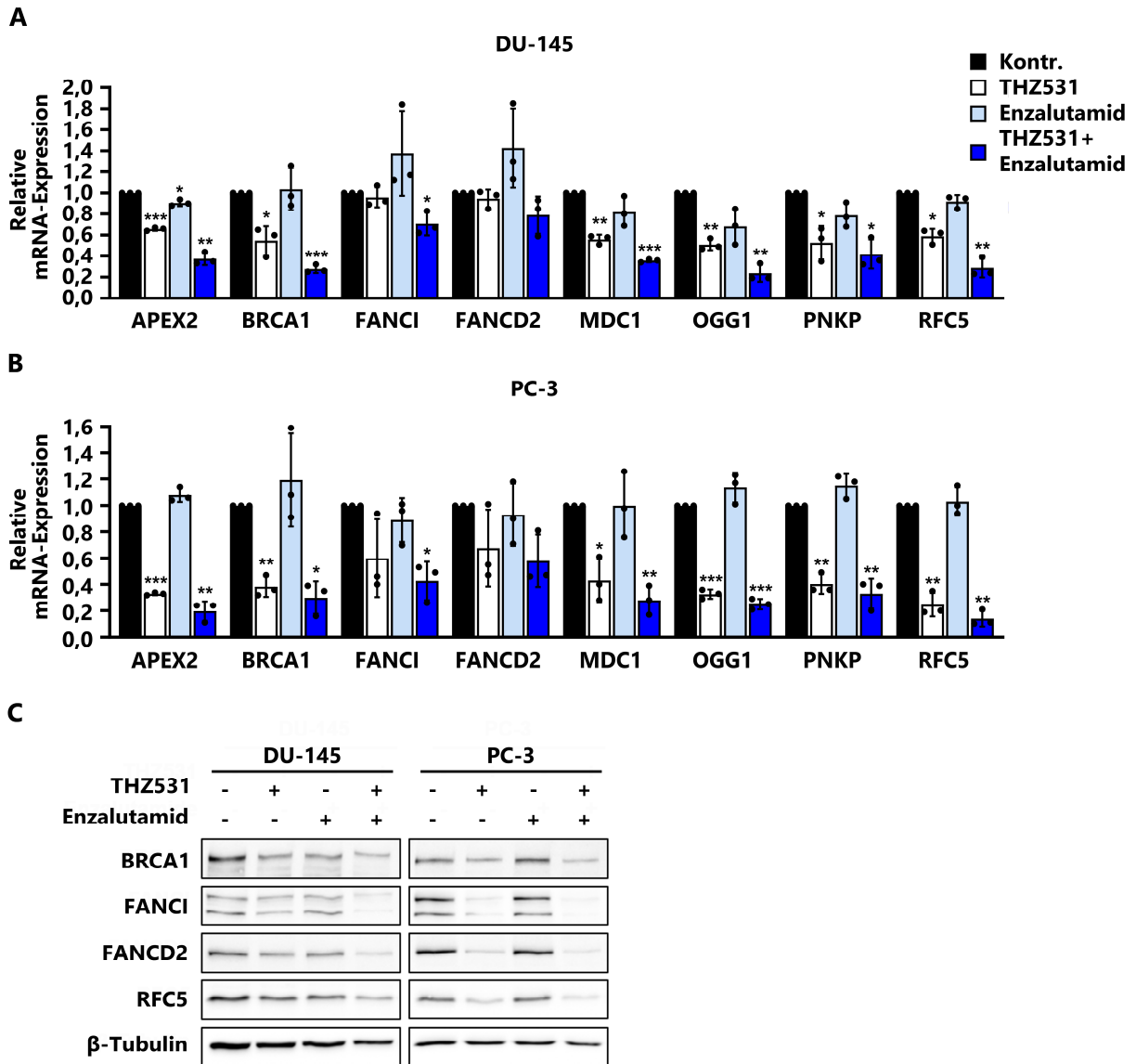


Abbildung 4-18 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid verursacht eine marginal verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpression der DNA-Reparaturgene in den androgenunabhängigen Zelllinien. (A-C) DU-145- und PC-3-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 µM Enzalutamid behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. (A-B) RNA wurde 24 h nach der Behandlung isoliert und die mRNA-Expressionslevel der DNA-Reparaturgene (APEX2, BRCA1, FANCI, FANCD2, MDC1, OGG1, PNKP, RFC5) mittels qRT-PCR bestimmt und auf die internen 18S rRNA-Level normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; Behandlung versus Kontrolle). (C) Die Immunblot-Analyse der DNA-Reparaturgene (BRCA1, FANCI, FANCD2, RFC5) wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 µg Gesamtprotein wurde auf einem 8%- bzw. 10%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. β-Tubulin diente als Ladekontrolle.

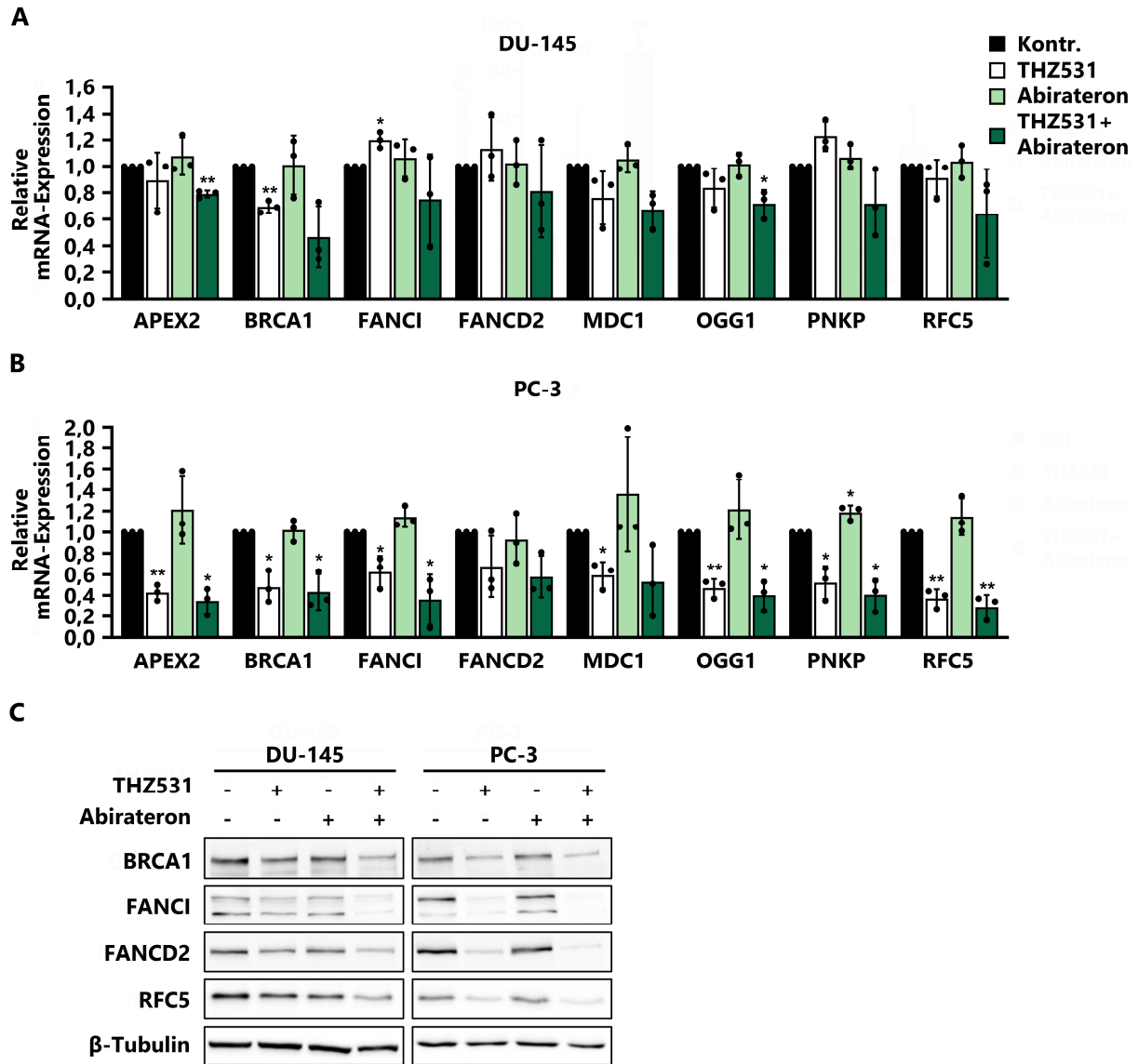


Abbildung 4-19 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Abirateron verursacht eine marginal verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpression der DNA-Reparaturgene in den androgenunabhängigen Zelllinien. (A-C) DU-145- und PC-3-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 μ M Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. (A-B) RNA wurde 24 h nach der Behandlung isoliert und die mRNA-Expressionslevel der DNA-Reparaturgene (APEX2, BRCA1, FANCI, FANCD2, MDC1, OGG1, PNKP, RFC5) mittels qRT-PCR bestimmt und auf die internen 18S rRNA-Level normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; Behandlung versus Kontrolle). (C) Die Immunblot-Analyse der DNA-Reparaturgene (BRCA1, FANCI, FANCD2, RFC5) wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 μ g Gesamtprotein wurde auf einem 8%- bzw. 10%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. β -Tubulin diente als Ladekontrolle.

In der vorangegangenen Genexpressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und des AR-Signalwegs signifikante Veränderungen der Expressionslevel der DNA-Reparaturgene verursacht. Folglich wurde als Nächstes untersucht, ob die behandlungsinduzierten Abweichungen dieser Gene die DNA-Reparaturmaschinerie beeinträchtigen und zur Erhöhung von DNA-Schäden in den PCa-Zelllinien beitragen. Zu diesem Zweck wurde das Ausmaß der DNA-Schäden in Form von γ H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenzfärbung visualisiert und quantifiziert. Hierfür wurden PCa-Zellen 48 h und 72 h nach der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper gefärbt und die γ H2AX-Foci anschließend mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop detektiert.

In den androgensensitiven PCa-Zelllinien C4-2B, LAPC4 und LNCaP verursachte die Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron die Entstehung von DNA-Schäden. Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung dieser Zellen sind in Abbildung 4-20 bis Abbildung 4-22 dargestellt. Eine Zunahme γ H2AX-positiver Zellen konnte insbesondere in der jeweiligen Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron, im Vergleich zu den Kontroll- und Einzelbehandlungen, beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde durch die quantitative Auswertung der Anzahl an γ H2AX-positiven Zellen bestätigt. In den Zelllinien C4-2B und LAPC4 konnte 72 h nach der Kombinationsbehandlung eine signifikante Zunahme γ H2AX-positiver Zellen detektiert werden (Abbildung 4-23 A, B). Im Gegensatz dazu wurde in LNCaP-Zellen zwar eine erhöhte Anzahl an γ H2AX-positiven Zellen durch die kombinierte Behandlung festgestellt, jedoch war diese nach 72 h statistisch nicht signifikant (Abbildung 4-23 C). Zusätzlich konnte in den androgensensitiven PCa-Zelllinien eine erhöhte Proteinexpression von γ H2AX mittels Immunblot-Analyse sowohl nach der THZ531- als auch der kombinierten Behandlung nachgewiesen werden. Eine Ausnahme stellten die LNCaP-Zellen dar, bei denen lediglich nach der Kombinationsbehandlung eine erhöhte γ H2AX-Proteinexpression ermittelt werden konnte (Abbildung 4-23 D).

Ferner wurde die Quantifizierung der γ H2AX-Foci auch in den androgenunabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 nach der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen dieser Zelllinien sind in Abbildung 4-24 und Abbildung 4-25 dargestellt. Sowohl die Zelllinie DU-145 als auch PC-3 zeigten in der quantitativen Analyse der γ H2AX-Foci eine erhöhte Anzahl γ H2AX-positiver Zellen nach der kombinierten Behandlung. Diese Zunahme war jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 4-26 A-B). Die Immunblot-Analyse wies nach der THZ531- und der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron eine deutliche γ H2AX-Expression auf (Abbildung 4-26 C).

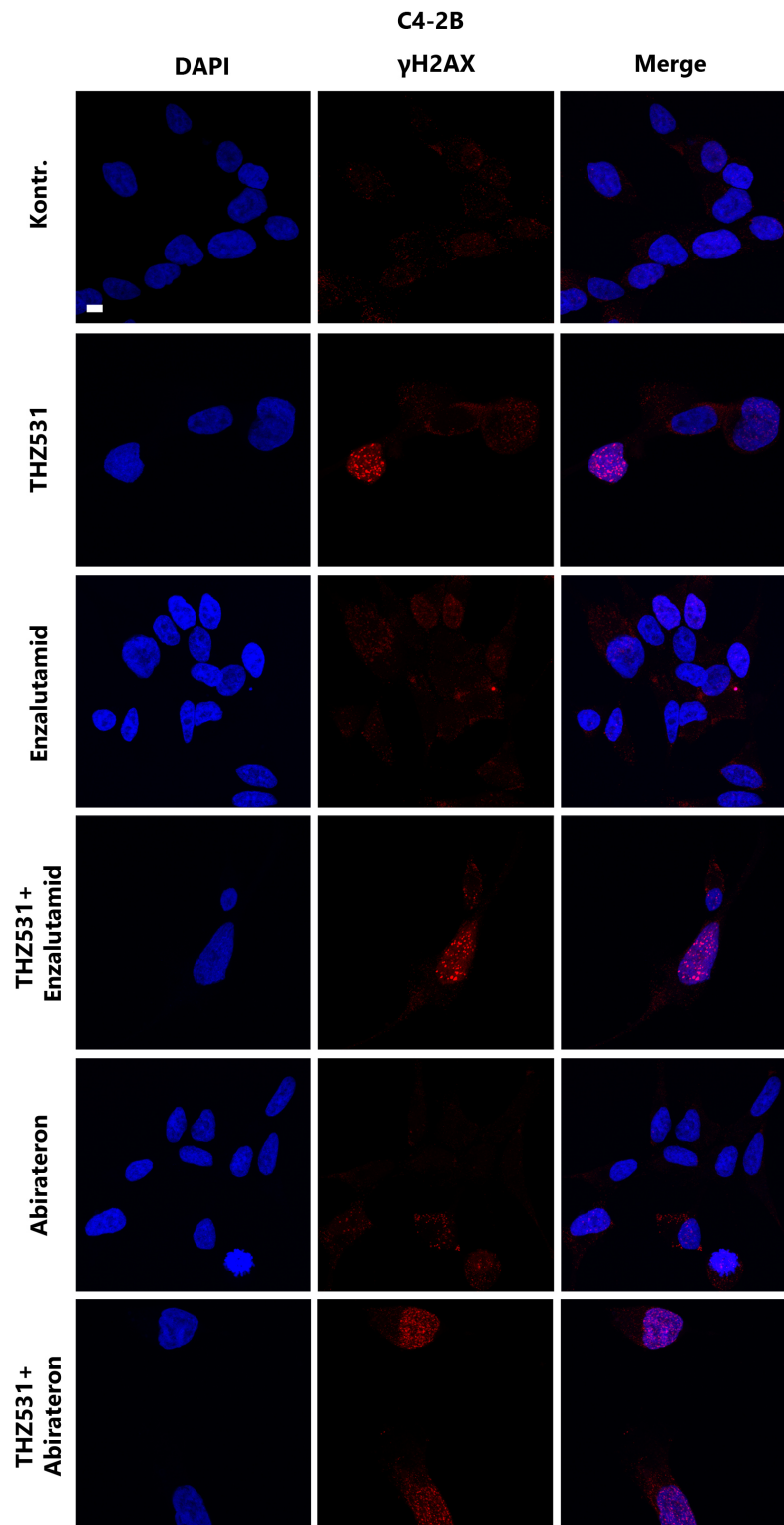


Abbildung 4-20 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie C4-2B. C4-2B-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 μ M Enzalutamid oder 10 μ M Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden C4-2B-Zellen 72 h nach der Behandlung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper angefärbt und die DNA mit DAPI gegengefärbt. Repräsentative *Z-stack*-Aufnahmen der Kontroll- und behandelten Zellen mit γ H2AX-Foci (rot), DAPI (blau) und der überlagerten Farbkanäle (Merge) sind dargestellt. Jede Aufnahme wurde aus fünf Bildern entlang der Z-Achse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit 63-facher Vergrößerung aufgenommen (Maßstab = 10 μ m). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

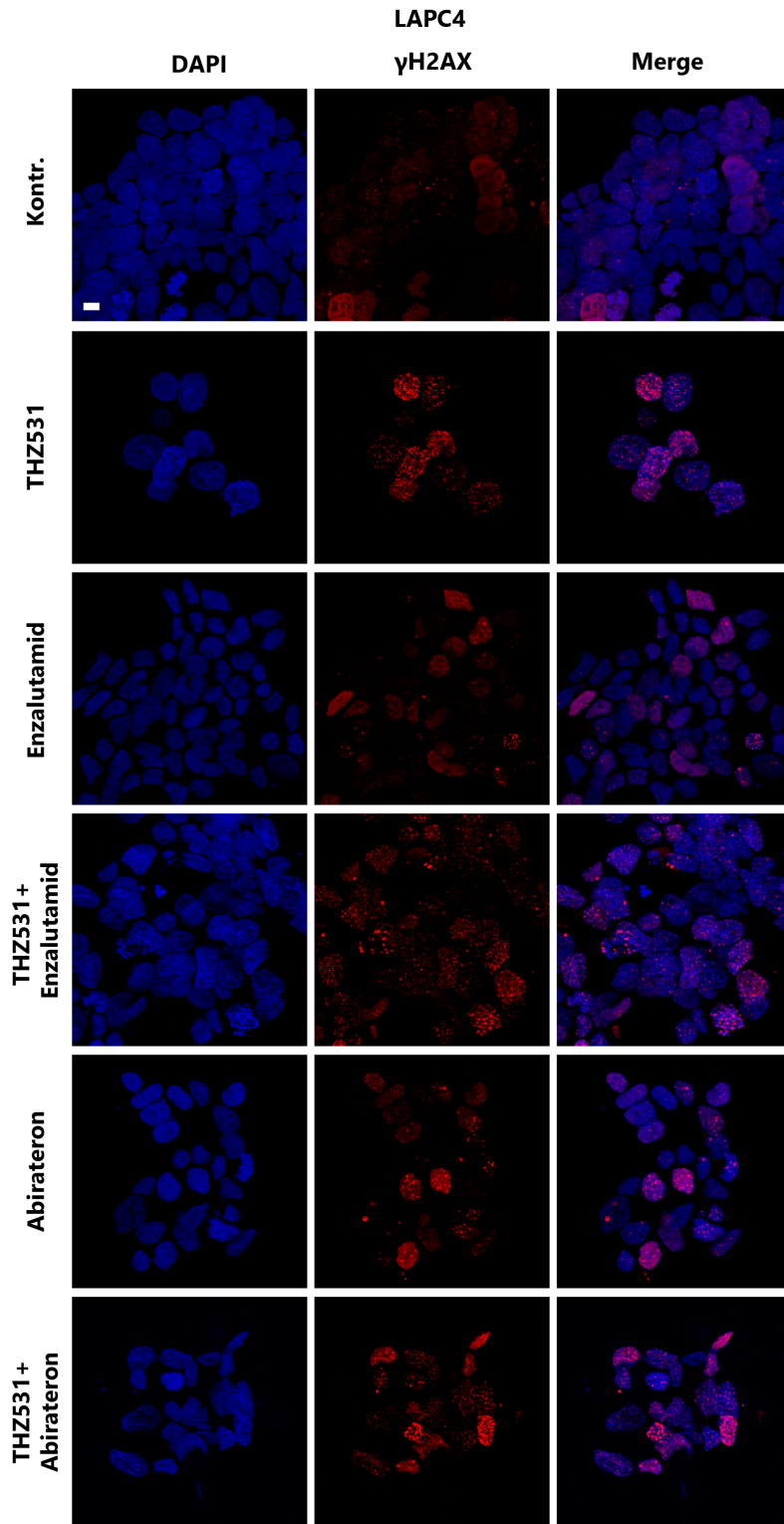


Abbildung 4-21 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie LAPC4. LAPC4-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 μ M Enzalutamid oder 10 μ M Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden LAPC4-Zellen 72 h nach der Behandlung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper angefärbt und die DNA mit DAPI gegengefärbt. Repräsentative *Z-stack*-Aufnahmen der Kontroll- und behandelten Zellen mit γ H2AX-Foci (rot), DAPI (blau) und der überlagerten Farbkanäle (Merge) sind dargestellt. Jede Aufnahme wurde aus fünf Bildern entlang der Z-Achse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit 63-facher Vergrößerung aufgenommen (Maßstab = 10 μ m). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

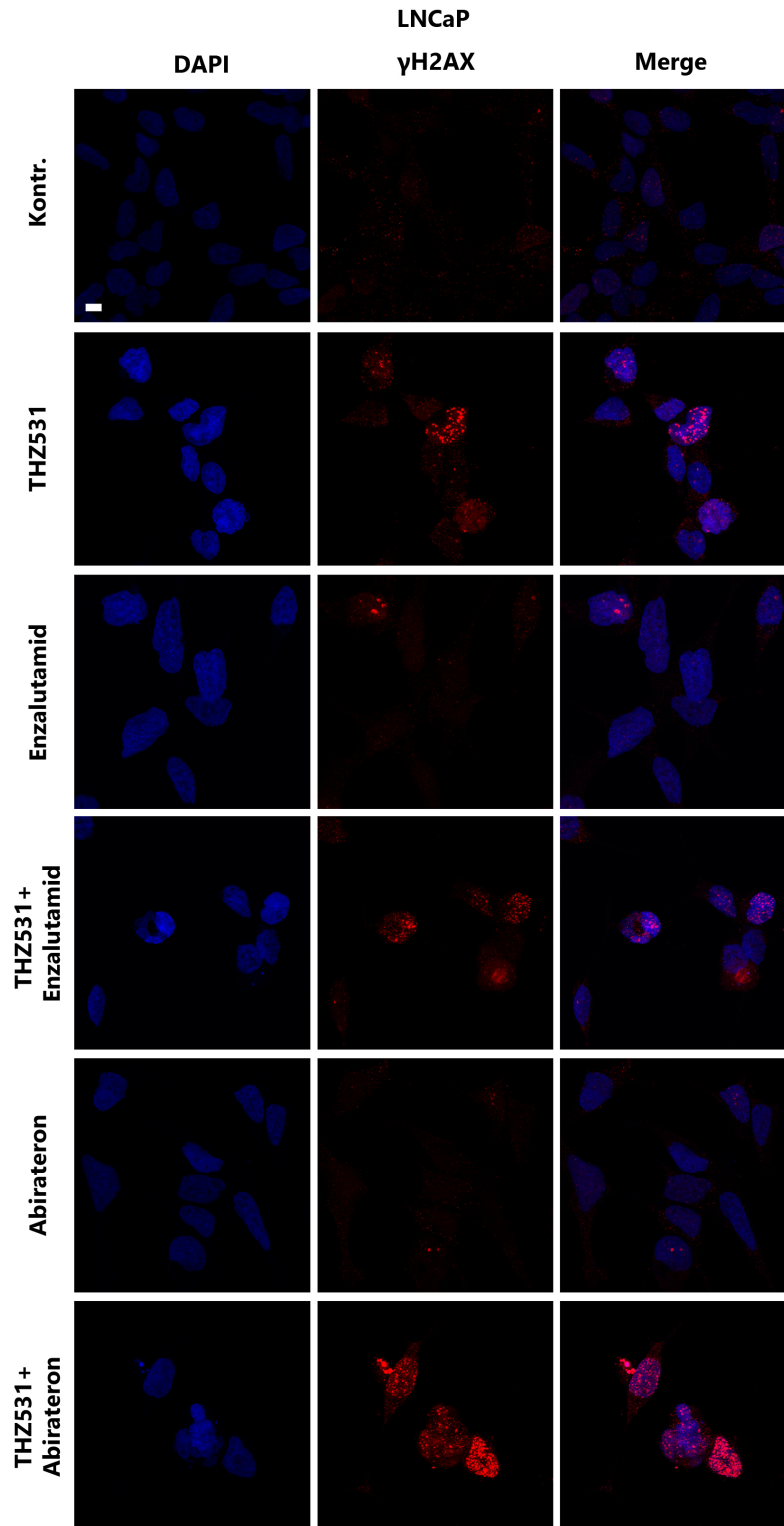
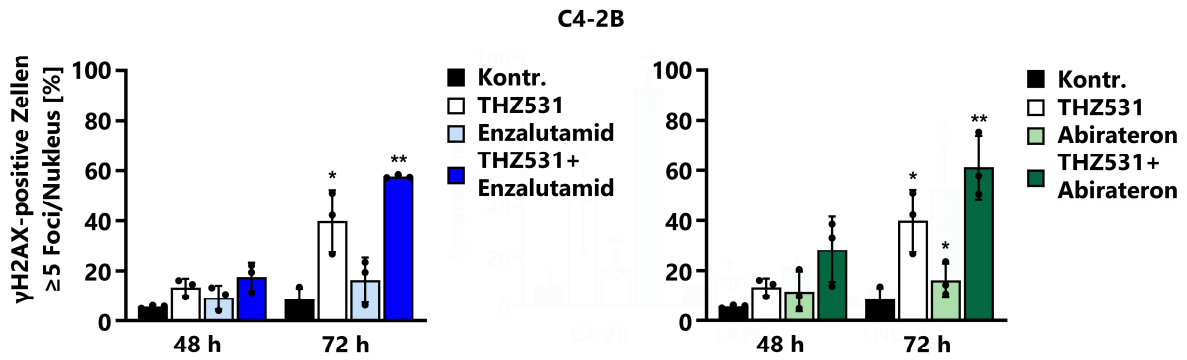
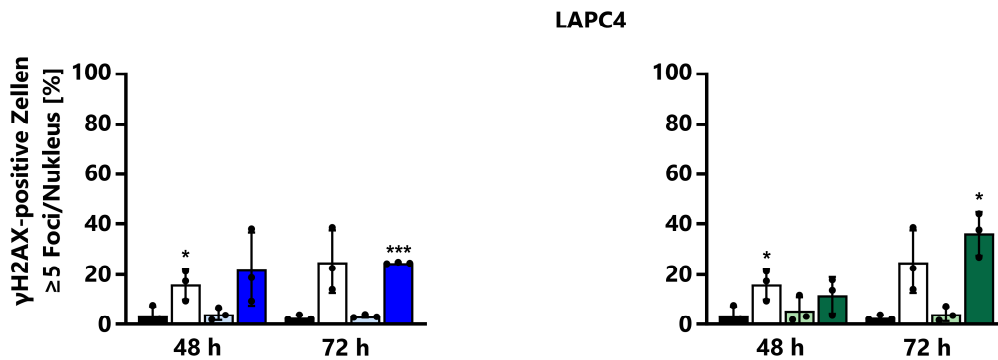


Abbildung 4-22 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie LNCaP. LNCaP-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 μ M Enzalutamid oder 10 μ M Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden LNCaP-Zellen 72 h nach der Behandlung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper angefärbt und die DNA mit DAPI gegengefärbt. Repräsentative *Z-stack*-Aufnahmen der Kontroll- und behandelten Zellen mit γ H2AX-Foci (rot), DAPI (blau) und der überlagerten Farbkanäle (Merge) sind dargestellt. Jede Aufnahme wurde aus fünf Bildern entlang der Z-Achse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit 63-facher Vergrößerung aufgenommen (Maßstab = 10 μ m). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

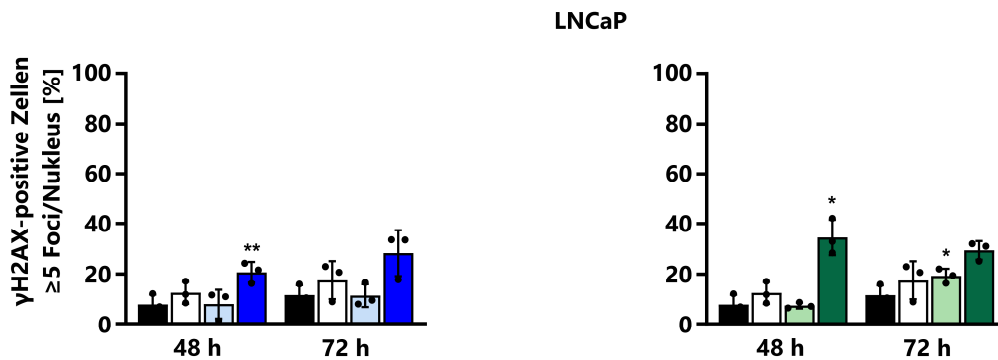
A



B



C



D

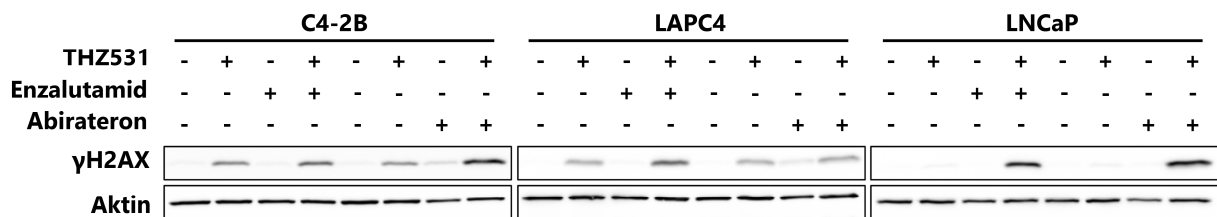


Abbildung 4-23 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron verursacht die Akkumulation von DNA-Schäden in den androgensensitiven PCa-Zelllinien. (A-D) C4-2B-, LAPC4- und LNCaP-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 µM Enzalutamid oder 10 µM Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen 48 h und 72 h nach der Behandlung mit einem Anti-γH2AX-Antikörper angefärbt. (A-C) Der prozentuale Anteil γH2AX-positiver Zellen (≥ 5 γH2AX-Foci pro Nukleus) wurde quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (n=3± s.d., t-Test, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; Behandlung versus Kontrolle). (D) Die Immunblot-Analyse von γH2AX wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 µg Gesamtprotein wurde auf einem 15%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

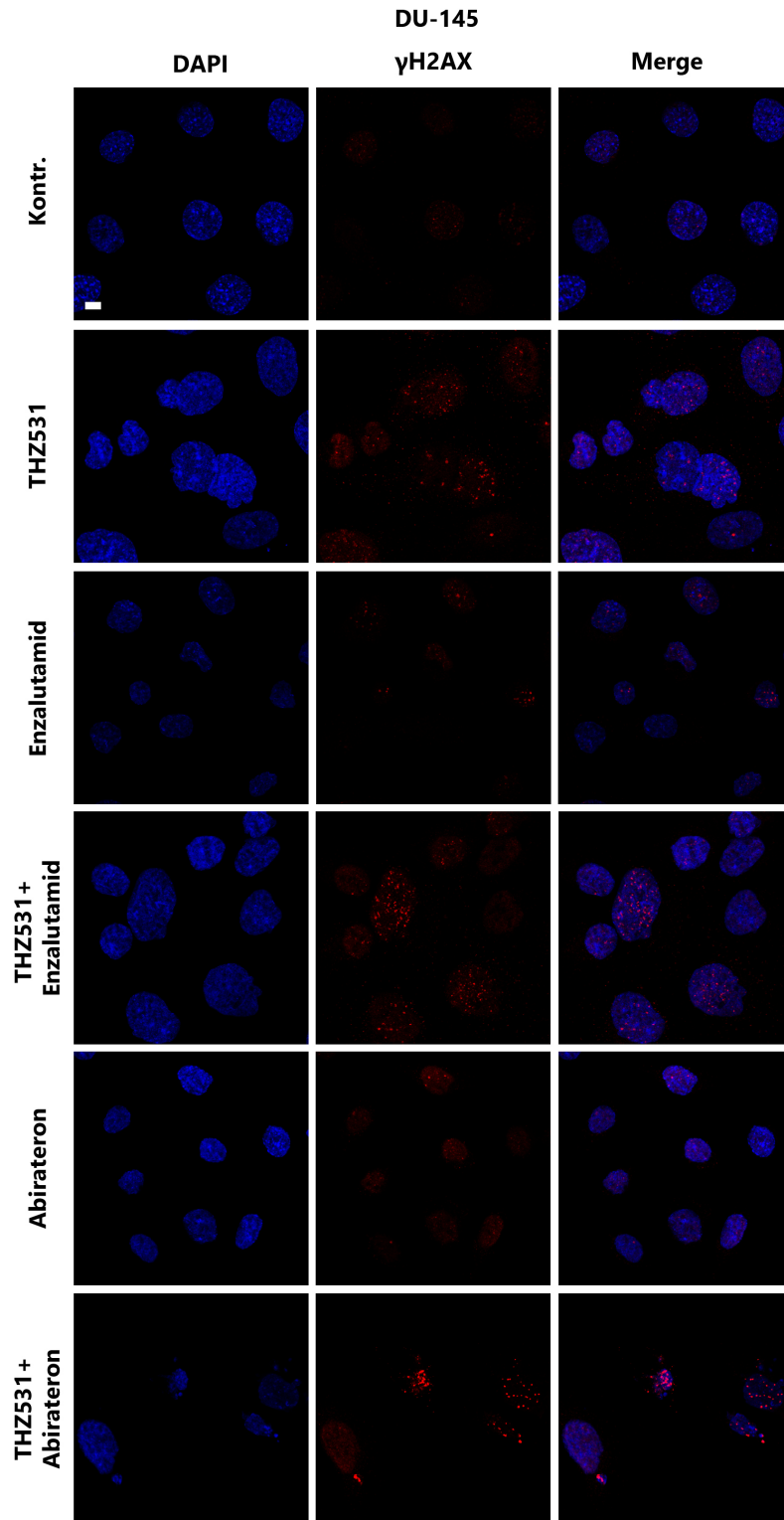


Abbildung 4-24 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie DU-145. DU-145-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 μ M Enzalutamid oder 10 μ M Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden DU-145-Zellen 72 h nach der Behandlung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper angefärbt und die DNA mit DAPI gegengefärbt. Repräsentative *Z-stack*-Aufnahmen der Kontroll- und behandelten Zellen mit γ H2AX-Foci (rot), DAPI (blau) und der überlagerten Farbkanäle (Merge) sind dargestellt. Jede Aufnahme wurde aus fünf Bildern entlang der Z-Achse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit 63-facher Vergrößerung aufgenommen (Maßstab = 10 μ m).

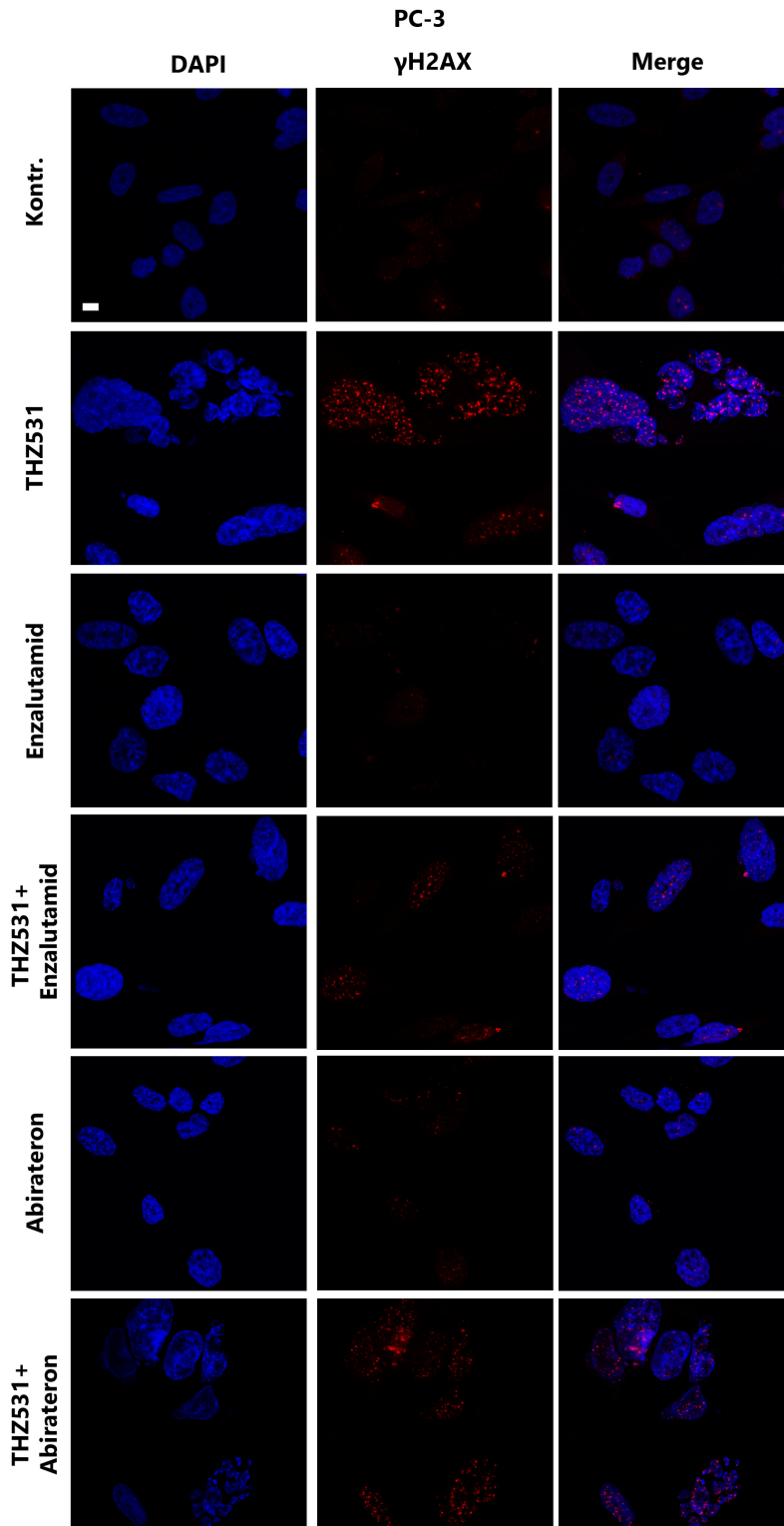
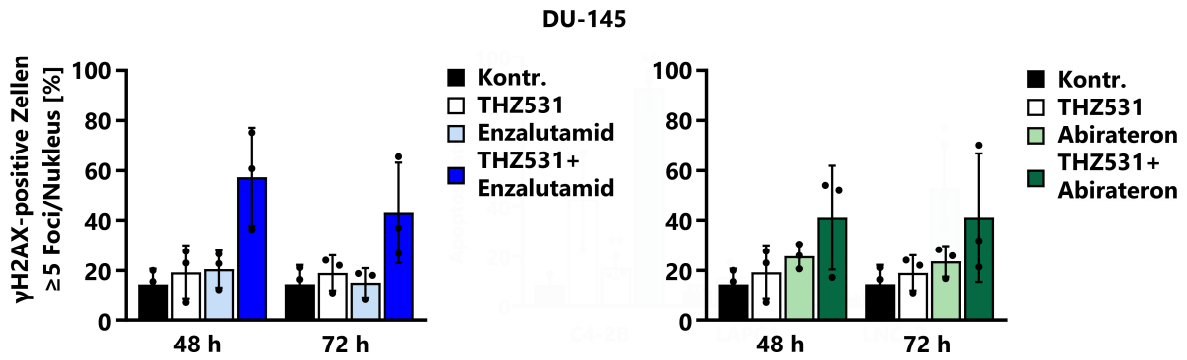
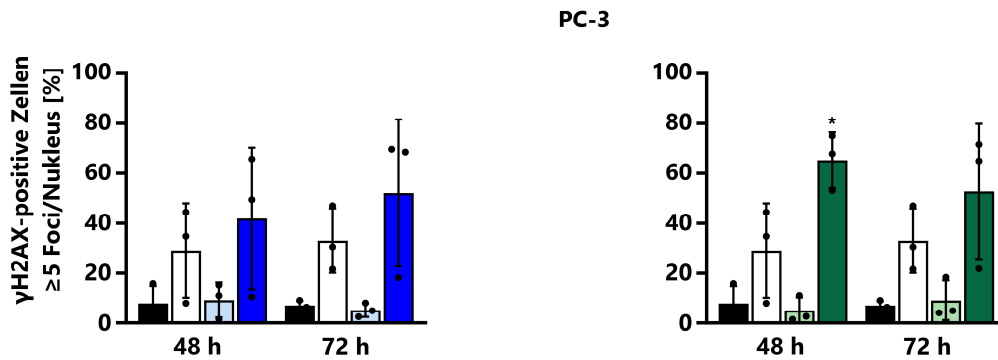


Abbildung 4-25 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie PC-3. PC-3-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 μ M Enzalutamid oder 10 μ M Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden PC-3-Zellen 72 h nach der Behandlung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper angefärbt und die DNA mit DAPI gegengefärbt. Repräsentative *Z-stack*-Aufnahmen der Kontroll- und behandelten Zellen mit γ H2AX-Foci (rot), DAPI (blau) und der überlagerten Farbkanäle (Merge) sind dargestellt. Jede Aufnahme wurde aus fünf Bildern entlang der Z-Achse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie mit 63-facher Vergrößerung aufgenommen (Maßstab = 10 μ m).

A



B



C

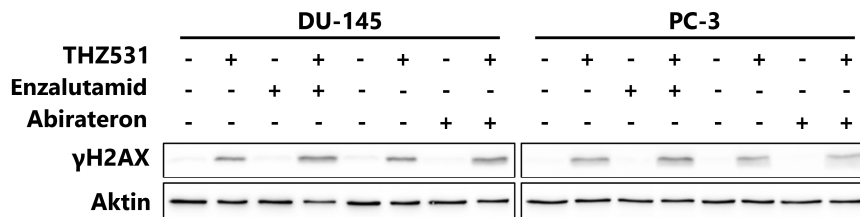


Abbildung 4-26 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron verursacht die Akkumulation von DNA-Schäden in den androgenunabhängigen PCa-Zelllinien. (A-C) DU-145- und PC-3-Zellen wurden mit 100 nM THZ531 und 10 μ M Enzalutamid oder 10 μ M Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen 48 h und 72 h nach der Behandlung mit einem Anti- γ H2AX-Antikörper angefärbt. (A-B) Der prozentuale Anteil γ H2AX-positiver Zellen (≥ 5 γ H2AX-Foci pro Nucleus) wurde quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3 \pm$ s.d., t-Test, $*p < 0,05$; Behandlung versus Kontrolle). (C) Die Immunblot-Analyse von γ H2AX wurde 72 h nach der Behandlung an Gesamtzellextrakten durchgeführt. 30 μ g Gesamtprotein wurde auf einem 15%igen SDS-PAGE-Gel analysiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

4.3.2.1 Effekte der kombinierten Behandlung mit THZ531 und der ADT – *ex vivo*

Die Erforschung neuer therapeutischer Ansätze für die Behandlung des PCa ist allein durch *in vitro*-Modelle, wie die Zellkultur, nur begrenzt möglich, da diese Modelle die dreidimensionale Architektur, die Heterogenität und die Mikroumgebung des Tumors nicht berücksichtigen. Das Fehlen dieser Tumormerkmale erschwert die genaue Analyse und Vorhersage des individuellen Therapieansprechens eines Patienten [241, 242]. Daher wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine geeignetere Methode – das *ex vivo*-Gewebekulturmodell – verwendet, um die Auswirkungen der gleichzeitigen Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und des AR-Signalwegs an humanem PCa-Gewebe zu analysieren.

Zu diesem Zweck wurde frisches PCa-Gewebe von zwölf Patienten verwendet, die sich einer radikalen Prostatektomie unterzogen hatten. Die Tumorgewebsstanze wurde daraufhin in 300 µm dicke Schnitte geschnitten, in frischem Medium kultiviert und mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron behandelt. Nach 72 h wurde das Gewebe mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend immunhistochemisch analysiert. Alle Tumorproben wurden parallel zur *ex vivo*-Kultivierung am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz nach dem neuen ISUP 2014/WHO 2016-Grading-System klassifiziert und eingestuft [54, 55]. In Tabelle 4-1 sind die klinischen und pathologischen Charakteristika der analysierten Patienten aufgelistet.

Tabelle 4-1 Klinische und pathologische Informationen des Patientenkollektivs des *ex vivo*-Modells (n=12).

Tumor Nr.	Alter bei Operation	TNM-Klassifikation	ISUP/WHO-Grading
1	70	pT3a, pN0, L0, V0, Pn1	3
2	87	pT1b, pNx, L0, V0, Pn0	3
3	59	pT3a, pN1, pMx, L0, V0, Pn1	3
4	61	pT2a, pNx, L0, V0, Pn1	2
5	85	pT3b, pN1, pMx, L1, V1, Pn1	5
6	52	pT3b, pN0, L1, V1, Pn1	3
7	69	pT3b, pN0, L0, V0, Pn1	2
8	58	pT3b, pN0, L0, V0, Pn1	3
9	66	pT2c, pN0, L0, V0, Pn1	2
10	71	pT3a, pN0, L0, V0, Pn1	2
11	71	pT3a, pN0, L0, V0, Pn1	3
12	61	pT2c, pN0, L0, V0, Pn1	2

Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Zunächst wurde die Proteinexpression von CycK, CDK12 und dem AR anhand des unbehandelten und nicht kultivierten PCa-Gewebes für jeden Patienten immunhistochemisch verifiziert. In Abbildung 4-27 sind repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen der genannten Proteine im PCa-Gewebe dargestellt. Die eindeutige und spezifische Immunreaktion der verwendeten Antikörper zeigt deutlich, dass das Tumorgewebe sowohl den AR als auch CycK und CDK12 exprimiert.

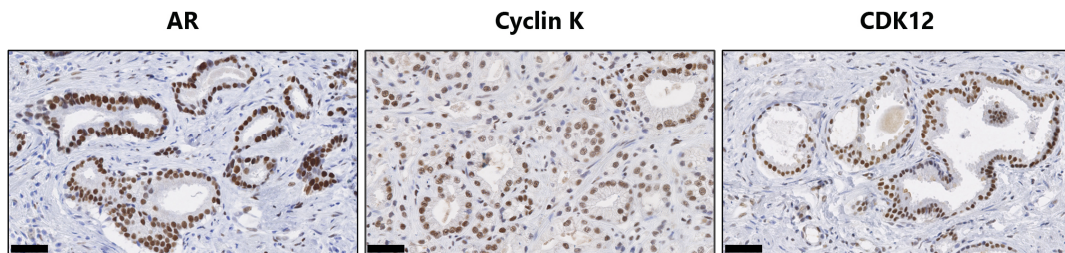
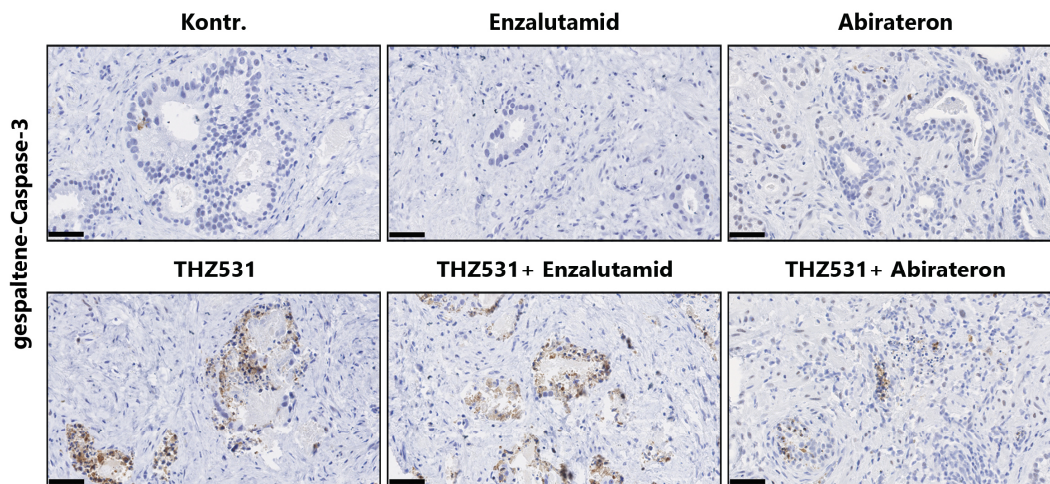


Abbildung 4-27 Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung für AR, CycK und CDK12 im PCa-Gewebe. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von nicht kultiviertem humanem primärem PCa-Gewebe, das mit einem Anti-AR-, Anti-CycK- und Anti-CDK12-Antikörper gefärbt wurde (Maßstab = 50 µm). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Um das Therapieansprechen auf die gleichzeitige Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und des AR-Signalweges zu untersuchen, wurden die Auswirkungen der jeweiligen Behandlung auf die Proliferationsfähigkeit und die Induktion des apoptotischen Zelltods im PCa-Gewebe analysiert. Dazu wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 und der gespaltenen Caspase-3 als Apoptosemarker durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen eines Patienten sind in Abbildung 4-28 A für die Caspase-3-Spaltung und in Abbildung 4-28 B für Ki67 dargestellt. Hierbei wurde eine positive Färbung der Caspase-3-Spaltung im Gewebe, sowohl nach der Behandlung mit THZ531 als auch nach der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron, beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten in der immunhistochemischen Färbung mit Ki67 nach der kombinierten Behandlung weniger Ki67-positive Tumorzellen detektiert werden.

A



B

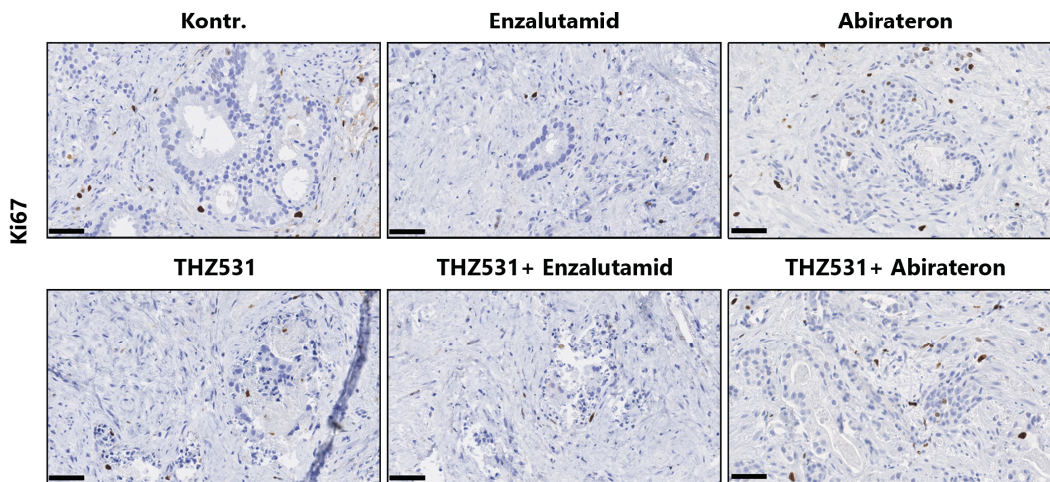


Abbildung 4-28 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron induziert die Caspase-3-Spaltung und vermindert die Ki67-Positivität im *ex vivo*-Gewegekulturmodell. Frisches humanes PCa-Gewebe wurde für 72 h *ex vivo* in einem Gewebekulturmodell mit 500 nM THZ531 und 10 µM Enzalutamid oder 10 µM Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Die immunhistochemische Färbung der PCa-Gewebeschnitte wurde nach der Behandlung mit einem (A) Anti-aktive (gespaltene) Caspase-3-Antikörper und einem (B) Anti-Ki67-Antikörper durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen sind dargestellt (Maßstab = 50 µm). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Zur Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen von Ki67 und der Caspase-3-Spaltung wurden die gefärbten PCa-Gewebeschnitte mit Hilfe der digitalen Bildanalyse-Software QuPath ausgewertet [206]. Die individuelle Quantifizierung der gespaltenen Caspase-3 im PCa-Gewebe ergab hierbei ein sehr heterogenes Spektrum der Therapieantwort: In den Tumorgewebe 2, 10 und 11 wurde eine erhöhte Anzahl Caspase-3-positiver Tumorzellen nach den Kombinationsbehandlungen detektiert. Im Gegensatz dazu zeigten beispielsweise die Tumorgewebe 3 und 8 keine Zunahme an Caspase-3-positiven Tumorzellen, weder nach der alleinigen THZ531- noch nach der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron (Abbildung 4-29, Abbildung 4-30).

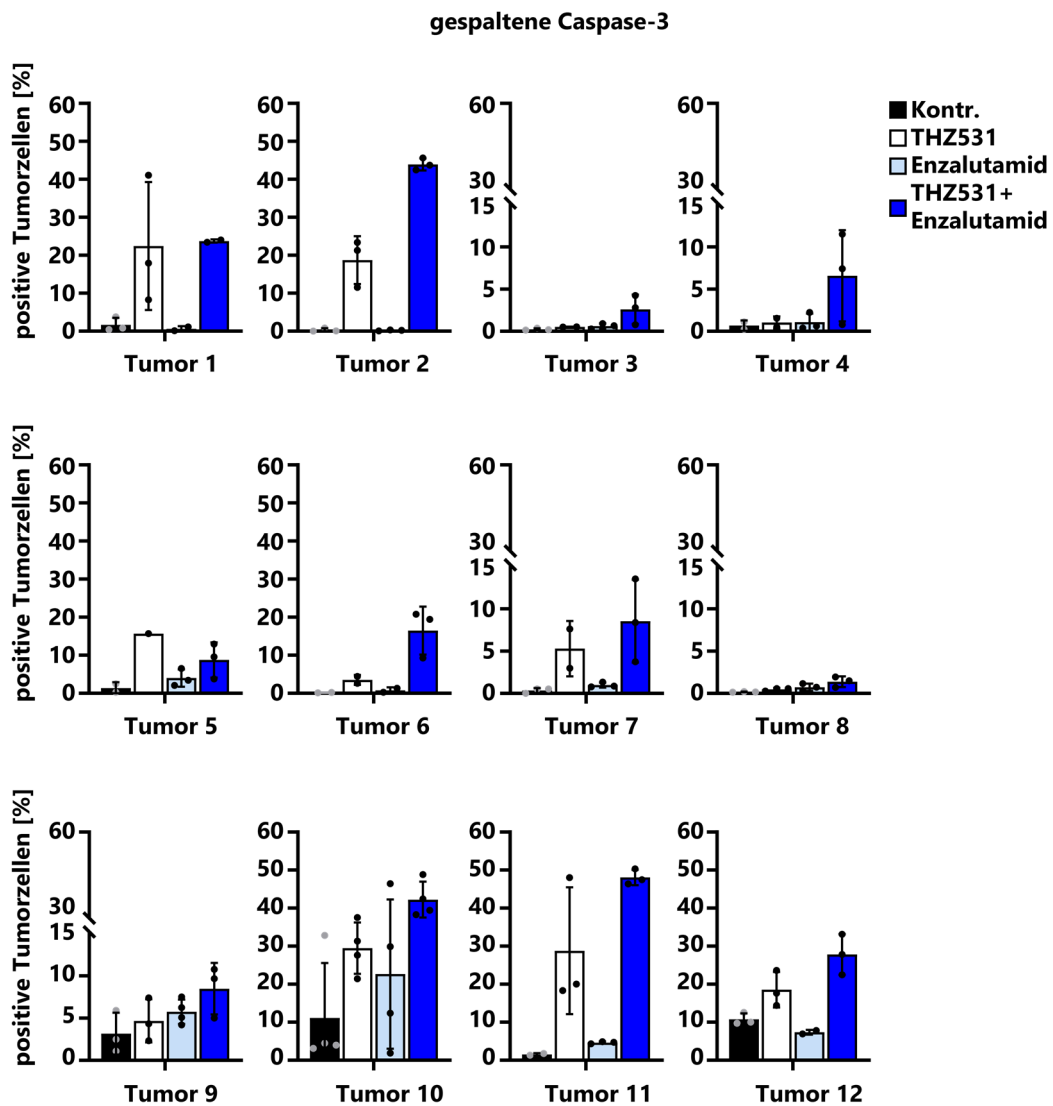


Abbildung 4-29 Individuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung der gespaltenen Caspase-3 des Patientenkollektivs im *ex vivo*-Gewebekulturmodell (n=12). Frisches humanes PCA-Gewebe wurde für 72 h *ex vivo* in einem Gewebekulturmodell mit 500 nM THZ531 und 10 µM Enzalutamid behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Die immunhistochemische Färbung der PCA-Gewebeschnitte wurde nach der Behandlung mit einem Anti-aktive (gespaltene) Caspase-3-Antikörper durchgeführt und mittels digitaler Bildanalyse-Software analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil gespaltenen Caspase-3-positiver Tumorzellen im PCA-Gewebe. Zur Analyse wurden jeweils drei oder vier Tumorgewebeschnitte als biologisches Replikat pro Behandlung verwendet (n=3 oder 4± s.d.). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

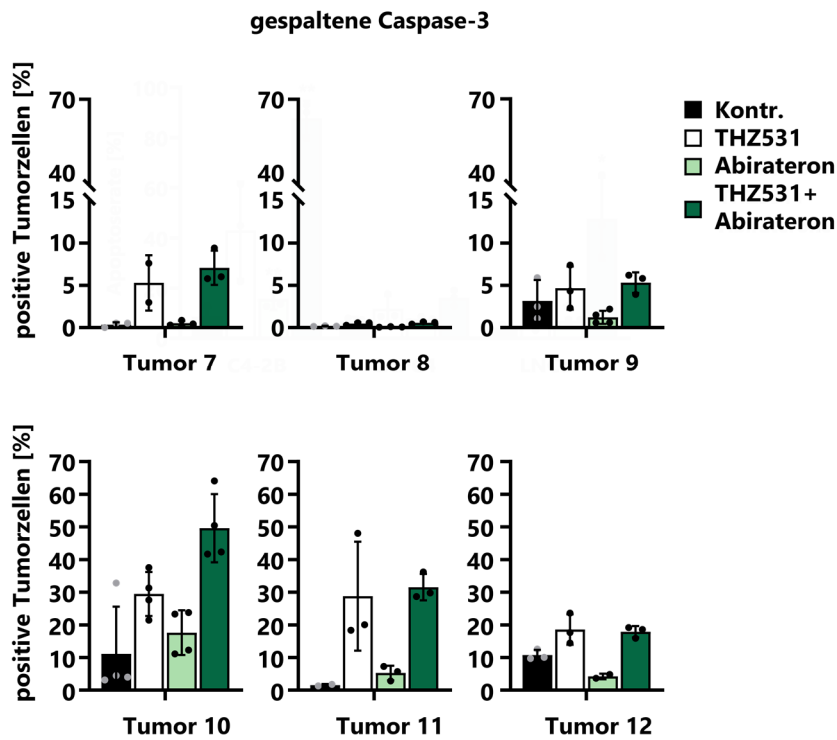


Abbildung 4-30 Individuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung der gespaltenen Caspase-3 des Patientenkollektivs im *ex vivo*-Gewebekulturmodell (n=6). Frisches humanes PCa-Gewebe wurde für 72 h *ex vivo* in einem Gewebekulturmodell mit 500 nM THZ531 und 10 μ M Abirateron behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Die immunhistochemische Färbung der PCa-Gewebeschnitte wurde nach der Behandlung mit einem Anti-aktive (gespaltene) Caspase-3-Antikörper durchgeführt und mittels digitaler Bildanalyse-Software analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil gespalteener Caspase-3-positiver Tumorzellen im PCa-Gewebe. Zur Analyse wurden jeweils drei oder vier Tumorgewebeschnitte als biologisches Replikat pro Behandlung verwendet (n=3 oder 4 \pm s.d.). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Die Ergebnisse der globalen Analyse der gespaltenen Caspase-3-Färbung im Patientenkollektiv des *ex vivo*-Gewebekulturmodells zeigten eine signifikante Erhöhung apoptotischer Tumorzellen, die durch die kombinierte Behandlung von THZ531 und der beiden Antiandrogene verursacht wurde. Eine erhöhte Anzahl gespaltenen Caspase-3-positiver Tumorzellen wurde sowohl nach der alleinigen THZ531-Behandlung als auch nach der Kombination mit THZ531 und Enzalutamid (Abbildung 4-31 A) oder Abirateron (Abbildung 4-31 B) beobachtet.

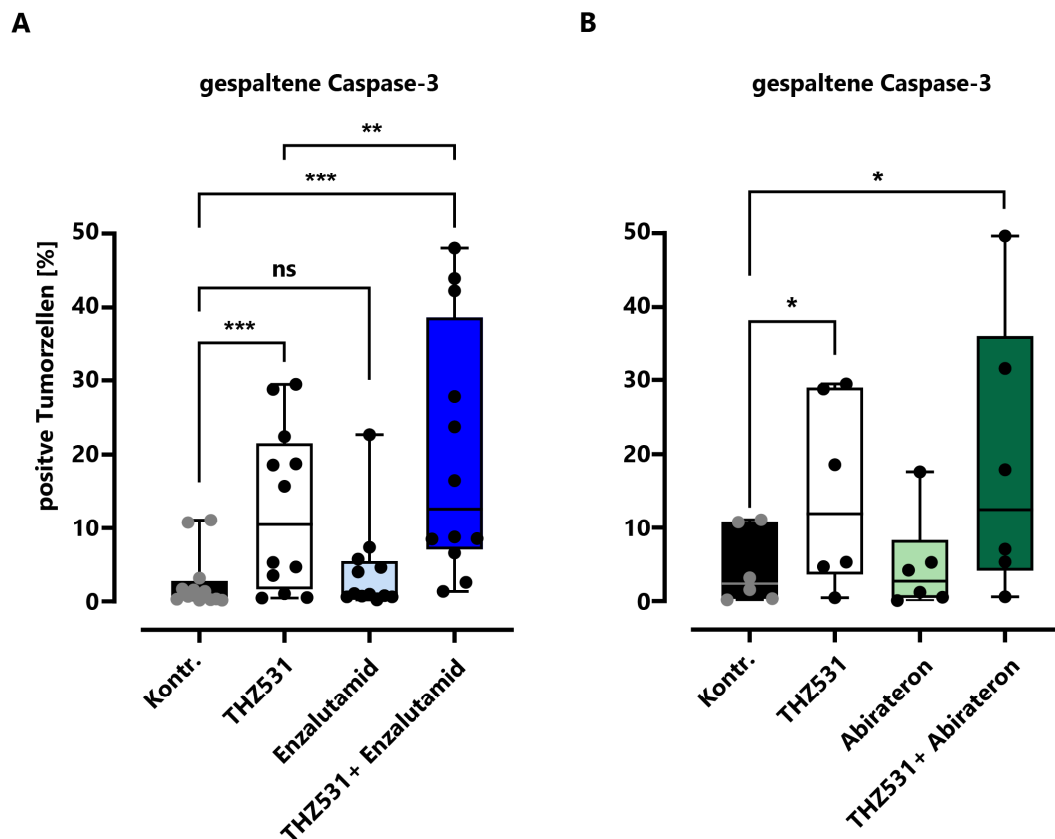


Abbildung 4-31 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron induziert Apoptose im *ex vivo*-Gewebekulturmodell. Frisches humanes PCa-Gewebe wurde für 72 h *ex vivo* in einem Gewebekulturmodell mit 500 nM THZ531 und 10 µM Enzalutamid (A) oder 10 µM Abirateron (B) behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Die immunhistochemische Färbung der PCa-Gewebeschnitte wurde nach der Behandlung mit einem Anti-aktive (gespaltene) Caspase-3-Antikörper durchgeführt und mittels digitaler Bildanalyse-Software analysiert. Die Boxplots zeigen die Quantifizierung des prozentualen Anteils aktiver Caspase-3-positiver Tumorzellen von 12 Patienten nach der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Enzalutamid (A) und von 6 Patienten nach der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Abirateron (B). Jeder Punkt symbolisiert die Mittelwerte aus drei oder vier Tumorgewebeschnitten pro Behandlung jedes Patienten (Mittelwerte ± s.d., gepaarter zweiseitiger t-Test oder Wilcoxon signed-rank test, *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ns, nicht signifikant). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Eine ähnlich heterogene Reaktion hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit des PCa-Gewebes wurde nach der kombinierten Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und des AR-Signalwegs beobachtet. In einigen PCa-Gewebeproben (Tumor 3, 6 und 7) wurde nach der Behandlung mit THZ531 eine erhöhte Anzahl Ki67-positiver Tumorzellen im Vergleich zum Kontrollgewebe festgestellt. Im Gegensatz dazu führte die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid

oder Abirateron in dem genannten Tumorgewebe zu einer Abnahme des Anteils an Ki67-positiven Zellen. Darüber hinaus wurden Tumorgewebe identifiziert, die nur einen sehr geringen Anteil an Ki67-positiven Tumorzellen (Tumor 8 und 10) aufwiesen und somit eine geringe Proliferationsaktivität zeigten. Die Effekte der kombinierten Behandlung waren in diesen Tumorproben ebenfalls weniger ausgeprägt (Abbildung 4-32, Abbildung 4-33).

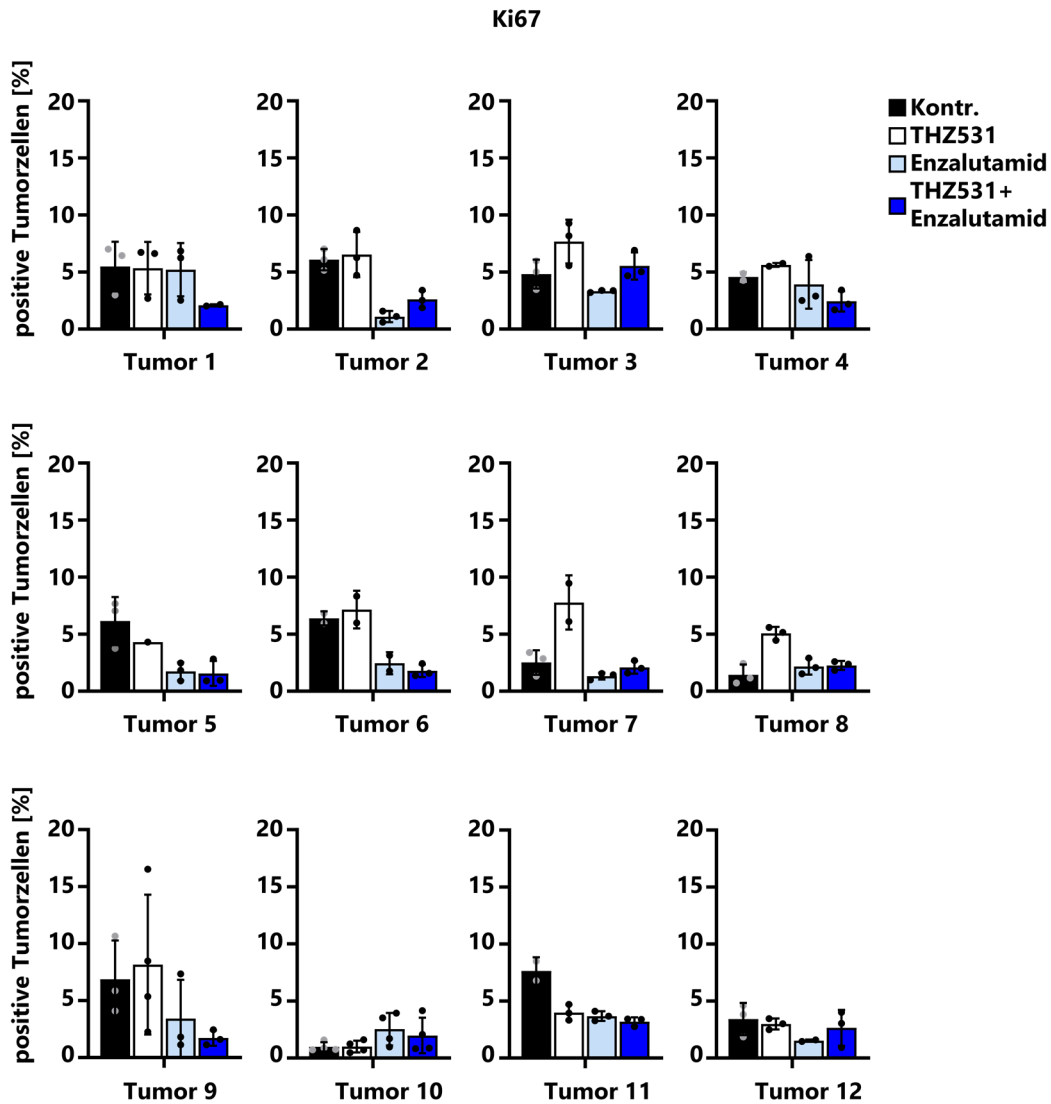


Abbildung 4-32 Individuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung von Ki67 des Patientenkollektivs im *ex vivo*-Gewebekulturmodell (n=12). Frisches humanes PCa-Gewebe wurde für 72 h *ex vivo* in einem Gewebekulturmodell mit 500 nM THZ531 und 10 μ M Enzalutamid behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Die immunhistochemische Färbung der PCa-Gewebeschnitte wurde nach der Behandlung mit einem Anti-Ki67-Antikörper durchgeführt und mittels digitaler Bildanalysesoftware analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Ki67-positiver Tumorzellen im PCa-Gewebe. Zur Analyse wurden jeweils drei oder vier Tumorgewebeschnitte als biologisches Replikat pro Behandlung verwendet (n=3 oder 4 \pm s.d.). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

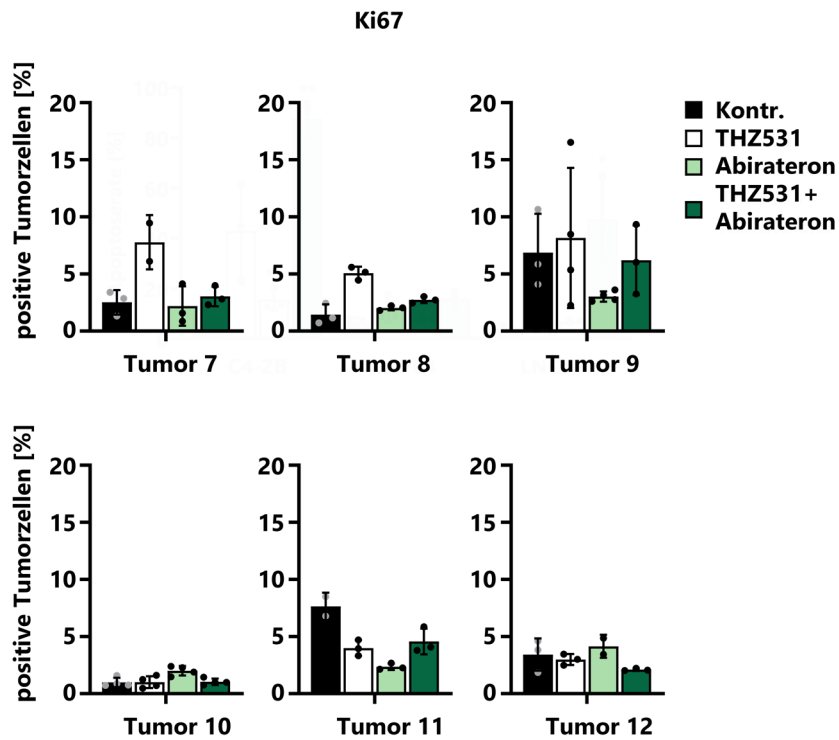


Abbildung 4-33 Individuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung von Ki67 des Patientenkollektivs im *ex vivo*-Gewegekulturmodell (n=6). Frisches humanes PCa-Gewebe wurde *ex vivo* in einem Gewebekulturmodell mit 500 nM THZ531 und 10 μ M Abirateron für 72 h behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Die immunhistochemische Färbung der PCa-Gewebeschnitte wurde nach der Behandlung mit einem Anti-Ki67-Antikörper durchgeführt und mittels digitaler Bildanalysesoftware analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Ki67-positiver Tumorzellen im PCa-Gewebe. Zur Analyse wurden jeweils drei oder vier Tumorgewebeschnitte als biologisches Replikat pro Behandlung verwendet (n=3 oder 4 \pm s.d.). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse des gesamten PCa-Gewebekollektivs zeigten eine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils an Ki67-positiven Tumorzellen nach der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Enzalutamid im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit THZ531 und dem Kontrollgewebe (Abbildung 4-34 A). Analog dazu reduzierte die Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Abirateron die Ki67-Positivität, jedoch nicht in einem statistisch signifikanten Ausmaß (Abbildung 4-34 B).

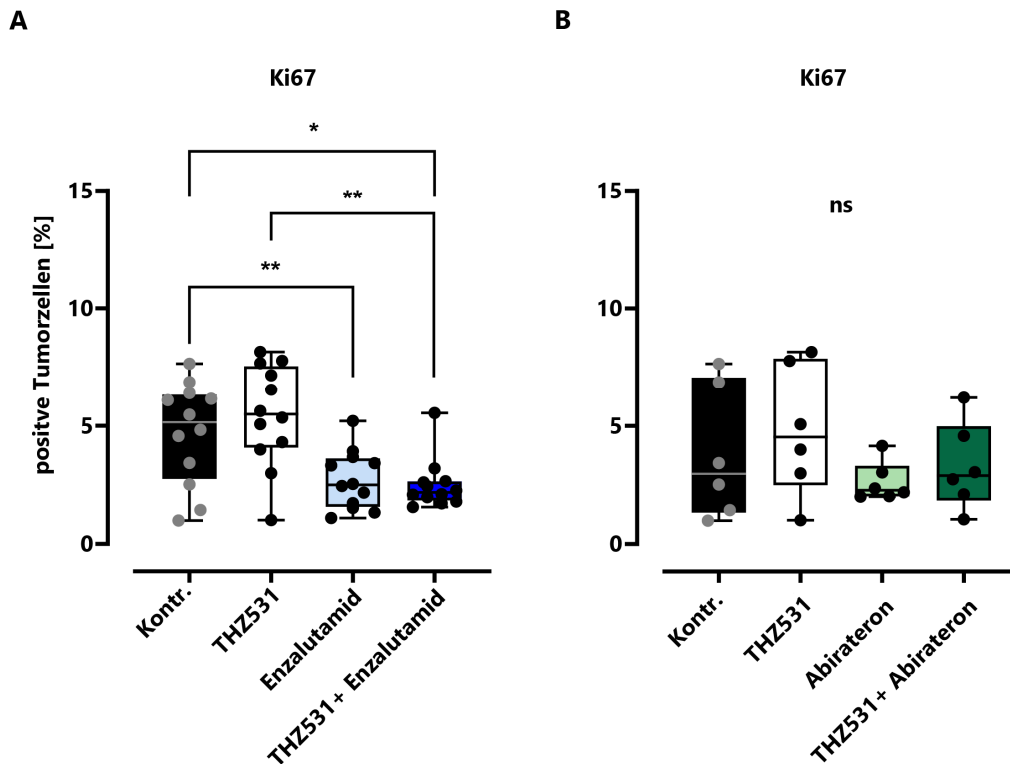


Abbildung 4-34 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron beeinträchtigt die Proliferation im *ex vivo*-Gewebekulturmodell. Frisches humanes PCa-Gewebe wurde für 72 h *ex vivo* in einem Gewebekulturmodell mit 500 nM THZ531 und 10 µM Enzalutamid (A) oder 10 µM Abirateron (B) behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle (Kontr.) sowie den Einzelbehandlungen der Inhibitoren verglichen. Die immunhistochemische Färbung der PCa-Gewebeschnitte wurde nach der Behandlung mit einem Anti-Ki67-Antikörper durchgeführt und mittels digitaler Bildanalyse-Software analysiert. Die Boxplots zeigen die Quantifizierung des prozentualen Anteils Ki67-positiver Tumorzellen von 12 Patienten nach der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Enzalutamid (A) und von 6 Patienten nach der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Abirateron (B). Jeder Punkt symbolisiert die Mittelwerte aus drei oder vier Tumorgewebeschnitten pro Behandlung jedes Patienten (Mittelwerte ± s.d., gepaarter zweiseitiger t-Test oder Wilcoxon signed-rank test, *p < 0,05; **p < 0,01; ns, nicht signifikant). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

4.4 Klinische Relevanz des CycK-CDK12-Komplexes im PCa

In den vorherigen Abschnitten 4.2 und 4.3 wurde die Eignung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als therapeutische Zielstrukturen sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Standardtherapieformen des PCas *in vitro* und *ex vivo* untersucht. Die dabei beobachteten antitumorigenen Effekte dieser Behandlungen unterstreichen die Notwendigkeit, die klinische Bedeutung des CycK-CDK12-Komplexes als prognostischen Biomarker bei PCa-Patienten näher zu analysieren. Daher wurde die Expression von CycK und CDK12 immunhistochemisch anhand eines PCa-TMAs ermittelt und anschließend mittels Korrelationsanalysen überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der CycK- und CDK12-Expression und den verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen besteht.

4.4.1 Etablierung der immunhistochemischen Färbung von CDK12 in Zellpellets und Gewebe

Die Etablierung des Anti-CycK-Antikörpers wurde bereits in einer vorangegangenen Studie durchgeführt, sodass dieser direkt für die nachfolgende TMA-Analyse verwendet werden konnte [131]. Dagegen wurden die Spezifität und Sensitivität eines Anti-CDK12-Antikörpers zunächst an FFPE-Zellpellets getestet. Zur Etablierung des Anti-CDK12-Antikörpers wurden Positiv- und Negativkontrollen der PCa-Zellen generiert, um die Antikörperspezifität zu überprüfen sowie unspezifische Bindungen und Hintergrundsignale zu identifizieren und zu minimieren. Hierfür erfolgte die transiente Transfektion der Zelllinien DU-145, LNCaP und PC-3 mit einer spezifischen CDK12-siRNA, während eine unspezifische siRNA als Kontrolle (scram) eingesetzt wurde. Die Zellpellets wurden 72 h nach der Transfektion hergestellt und anschließend immunhistochemisch mit einem Anti-CDK12-Antikörper gefärbt, um die Spezifität und die optimalen Färbebedingungen zu bestimmen.

In den Kontrollzellen konnte ein sehr intensives immunreaktives Signal für CDK12 beobachtet werden. Im Vergleich dazu war die Intensität des CDK12-Signals in den Zellen mit reduzierter CDK12-Expression (CDK12 si) deutlich vermindert. CDK12 konnte hierbei sehr spezifisch im Zellkern detektiert werden. Der Anti-CDK12-Antikörper zeigte somit eine hohe Spezifität für den Nachweis von CDK12 in den FFPE-Zellpellets (Abbildung 4-35).

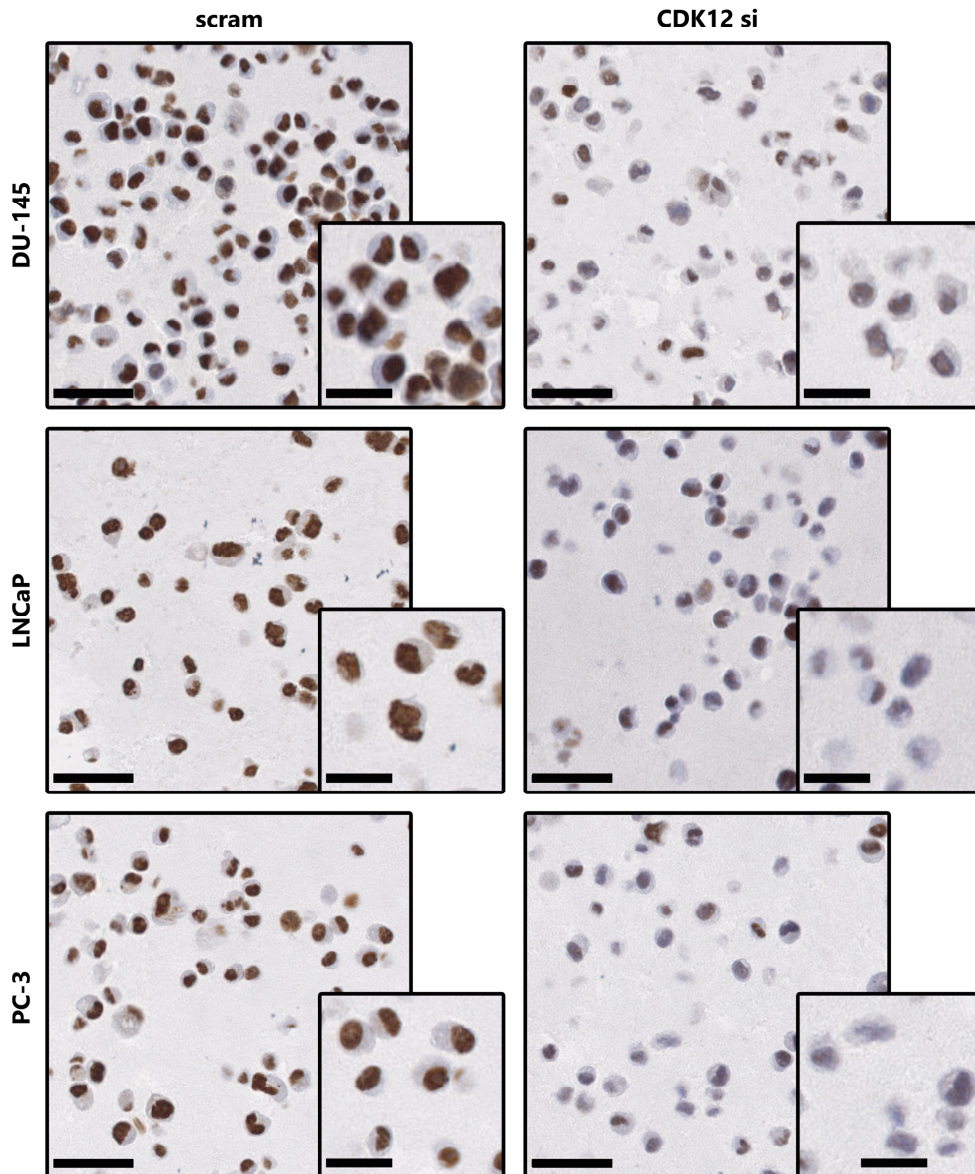


Abbildung 4-35 Der Anti-CDK12-Antikörper zeigt ein spezifisches immunreaktives Signal in FFPE-Zellpellets der PCa-Zelllinien. DU-145-, LNCaP- und PC-3-Zellen wurden mit 1 nM einer CDK12-siRNA (CDK12 si) oder einer unspezifischen Kontroll-siRNA (scram) transfiziert. Für die immunhistochemische Analyse wurden 72 h nach der Transfektion FFPE-Zellpellets hergestellt. Die immunhistochemische Färbung der FFPE-Zellepellets wurde mit einem Anti-CDK12-Antikörper durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung sind dargestellt (Maßstab = 50 μ m). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen die Lokalisation von CDK12 im Nukleus (Maßstab = 10 μ m).

Im Anschluss daran wurden die Färbebedingungen des Anti-CDK12-Antikörpers an FFPE-Gewebeschnitten des TMAs etabliert. Die immunhistochemische Färbung mit dem Anti-CDK12-Antikörper erzeugte auch in diesem Fall ein spezifisches Signal, ohne unspezifische Hintergrundfärbung des Stromas (Abbildung 4-36). Im Vergleich zu den immunhistochemischen Färbungen der Zellpellets wurde im FFPE-Gewebe die CDK12-Expression nicht nur im Nukleus, sondern auch im Zytoplasma detektiert. Insofern war der Anti-CDK12-Antikörper für die immunhistochemische Analyse der CDK12-Expression im PCa-Gewebe geeignet und konnte in der nachfolgenden TMA-Analyse verwendet werden.

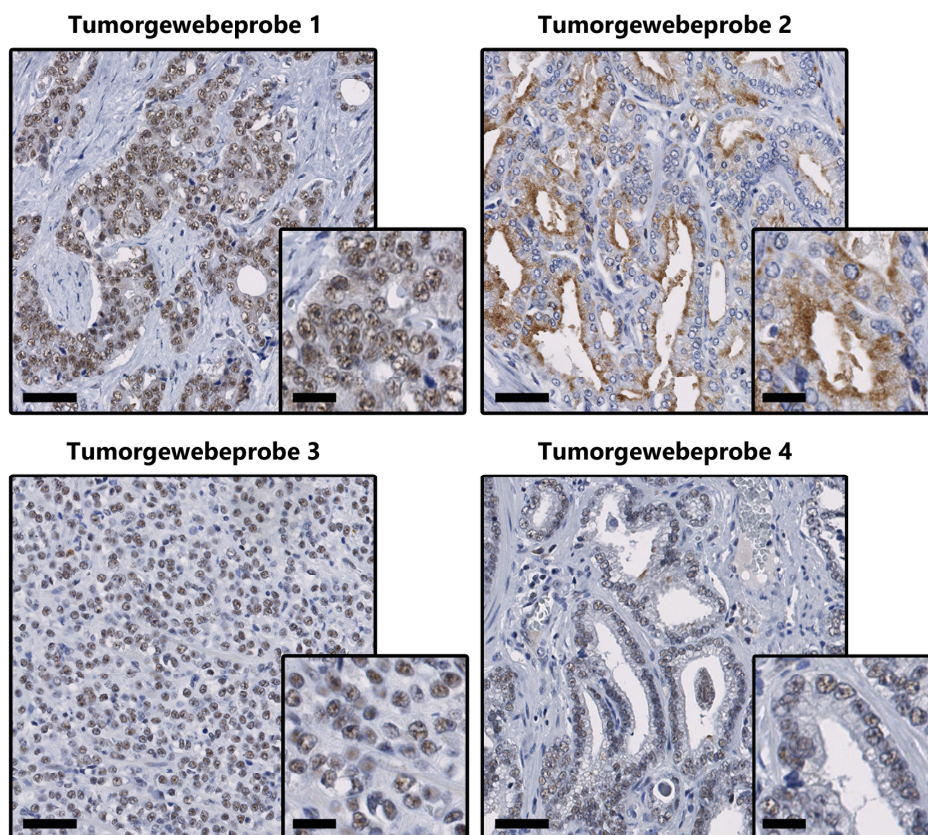


Abbildung 4-36 Der Anti-CDK12-Antikörper zeigt ein spezifisches immunreaktives Signal im PCa-Gewebe. Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem Anti-CDK12-Antikörper an Gewebeproben von PCa-Patienten durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung von CDK12 sind dargestellt (Maßstab = 50 µm). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen die Lokalisation von CDK12 in Nukleus und Zytoplasma (Maßstab = 20 µm).

4.4.2 Evaluierung von CycK und CDK12 als prognostische Biomarker

Nachdem die Bedingungen der immunhistochemischen Färbung von CycK und CDK12 im PCa-Gewebe etabliert waren, wurde der TMA immunhistochemisch mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und anschließend ausgewertet. Das TMA-Kollektiv umfasste 1200 Primärtumorproben aus jeweils zwei unterschiedlichen und morphologisch repräsentativen Geweberegionen von insgesamt 300 PCa-Patienten, die vor der radikalen Prostatektomie keine neoadjuvante Therapie erhalten haben. Zusätzlich wurden, sofern verfügbar, sowohl Metastasengewebe als auch Gewebe von *high-grade* PINs in die TMA-Analyse inkludiert. Die klinischen und pathologischen Merkmale des Patientenkollektivs sind in Tabelle 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2 Zusammenfassung der klinischen und pathologischen Daten des TMA-Kollektivs (n=300).

		n	%
		300	100,0
Alter bei Diagnose			
	≤ 65	114	38,0
	> 65	186	62,0
ISUP/WHO-Grading			
	1	25	8,3
	2	161	53,7
	3	71	23,7
	4	15	5,0
	5	28	9,3
pT-Stadium			
	pT2	177	59,0
	pT3	121	40,3
	pT4	2	0,7
pN-Stadium			
	pN0	230	76,7
	pN1	40	13,3
	pNX	30	10,0
pM-Stadium			
	M0	109	36,3
	M1	2	0,7
	MX	189	63,0
V, L, Pn			
	V0	289	96,3
	V1	11	3,7
	L0	276	92,0
	L1	24	8,0
	Pn0	65	21,7
	Pn1	235	78,3
PSA bei Diagnose (ng/ml)			
	< 5	32	10,7
	5-10	158	52,7
	11-20	69	23,0
	> 20	41	13,6

Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Die immunhistochemische Analyse des TMA-Kollektivs zeigte ein heterogenes Spektrum der CycK- und CDK12-Expression, das sowohl im Nukleus und/oder im Zytoplasma des PCa-Gewebes detektiert wurde. Die beobachteten Expressionsniveaus reichten hierbei von einer negativen (Daten nicht gezeigt) über eine schwache und mittlere bis hin zu einer starken Intensität. Repräsentative Regionen dieser unterschiedlichen Expressionslevel von CycK und CDK12 in PCa-Tumorcores sind in Abbildung 4-37 und Abbildung 4-38 dargestellt.

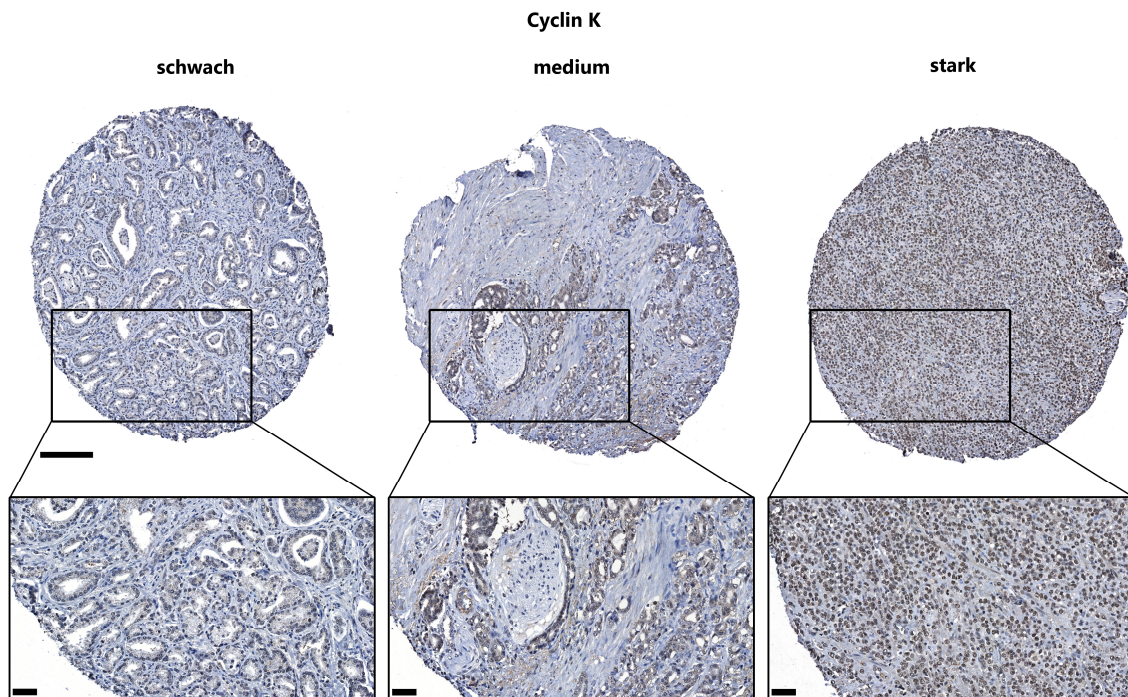


Abbildung 4-37 Repräsentative Darstellung der unterschiedlichen CycK-Expressionslevel im PCa-TMA. Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem Anti-CycK-Antikörper am PCa-Gewebe des TMA-Kollektivs durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen einzelner PCa-Gewebecores, die eine schwache, mittlere und starke Intensität der CycK-Expression aufweisen, sind dargestellt. Der Maßstab entspricht im Gewebecore 200 μm und im vergrößerten Ausschnitt 50 μm . Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

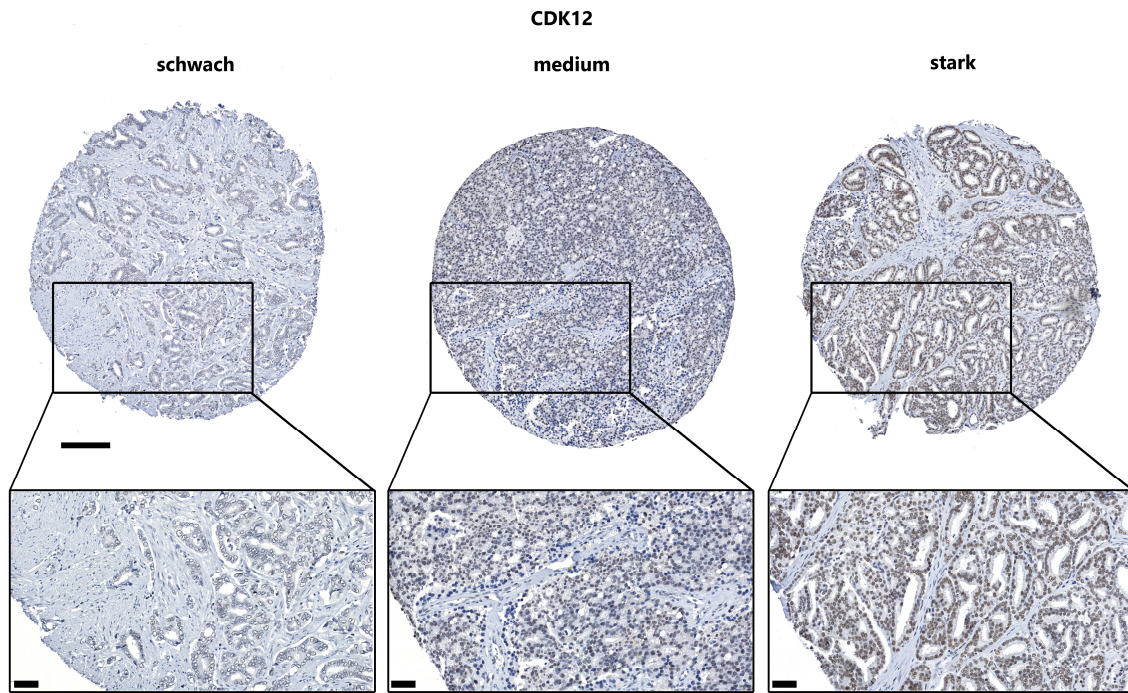


Abbildung 4-38 Repräsentative Darstellung der unterschiedlichen CDK12-Expressionslevel im PCa-TMA. Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem Anti-CDK12-Antikörper am PCa-Gewebe des TMA-Kollektivs durchgeführt. Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen einzelner PCa-Gewebecores, die eine schwache, mittlere und starke Intensität der CDK12-Expression aufweisen, sind dargestellt. Der Maßstab entspricht im Gewebecore 200 μm und im vergrößerten Ausschnitt 50 μm . Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Vor der softwarebasierten Auswertung des TMAs erfolgte eine manuelle Überprüfung der gefärbten und digitalisierten TMA-Präparate. Dabei wurden fehlende und fehlerhafte Cores sowie auffällige Artefakte, wie beispielsweise Gewebefalten, identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die Analyse selbst wurde mit der digitalen Bildanalysesoftware QuPath durchgeführt, die über verschiedene Funktionen und Algorithmen verfügt, um Tumor- und Stromazellen zu differenzieren sowie die Färbintensität und den prozentualen Anteil gefärbter Tumorzellen zu bestimmen [206].

Zu Beginn der Analyse wurden die Tumorzellen mittels QuPath hinsichtlich der Intensität ihrer CycK- und CDK12-Färbung in schwach, mittel oder stark positiv kategorisiert (Abbildung 4-37, Abbildung 4-38). Die entsprechenden Schwellenwerte wurden manuell festgelegt. Die Auswertung wurde unabhängig von der subzellulären Lokalisation von CycK und CDK12 durchgeführt. Auf Grundlage der festgelegten Intensitätsschwellenwerte wurde anschließend für jeden Gewebecore ein H-Score (H-Score = 0 – 300) berechnet, wie in Abschnitt 3.4.1.2 beschrieben. Dieser Wert berücksichtigt sowohl die Intensität der Färbung als auch den prozentualen Anteil positiv gefärbter Zellen. Je höher der H-Score eines Gewebecores ist, desto höher sind dementsprechend auch die Farbtintensität und die Anzahl positiver Zellen. Dies ermöglicht die semiquantitative Erfassung der jeweiligen Proteinexpression, wodurch insbesondere die intratumorale Heterogenität des TMA-Kollektivs für beide potenziellen Biomarker, CycK und CDK12, bestimmt und untersucht werden kann.

Um die Eignung von CycK und CDK12 als prognostische Biomarker zu evaluieren, wurde die Korrelation der jeweiligen H-Scores mit den folgenden klinisch-pathologischen Merkmalen der Patienten des TMA-Kollektivs analysiert: ISUP/WHO-Grading, Tumorausdehnung (pT-Stadium), Lymphknotenmetastasierung (pN-Stadium) und der perineuralen Invasion (Pn).

Die Korrelationsanalyse ergab hierbei, dass erhöhte CycK-Expressionslevel statistisch signifikant mit einem höheren ISUP/WHO-Grading ($p \leq 0,001$), einer größeren Tumorausdehnung ($p \leq 0,05$), der Lymphknotenmetastasierung ($p \leq 0,01$) und der perineuralen Invasion ($p \leq 0,001$) assoziiert waren (Abbildung 4-39). Im Gegensatz dazu konnte bei der Korrelationsanalyse der CDK12-Expression nur eine statistisch signifikante Abnahme der CDK12-Expression in Tumoren mit perineuraler Invasion ($p \leq 0,05$) festgestellt werden (Abbildung 4-40).

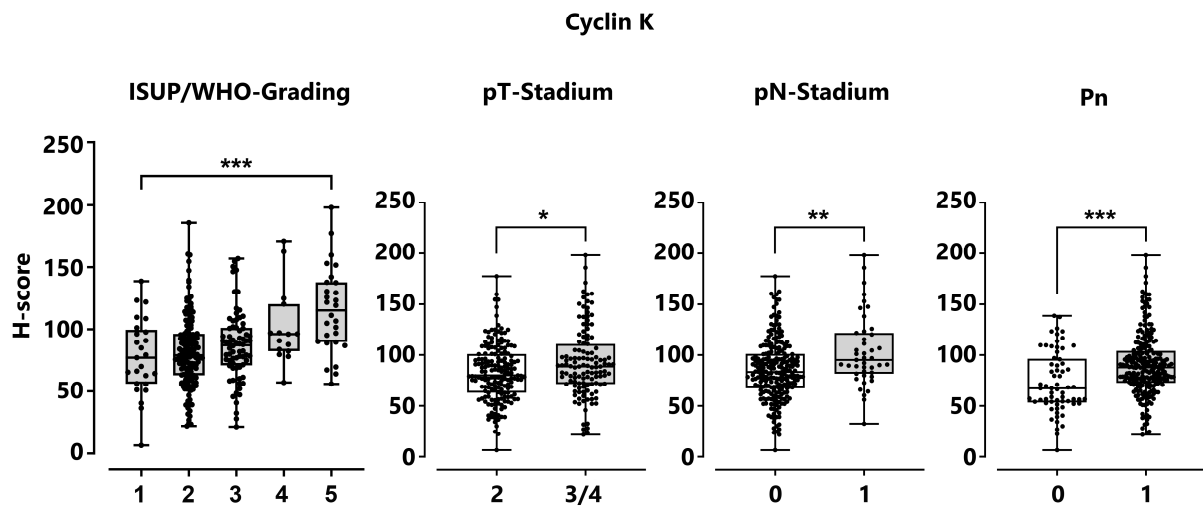


Abbildung 4-39 Eine erhöhte Expression von CycK ist mit einem aggressiveren Tumorphänotyp assoziiert. Die CycK-Expressionslevel wurden mit den klinisch-pathologischen Merkmalen (ISUP/WHO-Grading, pT-, pN-Stadium und der perineuralen Invasion (Pn)) der PCa-Patienten verglichen. Die Boxplots zeigen den H-Score von CycK, der mit Hilfe der Bildanalysesoftware QuPath berechnet wurde. Jeder Punkt symbolisiert den Mittelwert von vier Tumorcores eines jeden Patienten ($n=300 \pm$ s.d., Kruskal-Wallis-Test $***p < 0,001$; Mann-Whitney U-Test $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

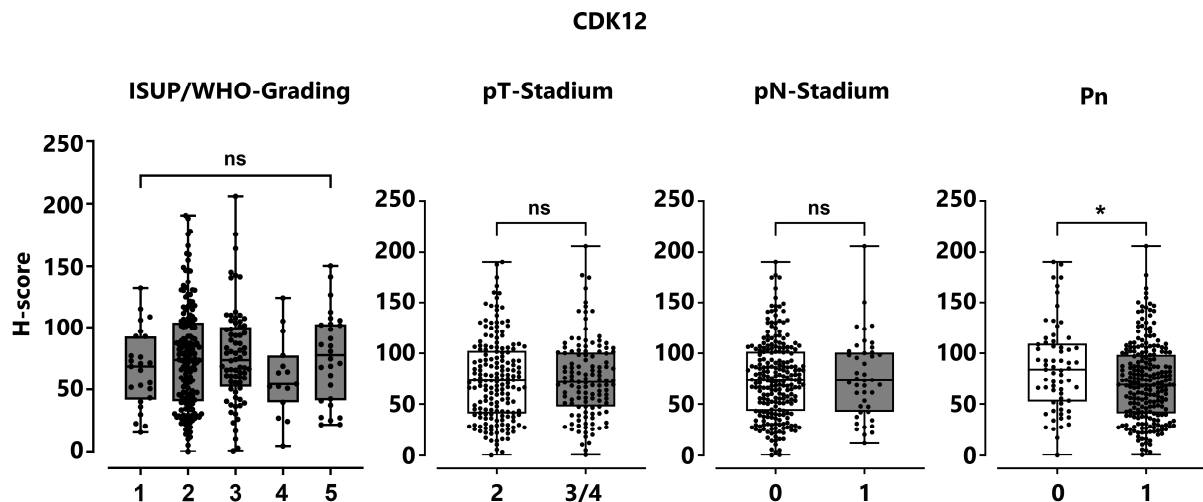


Abbildung 4-40 Die CDK12-Expression zeigt keine eindeutige Korrelation mit den klinisch-pathologischen Merkmalen. Die CDK12-Expressionenlevel wurde mit den klinisch-pathologischen Merkmalen (ISUP/WHO-Grading, pT-, pN-Stadium und der perineuralen Invasion (Pn)) der PCa-Patienten verglichen. Die Boxplots zeigen den H-Score von CDK12, der mit Hilfe der Bildanalysesoftware QuPath berechnet wurde. Jeder Punkt symbolisiert den Mittelwert von vier Tumorcores eines jeden Patienten ($n=300 \pm$ s.d., Kruskal-Wallis-Test ns, nicht signifikant; Mann-Whitney U-Test $*p < 0,05$; ns, nicht signifikant). Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Für die anschließende Dichotomisierung wurde der Median der jeweiligen Expressionslevel von CycK und CDK12 als Schwellenwert verwendet. Das TMA-Kollektiv konnte somit basierend auf der CycK- und CDK12-Expression in jeweils zwei Gruppen (50 % schwach, 50 % stark) dichotomisiert und in Bezug auf die klinisch-pathologischen Charakteristika untersucht werden. Die Korrelationsanalyse der CycK-Expression nach der Dichotomisierung zeigte ähnliche Assoziationen mit dem ISUP/WHO-Grading ($p \leq 0,001$), der Lymphknotenmetastasierung ($p \leq 0,01$) und der perineuralen Invasion ($p \leq 0,05$) (Tabelle 4-3), wie bereits in der vorherigen Analyse beobachtet werden konnte. Jedoch wurde hier kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der CycK-Expression und der Tumorausdehnung (pT-Stadium) nachgewiesen. Die Analyse der dichotomisierten CDK12-Expressionslevel ergab ebenfalls keine Assoziation mit den klinisch-pathologischen Daten (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3 Korrelation der CycK- und CDK12-Expression mit den klinisch-pathologischen Merkmalen des TMA-Kollektivs (n=300).

Merkmale	Anzahl der Fälle	CycK-Expression		p-Wert ^a	CDK12-Expression		p-Wert ^a
		schwach	stark		schwach	stark	
ISUP/WHO-Grading				≤ 0,001			0,301
1	25	14 (56%)	11 (44%)		15 (60%)	10 (40%)	
2	160	93 (58%)	67 (42%)		76 (48%)	84 (52%)	
3	72	34 (47%)	38 (53%)		35 (49%)	37 (51%)	
4	15	5 (33%)	10 (67%)		11 (73%)	4 (27%)	
5	28	4 (14%)	24 (86%)		13 (46%)	15 (54%)	
pT-Stadium				0,24			1
pT2	177	94 (53%)	83 (47%)		88 (49%)	89 (50%)	
pT3/4	123	56 (45%)	67 (55%)		62 (50%)	61 (49%)	
pN-Stadium				≤ 0,01			1
pN0	230	118 (51%)	112 (49%)		113 (49%)	117 (51%)	
pN1	43	12 (28%)	31 (72%)		21 (49%)	22 (51%)	
Pn				≤ 0,05			0,161
Pn0	65	42 (65%)	23 (35%)		27 (42%)	38 (58%)	
Pn1	235	108 (46%)	127 (54%)		123 (52%)	112 (48%)	

^ap-Werte: Pearson Chi-Quadrat-Test. Modifiziert nach Frei *et al.* [75].

Um die Rolle von CycK und CDK12 bei der Entwicklung und Metastasierung des PCas zu untersuchen, wurden die H-Scores der immunhistochemischen Färbungen von CycK und CDK12 sowohl in Gewebecores von Metastasen als auch in *high-grade* PINs der TMA-Kohorte ermittelt und mit den korrespondierenden H-Scores des Primärtumorgewebes der PCa-Patienten verglichen. Innerhalb des TMA-Kollektivs konnten 34 Patienten mit Metastasen und 21 Patienten mit *high-grade* PINs analysiert werden. Die klinisch-pathologischen Merkmale der PCa-Patienten mit Metastasen sind in Tabelle 4-4 und diejenigen, mit einem *high-grade* PIN, in Tabelle 4-5 zusammengefasst.

Tabelle 4-4 Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Daten der PCa-Patienten des TMA-Kollektivs mit Metastasen (n=34).

		n	%
		34	100.0
ISUP/WHO-Grading			
	2	7	21
	3	13	38
	4	2	6
	5	12	35
pT-Stadium			
	pT2	6	18
	pT3/4	28	82
pN-Stadium			
	pN0	3	9
	pN1	30	88
	pNX	1	3
Pn			
	Pn0	1	3
	Pn1	33	97

Tabelle 4-5 Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Daten der PCa-Patienten des TMA-Kollektivs mit *high-grade* PINs (n=21).

		n	%
		21	100.0
ISUP/WHO-Grading			
	2	12	57
	3	8	38
	5	1	5
pT-Stadium			
	pT2	12	57
	pT3/4	9	43
pN-Stadium			
	pN0	19	90
	pN1	0	0
	pNX	2	10
Pn			
	Pn0	7	33
	Pn1	14	67

Verglichen mit dem korrespondierenden Primärtumorgewebe wurden im Metastasengewebe ($p \leq 0,001$) sowie in den *high-grade* PINs ($p \leq 0,001$) des TMA-Kollektivs signifikant höhere CycK-Expressionslevel festgestellt werden (Abbildung 4-41 A). Die Analyse der CDK12-Expression zeigte ebenfalls eine signifikante Zunahme im Metastasengewebe ($p \leq 0,01$) im Vergleich zum zugehörigen Primärtumorgewebe. In den *high-grade* PINs konnte zwar ebenfalls eine vermehrte CDK12-Expression nachgewiesen werden, jedoch erreichte diese keine statistische Signifikanz (Abbildung 4-41 B).

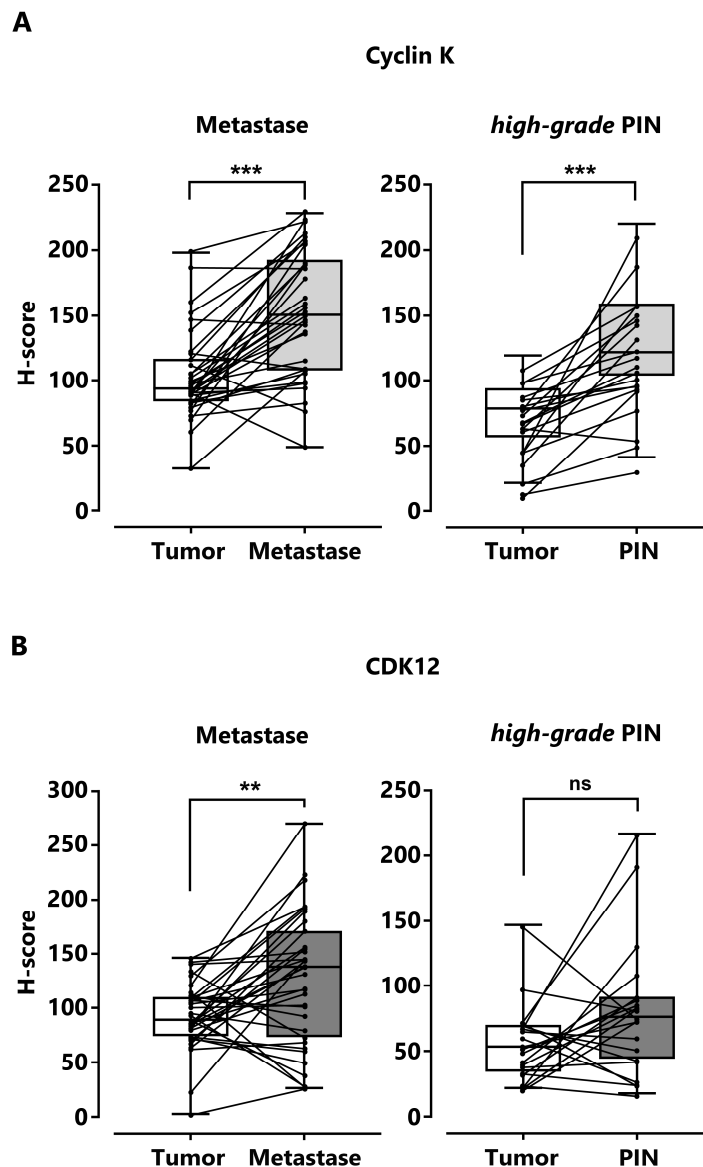


Abbildung 4-41 Die CycK- und CDK12-Expression ist in den Metastasen und *high-grade* PINs des TMA-Kollektivs erhöht. Die (A) CycK- und (B) CDK12-Expressionslevel wurden in Metastasen, *high-grade* PINs und dem zugehörigen Primärtumorgewebe analysiert. Die Boxplots zeigen die H-Scores von CycK und CDK12, die mit Hilfe der Bildanalysesoftware QuPath berechnet wurden. Jeder Punkt symbolisiert den Mittelwert von zwei Metastasen, *high-grade* PINs und Tumorcores jedes Patienten (Metastasen $n=34 \pm$ s.d., *high-grade* PINs $n=21 \pm$ s.d., Mann-Whitney U-Test ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns, nicht signifikant).

5 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die funktionellen Auswirkungen der Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe mit THZ531 an PCa-Zelllinien untersucht sowie die zugrunde liegenden Mechanismen analysiert. Des Weiteren wurde die Kombination von THZ531 mit einem PARP-Inhibitor und zwei Antiandrogenen untersucht, um die potenziellen Effekte einer THZ531-vermittelten Sensitivierung von PCa-Zellen und -Gewebe gegenüber Standardtherapieformen zu ermitteln. Abschließend wurden CycK und CDK12 als mögliche prognostische Faktoren für das PCa mit Hilfe einer TMA-Analyse evaluiert.

5.1 Funktionelle Rolle der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe im PCa

5.1.1 Einfluss der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf die Phosphorylierung der CTD der RNAP II

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Rolle der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe an fünf genetisch unterschiedlichen PCa-Zelllinien analysiert (Abbildung 4-1, Tabelle 2-2). Hierzu wurde der selektive CDK12/CDK13-Inhibitor THZ531 verwendet, der irreversibel die katalytische Enzymaktivität von CDK12 und CDK13 inhibiert, indem er kovalent an die Cysteinreste Cys1039 (CDK12) und Cys1017 (CDK13) der beiden Kinasen bindet [113]. Frühere Studien haben gezeigt, dass die humanen CycK-CDK12/CDK13-Komplexe *in vitro* bevorzugt Ser2 und Ser5 und in geringerem Maße auch Ser7 innerhalb der CTD der RNAP II phosphorylieren [97, 98, 101, 112]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde zur Verifizierung der On-Target-Aktivität bzw. zum Nachweis der Inhibitor-Aktivität die Serin-Phosphorylierung der CTD analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Expressionsniveaus der CTD mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern (pSer2, pSer5 und pSer7) an Gesamtzellextrakten ermittelt. Die kurzzeitige Behandlung mit THZ531 führte in allen PCa-Zelllinien zu einer dosisabhängigen Unterdrückung der Phosphorylierung an Ser2. Im Gegensatz dazu konnte eine ausgeprägte Verminderung der Expressionsniveaus von pSer5 und pSer7 nach der höchsten THZ531-Konzentration (500 nM) beobachtet werden (Abbildung 4-2). Auf diese Weise wurde die effektive inhibitorische Aktivität von THZ531 gegenüber den CycK-CDK12/CDK13-Komplexen in PCa-Zellen bestätigt. Zudem decken sich diese Daten mit früheren Studien, die ebenfalls variierende dosis- und zeitabhängige Auswirkungen der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf die Phosphorylierung von Ser2, Ser5 und Ser7 in verschiedenen Tumorzelllinien zeigen konnten [113, 114, 126, 243].

Die Genexpression stellt bei Eukaryonten einen hochkomplexen Prozess dar, der in erster Linie durch die RNAP II gesteuert wird. Dabei sind die variierenden und reversiblen Phosphorylierungsmuster der CTD der RNAP II von zentraler Bedeutung, da sie den Übergang zwischen den

einzelnen Phasen der Transkription (Initiation, Elongation und Termination) koordinieren und initiieren. Die Initiationsphase wird durch die Phosphorylierung von Ser5 und Ser7 gefördert, die durch die Assoziation des CAK-Komplexes, bestehend aus Cyclin H, CDK7 und Mat1, mit dem Transkriptionsfaktor TFIIF erfolgt. Mit dem Fortschreiten der Transkription wird Ser5 dephosphoryliert, während gleichzeitig die Phosphorylierung von Ser2 zunimmt. Die Ser2-Phosphorylierung spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Elongationsphase und der mRNA-Prozessierung. Diese wird unter anderem durch den Cyclin T1-CDK9-Komplex (P-TEFb) vermittelt und induziert den Übergang von der Initiationsphase zur produktiven Elongation. Der Elongationsprozess der RNAP II wird daraufhin durch das dynamische Phosphorylierungsmuster von Ser2, Ser5 und Ser7 gesteuert, das durch die Aktivität der Cyclin T1-CDK9- und CycK-CDK12/CDK13-Komplexe aufrechterhalten wird. Zusätzlich tragen diese unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster zur Rekrutierung von Spleiß-, Chromatinumwandlungs- und mRNA-Prozessierungsfaktoren bei. Die Phosphorylierung von Ser2 der CTD ist zudem von zentraler Bedeutung für die Bildung des 3'-Endes der prä-mRNA, welches eng an die Termination gekoppelt ist. Sobald die RNAP II die kanonischen Polyadenylierungsstellen der prä-mRNA des jeweiligen Gens erreicht, wird eine Erhöhung der Ser2-Phosphorylierung der CTD beobachtet, was die Rekrutierung von 3'-Endprozessierungsfaktoren initiiert und so die Entstehung eines vollständigen prä-mRNA-Transkripts sicherstellt [244-246].

In PCa-Zellen scheint die Ser2-Phosphorylierung besonders spezifisch für die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe zu sein, da bereits niedrige Konzentrationen (100 nM) von THZ531 die Phosphorylierung von Ser2 negativ beeinflussen, während die Phosphorylierungsmuster von Ser5 und Ser7 unverändert bleiben (Abbildung 4-2). Demnach könnte die beobachtete THZ531-induzierte Abnahme der Ser2-Phosphorylierung in PCa-Zellen darauf hindeuten, dass vor allem der Elongationsprozess beeinträchtigt ist. Dies könnte einerseits bedeuten, dass die Transkriptionsmaschinerie in der Initiationsphase stagniert, da Ser5 und Ser7 weiterhin phosphoryliert werden (Abbildung 4-2), andererseits könnte dies eine fehlerhafte transkriptionelle Elongation verursachen, was eine frühzeitige Termination der naszierenden mRNA zur Folge hätte. Frühere Studien haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass eine Hemmung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe mit genlängenabhängigen Elongationsdefekten assoziiert ist, was die letztgenannte Annahme unterstützt. Die CycK-CDK12/CDK13-Inhibition führte dabei zur Verkürzung der Transkripte, was durch eine vorzeitige Termination aufgrund einer verlangsamten Elongationsrate und einer reduzierten RNA-Prozessivität der RNAP II verursacht wird [113, 114, 247]. Der vorzeitige Abbruch der Transkription tritt hauptsächlich an intronischen Polyadenylierungsstellen auf und nicht an den regulären Polyadenylierungsstellen der prä-mRNA des jeweiligen Gens, die normalerweise für die 3'-Endprozessierung genutzt werden. Dies führt zur Bildung von verkürzten mRNA-Transkripten [107, 137]. Lange Gene mit einer großen Anzahl an

intronischen Polyadenylierungsstellen wie z. B. DNA-Replikations- und DDR-Gene, sind daher besonders betroffen [107, 114, 137]. Darüber hinaus konnten Krajewska *et al.* feststellen, dass die CycK-CDK12/CDK13-Inhibition nicht nur zu Elongationsdefekten führt, sondern auch mit einer verstärkten Transkriptionsinitiation und einer vermehrten Freigabe der RNAP II aus dem Promotor-proximalen-Pausieren stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes einhergeht [114]. Das Promotor-proximale-Pausieren bezeichnet hierbei das Verharren der RNAP II nach der Synthese eines ca. 19 - 22 Nukleotid langen Transkripts stromabwärts des Promotors. Während dieser Pause wird durch verschiedene Enzyme eine Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA angefügt. Anschließend bewirkt die Phosphorylierung von Ser5 der CTD und anderen Elongationsfaktoren die Freisetzung der RNAP II aus dieser Pause. Dieser Schritt ist entscheidend für den Übergang zur produktiven Elongation [248]. Daher könnte die vermehrte Induktion dieser transkriptionellen Prozesse eine mögliche Erklärung für die unveränderten pSer5- und pSer7-Expressionslevel nach der Behandlung mit THZ531 (500 nM) in PCa-Zellen sein (Abbildung 4-2). In diesem Kontext beruhen die detektierten CTD-Phosphorylierungen möglicherweise auf der Aktivität anderer Kinasen, wie beispielsweise der TFIIF-assoziierten Kinase CDK7 oder P-TEFb, welche Ser5 und Ser7 bevorzugt phosphorylieren [245, 248]. Die Aktivität der genannten Kinasen wird von THZ531 erst bei einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 8,5 μ M und 10,5 μ M inhibiert, was bis zu 50-Fach höher ist als die IC_{50} von CDK12 und CDK13. Daher werden sie bei niedrigen Dosen nicht beeinflusst [113]. Da in dieser Arbeit Gesamtzellextrakte verwendet wurden, besteht die Möglichkeit, dass eine teilweise redundante oder überlappende Aktivität weiterer Kinasen die Interpretation der Immunblot-Daten der CTD-Phosphorylierung beeinflusst haben könnte.

Frühere Studien haben zudem gezeigt, dass hohe THZ531-Konzentrationen (500 nM) in einer stärkeren Abnahme der pSer5- bzw. pSer7-Expressionslevel in Lymphom- und hepatozellulären Karzinomzellen resultierten, was mit den Analysen dieser Arbeit übereinstimmt [126, 243]. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beobachteten Ergebnissen zeigten niedrige Dosen (100 nM) von THZ531 keine Veränderung der CTD-Phosphorylierung, sondern führten erst bei höheren Dosen (>200 nM) zu einer Verringerung von pSer2 in Jurkat- und Neuroblastomzellen [113, 114]. Die Suppression von CDK12 oder CDK13 zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der CTD-Phosphorylierung. Es wurde lediglich eine geringe Reduktion von pSer2 festgestellt, die speziell in CDK12-depletierten Zellen beobachtet wurde [97, 100, 111]. Angesichts dieser unterschiedlichen Beobachtungen nach Beeinträchtigung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe, einschließlich der nahezu vollständigen Unterdrückung der Ser-Phosphorylierung der CTD bei 500 nM THZ531 in den eigenen Analysen, könnten Letztere vermutlich auf eine vollständige Blockade der Kinaseaktivität der Komplexe zurückzuführen sein. Die IC_{50} von THZ531 für CDK12 und CDK13 wird *in vitro* bereits bei 158 nM bzw. 69 nM erreicht, was diese Vermutung unterstützt [113]. Zudem ist es denkbar, dass die ausgeprägte Reduktion von pSer2, pSer5 und pSer7 auch durch

die duale Inhibition von CDK12 und CDK13 oder durch potenzielle Off-Target-Effekte anderer transkriptionsassoziierter Kinasen wie z. B. den JNK-Kinasen erklärt werden könnte [107, 113, 137]. Zukünftige Studien sollten daher spezifischere Methoden wie beispielsweise die Massenspektrometrie in Verbindung mit selektiveren CDK12- und CDK13-Inhibitoren verwenden, um einerseits die Rolle der Kinasen bei der Phosphorylierung der CTD der RNAP II genauer zu charakterisieren und andererseits das vorherrschende Phosphorylierungsmuster der Heptapeptid-Wiederholungen innerhalb der CTD zu identifizieren [249].

5.1.2 Einfluss der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf die Expression von DNA-Reparaturgenen, die Induktion von DNA-Schäden und die DDR

In der Literatur ist bekannt, dass die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Transkription bestimmter Gen-Subgruppen spielen. Durch die Phosphorylierung der CTD der RNAP II können die beiden Komplexe direkt die Aktivität der RNAP II regulieren und die Transkriptionselongation beeinflussen. Zudem sind die Komplexe in der Lage, mit verschiedenen mRNA-Prozessierungsfaktoren oder Spleißfaktoren zu interagieren [107, 111, 118]. In dieser Arbeit wurde die spezifische Rolle der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe bei der Transkription in PCa-Zellen stellvertretend an acht ausgewählten Genen (APEX2, BRCA1, FANCI, FANCD2, MDC1, OGG1, PNKP und RFC5) untersucht. Bei der Auswahl der Gene wurde berücksichtigt, dass diese in der gegenwärtigen Literatur bereits in Verbindung mit einer CycK-CDK12-abhängigen Transkription beschrieben wurden [97, 113, 114]. Darüber hinaus stellen diese Gene wesentliche Komponenten der DDR, speziell der DNA-Reparaturmechanismen, dar oder sind vereinzelt als Kontrollpunkte direkt an der Regulation des Zellzyklus beteiligt [232-234, 236, 237].

Die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe führte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu einer reduzierten Expression der DDR-Gene, wobei diese Reduktion nicht in allen PCa-Zelllinien gleichermaßen stark ausgeprägt war (Abbildung 4-8). Somit konnte die regulative Rolle der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe bei der Transkription dieser Gen-Subgruppe in PCa-Zellen verifiziert werden. Gleichzeitig wurde eine THZ531-vermittelte genomische Instabilität in PCa-Zelllinien festgestellt, die sich durch das Auftreten von DNA-Schäden in Form von γ H2AX-Foci manifestierte (Abbildung 4-9, Abbildung 4-10). Zudem stimmten diese Ergebnisse mit früheren Studien überein, die ebenfalls eine verminderte Expression von DDR-Genen, insbesondere von Genen der HR-Reparatur, als Folge einer Beeinträchtigung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe feststellen konnten [97, 108, 111, 113, 134]. Darüber hinaus korrelierte die Akkumulation von DNA-Schäden in den PCa-Zelllinien mit weiteren Forschungsarbeiten, die einen Anstieg der DNA-Schäden in Form von γ H2AX- und 53BP1-Foci nach CycK- oder CDK12-Suppression sowie nach einer THZ531-Behandlung in anderen Tumorentitäten nachweisen konnten [97, 125]. Analog

dazu wurde in CDK12-defizienten Blastozysten Zellen der Maus ebenfalls eine Zunahme von 53BPI-Foci beobachtet, die mit einer Reduktion der DDR-Gene assoziiert war [108].

Im Rahmen dieser Expressionsanalyse war besonders auffällig, dass LNCaP-Zellen im Gegensatz zu ihrem Derivat C4-2B und den anderen PCa-Zelllinien keine ausgeprägte THZ531-induzierte Reduktion der Expression der DDR-Gene zeigten, was nur mit einer geringen Anzahl an DNA-Schäden einherging (Abbildung 4-8 - Abbildung 4-10), obwohl die Ser2-Phosphorylierung der CTD der RNAP II negativ beeinflusst war (Abbildung 4-2). Diese Resistenz gegenüber THZ531 in LNCaP-Zellen könnte auf spezifische zelluläre Unterschiede oder genetische Aberrationen zurückzuführen sein, die vermutlich nicht durch die THZ531-vermittelten Veränderungen beeinflusst werden. Generell unterliegt die Transkription einer Vielzahl an dynamischen Prozessen, an denen verschiedene Transkriptionsfaktoren, Chromatinregulatoren, Histon-Modifikationen und mRNA-Prozessierungsfaktoren etc. beteiligt sind, die alle einen Einfluss auf die Regulation der Genexpression haben [250]. Daher wäre es denkbar, dass in LNCaP-Zellen regulative Mechanismen oder die Aktivität bestimmter Faktoren vorherrschen, die einer Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-abhängigen Genexpression entgegenwirken, sodass keine nennenswerten Effekte nachgewiesen werden können.

In diesem Zusammenhang könnte die Aktivität von Histon-Demethylasen und Methyltransferasen, die die epigenetische Regulation der Genexpression durch verschiedene Methylierungszustände der Histone beeinflussen, eine Rolle spielen [251]. Ein Verlust der Lysin-Demethylase 5D (KDM5D) in PCa-Zellen verursacht epigenetische Modifikationen, die eine vermehrte Zellzyklus-Aktivität, erhöhten DNA-Replikationsstress und DNA-Schäden begünstigen und zudem mit aggressiveren PCa-Varianten assoziiert sind [252]. Konsistent mit dieser Studie zeigten C4-2B-Zellen, die KDM5D nur schwach exprimieren, eine erhöhte Sensitivität gegenüber THZ531 und ein größeres Ausmaß an DNA-Schäden (Abbildung 4-10) [253]. Verglichen mit ihrem Derivat wurden in LNCaP-Zellen hohe KDM5D-Expressionenlevel nachgewiesen, die möglicherweise eine Erklärung für die Resistenz darstellen und der CDK12/CDK13-Inhibition entgegenwirken könnten [253].

Ein weiterer potenzieller Faktor, der zur THZ531-Resistenz in LNCaP-Zellen beitragen könnte, ist die vermehrte Expression der p21-aktivierenden Kinase 1 (PAK1), da diese in C4-2B-Zellen im Vergleich zu LNCaP-Zellen deutlich geringer exprimiert wird [253]. Diese Annahme wird durch die beobachtete PAK1-abhängige Reduktion der Expression von Genen gestützt, die an den Fanconi-Anämie- und BRCA-Signalwegen beteiligt sind, was zu einer beeinträchtigten DNA-Reparatur und folglich auch zu einer Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien führt [254]. Die erhöhte PAK1-Expression in LNCaP-Zellen könnte daher den Effekten der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition gegensteuern und somit eine weitere potenzielle Ursache für die Resistenz gegenüber THZ531 darstellen. Zusätzlich ist bekannt, dass PAK1 die Transkriptionsaktivität des ARs stimuliert [255], der wiederum mit der DDR verknüpft ist und die Expression von DDR-Genen positiv reguliert [238, 239]. Dies könnte sich ebenfalls auf die Expression der DDR-Gene auswirken und die zelluläre

Reaktion auf die CycK-CDK12/CDK13-Inhibition beeinflussen. Weitere Studien sind daher notwendig, um sowohl die Rolle von PAK1 als auch KDM5D in Bezug auf die Sensitivität gegenüber THZ531 zu untersuchen.

Angesichts der THZ531-vermittelten Abnahme der DDR-Genexpression in den PCa-Zelllinien wird vermutet, dass essenzielle DNA-Reparaturmechanismen nicht mehr in der Lage sind, effizient und fehlerfrei zu agieren, was zur Akkumulation von DNA-DSB führt [171]. Hauptverantwortlich dafür könnten höchstwahrscheinlich persistierende, nicht reparierte DNA-SSB oder andere *bulky lesions* sein, die aufgrund einer defekten BER, MMR oder NER nicht mehr repariert werden können [166, 168, 169]. Während der S-Phase verursachen diese Schäden bei einer Kollision mit DNA-Replikationsgabeln die Bildung von DNA-DSB [170]. Besonders kritisch ist in diesem Kontext eine beeinträchtigte HR-Reparatur, die dazu führt, dass DNA-DSB nicht mehr fehlerfrei behoben werden können und sich somit Mutationen nach jeder weiteren Zellzyklusrunde in der Zelle anhäufen [172, 178]. Eine dysfunktionale HR-Reparatur wird häufig in Tumorzellen mit CDK12-Mutationen oder nach der Suppression bzw. Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe beobachtet, was mit einer verringerten Expression essenzieller HR-Gene wie BRCA1, FANCI und FANCD2 einhergeht und mit den Daten dieser Arbeit (Abbildung 4-8) übereinstimmt [97, 125, 137]. Defekte der DNA-DSB-Reparaturmechanismen können daher schwerwiegende Genommutationen oder Chromosomenumlagerungen verursachen, die zur Erhöhung der genomischen Instabilität beitragen. Dies äußert sich beispielsweise in Form von Tandemduplikationen, die bereits gehäuft bei Prostata- und Ovarialkarzinomen mit CDK12-Mutationen beobachtet wurden [139, 141, 256].

In Abhängigkeit von Art und Umfang der DNA-Läsion entscheidet das komplexe System der DDR über das Schicksal der Zelle, indem es die entsprechende Signalkaskade zur Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkt-Kinasen CHK1 und CHK2 initiiert [151]. In dieser Arbeit wurde nach der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition zunächst eine Reaktion auf DNA-SSB beobachtet, die durch eine erhöhte Proteinexpression von pCHK1 gekennzeichnet war. Daraufhin folgte ein zeitlich verzögerter Anstieg der pCHK2-Expression, was auf die Anwesenheit von DNA-DSB hinweist (Abbildung 4-11). Demnach wird vermutet, dass die THZ531-bedingte zeitversetzte Aktivierung der beiden DDR-Signalwege ATM-CHK2 (DNA-DSB) und ATR-CHK1 (DNA-SSB) auf eine sukzessive Entstehung von DNA-DSB hinweist, was die zuvor dargestellte Theorie stützen könnte. In dieser Analyse fiel besonders die verringerte Proteinexpression von CHK1 in LAPC4-Zellen nach der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf (Abbildung 4-11). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die von Choi *et al.* beschriebene CDK12-abhängige Translation der CHK1 sein, die durch THZ531 speziell in der Zelllinie LAPC4 beeinträchtigt sein könnte [121]. Zusammenfassend heben diese Ergebnisse die funktionelle Rolle der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als Transkriptionsregulatoren der Expression von DDR- und DNA-Reparaturgenen im PCa hervor, was für die Erhaltung der genomischen Stabilität von großer Bedeutung ist [97, 108].

5.1.3 Zelllinienabhängige Auswirkungen der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition auf die Proliferation und das Überleben

Im Rahmen dieser Arbeit konnten unterschiedliche Auswirkungen der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition beobachtet werden, die in Abhängigkeit von der jeweiligen PCa-Zelllinie zu teils erheblichen Veränderungen der Zellviabilität und des Überlebens führten. Die Behandlung mit THZ531 löste in den Zelllinien DU-145 und C4-2B die Induktion des apoptotischen Zelltodes aus (Abbildung 4-4), während sie in PC-3- und LAPC4-Zellen einen Stillstand des Zellzyklus in der G2/M-Phase verursachte (Abbildung 4-5). Konträr zu den anderen PCa-Zelllinien erwiesen sich LNCaP-Zellen als resistent gegenüber THZ531, sodass keine behandlungsinduzierten Effekte festgestellt werden konnten (Abbildung 4-3 - Abbildung 4-5). Des Weiteren konnte die anti-tumorigene Wirkung von THZ531 ebenfalls in Tumorexografts des CAM-Modells nachgewiesen werden. Die THZ531-Behandlung führte hier zu einer Abnahme der Tumorviabilität, die mit einer gesteigerten Apoptoserate einherging (Abbildung 4-6, Abbildung 4-7). Diese Ergebnisse verdeutlichen das antineoplastische Potenzial der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition sowohl in PCa-Zellen als auch in Tumorexografts des CAM-Modells und stimmen zudem mit anderen Studien überein, die vergleichbare Effekte nach einer gezielten Beeinträchtigung von CycK oder CDK12 beschrieben haben: Schecher *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass die siRNA-vermittelte Suppression von CycK in DU-145-Zellen Apoptose induzierte [131]. Zudem löste THZ531 in Jurkat- und hepatozellulären Karzinomzelllinien starke anti-proliferative Effekte aus und bewirkte ebenfalls die Induktion des apoptotischen Zelltods [113, 126]. Weiterhin stellten Blazek *et al.* fest, dass eine siRNA-bedingte Reduktion von CycK oder CDK12 in Zervixkarzinomzelllinien zur Akkumulation von Zellen in der G2/M-Phase führt [97]. Analog dazu konnte eine Anreicherung von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus nach CycK-Suppression in PCa-Zellen nachgewiesen werden [131].

Angesichts der unterschiedlichen Reaktionen der PCa-Zelllinien auf die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe stellt sich die Frage, welche Mechanismen oder Faktoren letztendlich darüber entscheiden, ob eine Zelle weiter proliferiert, einen Stillstand im Zellzyklus herbeiführt oder den programmierten Zelltod auslöst. In diesem Zusammenhang scheinen das genomische Profil der PCa-Zelllinien (Abbildung 4-1, Tabelle 2-2) sowie das Ausmaß der durch die THZ531-Behandlung hervorgerufenen DNA-Schäden eine wesentliche Rolle zu spielen. Die Festlegung des Zellschicksals wird durch eine Vielzahl an Regulatoren der Zellzyklusmaschinerie vermittelt, welche verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren und somit auf diverse externe (z. B. ionisierende Strahlung) und interne Stimuli (z. B. DNA-Schäden) reagieren. Bei diesem Prozess sind Proteine involviert, die eine funktionelle Doppelrolle besitzen und sowohl Apoptose als auch die Progression des Zellzyklus kontrollieren können [257]. Zu diesen Proteinen gehört der

Tumorsuppressor p53, dessen Aktivierung durch die schadensabhängigen DDR-Signalwege ATM-CHK2 und ATR-CHK1 erfolgt. Dies führt zu seiner Stabilisierung und Anreicherung im Zellkern, wo er als Transkriptionsfaktor agiert. Abhängig vom Umfang der DNA-Schäden bindet p53 entweder mit hoher Affinität an die Promotoren von Genen, die mit dem Zellzyklusarrest verknüpft sind, oder mit niedriger Affinität an die Promotoren pro-apoptotischer Gene [153, 258]. Demnach vermittelt p53 einerseits die Hochregulation seiner Zielgene wie dem CDK-Inhibitor p21, der über die Hemmung von Cyclin D-CDK4/CDK6 und Cyclin E-CDK6 den Zellzyklus arretiert. Andererseits induziert p53 die Apoptose durch die Expression pro-apoptotischer Gene (z. B. Puma, Bax und Noxa) oder durch die direkte Bindung an anti-apoptotische Proteine (Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1), wodurch ihre Aktivität beeinträchtigt und es indirekt zur Apoptoseinduktion kommt [259]. Ein weiteres Protein, das als negativer Regulator der PI3K/AKT-Signaltransduktion fungiert und sowohl Apoptose auslösen als auch das Zellwachstum kontrollieren kann, ist der Tumorsuppressor PTEN [260]. PTEN ist zudem in der Lage, mit p53 zu interagieren. Eine verstärkte PTEN-Expression kann beispielsweise AKT und MDM2 hemmen, was die p53-Level erhöht und dadurch einen G2/M-Phasenarrest und Apoptose verursacht [261]. Im Gegensatz dazu kann die Aktivierung von Akt durch die Überexpression einer konstitutiv aktivierten Form oder durch einen PTEN-Verlust den G2/M-Zellzykluskontrollpunkt überwinden, der durch DNA-Schäden aktiviert wird [262].

In Bezug auf die funktionelle Doppelrolle von p53 und PTEN führen genomische Aberrationen, Mutationen oder ein Funktionsverlust dieser Gene zu einer Dysregulation oder zu Defekten in den Regulationsmechanismen der Proliferation und der Apoptose. Veränderungen dieser Art werden häufig im CRPC beobachtet und mit einer Apoptoseresistenz assoziiert, was möglicherweise die zelllinienabhängigen Unterschiede in der Apoptoseinduktion und dem Zellzyklusarrest erklären könnte [27, 78, 263]. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden, da keine offensichtliche Korrelation zwischen dem Mutations- oder Wildtyp-Status dieser Gene in den PCa-Zelllinien (Tabelle 2-2, Abbildung 4-1) und den THZ531-vermittelten Effekten festgestellt werden konnte. Zusätzliche Studien sind demnach notwendig, um die Beteiligung weiterer Faktoren zu ermitteln, die für die heterogenen Reaktionen der PCa-Zelllinien nach der Behandlung mit THZ531 verantwortlich sein könnten. Eine Analyse von Mutationen in Zellzykluskontrollpunkten, pro- oder anti-apoptotischen Faktoren wie p21, Bcl-2, XIAP und Survivin sowie des p53-Antagonisten MDM2 wäre hier besonders interessant [200, 202, 263]. Ergänzend dazu konnte eine erhöhte Bcl-2- und Bcl-XL-Expression in PC-3-Zellen bereits als potenzieller Vermittler der Apoptoseresistenz gegenüber verschiedenen Wirkstoffen identifiziert werden, was jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht wurde [264, 265].

Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen THZ531-induzierten Auswirkungen auf PCa-Zelllinien könnte das Vorkommen von Mutationen oder epigenetischen Modifikationen in essenziellen Signalwegen der DNA-Reparaturmaschinerie sein [21, 78]. Ein Vergleich der genomischen Profile von PC-3- und DU-145-Zellen (freizugängliche Datensätze der Zelllinien wurden beim *Cancer Dependency Map Portal*, <https://depmap.org/portal>, abgerufen) ergab, dass PC-3-Zellen keine Mutationen in essenziellen DDR-Genen wie *BRCA1/2*, *RAD50* und *XRCC1* aufweisen, während in DU-145-Zellen Mutationen in den genannten sowie weiteren DDR-Genen gefunden wurden [75, 266, 267]. Dies deutet darauf hin, dass die durch THZ531 hervorgerufenen Effekte vermutlich auf eine unterschiedliche Effektivität der DNA-Reparaturmechanismen, speziell der HR-Reparatur, zurückzuführen sein könnten. Eine dysfunktionale DNA-Reparaturmaschinerie in DU-145-Zellen könnte dazu führen, dass die THZ531-bedingten DNA-Schäden nicht mehr repariert werden können, was möglicherweise den apoptotischen Zelltod auslöst [152, 184].

Darüber hinaus könnte der in den Zelllinien PC-3 und LAPC4 festgestellte Zellzyklusarrest (Abbildung 4-5) einen alternativen Überlebensmechanismus darstellen, um der Apoptoseinduktion zu entgehen, obwohl diese Zellen nach der THZ531-Behandlung die stärkste Reduktion der Expression der DNA-Reparaturgene aufwiesen (Abbildung 4-8). Da endogene DNA-Schäden häufig replikationsabhängig entstehen, könnte der Stillstand des Zellzyklus verhindern, dass sich neue schwerwiegendere DNA-Schäden ansammeln. Zukünftige Forschungsarbeiten, die die Gründe für die heterogenen Effekte der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition in PCa-Zellen untersuchen, könnten dazu beitragen, die Wirksamkeit dieser neuen Behandlungsstrategie zu optimieren. Demnach könnte die Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen zu einer gezielteren Anwendung bei den entsprechenden PCa-Formen führen, die durch spezifische molekulare Veränderungen charakterisiert sind und daher sensitiver auf eine Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe reagieren.

5.2 Bedeutung der divergenten Funktionen von CDK12 und CDK13 für die antitumorogene Wirkung von THZ531

In der vorliegenden Arbeit stellt sich durch die Anwendung des dualen CDK12/CDK13-Inhibitors THZ531 die Frage, ob die beobachteten pro-apoptischen und anti-proliferativen Effekte in PCa-Zellen (Abschnitt 4.2) primär auf die Hemmung der Aktivität des CycK-CDK12-Komplexes, des CycK-CDK13-Komplexes oder auf eine Wechselwirkung beider Komplexe zurückzuführen sind. Obwohl CDK12 und CDK13 zwei evolutionär verwandte Kinasen sind, die eine hohe Sequenz- und strukturelle Ähnlichkeit aufweisen und beide mit CycK zu einem Komplex assoziieren sowie als CTD-Kinase fungieren, wurden in einigen Studien funktionelle Unterschiede festgestellt. Diese spezifischen CDK-abhängigen Unterschiede könnten möglicherweise entscheidende Erkenntnisse liefern, um die Rolle der jeweiligen Kinasen mit den in dieser Arbeit beobachteten Auswirkungen des CDK12/CDK13-Inhibitors in Verbindung zu bringen. Besonders hervorgehoben wird in diesen Publikationen die selektive CDK-abhängige Regulation bestimmter Gen-Subgruppen während der Transkription. In diesem Kontext zeigten eigene Genexpressionsanalysen eine THZ531-vermittelte Reduktion der DDR-Gene (Abbildung 4-8), was mit der in der Literatur beschriebenen transkriptionellen Aktivität des CycK-CDK12-Komplexes korreliert: Während der CycK-CDK12-Komplex hauptsächlich die Expression von Genen reguliert, die an der DDR, DNA-Reparatur und DNA-Replikation beteiligt sind [97, 113-115, 137], kontrolliert der CycK-CDK13-Komplex Gene, die an posttranskriptionellen Modifikationen der rRNA, verschiedenen extrazellulären und wachstumsfördernden Signalwegen oder dem mitochondrialen Energiestoffwechsel involviert sind [101, 111, 114].

Weitere Studien an CycK-, CDK12- und CDK13-defizienten Mäusen konnten zudem zeigen, dass die genannten Kinasen bzw. CycK eine wesentliche Rolle in der Embryonalentwicklung spielen, die sich jedoch unterschiedlich manifestiert. Obwohl eine vollständige Inaktivierung sowohl von CDK12 als auch von CDK13 *in vivo* zu einer embryonalen Letalität führt, unterscheiden sich die zugrunde liegenden Ursachen dieser Letalität. Im Gegensatz zu CDK13-defizienten Mäusen, die erst im späten Stadium der Embryogenese (Tag 16,5) aufgrund einer fehlerhaften Entwicklung mehrerer Organe und Gewebestrukturen sterben [109], resultiert die genetische Inaktivierung von CDK12 in einer früheren Sterblichkeit im Blastozystenstadium. Diese frühe Letalität ist auf eine fehlerhafte Expression von DNA-Reparaturgenen zurückzuführen, was eine genomische Instabilität verursacht [108]. In CycK-defizienten Mäusen tritt dieser letale Phänotyp im Blastozystenstadium ebenfalls auf [97].

Neben ihrer zentralen Funktion bei der Transkription wurde den CycK-CDK12/CDK13-Komplexen auch eine wesentliche regulatorische Rolle bei der Translation zugeschrieben. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass CDK13 die Translation durch direkte Phosphorylierung

von 4E-BP1 reguliert, was speziell die Proteinexpressionsspiegel von MYC beeinflusst [122]. Darüber hinaus konnten Choi *et al.* feststellen, dass der CycK-CDK12-Komplex die Translation von mTORC1-abhängigen mRNAs koordiniert, die für die mitotische Chromosomenstabilität unerlässlich sind. Die Suppression von CycK und CDK12 führte in diesem Zusammenhang zu schweren chromosomalen Fehlanordnungen und mitotischen Defekten [121]. Gleichmaßen induzierte die Suppression von CycK in PCa-Zellen eine Aurora-Kinase B-abhängige mitotische Katastrophe, die Apoptose auslöste [131]. Da eine mitotischen Katastrophe auch als Folge von DNA-Schäden auftreten kann, die in eigenen Analysen nach der Behandlung mit THZ531 in den PCa-Zelllinien detektiert wurden (Abbildung 4-9, Abbildung 4-10), sind diese Effekte vermutlich auf die Inhibition des CycK-CDK12-Komplexes zurückzuführen [268].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die CycK-CDK12/CDK13-Inhibition in einigen PCa-Zelllinien einen G2/M-Phasenarrest verursachte (Abbildung 4-5). Verschiedene Forschungsarbeiten deuten darauf hin, dass diese zelluläre Reaktion ebenfalls der Hemmung des CycK-CDK12-Komplexes zuzuschreiben ist: Chirackal Manavalan *et al.* identifizierten die CDK12-vermittelte RNAP II-Prozessivität als geschwindigkeitsbestimmenden Faktor für den Eintritt in die S-Phase und der Zellproliferation [137]. Ferner wurde eine CycK-CDK12-vermittelte Phosphorylierung von Cyclin E1 beschrieben, die die Assemblierung des prä-Replikationskomplexes in der G1-Phase reguliert, was eine Voraussetzung für die DNA-Replikation und eine kontinuierliche Zellproliferation darstellt [129].

Aufgrund dieser Studien wird daher vermutet, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten THZ531-vermittelten Effekte primär eine Folge der Inhibition des CycK-CDK12-Komplexes sein könnten. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die duale CDK12/CDK13-Inhibition durch THZ531 ein erhebliches antineoplastisches Potenzial besitzen könnte, da bei der gleichzeitigen Hemmung der beiden Komplexe größere Effekte auf die Genexpression beobachtet wurden [114, 118, 247, 269]. Verglichen mit den moderaten Effekten, die durch eine alleinige CDK12- oder CDK13-Inhibition hervorgerufen wurden, reduziert THZ531 die Phosphorylierung der CTD, verringert die globale RNAP II-Prozessivität und verlangsamt die Elongationsgeschwindigkeit, was zu Elongationsdefekten führt. Diese Daten deuten auf eine mögliche funktionelle Redundanz oder eine kooperative Wirkungsweise von CDK12 und CDK13 als Regulatoren der RNAP II-Prozessivität und Elongation hin [94, 247]. Zukünftige Studien sollten daher sowohl die unabhängigen regulatorischen Funktionen der Kinasen unter Einsatz spezifischer Inhibitoren, siRNAs oder der CRISPR-Cas-Technologie als auch die Interaktionen zwischen den beiden Kinasen in PCa-Zellen weiter erforschen [137]. Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, die selektive Hemmung und parallele Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe für die zielgerichtete therapeutische Anwendung bei malignen Erkrankungen zu optimieren.

5.3 Eignung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als therapeutische Zielstrukturen in Kombination mit Standardtherapieformen des PCa

5.3.1 Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe sensitiviert PCa-Zellen für Olaparib

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung der PCa-Zelllinien mit THZ531 zu einer Reduktion der BRCA1-Expression und zur Anhäufung von DNA-Schäden führte, was auf eine mögliche dysfunktionale HR-Reparatur hinweist (Abschnitt 4.2.4.1). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde daraufhin analysiert, ob THZ531 in Kombination mit dem PARP1-Inhibitor Olaparib eine synthetische Letalität in PCa-Zelllinien hervorruft. Dabei wurde festgestellt, dass die gleichzeitige Behandlung mit THZ531 und Olaparib lediglich in der Zelllinie LNCaP einen synergistischen Effekt erzeugte, der durch eine deutliche Zunahme der Apoptoserate gekennzeichnet war (Abbildung 4-12). Diese Beobachtung war unerwartet, da sich LNCaP-Zellen in vorangegangenen Analysen als resistent gegenüber THZ531 erwiesen hatten (Abbildung 4-3, Abbildung 4-4). In DU-145- und C4-2B-Zellen verursachte die kombinierte Behandlung eine erhöhte Apoptoserate. Im Gegensatz dazu konnten nur geringe bzw. keine Effekte in den Zelllinien LAPC4 und PC-3 nach der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Olaparib beobachtet werden (Abbildung 4-12). Diese Ergebnisse sind teilweise konsistent mit früheren Studien, in denen die Induktion eines synergistischen Zelltods als Folge der kombinierten Behandlung aus THZ531 und Olaparib in Myelom- und Ewing-Sarkomzelllinien nachgewiesen werden konnte [124, 125].

In den Zelllinien LAPC4 und PC-3 könnte das Ausbleiben einer Reaktion auf die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Olaparib höchstwahrscheinlich auf den THZ531-induzierten G2/M-Phasenarrest zurückzuführen sein (Abbildung 4-5). Dieser Arrest unterbindet den vollständigen Ablauf des Zellzyklus, einschließlich der DNA-Replikation, die für die synergistische Zytotoxizität von Olaparib erforderlich ist. Die Wirksamkeit von Olaparib beruht in der Regel darauf, dass DNA-Replikationsgabeln in replizierenden Zellen mit PARP1-DNA-Addukten oder DNA-SSB kollidieren, wodurch DNA-DSB akkumuliert werden, die aufgrund einer defekten HR-Reparatur nicht mehr behoben werden können [270]. Zukünftige *in vitro*-Analysen, die Zellzykluskontrollpunkt-Inhibitoren in Kombination mit THZ531 einsetzen, könnten klären, ob der durch THZ531 verursachte Zellzyklusarrest in PC-3- und LAPC4-Zellen aufgehoben oder umgangen werden kann und dadurch möglicherweise die Apoptose ausgelöst wird [271, 272].

Ferner besteht die Möglichkeit, dass die unveränderte BRCA1-Proteinexpression in PC-3-Zellen nach der Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe (Abbildung 4-8 F) ein potenzieller Grund für die fehlende Reaktion auf die Kombinationsbehandlung sein könnte, da die HR-Reparaturmaschinerie dadurch wahrscheinlich weiterhin intakt war. Im Vergleich dazu zeigten DU-145-Zellen mit ähnlich unveränderter BRCA1-Proteinexpression (Abbildung 4-8 F), jedoch einen verstärkten Effekt der Apoptoseinduktion als Folge der Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Olaparib (Abbildung 4-12). Dies könnte vermutlich auf die in DU-145-Zellen vorherrschenden Mutationen in den *BRCA1/2*- und anderen DDR-Genen zurückzuführen sein, die die HR-Reparatur zusätzlich beeinträchtigen und diese Zelllinie dadurch anfälliger für PARP-Inhibitoren machen könnten [266, 267].

Generell war die THZ531-bedingte Reduktion der BRCA1-Expression auf Proteinebene bei den androgensensitiven Zellen im Vergleich zu den androgenunabhängigen DU-145- und PC-3-Zellen deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 4-8 F). Feiersinger *et al.* konnten in diesem Kontext ein mutiertes *BRCA2*-Gen in LNCaP-Zellen identifizieren, was dieser Zelllinie möglicherweise eine erhöhte Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren verleihen könnte [266]. Das Zusammenspiel einer BRCA2-Mutation mit der THZ531-vermittelten Reduktion der BRCA1-Expression könnte daher den beobachteten synergistischen Effekt in LNCaP-Zellen nach der Kombinationsbehandlung erklären. In ähnlicher Weise könnte dies auch auf ihr Derivat, die Zelllinie C4-2B, zutreffen, die ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate nach der kombinierten Behandlung aufwies (Abbildung 4-12). Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig, die die Konsequenzen der Kombinationsbehandlung auch auf molekularer Ebene untersuchen und die Zellen hinsichtlich der veränderten Reparaturmaschinerie und DNA-Schäden analysieren, um schließlich klären zu können, warum hier ein unterschiedliches Therapieansprechen beobachtet wurde.

5.3.2 Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe erhöht die Effektivität der ADT in PCa-Zellen und im -Gewebe

5.3.2.1 Funktionelle Effekte der Kombinationsbehandlung in AR-positiven Zelllinien

Die gleichzeitige Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und des ARs bzw. der Androgensynthese verursachte in den androgensensitiven PCa-Zelllinien verstärkte zelluläre Auswirkungen. In der Zelllinie LNCaP löste die Kombinationsbehandlung mit THZ531 und Enzalutamid bzw. Abirateron die Apoptose aus, während sie in C4-2B- und LAPC4-Zellen zu einer unterschiedlich starken Zunahme der Apoptoserate führte (Abbildung 4-14, Abbildung 4-15). Diese Ergebnisse waren konsistent mit einer früheren Studie von Lei *et al.*, die ebenfalls eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen nach der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid in PCa-Zellen feststellten [273]. Im Vergleich zur Kombinationsbehandlung zeigten die PCa-Zellen nach der Einzelbehandlung mit Enzalutamid oder Abirateron keine Apoptoseinduktion.

Als mögliche Ursache der gesteigerten Apoptoserate bzw. der Apoptoseinduktion könnte die deutlich reduzierte DDR-Genexpression nach der Kombinationsbehandlung vermutet werden (Abbildung 4-16, Abbildung 4-17), die zudem mit einer erhöhten Anzahl an DNA-Schäden einherging (Abbildung 4-20 – Abbildung 4-23). Im Gegensatz dazu führten die Einzelbehandlungen mit Enzalutamid oder Abirateron nur zu marginalen Expressionsunterschieden der untersuchten DDR-Gene (Abbildung 4-16, Abbildung 4-17). Diese Ergebnisse stimmen daher nur teilweise mit der Studie von Li *et al.* überein, in der eine Enzalutamid-bedingte Verminderung von HR-assoziierten Genen, wie beispielsweise BRCA1, in LNCaP-Zellen identifiziert wurde [274]. Die geringfügigen Abweichungen in den Beobachtungen könnten wahrscheinlich auf die Verwendung verschiedener Inhibitorkonzentrationen oder Inkubationszeiten zurückzuführen sein.

Darüber hinaus existieren bereits mehrere Studien, die eine Interaktion zwischen der AR-Signaltransduktion und der DNA-Reparatur bzw. der DDR aufzeigen. In diesem Zusammenhang kann der AR einerseits als Reaktion auf DNA-Schäden die Expression von DDR-Genen transkriptionell hochregulieren [238-240], andererseits zeigten weitere Studien, dass nicht nur der AR selbst die Transkription dieser Gene steuern kann, sondern dessen Aktivität auch von einigen DDR-Faktoren beeinflusst wird. Beispielsweise können Proteine wie PARP1, Ku70, Ku80 und BRCA1 direkt mit dem AR interagieren und so seine Transkriptionsaktivität verstärken [275-277]. Im Gegensatz dazu verhindert die Bindung von RAD9A an die LBD die AR-Aktivität [278]. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sowohl die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als auch der AR eine wesentliche Rolle während der transkriptionellen Regulation der Expression der DDR-Gene im PCa spielen. Eine gleichzeitige Hemmung des AR-Signalwegs und der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe könnte demnach die Transkription maßgeblich beeinflussen und zu einem starken Rückgang der DDR-Genexpression führen, was in eigenen Analysen ebenfalls beobachtet werden konnte (Abbildung 4-16, Abbildung 4-17).

Bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für das PCas ist die Interaktion zwischen dem AR-Signalweg und der Transkription von DDR-Genen besonders relevant, da sie die gezielte Anwendung von Kombinationstherapien zur Induktion der synthetischer Letalität ermöglicht [279]. Lei *et al.* konnten bereits zeigen, dass die gleichzeitige Behandlung mit THZ531 und AR-Antagonisten in androgensensitiven PCa-Zellen eine synthetische Letalität auslöst [273]. Daraus ergibt sich eine vielversprechende Perspektive für künftige Studien, die die zugrunde liegenden Mechanismen der Korrelation zwischen der AR-Signaltransduktion und der Transkription von DDR-Genen sowie die Rolle des CycK-CDK12/CDK13-Komplexes in diesem Kontext genauer untersuchen.

5.3.2.2 Funktionelle Effekte der Kombinationsbehandlung in AR-negativen Zelllinien

Grundsätzlich ist das Ansprechen auf eine Hormontherapie in PCa-Zellen eng mit dem Expressionsstatus des ARs verbunden. PCa-Zelllinien mit einer hohen Proteinexpression des Wildtyp-ARs reagieren in der Regel stärker auf die Behandlung mit Enzalutamid als Zelllinien mit niedrigen AR-Spiegeln oder AR-Spleißvarianten. In der Literatur wird jedoch auch ein gutes Therapieansprechen bei AR-negativen Zelllinien beobachtet [280]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden in der vorliegenden Arbeit neben den AR-positiven auch die AR-negativen PCa-Zelllinien DU-145 und PC-3 mit THZ531 und Enzalutamid bzw. Abirateron behandelt und die funktionellen Auswirkungen analysiert. Nach der Kombinationsbehandlung konnte in DU-145-Zellen eine erhöhte Zunahme der Apoptoserate festgestellt werden, was mit den Ergebnissen der androgensensitiven PCa-Zellen vergleichbar war. Im Gegensatz dazu wiesen PC-3-Zellen keine Anzeichen einer behandlungsinduzierten Apoptose auf (Abbildung 4-14, Abbildung 4-15). Parallel dazu führte die Kombinationsbehandlung sowohl in der Zelllinie DU-145 als auch in PC-3-Zellen zu einer deutlich reduzierten DDR-Genexpression (Abbildung 4-18, Abbildung 4-19), was zudem mit einer stärkeren Ansammlung von DNA-Schäden assoziiert war (Abbildung 4-24 - Abbildung 4-26).

In diesem Zusammenhang könnten potenzielle Off-Target-Effekte von Enzalutamid oder Abirateron eine mögliche Ursache für die ausgeprägte antitumorogene Wirkung der Kombinationsbehandlung in DU-145-Zellen darstellen. Diese Annahme wird von einer früheren Studie gestützt, die gezeigt hat, dass AR-negative Zelllinien wie z. B. DU-145 ebenfalls auf die Behandlung mit Enzalutamid ansprechen. Dabei konnten Smith *et al.* in DU-145-Zellen eine erhöhte Aktivität der Androgen- und Östrogensignalwege nachweisen, was mit einer vermehrten Expression des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) einherging [280]. Der GR übernimmt oder imitiert dabei die Aktivität des ARs und kann somit die Expression von AR-Zielgenen wie KLK3 (PSA) und TMPRSS2 steuern [281, 282]. Es ist daher denkbar, dass Enzalutamid nicht nur zielgerichtet den AR inhibiert, sondern auch Off-Target die Aktivität des GRs unterdrückt, da die DBD bzw. die LBD des GRs eine Sequenzidentität von 83 % bzw. 98 % gegenüber der DBD und LBD des AR aufweisen [283].

Die Beeinträchtigung der GR-Aktivität durch die ADT könnte daher in AR-negativen Zelllinien ähnliche Auswirkungen wie eine AR-Inhibition in AR-positiven Zelllinien hervorrufen. Darüber hinaus stellten weitere Studien fest, dass eine transkriptionelle Wechselwirkung zwischen dem GR und BRCA1 im Mamma- oder Ovarialkarzinom besteht [284, 285]. In Mammakarzinomzellen kann der GR beispielsweise in Abwesenheit seines Liganden die BRCA1-Expression positiv regulieren [285]. Diese Erkenntnis könnte möglicherweise auch die verstärkte Abnahme der DDR-Genexpression nach der Kombinationsbehandlung in den AR-negativen PCa-Zellen erklären. Weitere Untersuchungen sind daher erforderlich, um festzustellen, ob die Interaktion zwischen dem GR und BRCA1 auch im PCa eine Rolle spielen könnte.

Obwohl die Zelllinie PC-3 nach der Kombinationsbehandlung eine deutlich reduzierte DDR-Genexpression sowie eine erhöhte Anzahl an DNA-Schäden aufwies, führte dies in diesen Zellen nicht zur Induktion der Apoptose (Abbildung 4-14, Abbildung 4-15). Demnach scheinen die oben beschriebenen Off-Target-Effekte der ADT zwar ebenfalls auf diese Zelllinie zuzutreffen, allerdings wird die Auslösung der Apoptose möglicherweise durch andere Mechanismen verhindert oder blockiert. Es ist daher möglich, dass die AR-negative Zelllinie PC-3 über alternative Überlebensmechanismen verfügt, die die Apoptose verhindern und stattdessen einen Zellzyklusarrest verursachen, der nach der Einzelbehandlung mit THZ531 in dieser Zelllinie beobachtet wurde (Abbildung 4-5). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um einerseits die zugrundeliegenden Mechanismen der zellulären Effekte zu identifizieren und andererseits die Therapieresistenz in diesen Zellen zu überwinden. Darüber hinaus verdeutlichen diese Beobachtungen, dass die Wirksamkeit neuer Therapien an einem breiten Spektrum verschiedener PCa-Zelllinien analysiert werden sollte, um ein umfassenderes Bild des heterogenen Charakters des PCas zu erfassen.

5.3.2.3 Funktionelle Effekte der Kombinationsbehandlung an frischem humanem PCa-Gewebe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der kombinierten Behandlung mit THZ531 und den Antiandrogenen nicht nur *in vitro*, sondern darüber hinaus auch an einem *ex vivo*-Gewebekulturmodell untersucht. Die Verwendung dieses Modells bietet gegenüber den traditionellen Zellkulturmethoden einige Vorteile, die für die Analyse neuer therapeutischer Behandlungsstrategien von entscheidender Bedeutung sind. Die direkte Behandlung von Gewebeschnitten aus frischem humanem PCa-Gewebe ermöglicht eine individuellere Untersuchung des Therapieansprechens unter Berücksichtigung des ursprünglichen Tumorstromas, der dreidimensionalen Gewebearchitektur und der komplexen Zell-Zell-Interaktion der Tumormikroumgebung. Dadurch ist eine präzisere Darstellung der zellulären Heterogenität und

Komplexität des PCas und damit auch eine bessere Vergleichbarkeit der *ex vivo*-Effekte mit der *in vivo*-Situation möglich [241, 242].

Die gleichzeitige Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe und der AR-Signaltransduktion der Gewebeschnitte des PCa-Gewebekollektivs führte sowohl zur Reduktion der Anzahl proliferierender Zellen (Abbildung 4-34) als auch zur Induktion der Apoptose (Abbildung 4-31). Diese Ergebnisse bestätigten die antitumorigene Wirkung der Kombinationsbehandlung, die in den vorangegangenen *in vitro*-Experimenten dieser Arbeit beobachtet wurde. Darüber hinaus konnte bei der individuellen Betrachtung der Proliferations- (Abbildung 4-32, Abbildung 4-33) und Apoptose-Daten (Abbildung 4-29, Abbildung 4-30) der einzelnen Tumorproben nach der kombinierten Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron ein breites Spektrum an Therapieantworten festgestellt werden, die von einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Behandlung bis hin zur Therapieresistenz reichten. Anzumerken ist hierbei, dass keine Korrelation zwischen den klinischen und pathologischen Daten der PCa-Patienten, wie z. B. der TNM-Klassifikation und dem ISUP/WHO-Grading (Tabelle 4-1), sowie dem Ansprechen auf die Behandlung festgestellt werden konnte. Eine Erweiterung des Gewebekollektivs könnte wahrscheinlich zusätzliche Erkenntnisse über mögliche Zusammenhänge zwischen diesen Daten und der Reaktion auf die Therapie liefern.

Die beobachtete Varianz des Therapieansprechens der einzelnen Tumorproben ist daher vermutlich auf die komplexe inter- und intratumorale Heterogenität des PCas zurückzuführen [64]. In diesem Kontext könnten CDK12-Mutationen, die mit einer Häufigkeit von ca. 7 % im PCa auftreten, eine potenzielle Erklärung für ein schlechteres Ansprechen auf die THZ531-Behandlung sein [286]. Je nachdem an welcher Stelle die Mutation im Gen lokalisiert ist oder welche Art von Mutation vorliegt, wie z. B. ein verkürztes Genprodukt, Leseraster- oder Missense-Mutationen, Rearrangements oder Deletionen, könnte das entsprechende Cystein-Molekül (Cys-1039) entweder verändert oder nicht mehr zugänglich sein [287, 288]. Dies könnte zur Folge haben, dass eine kovalente Bindung von THZ531 und damit eine Unterdrückung der Kinaseaktivität nicht mehr möglich ist.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass das Therapieansprechen durch epigenetische oder mutationsbedingte Alterationen des AR-Signalwegs oder des AR selbst negativ beeinflusst wird. In diesem Zusammenhang ist in der Literatur beschrieben, dass das Vorhandensein der AR-Spleißvarianten, insbesondere der Variante 7 (AR-V7), mit einer Resistenz gegen Enzalutamid und Abirateron assoziiert ist [45, 289]. Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, dass diese Spleißvariante im untersuchten PCa-Gewebe nachzuweisen ist, da die PCa-Patienten des Kollektivs vor der radikalen Prostatektomie keine neoadjuvante Therapie erhalten hatten. Diese Spleißvarianten des ARs bilden sich typischerweise erst im Verlauf einer Hormontherapie durch das alternative Spleißen des ARs. Dieser adaptive Mechanismus als Reaktion auf die Hemmung des AR-Signalwegs

trägt maßgeblich zur Entwicklung einer Kastrationsresistenz bei und wird erst bei fortgeschrittenen PCa-Varianten beobachtet [290].

Neben Aberrationen der Inhibitor-Targets könnten auch andere Mutationen, die häufig in Verbindung mit einem PCa auftreten, für das heterogene Therapieansprechen verantwortlich sein. Beispielsweise wird in etwa 50 % der PCa-Fälle die TPMRSS2:ERG-Fusion identifiziert, die mit einer anomalen Aktivierung des PI3K-Signalwegs oder einem PTEN-Verlust einhergeht [26, 291, 292]. Darüber hinaus ist bekannt, dass PTEN und TPMRSS2:ERG ebenfalls an der Reparatur von DNA-Schäden bzw. der DDR beteiligt sind, was den antitumorigenen Effekten der ADT bzw. von THZ531 entgegenwirken könnte [260, 293]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass genetische Veränderungen in anderen DDR-assoziierten Proteinen wie beispielsweise p53, ATM oder auch BRCA1/2 ebenfalls das Therapieansprechen beeinträchtigen [26, 292]. Die genannten Faktoren stellen nur einen kleinen Teil der möglichen Ursachen dar, die die Heterogenität des PCa-Gewebes bzw. die variierende Reaktion auf die Behandlung erklären könnten. Möglicherweise spielen auch bislang unbekannte Faktoren, Signalwege oder andere adaptive Mechanismen eine Rolle, die für eine schlechtere Therapieantwort ursächlich sind und daher weitere Studien erfordern. In diesem Zusammenhang könnten ergänzenden Methoden zur Gewebekultur, wie z. B. *Next Generation Sequencing*, Einblicke in die vorherrschenden Mutationen des PCa-Gewebes liefern, um somit Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen zu ermöglichen.

5.4 Präklinische Evaluierung des CycK-CDK12-Komplexes als Biomarker

5.4.1 Prognostische Relevanz der CycK- und CDK12-Expression im humanen PCa-Gewebe

Die biologische Heterogenität und der variable klinische Verlauf des PCas, dessen Spektrum von einer indolenten Erkrankung bis hin zu aggressiven Formen mit teils tödlichem Verlauf reicht, erfordern eine genaue Stratifizierung der Patienten in Risikogruppen, damit eine geeignete, individuelle Therapie angewendet werden kann. Daher ist die Identifizierung und Evaluierung neuer prognostischer und prädiktiver Biomarker besonders entscheidend, um eine personalisierte und präzisere Behandlung der PCa-Patienten zu gewährleisten, Unter- bzw. Überbehandlungen zu vermeiden und das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen zu minimieren. Eine individuelle Behandlung, die sich an spezifischen Biomarkern orientiert, kann zudem zu höheren Ansprechraten, längeren Überlebenszeiten und einer besseren Lebensqualität der Patienten führen [294]. Neben dem klassischen diagnostischen und prognostischen Serum-Biomarker PSA wurden in den letzten Jahren neue gewebebasierte Biomarker identifiziert, die Informationen über das Risiko einer hochgradigen Erkrankung, die Metastasierungsrate und das Überleben liefern sollen [63, 295]. Allerdings fehlen derzeit klinische Daten, die sowohl die Wirksamkeit dieser Biomarker validieren als auch den optimalen Nutzen bestimmen [294]. Die Identifizierung neuer prognostischer und prädiktiver Biomarker, die den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen vorhersagen, stellt daher weiterhin ein zentrales Forschungsziel zur Entwicklung individueller Behandlungsstrategien für PCa-Patienten mit metastasierten oder kastrationsresistenten Varianten dar.

Zur Evaluierung von CycK und CDK12 als prognostische Biomarker im PCa wurde in dieser Arbeit ein TMA verwendet, der Primärtumorproben sowie Proben von *high-grade* PINs oder Metastasengewebe von 300 PCa-Patienten umfasst, die keine neoadjuvante Therapie erhalten haben. Durch die Nutzung eines TMAs ist es möglich, mehrere potenzielle Biomarker gleichzeitig und präzise in einem großen und divergenten Patientenkollektiv zu analysieren, was zu einer höheren Zuverlässigkeit und Aussagekraft der Ergebnisse führt [296]. In der vorliegenden Arbeit wurde der TMA immunhistochemisch mit einem Anti-CycK- und einem Anti-CDK12-Antikörper gefärbt. Letzterer wurde zuvor auf seine Spezifität und Sensitivität getestet (Abbildung 4-35, Abbildung 4-36). Der Anti-CycK-Antikörper wurde bereits von Schecher *et al.* etabliert [131]. Für jeden der insgesamt 1200 Tumorgewebecores, *high-grade* PINs und Metastasen wurde ein H-Score ermittelt, der sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl der immunreaktiven CycK- bzw. CDK12-Zellen berücksichtigt und somit die Proteinexpression repräsentiert.

Mittels Korrelationsanalysen wurde anschließend auf der Basis des H-Scores der jeweiligen Tumorcors untersucht, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen der CycK- bzw. CDK12-Expression und den verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen besteht. Innerhalb des

Kollektivs wurde sowohl bei der CycK- als auch bei der CDK12-Expression ein breites Spektrum an inter- und intratumoraler Heterogenität beobachtet, was die heterogene Natur des Karzinoms widerspiegelt (Abbildung 4-37, Abbildung 4-38). Außerdem konnte festgestellt werden, dass hohe CycK-Expressionswerte signifikant mit einem aggressiveren Tumorphänotyp assoziiert sind (Abbildung 4-39). Die Dichotomisierung der CycK-Expression in schwach und stark ergab ebenfalls eine statistische Korrelation zwischen einer hohen CycK-Expression und hochgradigen Tumoren sowie Tumoren mit Lymphknotenmetastasen (pN1-Stadium) und perineuraler Invasion (Pn1) (Tabelle 4-3). Somit konnte gezeigt werden, dass CycK sich als potenzieller prognostischer Biomarker beim PCa eignet.

Studien, die die Expression von CycK in anderen Tumorentitäten untersuchten, beobachteten ähnliche prognostische Zusammenhänge. Beispielsweise konnten Lei *et al.* nachweisen, dass CycK in Tumorproben von Mammakarzinompatientinnen überexprimiert wird und dass eine höhere CycK-Expression vor allem in späteren Stadien der Tumorentstehung auftritt [129]. Eine erhöhte Expression von CycK wurde ebenfalls im Lungenkarzinomgewebe im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe festgestellt, die zudem mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechteren Prognose korreliert [130]. Über das Potenzial von CycK als möglicher Biomarker im PCa ist in der Literatur jedoch wenig bekannt. Eine dieser Arbeit vorangegangene Studie legt jedoch nahe, dass CycK ein möglicher prädiktiver Biomarker für das klinische Ergebnis und das Therapieansprechen bei Patienten mit einem PCa sein könnte. In dieser Studie konnten Schecher *et al.* zudem zeigen, dass eine erhöhte CycK-Expression im Tumorgewebe mit einem verringerten biochemisch-rezidivfreien Überleben assoziiert ist [131]. Dementsprechend könnte das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Kollektiv in zukünftigen Studien durch die Einbeziehung der PSA-Spiegel und weiterer Follow-up-Daten der Patienten entscheidende Erkenntnisse liefern, um neben der prognostischen auch die prädiktive Rolle von CycK umfassender zu charakterisieren.

Die erhöhten CycK-Expressionswerte im Primärtumorgewebe mit höherem Gleason-Score, bei Tumoren, die eine extraprostatiche Expansion aufweisen (pT3/4), in Tumoren mit regionalen Lymphknotenmetastasen (pN1) oder bei Tumoren mit perineuraler Infiltration (Pn1) deuten darauf hin, dass CycK eine entscheidende Rolle bei Tumorwachstum, Proliferation und Metastasierung spielen könnte (Abbildung 4-39). Diese Annahme wird durch frühere Studien gestützt, die gezeigt haben, dass CycK für das Wachstum von PCa-Zellen erforderlich [131] und gleichermaßen unerlässlich für die Zellproliferation in anderen Tumorentitäten ist [127, 130].

Darüber hinaus könnte die Korrelation der CycK-Expression mit einem aggressiveren Tumorphänotyp auch auf die kürzlich identifizierte Funktion von CycK als Modulator des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs zurückzuführen sein. Dieser wird auch als kanonischer Wnt-Signalweg bezeichnet, der nach der Aktivierung die Kerntranslokation von β -Catenin

induziert. Dadurch wird die Expression von Genen gefördert, die an der Zellproliferation, dem Überleben, der Differenzierung und der Migration beteiligt sind [297]. Durch die Interaktion von CycK mit β -Catenin, das als transkriptioneller Aktivator der Wnt-Zielgene fungiert, wird die Expression von Cyclin D1 hochreguliert, was die Tumorentstehung beim Lungenkarzinom begünstigt [130, 298]. Analog dazu wurde in der Literatur eine erhöhte Cyclin D1-Expression [299] sowie eine vermehrte Akkumulation von nukleärem β -Catenin im Tumorgewebe von PCa-Patienten mit einem hochgradigen Gleason-Score (≥ 7) nachgewiesen [298]. Zudem deuten weitere Studien darauf hin, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in fortgeschrittenen PCa-Stadien aktiv ist und dessen Aktivierung Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung der Tumorzellen hat sowie den epithelial-mesenchymalen Übergang ermöglicht [298, 300]. Demnach könnte eine erhöhte CycK-Expression vermutlich die Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion verstärken, was zur Förderung der Tumorentwicklung und -progression beitragen könnte.

Im Gegensatz zur CycK-Expression konnte in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen der CDK12-Expression und den klinisch-pathologischen Merkmalen im PCa-Kollektiv beobachtet werden. Eine Ausnahme bildeten jedoch Pn1-positive Tumore, die mit einer geringeren CDK12-Expression assoziiert waren (Abbildung 4-40, Tabelle 4-3). In der Literatur sind dazu gegensätzliche Assoziationen zwischen der CDK12-Expression und dem Krankheitsstadium sowie dem -verlauf in verschiedenen Entitäten beschrieben. Einerseits konnte festgestellt werden, dass eine hohe CDK12-Expression in Magenkarzinomgewebe oder im Tumorgewebe von Chordom-Patienten mit einem malignen Phänotyp sowie einem schlechteren Therapieansprechen und einem kürzeren Gesamt- und progressionsfreien Überleben einhergeht [132, 301]. Andererseits zeigten Liu *et al.*, dass eine niedrige CDK12-Expression im Tumorgewebe mit einem fortgeschrittenen Stadium und einer schlechten Prognose beim Magenkarzinom assoziiert ist [302]. Ferner korrelierte eine hohe CDK12-Expression mit einer HER2-Positivität im Mammakarzinom, während das Fehlen der CDK12-Proteinexpression mit einem triple-negativen Phänotyp (TNBC) und einer verminderten Expression von DDR-Proteinen einhergeht [138]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die immunhistochemische Analyse der CDK12-Expression in einigen Tumorentitäten vermutlich als prognostischer Marker zur Bewertung des Krankheitsverlaufs verwendet werden könnte. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen der CDK12-Expression und ihrer prognostischen Relevanz als Biomarker beim PCa festgestellt (Abbildung 4-40).

Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass Mutationen im *CDK12*-Gen die funktionelle Kinaseaktivität beeinträchtigen, sodass die Analyse der CDK12-Expressionslevel keine präzisen Aussagen über die tatsächliche Proteinaktivität zulässt. In diesem Zusammenhang wurden genomische CDK12-Aberrationen in etwa 30 verschiedenen Tumorentitäten beobachtet, die in diesen sequenzierten Fällen mit einer Inzidenz von bis zu 15 % vorkommen [107, 135, 303]. Beim

PCa treten CDK12-Mutationen mit einer Häufigkeit von etwa 7 % auf und sind mit höheren Gleason-Scores, einem schlechteren Gesamt- und progressionsfreien Überleben sowie einem schnellen Fortschreiten zum CRPC assoziiert [286]. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass der Mutationsstatus von CDK12 ein mögliches Biomarker-Potenzial besitzt. Beim PCa umfasst die Mehrzahl an CDK12-Mutationen Trunktations-, Raster- und Missense-Mutationen sowie Rearrangements und Deletionen [286, 287]. Diverse Studien in Prostata-, Ovarial-, Mamma- und Lungenkarzinomen haben gezeigt, dass die verschiedenen Mutationsarten zu verschiedenen funktionellen, teils auch pathogenen Auswirkungen führen [107, 135, 303]. Beispielsweise verursachen Punktmutationen innerhalb der Kinase-Domäne von CDK12 (Abbildung 1-5) oder eine Verschiebung des Leserasters einen Funktionsverlust der Kinase, der mit genomischer Instabilität und einer defekten HR-Reparatur einhergeht. Im Gegensatz dazu führt eine Genamplifikation von CDK12 zur Überexpression des Proteins, wodurch das Überleben von malignen Zellen durch die Steigerung der Expression der DDR-Gene gefördert wird [107, 135, 303]. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte die kombinierte Analyse der CDK12-Expression und des -Mutationsstatus einen vielversprechenden Ansatz darstellen, um als prognostischer Biomarker Aussagen über den Krankheitsverlauf bei PCa-Patienten zu treffen.

In den letzten Jahren ist zudem die prädiktive Rolle des CDK12-Mutationsstatus im mCRPC in den Fokus der Forschung gerückt, insbesondere hinsichtlich des Ansprechens auf eine Immuntherapie. In diesem Kontext wurde ein neuer molekularer Subtyp des mCRPCs identifiziert, der eine biallelische Inaktivierung von CDK12 aufweist. Diese Inaktivierung führt zu einem speziellen Phänotyp genomischer Instabilität, der durch zahlreiche fokale Tandemduplikationen gekennzeichnet ist, die fusionsinduzierte Neoantigene erzeugen [141, 256, 287, 304]. Dieser Phänotyp wurde auch bei Ovarialkarzinomen beobachtet, bei denen ein biallelischer Verlust des *CDK12*-Gens vorliegt [139]. Erstaunlicherweise konnte bei diesen CDK12-inaktivierten Tumoren keine reduzierte Expression der HR-Gene, einschließlich BRCA1/2, festgestellt werden [134, 139, 141]. Des Weiteren korreliert ein biallelischer CDK12-Verlust bei mCRPC-Patienten mit einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie und PARP-Inhibitoren. Auffallend war jedoch, dass einige mCRPC-Patienten eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Immuntherapie zeigten [140, 141, 256]. In einer laufenden klinischen Studie wird derzeit der biallelische Verlust von CDK12 als prädiktiver Biomarker für die Immuntherapie untersucht (NCT03570619).

Zusammengefasst deuten die vorliegenden Daten auf unterschiedliche prognostische Rollen von CycK und CDK12 im PCa hin. Während die CycK-Expression als prognostischer Biomarker im PCa verwendet werden kann, sind für die Nutzung von CDK12 als Biomarker im PCa weitere Analysen erforderlich. Durch eine Sequenzierung des PCa-Gewebes können zusätzliche Erkenntnisse über vorliegende genomische CDK12-Alterationen gewonnen werden. Diese Sequenzierungsergebnisse könnten demnach zeigen, ob und wie der Mutationsstatus von CDK12 mit den klinischen Daten

dieser Patienten korreliert. Weiterhin ist es denkbar, dass CDK13 ebenfalls eine prognostische Rolle im PCa übernehmen könnte, da jüngste Studien eine Hochregulation von CDK13 im humanen PCa-Gewebe nachweisen konnten [305]. Zukünftige immunhistochemische Untersuchungen des TMA-Kollektivs sollten daher auch die Analyse von CDK13 berücksichtigen.

5.4.2 Relevanz der CycK- und CDK12-Expression für die Karzinogenese und Metastasierung

Zur Analyse der Rolle von CycK und CDK12 bei der Tumorentstehung und Metastasierung des PCas wurden die Gewebeproben einer kleinen Kohorte PCa-Patienten mit *high-grade* PINs (n = 21) oder Metastasen (n = 34) des TMAs hinsichtlich ihrer CycK- und CDK12-Expression untersucht und mit dem korrespondierenden Primärtumorgewebe verglichen. Im Rahmen dieser Analyse wurde eine statistisch signifikante erhöhte CycK-Expression im Metastasengewebe und in *high-grade* PINs im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumorgewebe festgestellt (Abbildung 4-41 A). Die CDK12-Expression war im metastasierten Gewebe, verglichen mit dem Primärtumorgewebe, ebenfalls signifikant erhöht. In den *high-grade* PINs konnte zwar die Tendenz einer ähnlich erhöhten CDK12-Expression beobachtet werden, jedoch erreichte diese keine statistische Signifikanz (Abbildung 4-41 B). Diese Ergebnisse lassen daher vermuten, dass eine hohe Expression des CycK-CDK12-Komplexes in den Vorläuferläsionen entweder eine potenziell onkogene Aktivität besitzt, die zur Progression von einem *high-grade* PIN zu einem PCa beiträgt und somit ein frühes Ereignis während der Tumorentstehung darstellt, oder aber eine tumorsuppressive Rolle einnimmt, die die Entwicklung eines PCas verhindern könnte [107, 306].

Die tumorsuppressive Eigenschaft des CycK-CDK12-Komplexes basiert auf seiner zentralen Funktion bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. In *high-grade* PINs, die lediglich eine Vorläuferläsion des invasiven PCas darstellen, könnte dieser Komplex möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen, da das generelle Erkrankungsrisiko nach einer *high-grade* PIN Diagnose im Vergleich zu einer gutartigen Biopsie nicht wesentlich höher ist [307]. Daher lässt die beobachtete hohe CycK-Expression in den *high-grade* PINs im Vergleich zum Primärtumorgewebe sowie die tendenziell erhöhte Expression von CDK12 (Abbildung 4-41) vermuten, dass der CycK-CDK12-Komplex möglicherweise eine wichtige protektive Wirkung ausüben könnte. Eine verstärkte Aktivität des Komplexes könnte die genomische Integrität schützen, indem er als transkriptioneller Regulator die DDR- und DNA-Reparaturmaschinerie durch eine gesteigerte Expression der entsprechenden Gene fördert. Auf diese Weise könnten potenzielle DNA-Schäden oder Mutationen verhindert werden, die andernfalls die Tumorentstehung begünstigen würden [107, 303, 306].

Im Umkehrschluss könnte die Rolle des CycK-CDK12-Komplexes bei der Genomstabilität jedoch auch zur Entwicklung eines PCas beitragen, da dieser mit mehreren onkogenen Signalwegen und Prozessen in Verbindung gebracht wird [107, 145]. Onkogene Transkriptionsfaktoren wie MYC, ERG

und der AR sind im PCa häufig mutiert und können unter anderem eine gesteigerte Zellzyklusprogression induzieren und somit die Entstehung eines Karzinoms vorantreiben [27, 30, 31, 308]. Diese schnell proliferierenden Zellen, die Mutationen in den genannten Onkogenen aufweisen, unterliegen einer sogenannten Transkriptionssucht. Daher sind diese Zellen besonders auf eine gesteigerte Aktivität des CycK-CDK12-Komplexes angewiesen, der die Expression von DDR- und DNA-Reparaturgenen hochreguliert, um hohe Transkriptionsraten sowie eine beschleunigte und reibungslose Replikation sicherzustellen. Dadurch könnten diese Zellen einen Überlebensvorteil erlangen, der wiederum das Tumorwachstum fördern könnte [143, 144, 147].

Es besteht zudem die Möglichkeit, dass eine erhöhte CycK-Expression bereits zu diesem frühen Zeitpunkt die Aktivität des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs steigert, was ebenfalls die Tumorentwicklung beschleunigen könnte. Diese Annahme wird durch die beobachtete Überexpression von β -Catenin in PINs unterstützt [298]. Darüber hinaus könnte eine vermehrte Aktivität des CycK-CDK12-Komplexes möglicherweise auch die Bildung tumorspezifischer Neoantigene verhindern, die durch genomische Mutationen entstehen können. Dies könnte die Entwicklung eines Karzinoms ebenfalls begünstigen, da diese Zellen wahrscheinlich weniger effektiv von Immunzellen erkannt werden und dadurch einer Eliminierung durch das Immunsystem entgehen könnten [309].

Die hohe Expression von CycK und CDK12 im Metastasengewebe (Abbildung 4-41) deutet darauf hin, dass der CycK-CDK12-Komplex möglicherweise eine wesentliche Rolle im Metastasierungsprozess spielt. Bei der Metastasierung ist insbesondere die EMT der neoplastischen Zellen von entscheidender Bedeutung für den Erwerb invasiver Eigenschaften, die die Ausbreitung dieser Zellen aus dem Primärtumor ermöglichen. Die Bildung von Tochterneoplasien abseits der Primärläsion ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, bei dem neoplastische Zellen einer Selektion unterliegen. Folglich können nur wenige dieser zirkulierenden neoplastischen Zellen in entfernten Geweben extravasieren, überleben und Metastasen bilden. Zusätzlich spielt die Mikroumgebung, die aus verschiedenen Zelltypen und Komponenten der extrazellulären Matrix (Stroma) besteht, eine zentrale Rolle bei der Förderung der Proliferation, der Invasion und der Ansiedlung maligner Zellen [310]. Daher ist es denkbar, dass der CycK-CDK12-Komplex durch eine verstärkte Aktivierung von Signalwegen wie z. B. dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der unter anderem die Differenzierung und die EMT maligner Zellen fördert, den Metastasierungsprozess unterstützen könnte [298, 300].

Weiterhin könnte der CycK-CDK12-Komplex eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Expression von Onkogenen spielen, die ebenfalls die Metastasierung vorantreiben. In diesem Zusammenhang wurde die Überexpression des Onkogens *c-MYC*, das sowohl in frühen als auch in metastasierten Stadien des PCas auftritt und für die transkriptionelle Aktivierung metastasierungsrelevanter Zielgene verantwortlich ist, als CDK12-abhängig identifiziert. CDK12

wird dabei für die Prozessierung des 3'-Endes des MYC-Transkriptes benötigt [30, 244]. Zudem vermittelt der CycK-CDK12-Komplex zusammen mit MYC die mTORC1-abhängige Translation von mRNAs, die verschiedene onkogene Faktoren codieren [121]. Die erhöhte CycK-Aktivität könnte in Verbindung mit CDK13 ebenfalls zu einer verstärkten MYC-Proteinsynthese führen, da diese von einer CycK-CDK13-regulierten Translation abhängig ist und somit die Zellproliferation beeinflussen kann [122]. Dies lässt vermuten, dass die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe zusammen mit MYC agieren und durch die Verstärkung des MYC-Transkriptionsprogrammes zur Invasion und Bildung von Metastasen beitragen könnten [30, 107, 143].

Darüber hinaus zeigen weitere Studien, die die Rolle von CDK12 bei der Metastasierung untersucht haben, dass eine verstärkte CDK12-Expression die Migration und Metastasierung von papillären Schilddrüsenkarzinomzellen durch die Aktivierung des c-MYC/ β -Catenin-Signalwegs stimuliert [311]. Ferner stellten Tien *et al.* fest, dass CDK12 das alternative Spleißen des letzten Exons (ALE) von Genen mit langen Transkripten und vielen Exons regulieren kann [116]. Ein Beispiel hierfür ist das *DNAJB6*-Gen, das zwei unterschiedliche lange Proteinformen codiert, wobei die kürzere Isoform als ein zytosolisches Chaperon der Hitzeschockprotein-40-Familie beschrieben ist. Die Suppression von CDK12 fördert das ALE-Spleißen von *DNAJB6*, wodurch eine längere Isoform entsteht, die ein nukleäres Lokalisierungssignal enthält. Die daraus resultierende Lokalisation von *DNAJB6* im Nukleus reduziert die Kanzerogenität und das Migrationspotenzial von Ösophagus- und Mammakarzinomzellen. Eine Überexpression von CDK12 verringert daher die Expression der langen *DNAJB6*-Isoform, was die Migrationsfähigkeit und Invasivität einer Mammakarzinomzelllinie erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine aberrante CDK12-Expression tumorogene Prozesse wie z. B. die Zellinvasion verstärken könnte [116].

Ein weiterer kritischer Aspekt bei der Metastasierung ist die Fähigkeit von zirkulierenden malignen Zellen, sich an das neue Mikromilieu anzupassen und zu proliferieren. Choi *et al.* konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass eine verstärkte CDK12-Expression die Selbsterneuerung von Tumorstammzellen (CSCs) im Mammakarzinom induziert und *in vivo* die Fähigkeit zur Tumoriinitiierung erhöht [133]. Die Expansion dieser CSCs wurde durch eine CDK12-vermittelte Zunahme einer CD44⁺/CD24⁻/ESA⁻-Zellpopulation charakterisiert. CD44, CD24 und ESA sind typische Marker, die zur Identifizierung von CSCs verwendet werden. Weiterhin vermuteten die Autoren, dass die Aktivierung der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade durch CDK12 die Expansion der CSCs begünstigt [133]. Konsistent mit dieser Beobachtung zeigten Peng *et al.*, dass eine hohe Expression von CDK12 die Mobilität, die EMT sowie die Bildung von Lungenmetastasen von Mammakarzinomzellen *in vivo* fördert. Dabei wurde festgestellt, dass eine erhöhte CDK12-Expression auch die Expression von CD44 induziert. Zudem wird angenommen, dass die CDK12-vermittelte Aktivierung des c-Myc/ β -Catenin-Signalwegs für die Erhaltung der Stammzellfunktion im Mammakarzinom verantwortlich sein könnte [312]. Im primären PCa-Gewebe sowie in Lymphknotenmetastasen

konnten Ni *et al.* die Expression einer CD44-Variante ebenfalls nachweisen. Diese Variante fungiert als wichtiger Marker für CSCs im PCa und ist mit der Proliferation, Adhäsion, Invasion, Metastasierung, EMT-Induktion sowie der Aktivierung der PI3K/AKT/mTOR- und Wnt-Signalwege assoziiert [313]. Diese Erkenntnisse könnten darauf hindeuten, dass die beobachtete erhöhte CDK12-Expression im Metastasengewebe (Abbildung 4-41) möglicherweise die CD44-Expression beeinflusst und dadurch die Expansion von PCa-CSCs anregen kann, was zur Tumorbildung beitragen könnte.

Zur Aufklärung der funktionellen Rolle des CycK-CDK12-Komplexes in *high-grade* PINs und Metastasen des PCas sind weitere Untersuchungen erforderlich, die das Biomarkerpotenzial von CycK und CDK12 im PCa weiter hervorheben könnten. Ein besonderer Fokus sollte hierbei auf der Beteiligung des Komplexes am Wnt/ β -Catenin-Signalweg liegen. Außerdem erscheint eine Analyse der CDK13-Expression in *high-grade* PINs und Metastasen des PCas als sinnvoll, um weitere Erkenntnisse über eine mögliche Funktion des CycK-CDK13-Komplexes bei der Tumorentstehung oder Metastasierung zu erlangen.

5.5 Klinische Relevanz der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität im PCa spielen (Abschnitt 4.2). Diese Eigenschaft der Komplexe ist hauptsächlich auf ihre Funktion als Regulatoren der Transkription essenzieller Gene zurückzuführen, die an zellulären Prozessen wie der DDR und DNA-Reparatur beteiligt sind, was mit früheren Studien in anderen Tumorentitäten übereinstimmt [97, 99, 137]. Aberrante Veränderungen dieser Komplexe, insbesondere von CycK und CDK12, werden in der Literatur bereits mit verschiedenen Tumorentitäten, einschließlich des PCas, assoziiert [141, 303, 304, 306]. PCa-Patienten mit CDK12-Mutationen weisen meist einen aggressiveren Phänotyp auf, der mit einem schlechten Therapieansprechen einhergeht und durch genomische Instabilität gekennzeichnet ist [141, 256]. Ferner zeigte die kürzlich veröffentlichte Studie von Lei *et al.*, dass CDK12 eine essenzielle Rolle beim Überleben von PCa-Zellen spielt und eine CDK12-Inhibition die AR-Signaltransduktion negativ beeinflusst [273]. Basierend auf diesen Erkenntnissen werden die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als relevante therapeutische Zielstrukturen angesehen, die derzeit im Fokus der Forschung an neuen, zielgerichteten Behandlungsstrategien für maligne Erkrankungen stehen. Besonders vielversprechend ist in diesem Zusammenhang die Entwicklung des selektiven CDK12/CDK13-Inhibitors THZ531, dessen therapeutisches Potenzial neue Ansätze zur Behandlung des PCas ermöglichen könnte [113].

Die Anwendung der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition als Monotherapie könnte daher eine neue, effektive Strategie darstellen, um gezielt die genomische Instabilität in Tumorzellen zu verstärken. Dies wird insbesondere durch die Beobachtung unterstützt, dass die funktionelle Unterdrückung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe durch THZ531 in eigenen *in vitro*-Experimenten sowie in Tumorxenografts zu deutlichen anti-proliferativen und pro-apoptischen Effekten führte (Abbildung 4-3 - Abbildung 4-5, Abbildung 4-6, Abbildung 4-7). Diese Auswirkungen sind auf eine defekte DNA-Reparaturmaschinerie und die daraus resultierenden DNA-Schäden zurückzuführen (Abbildung 4-8 - Abbildung 4-10) [75]. In diesem Zusammenhang könnte die Ermittlung der CycK-Expression im PCa-Gewebe als prognostischer Biomarker fungieren, um PCa-Patienten für eine entsprechende Behandlung zu stratifizieren. Da eine hohe CycK-Expression im PCa-Gewebe mit einem klinisch aggressiveren PCa-Phänotyp korreliert (Abbildung 4-39) [75, 131], könnten PCa-Patienten mit erhöhten CycK-Expressionsleveln sehr wahrscheinlich von einer THZ531-Behandlung profitieren, sofern keine inaktivierende CDK12-Mutation vorliegt. Durch die zielgerichtete CycK-CDK12/CDK13-Inhibition könnte das Tumorwachstum möglicherweise effektiv eingedämmt und die Progression zu einem PCa im fortgeschritteneren Stadium verhindert werden. Angesichts der erhöhten Expression von CycK, mit potenziell onkogenen Eigenschaften, in *high-grade* Pins im Vergleich zum korrespondierenden Primärtumorgewebe (Abbildung 4-41) könnte eine frühzeitige Behandlung mit THZ531 die Entwicklung eines PCas gezielt beeinflussen.

Ferner könnte eine kombinierte CycK-CDK12/CDK13-Inhibition mit anderen DNA-schädigenden Therapieformen oder Antiandrogenen, die die AR-abhängige Regulation der DDR bzw. der DNA-Reparatur verringern, synergistische und synthetisch letale Effekte hervorrufen [238-240]. Diese Effekte könnten folglich zu einer effektiveren Therapie beitragen und positive Behandlungserfolge erzielen [154]. Eine solche therapeutische Strategie könnte beispielsweise bei PCa-Patienten mit einer verstärkten CycK-CDK12/CDK13-Aktivität oder erhöhter Expression von CycK genutzt werden, um ihr Ansprechen auf eine Strahlen- und Hormontherapie zu erhöhen. Sowohl strahleninduzierte als auch durch die Antiandrogen-Behandlung verursachte DNA-Schäden könnten möglicherweise aufgrund der THZ531-bedingten Beeinträchtigung der DNA-Reparaturmaschinerie nicht mehr repariert werden und letztendlich zur Apoptose führen [238]. Die Beobachtung, dass PCa-Patienten mit einer niedrigen CycK-Expression besser auf eine Strahlen- und Hormontherapie ansprechen, was mit einem verbesserten biochemisch-rezidivfreien Überleben einhergeht, spricht für eine solche Kombinationstherapie [131]. Zusätzlich wurde in eigenen Untersuchungen die synergistische Wirkung von THZ531 in Kombination mit Antiandrogenen beobachtet. Die Kombinationsbehandlung verursachte dabei nicht nur in androgensensitiven PCa-Zellen, sondern auch in vitalem humanem PCa-Gewebe deutliche antitumorogene Effekte (Abbildung 4-14 - Abbildung 4-26, Abbildung 4-28 - Abbildung 4-34). Folglich heben diese Ergebnisse das antineoplastische Potenzial der kombinierten Therapie im PCa hervor und stimmen zudem mit den Daten von Lei *et al.* überein [273]. Darüber hinaus verdeutlichen weitere Studien an verschiedenen Tumorentitäten die klinische Relevanz der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition in Kombination mit konventionellen Therapieformen: Synergistische Effekte zwischen THZ531 und DNA-schädigenden Substanzen wie Cisplatin oder ATR- und ATM-Inhibitoren konnten in Ewing-Sarkomzelllinien festgestellt werden [124]. Gleichmaßen erhöhte THZ531 die Sensitivität von Zellen des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms gegenüber der konventionellen Chemotherapie mit Doxorubicin [314]. In ähnlicher Weise unterdrückte THZ531 die Expression von DDR-Genen, induzierte eine verstärkte DDR und wirkte synergistisch mit Sorafenib im hepatozellulären Karzinom [126].

Mutationen in HR-Reparaturgenen wie *BRCA1/2*, *ATM* und *CHEK2* werden bei Patienten mit einem mCRPC häufig nachgewiesen, was mit einem aggressiveren und wenig differenzierten Tumorphänotyp sowie einer schlechteren Überlebensrate assoziiert ist [27, 315]. In mCRPC sowie in Mamma- und Ovarialkarzinomen, die durch Alterationen von *BRCA1/2* charakterisiert sind, induzieren PARP-Inhibitoren eine synthetische Letalität und haben sich daher als effektive Wirkstoffklasse etabliert [81, 189, 190]. Um den Anwendungsbereich von PARP-Inhibitoren auf Patienten auszudehnen, die nur wenige bis keine Defekte im HR-Reparatursignalweg aufweisen, werden in aktuellen klinischen Studien potenzielle Synergien zwischen PARP-Inhibitoren mit Enzalutamid (NCT03395197) [316], Abirateron (NCT01972217, NCT03732820) [317] oder anderen

Therapieformen bei mCRPC-Patienten untersucht [318]. Besonders vielversprechend scheint dabei die kombinierte Therapie mit Antiandrogenen zu sein, da sie zu einer Verminderung der AR-regulierten Expression der HR-Gene und folglich zu einer defekten HR-Reparatur führt. [238-240, 274]. Basierend auf dem Prinzip der gezielten Beeinträchtigung der DDR, insbesondere des HR-Reparatursignalwegs, könnte eine kombinierte Therapie aus CDK12/CDK13-Inhibitoren und PARP-Inhibitoren bei mCRPC-Patienten daher ein vielversprechender therapeutischer Ansatz sein. Durch die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe könnte die CycK-CDK12-abhängige Expression der DDR-Gene, einschließlich BRCA1, reduziert werden und folglich synergistische Effekte auslösen. Diese Strategie wird durch die Erkenntnis gestützt, dass CDK12 in einem genomweiten Screening des *high-grade* serösen Ovarialkarzinoms (HGSOC) als entscheidender Faktor für die Sensitivität gegenüber PARP-Inhibitoren identifiziert wurde [136, 319]. Eigene Analysen haben zudem gezeigt, dass die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe in PCa-Zellen die Anfälligkeit gegenüber dem PARP1-Inhibitor Olaparib erhöhte, was die Anwendung der kombinierten Therapie unterstreicht (Abbildung 4-12). Analog dazu konnte eine synthetische Letalität durch die kombinierte Anwendung von THZ531 mit PARP-Inhibitoren auch bei Ewing-Sarkom- und Myelomzelllinien beobachtet werden [124, 125]. Konsistent mit diesen Ergebnissen wurde in einer weiteren präklinischen Studie an HGSOC-Organoiden festgestellt, dass die kombinierte Behandlung mit THZ531 zu einer erhöhten Sensitivität von HGSOC-Zellen und -Organoiden gegenüber Olaparib führte [320].

Die CycK-CDK12/CDK13-Inhibition könnte außerdem eine alternative therapeutische Strategie darstellen, um Resistenzen gegenüber PARP-Inhibitoren zu überwinden. Die Entwicklung dieser Resistenzmechanismen erfolgt häufig aufgrund einer Reaktivierung der HR-Reparatur durch sekundäre BRCA1/2-Mutationen, was die Notwendigkeit einer Kombinationstherapie verdeutlicht [321]. In diesem Kontext konnte eine präklinische Studie zeigen, dass der pan-CDK-Inhibitor Dinaciclib, der primär CDK1, CDK2, CDK5 und CDK9 hemmt und zusätzlich eine starke inhibitorische Wirkung gegenüber CDK12 aufweist, die Resistenzentwicklung gegenüber PARP-Inhibitoren in BRCA1-mutierten TNBC-Zellen und patientenabgeleiteten Xenotransplantaten aufheben kann, indem er die Restaktivität der HR-Reparatur unterdrückt [145, 322]. Diese Studie deutet darauf hin, dass die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe eine potenziell effektivere und gezieltere Therapieoption zur Reduktion der BRCA1-Aktivität darstellt als die Monotherapie mit PARP-Inhibitoren. Derzeit wird in einer klinischen Phase-I-Studie die kombinierte Anwendung von Dinaciclib (SCH 727965) und dem PARP-Inhibitor Veliparib (ABT-888) zur Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren untersucht (NCT01434316).

Darüber hinaus wurde in jüngsten Studien ein aggressiver Subtyp des mCRPCs mit biallelischer Inaktivierung von CDK12 identifiziert, bei dem die betroffenen Patienten sowohl auf Standardtherapien als auch auf eine Behandlung mit PARP-Inhibitoren nur schlecht ansprechen. Diese Patienten könnten jedoch von einer Immuntherapie profitieren. Solche CDK12-inaktivierten Tumore sind durch fokale Tandemduplikationen gekennzeichnet, die eine hohe fusionsbedingte Neoantigenlast und eine verstärkte T-Zell-Infiltration verursachen, wodurch sie sensitiver auf Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) reagieren [141, 256]. ICIs sind humanisierte, monoklonale Antikörper, die z. B. auf hemmende Signalmoleküle der Immunantwort abzielen, welche auf der Oberfläche von Tumor- und Immunzellen lokalisiert sind. Durch die Blockade der Bindung zwischen Tumor- und Immunzellen heben ICIs die immunsuppressive Wirkung dieser Interaktion auf und induzieren die antitumorale Immunantwort [323]. Zu den bekanntesten Zielstrukturen gehören CTLA-4 (Ipilimumab), PD-1 (Nivolumab) oder PDL-1 (Atezolizumab). Diese wurden bereits erfolgreich zur Behandlung verschiedener maligner Erkrankungen (z. B. des Lungenkarzinoms) eingesetzt und haben zu einer erheblichen Verbesserung der Überlebenschancen sowie der Lebensqualität der Patienten beigetragen [323].

Obwohl die Immuntherapie die Behandlungskonzepte vieler Tumorentitäten revolutioniert hat, zeigte diese bisher in mCRPC-Patienten nur eine begrenzte Wirksamkeit [387]. Selbst die kombinierte Behandlung von ICIs mit Standardtherapieformen des mCRPCs, wie beispielsweise Enzalutamid und Pembrolizumab (NCT03016312) oder Pembrolizumab und DTX (NCT03834506), lieferte in klinischen Studien größtenteils enttäuschende Ergebnisse [324]. Das schlechte Therapieansprechen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das PCa allgemein als immunologisch „kalter“ Tumor gilt, der durch die weitestgehend fehlende T-Zell-Infiltration, eine geringe Neoantigenlast und eine stark immunsuppressive Mikroumgebung charakterisiert ist [325]. Angesichts dieser Studienlage ist die Entdeckung, dass mCRPC-Patienten mit biallelischer CDK12-Inaktivierung eine Sensitivität gegenüber ICIs zeigen, besonders relevant für die Anwendung und Effektivität der Immuntherapie im PCa. Im Rahmen klinischer Studien wird derzeit die Wirksamkeit einer Monotherapie mit verschiedenen ICIs wie Ipilimumab und Nivolumab (NCT03570619, NCT04717154), Pembrolizumab (NCT04104893) und Atezolizumab (NCT04751929) in Kohorten mit mCRPC-Patienten, die CDK12-Mutationen aufweisen, untersucht [326].

Weiterhin lässt die Identifizierung des CDK12-inaktivierten Subtyps vermuten, dass eine kombinierte Anwendung aus CycK-CDK12/CDK13-Inhibition und Immuntherapie im mCRPC vielversprechend sein könnte. Diese Behandlungsstrategie könnte demnach speziell für PCa-Patienten, die keine CDK12-Mutation aufweisen, profitabel sein, da sie gezielt die genomische Instabilität induziert, was die Expression von Neoantigenen stimulieren könnte. Dadurch könnte die antitumorale Immunantwort verstärkt und möglicherweise auch die Effektivität von ICIs

erhöht werden. In diesem Zusammenhang zeigten Larsen *et al.*, dass CDK12 im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom die Expression von PD-L1-Transkriptvarianten reguliert [327]. Durch die Behandlung mit THZ531 wurde die IFN- γ -induzierte PD-L1-mRNA-Expression von membrangebundenem PD-L1 (mPD-L1) verringert, was das Verhältnis zwischen löslichem (sPD-L1) und mPD-L1 beeinflusste. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass ein erhöhtes sPD-L1-Expressionslevel, verursacht durch die THZ531-bedingte Abnahme von mPD-L1, für eine anti-PD-1/PD-L1-Therapie von Vorteil sein könnte, da bekannt ist, dass die T-Zell-Aktivierung weniger effektiv von sPD-L1 im Vergleich zu mPD-L1 unterdrückt wird [327]. Ergänzend dazu konnten Li *et al.* feststellen, dass die CDK12/CDK13-Inhibition durch SR-4835 die Wirksamkeit der Anti-PD-1-Checkpoint-Blockade verstärken und synergistisch die antitumorale Aktivität in einem TNBC-Mausmodell induzieren kann [328]. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um das Potenzial der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe als immuntherapeutische Zielstrukturen im PCa zu ermitteln. Dabei sollte außerdem berücksichtigt werden, dass die Inhibition der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe mittels des dualen CDK12/CDK13-Inhibitors ZSQ836 nicht nur Auswirkungen auf die Tumorzellen hat, sondern auch die T-Zell-Infiltration im neoplastischen Gewebe beeinträchtigt, indem dieser die T-Zell-Proliferation und -Aktivierung negativ beeinflusst [269]. Zudem sollte beachtet werden, dass die ADT in Kombination mit einer Immuntherapie in der Literatur divergierende Effekte gezeigt hat. Während die Orchiektomie die Effektivität der Immuntherapie synergistisch verstärkt, können AR-Antagonisten die Immuntherapie unterdrücken [329]. Daher ist es entscheidend, die möglichen Wechselwirkungen zwischen der jeweiligen ADT und Immuntherapie sowie den optimalen Zeitpunkt und die Reihenfolge der Applikation der Kombinationstherapie zu analysieren.

Generell sollte im Zusammenhang mit einer möglichen klinischen Anwendung der CycK-CDK12/CDK13-Inhibition im PCa berücksichtigt werden, dass auch gesundes Gewebe und Zellen von dieser Therapie beeinträchtigt werden könnten. Xiang *et al.* konnten beispielsweise im Gewebe von Testikeln gesunder Männer eine hohe CycK-Expression nachweisen [127], was darauf hindeutet, dass auch gesundes Prostatagewebe möglicherweise eine veränderte CycK-Expression aufweist und somit durch eine CycK-CDK12/CDK13-Inhibition beeinflusst werden könnte. Dies könnte einerseits unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen und andererseits zu einer Induktion der genomischen Instabilität führen, die infolge der CycK-CDK12/CDK13-Hemmung zur Tumorentwicklung in gesunden Zellen beitragen könnte [97, 99, 137]. Um diese Problematik zu umgehen, könnte eine direkte Applikation eines CDK12/CDK13-Inhibitors innerhalb des Tumors in Betracht gezogen werden. In diesem Kontext haben zahlreiche Studien gezeigt, dass das prostataspezifische Membranantigen (PSMA) aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften eine gezielte Applikation von Wirkstoffen ermöglicht [330-332]. PSMA wird spezifisch an der Oberfläche von Prostatazellen exprimiert und weist die höchsten Expressionslevel im CRPC und

mCRPC auf. Zudem unterliegt es einer Clathrin-vermittelten Endozytose und wird daher nach der Ligandenbindung internalisiert und in Lysosomen transportiert [330]. Diese Eigenschaften ermöglichen es beispielsweise, therapeutische Wirkstoffe über einen Linker mit einem PSMA-bindenden Molekül zu verknüpfen, die nach der Aufnahme in die Tumorzelle gezielt freigesetzt werden [331]. Darüber hinaus werden gegen PSMA gerichtete Tumor-Nanopartikel, die DTX enthalten, klinisch untersucht (NCT01812746). Diese Nanopartikel sind so konzipiert, dass sie über einen längeren Zeitraum im Gefäßsystem zirkulieren, sich im erkrankten Gewebe anreichern und den eingekapselten Wirkstoff dort kontrolliert abgeben [332]. Daher wäre es denkbar, anstelle von zytotoxischen Wirkstoffen ebenfalls CDK12/CDK13-Inhibitoren direkt in Tumorzellen freizusetzen, um möglicherweise die Effektivität dieser Therapie zu steigern und gleichzeitig systemische Nebenwirkungen zu minimieren. Zusätzlich könnte auch eine Dosisanpassung eines CDK12/CDK13-Inhibitors ausreichen, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. In diesem Kontext konnten sowohl die eigenen Daten (Abbildung 4-8) als auch frühere Studien eine konzentrationsabhängige Wirkung von THZ531 zeigen. Niedrigere Konzentrationen von THZ531 (50-100 nM) waren hierbei ausreichend, um die Expression essenzieller DDR-Gene, einschließlich HR-Reparaturgene, zu verringern, ohne globale Transkriptionsdefekte zu verursachen [113, 114, 124]. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass sich Resistenzen gegen den CDK12/CDK13-Inhibitor entwickeln könnten. Gao *et al.* konnten in diesem Zusammenhang feststellen, dass THZ531 als Substrat der ABC-Transporter-Familie fungiert. Eine Hochregulation dieser Transmembranproteine könnte demnach erworbene Resistenzmechanismen gegenüber THZ531 begünstigen [333].

Derzeit existieren keine Studien, die die inhibitorische Aktivität von THZ531 *in vivo* untersucht haben. Allerdings haben Jiang *et al.* erst kürzlich das THZ531-Analogon BSJ-01-175 entwickelt, welches erfolgreich das Tumorstadium in einem Xenograft-Mausmodell des Ewing-Sarkoms unterdrückte. Somit stellt BSJ-01-175 den ersten selektiv kovalenten CDK12/CDK13-Inhibitor dar, der eine bestätigte *in vivo*-Wirksamkeit zeigte [193]. Durch die Möglichkeit der strukturellen Modifizierung und Optimierung von THZ531 wäre es daher denkbar, dass in zukünftigen Studien ein spezifischer Inhibitor zur funktionellen Hemmung der CycK-CDK12/CDK13-Komplexe, zur Therapie maligner Erkrankungen, konzipiert werden könnte. Ein CDK12/CDK13-Inhibitor wäre zudem nicht der erste CDK-Inhibitor, der eine Zulassung für die klinische Anwendung erhalten könnte. Die CDK4/CDK6-Inhibitoren Palbociclib, Ribociclib und Abemaciclib wurden in den letzten Jahren von der FDA zur Behandlung von Patientinnen mit metastasierten, hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom in Kombination mit einer endokrinen Therapie zugelassen [93].

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Daten stellen die CycK-CDK12/CDK13-Komplexe vielversprechende therapeutische Zielstrukturen im PCa dar. Besonders als Kombinationstherapie zusammen mit einer ADT oder anderen PCa-Therapieformen könnten diese als eine zielgerichtete und effektive Behandlungsstrategie angewendet werden, um beispielsweise beim mCRPC eine vorherrschende Therapieresistenz zu überwinden und so die Effektivität der Therapie zu steigern. Zukünftige Studien zur Entwicklung von CDK12/CDK13-Inhibitoren für die klinische Anwendung stehen zwar vor einigen Herausforderungen, jedoch heben sowohl eigene als auch in der Literatur beschriebene Erkenntnisse das antineoplastische Potenzial einer CycK-CD12/CDK13-Inhibition hervor.

6 LITERATUR

1. Wasinger G, Oszwald A, Shariat SF, Comperat E. Histological patterns, subtypes and aspects of prostate cancer: different aspects, different outcomes. *Curr Opin Urol*, **2022**; 32: 643-648.
2. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, **2016**; 70: 106-119.
3. Netto GJ, Amin MB, Berney DM, Comperat EM, Gill AJ, Hartmann A *et al*. The 2022 World Health Organization Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Urinary Tract Tumors. *Eur Urol*, **2022**; 82: 469-482.
4. Zitzmann M, Wiedmann M, Wetterauer U, Wennemuth G, Weidner W, Wagenlehner FME *et al*. Andrologie. In: Krause W, Diemer T, Sperling H, Weidner W (eds). *krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*, 4. Auflage edn. Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, **2011**, pp 18-19.
5. Vickman RE, Franco OE, Moline DC, Vander Griend DJ, Thumbikat P, Hayward SW. The role of the androgen receptor in prostate development and benign prostatic hyperplasia: A review. *Asian J Urol*, **2020**; 7: 191-202.
6. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE *et al*. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers*, **2021**; 7: 9.
7. Yu X, Liu R, Song L, Gao W, Wang X, Zhang Y. Differences in the pathogenetic characteristics of prostate cancer in the transitional and peripheral zones and the possible molecular biological mechanisms. *Front Oncol*, **2023**; 13: 1165732.
8. Levesque C, Nelson PS. Cellular Constituents of the Prostate Stroma: Key Contributors to Prostate Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2018**; 8.
9. Perner S, Sailer V-W. Azinäres Adenokarzinom der Prostata. In: Perner S, Sailer V-W (eds). *Histopathologische Diagnostik der Prostatastanzbiopsie*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2020**, pp 90-101.
10. Andreoiu M, Cheng L. Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum Pathol*, **2010**; 41: 781-793.
11. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*, **2010**; 24: 1967-2000.
12. Braun M, Perner S. [High-grade prostatic intraepithelial neoplasia: the only accepted prostate cancer precursor lesion]. *Pathologe*, **2011**; 32 Suppl 2: 237-241.
13. Grobholz R. Prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN). In: Perner S, Sailer V-W (eds). *Histopathologische Diagnostik der Prostatastanzbiopsie*. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2020**, pp 57-67.
14. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A *et al*. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, **2021**; 71: 209-249.
15. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*, **2019**; 10: 63-89.
16. Erdmann F, Spix C, Katalinic A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J *et al*. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., **2021**, p 24.
17. Gandaglia G, Leni R, Bray F, Fleshner N, Freedland SJ, Kibel A *et al*. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol*, **2021**; 4: 877-892.
18. Oh M, Alkushaym N, Fallatah S, Althagafi A, Aljadede R, Alsowaida Y *et al*. The association of BRCA1 and BRCA2 mutations with prostate cancer risk, frequency, and mortality: A meta-analysis. *Prostate*, **2019**; 79: 880-895.
19. Barsouk A, Padala SA, Vakiti A, Mohammed A, Saginala K, Thandra KC *et al*. Epidemiology, Staging and Management of Prostate Cancer. *Med Sci (Basel)*, **2020**; 8.
20. Sandhu S, Moore CM, Chiong E, Beltran H, Bristow RG, Williams SG. Prostate cancer. *Lancet*, **2021**; 398: 1075-1090.
21. Armenia J, Wankowicz SAM, Liu D, Gao J, Kundra R, Reznik E *et al*. The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nat Genet*, **2018**; 50: 645-651.
22. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW *et al*. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, **2005**; 310: 644-648.
23. Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, Schmidt FH, Mosquera JM, Setlur S *et al*. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res*, **2006**; 66: 8337-8341.
24. Haggflog C, Hammarsten P, Stromvall K, Egevad L, Josefsson A, Stattin P *et al*. TMPRSS2-ERG expression predicts prostate cancer survival and associates with stromal biomarkers. *PLoS One*, **2014**; 9: e86824.

25. Anderson PD, McKissic SA, Logan M, Roh M, Franco OE, Wang J *et al.* Nkx3.1 and Myc crossregulate shared target genes in mouse and human prostate tumorigenesis. *J Clin Invest*, **2012**; 122: 1907-1919.
26. Cancer Genome Atlas Research N. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*, **2015**; 163: 1011-1025.
27. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM *et al.* Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. *Cell*, **2015**; 162: 454.
28. Sharma A, Yeow WS, Ertel A, Coleman I, Clegg N, Thangavel C *et al.* The retinoblastoma tumor suppressor controls androgen signaling and human prostate cancer progression. *J Clin Invest*, **2010**; 120: 4478-4492.
29. Ku SY, Rosario S, Wang Y, Mu P, Seshadri M, Goodrich ZW *et al.* Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science*, **2017**; 355: 78-83.
30. Qiu X, Boufaied N, Hallal T, Feit A, de Polo A, Luoma AM *et al.* MYC drives aggressive prostate cancer by disrupting transcriptional pause release at androgen receptor targets. *Nat Commun*, **2022**; 13: 2559.
31. Gurel B, Iwata T, Koh CM, Jenkins RB, Lan F, Van Dang C *et al.* Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod Pathol*, **2008**; 21: 1156-1167.
32. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, De Sarkar N, Abida W, Beltran H *et al.* Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*, **2016**; 375: 443-453.
33. Stopsack KH, Nandakumar S, Wibmer AG, Haywood S, Weg ES, Barnett ES *et al.* Oncogenic Genomic Alterations, Clinical Phenotypes, and Outcomes in Metastatic Castration-Sensitive Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, **2020**; 26: 3230-3238.
34. Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health*, **2019**; 37: 288-295.
35. Feng Q, He B. Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol*, **2019**; 9: 858.
36. Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev*, **2005**; 105: 3352-3370.
37. Messner EA, Steele TM, Tsamouri MM, Hejazi N, Gao AC, Mudryj M *et al.* The Androgen Receptor in Prostate Cancer: Effect of Structure, Ligands and Spliced Variants on Therapy. *Biomedicines*, **2020**; 8.
38. Westaby D, Fenor de La Maza MLD, Paschalis A, Jimenez-Vacas JM, Welti J, de Bono J *et al.* A New Old Target: Androgen Receptor Signaling and Advanced Prostate Cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **2022**; 62: 131-153.
39. Marchetti PM, Barth JH. Clinical biochemistry of dihydrotestosterone. *Ann Clin Biochem*, **2013**; 50: 95-107.
40. Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera JM *et al.* Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, **2015**; 161: 1215-1228.
41. Waltering KK, Helenius MA, Sahu B, Manni V, Linja MJ, Janne OA *et al.* Increased expression of androgen receptor sensitizes prostate cancer cells to low levels of androgens. *Cancer Res*, **2009**; 69: 8141-8149.
42. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat*, **2012**; 33: 887-894.
43. Clinckemalie L, Vanderschueren D, Boonen S, Claessens F. The hinge region in androgen receptor control. *Mol Cell Endocrinol*, **2012**; 358: 1-8.
44. Jaaskelainen J, Deeb A, Schwabe JW, Mongan NP, Martin H, Hughes IA. Human androgen receptor gene ligand-binding-domain mutations leading to disrupted interaction between the N- and C-terminal domains. *J Mol Endocrinol*, **2006**; 36: 361-368.
45. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E *et al.* Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, **2009**; 69: 16-22.
46. Dehm SM, Tindall DJ. Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer*, **2011**; 18: R183-196.
47. Hu R, Isaacs WB, Luo J. A snapshot of the expression signature of androgen receptor splicing variants and their distinctive transcriptional activities. *Prostate*, **2011**; 71: 1656-1667.
48. Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM *et al.* Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res*, **2006**; 66: 2815-2825.
49. Humphrey PA, Andriole GL. Prostate cancer diagnosis. *Mo Med*, **2010**; 107: 107-112.
50. Mottet N, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M *et al.* EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer-2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*, **2021**; 79: 243-262.
51. Force USPST, Grossman DC, Curry SJ, Owens DK, Bibbins-Domingo K, Caughey AB *et al.* Screening for Prostate Cancer: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*, **2018**; 319: 1901-1913.

52. Thorson P, Humphrey PA. Minimal adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *Am J Clin Pathol*, **2000**; 114: 896-909.
53. Leroy X, Aubert S, Villers A, Ballereau C, Augusto D, Gosselin B. Minimal focus of adenocarcinoma on prostate biopsy: clinicopathological correlations. *J Clin Pathol*, **2003**; 56: 230-232.
54. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA *et al*. 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. *Am J Surg Pathol*, **2016**; 40: 244-252.
55. Moch H HP, Ulbright TM, Reuter VE. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC), **2016**.
56. Wittekind C. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. John Wiley & Sons, **2016**.
57. Boeker M, Franca F, Bronsert P, Schulz S. TNM-O: ontology support for staging of malignant tumours. *J Biomed Semantics*, **2016**; 7: 64.
58. Marchesi F, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev*, **2010**; 21: 77-82.
59. Cohn JA, Dangle PP, Wang CE, Brendler CB, Novakovic KR, McGuire MS *et al*. The prognostic significance of perineural invasion and race in men considering active surveillance. *BJU Int*, **2014**; 114: 75-80.
60. Kang M, Oh JJ, Lee S, Hong SK, Lee SE, Byun SS. Perineural Invasion and Lymphovascular Invasion are Associated with Increased Risk of Biochemical Recurrence in Patients Undergoing Radical Prostatectomy. *Ann Surg Oncol*, **2016**; 23: 2699-2706.
61. Zhang LJ, Wu B, Zha ZL, Qu W, Zhao H, Yuan J *et al*. Perineural invasion as an independent predictor of biochemical recurrence in prostate cancer following radical prostatectomy or radiotherapy: a systematic review and meta-analysis. *BMC Urol*, **2018**; 18: 5.
62. 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: 969-974.
63. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2. *AWMF Registernummer: 043/022OL*, **2021**, p 58.
64. Tolkach Y, Kristiansen G. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology*, **2018**; 85: 108-116.
65. Kremer A, Kremer T, Kristiansen G, Tolkach Y. Where is the limit of prostate cancer biomarker research? Systematic investigation of potential prognostic and diagnostic biomarkers. *BMC Urol*, **2019**; 19: 46.
66. 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. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **2004**; 58: 25-33.
67. Iwamoto H, Izumi K, Makino T, Mizokami A. Androgen Deprivation Therapy in High-Risk Localized and Locally Advanced Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*, **2022**; 14.
68. Gomez Rivas J, Fernandez L, Abad-Lopez P, Moreno-Sierra J. Androgen deprivation therapy in localized prostate cancer. Current status and future trends. *Actas Urol Esp (Engl Ed)*, **2023**; 47: 398-407.
69. Cornford P, van den Bergh RCN, Briers E, Van den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M *et al*. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II-2020 Update: Treatment of Relapsing and Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol*, **2021**; 79: 263-282.
70. Bumbaca B, Li W. Taxane resistance in castration-resistant prostate cancer: mechanisms and therapeutic strategies. *Acta Pharm Sin B*, **2018**; 8: 518-529.
71. Sekino Y, Teishima J. Molecular mechanisms of docetaxel resistance in prostate cancer. *Cancer Drug Resist*, **2020**; 3: 676-685.
72. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, Chen Y, Watson PA, Arora V *et al*. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science*, **2009**; 324: 787-790.
73. Imamura Y, Sadar MD. Androgen receptor targeted therapies in castration-resistant prostate cancer: Bench to clinic. *Int J Urol*, **2016**; 23: 654-665.
74. Schalken J, Fitzpatrick JM. Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*, **2016**; 117: 215-225.
75. Frei K, Schecher S, Daher T, Horner N, Richter J, Hildebrand U *et al*. Inhibition of the Cyclin K-CDK12 complex induces DNA damage and increases the effect of androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Int J Cancer*, **2023**.
76. Conteduca V, Mosca A, Brighi N, de Giorgi U, Rescigno P. New Prognostic Biomarkers in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cells*, **2021**; 10.
77. Fu X, Li P, Zhou Q, He R, Wang G, Zhu S *et al*. Mechanism of PARP inhibitor resistance and potential overcoming strategies. *Genes Dis*, **2024**; 11: 306-320.

78. Mateo J, Seed G, Bertan C, Rescigno P, Dolling D, Figueiredo I *et al.* Genomics of lethal prostate cancer at diagnosis and castration resistance. *J Clin Invest*, **2020**; 130: 1743-1751.
79. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, Miranda S, Mossop H, Perez-Lopez R *et al.* DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*, **2015**; 373: 1697-1708.
80. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, **2012**; 481: 287-294.
81. de Bono J, Mateo J, Fizazi K, Saad F, Shore N, Sandhu S *et al.* Olaparib for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*, **2020**; 382: 2091-2102.
82. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science*, **2017**; 355: 1152-1158.
83. Quandt E, Ribeiro MPC, Clotet J. Atypical cyclins: the extended family portrait. *Cell Mol Life Sci*, **2020**; 77: 231-242.
84. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, **1983**; 33: 389-396.
85. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol*, **2014**; 15: 122.
86. Echaliour A, Endicott JA, Noble ME. Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochim Biophys Acta*, **2010**; 1804: 511-519.
87. Emanuele MJ, Enrico TP, Mouery RD, Wasserman D, Nachum S, Tzur A. Complex Cartography: Regulation of E2F Transcription Factors by Cyclin F and Ubiquitin. *Trends Cell Biol*, **2020**; 30: 640-652.
88. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, **2013**; 140: 3079-3093.
89. D'Angiolella V, Donato V, Forrester FM, Jeong YT, Pellacani C, Kudo Y *et al.* Cyclin F-mediated degradation of ribonucleotide reductase M2 controls genome integrity and DNA repair. *Cell*, **2012**; 149: 1023-1034.
90. Ghafouri-Fard S, Khoshbakht T, Hussien BM, Dong P, Gassler N, Taheri M *et al.* A review on the role of cyclin dependent kinases in cancers. *Cancer Cell Int*, **2022**; 22: 325.
91. Constantin TA, Greenland KK, Varela-Carver A, Bevan CL. Transcription associated cyclin-dependent kinases as therapeutic targets for prostate cancer. *Oncogene*, **2022**; 41: 3303-3315.
92. Zhang M, Zhang L, Hei R, Li X, Cai H, Wu X *et al.* CDK inhibitors in cancer therapy, an overview of recent development. *Am J Cancer Res*, **2021**; 11: 1913-1935.
93. Cicens J, Simkus J. CDK Inhibitors and FDA: Approved and Orphan. *Cancers (Basel)*, **2024**; 16.
94. Xiao Y, Dong J. Coming of Age: Targeting Cyclin K in Cancers. *Cells*, **2023**; 12.
95. Edwards MC, Wong C, Elledge SJ. Human cyclin K, a novel RNA polymerase II-associated cyclin possessing both carboxy-terminal domain kinase and Cdk-activating kinase activity. *Mol Cell Biol*, **1998**; 18: 4291-4300.
96. Fu TJ, Peng J, Lee G, Price DH, Flores O. Cyclin K functions as a CDK9 regulatory subunit and participates in RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*, **1999**; 274: 34527-34530.
97. Blazek D, Kohoutek J, Bartholomeeusen K, Johansen E, Hulinkova P, Luo Z *et al.* The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. *Genes Dev*, **2011**; 25: 2158-2172.
98. Bosken CA, Farnung L, Hintermair C, Merzel Schachter M, Vogel-Bachmayr K, Blazek D *et al.* The structure and substrate specificity of human Cdk12/Cyclin K. *Nat Commun*, **2014**; 5: 3505.
99. Kohoutek J, Blazek D. Cyclin K goes with Cdk12 and Cdk13. *Cell Div*, **2012**; 7: 12.
100. Cheng SW, Kuzyk MA, Moradian A, Ichu TA, Chang VC, Tien JF *et al.* Interaction of cyclin-dependent kinase 12/CrkRS with cyclin K1 is required for the phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **2012**; 32: 4691-4704.
101. Greifenberg AK, Honig D, Pilarova K, Duster R, Bartholomeeusen K, Bosken CA *et al.* Structural and Functional Analysis of the Cdk13/Cyclin K Complex. *Cell Rep*, **2016**; 14: 320-331.
102. Ko TK, Kelly E, Pines J. CrkRS: a novel conserved Cdc2-related protein kinase that colocalises with SC35 speckles. *J Cell Sci*, **2001**; 114: 2591-2603.
103. Marques F, Moreau JL, Peaucellier G, Lozano JC, Schatt P, Picard A *et al.* A new subfamily of high molecular mass CDC2-related kinases with PITAI/VRE motifs. *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**; 279: 832-837.
104. Dai Q, Lei T, Zhao C, Zhong J, Tang YZ, Chen B *et al.* Cyclin K-containing kinase complexes maintain self-renewal in murine embryonic stem cells. *J Biol Chem*, **2012**; 287: 25344-25352.
105. Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Lim WA. The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE*, **2003**; 2003: RE8.
106. Zhou Z, Fu XD. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma*, **2013**; 122: 191-207.
107. Pilarova K, Herudek J, Blazek D. CDK12: cellular functions and therapeutic potential of versatile player in cancer. *NAR Cancer*, **2020**; 2: zcaa003.
108. Juan HC, Lin Y, Chen HR, Fann MJ. Cdk12 is essential for embryonic development and the maintenance of genomic stability. *Cell Death Differ*, **2016**; 23: 1038-1048.

109. Novakova M, Hampl M, Vrabel D, Prochazka J, Petrezselyova S, Prochazkova M *et al*. Mouse Model of Congenital Heart Defects, Dysmorphic Facial Features and Intellectual Developmental Disorders as a Result of Non-functional CDK13. *Front Cell Dev Biol*, **2019**; 7: 155.
110. Egloff S, Murphy S. Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet*, **2008**; 24: 280-288.
111. Liang K, Gao X, Gilmore JM, Florens L, Washburn MP, Smith E *et al*. Characterization of human cyclin-dependent kinase 12 (CDK12) and CDK13 complexes in C-terminal domain phosphorylation, gene transcription, and RNA processing. *Mol Cell Biol*, **2015**; 35: 928-938.
112. Tellier M, Zaborowska J, Caizzi L, Mohammad E, Velychko T, Schwalb B *et al*. CDK12 globally stimulates RNA polymerase II transcription elongation and carboxyl-terminal domain phosphorylation. *Nucleic Acids Res*, **2020**; 48: 7712-7727.
113. Zhang T, Kwiatkowski N, Olson CM, Dixon-Clarke SE, Abraham BJ, Greifenberg AK *et al*. Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and CDK13 inhibitors. *Nat Chem Biol*, **2016**; 12: 876-884.
114. Krajewska M, Dries R, Grasseti AV, Dust S, Gao Y, Huang H *et al*. CDK12 loss in cancer cells affects DNA damage response genes through premature cleavage and polyadenylation. *Nat Commun*, **2019**; 10: 1757.
115. Dubbury SJ, Boutz PL, Sharp PA. CDK12 regulates DNA repair genes by suppressing intronic polyadenylation. *Nature*, **2018**; 564: 141-145.
116. Tien JF, Mazloomian A, Cheng SG, Hughes CS, Chow CCT, Canapi LT *et al*. CDK12 regulates alternative last exon mRNA splicing and promotes breast cancer cell invasion. *Nucleic Acids Res*, **2017**; 45: 6698-6716.
117. Even Y, Durieux S, Escande ML, Lozano JC, Peaucellier G, Weil D *et al*. CDC2L5, a Cdk-like kinase with RS domain, interacts with the ASF/SF2-associated protein p32 and affects splicing in vivo. *J Cell Biochem*, **2006**; 99: 890-904.
118. Panzeri V, Pieraccioli M, Cesari E, de la Grange P, Sette C. CDK12/13 promote splicing of proximal introns by enhancing the interaction between RNA polymerase II and the splicing factor SF3B1. *Nucleic Acids Res*, **2023**; 51: 5512-5526.
119. Eifler TT, Shao W, Bartholomeeusen K, Fujinaga K, Jager S, Johnson JR *et al*. Cyclin-dependent kinase 12 increases 3' end processing of growth factor-induced c-FOS transcripts. *Mol Cell Biol*, **2015**; 35: 468-478.
120. Berro R, Pedati C, Kehn-Hall K, Wu W, Klase Z, Even Y *et al*. CDK13, a new potential human immunodeficiency virus type 1 inhibitory factor regulating viral mRNA splicing. *J Virol*, **2008**; 82: 7155-7166.
121. Choi SH, Martinez TF, Kim S, Donaldson C, Shokhirev MN, Saghatelian A *et al*. CDK12 phosphorylates 4E-BP1 to enable mTORC1-dependent translation and mitotic genome stability. *Genes Dev*, **2019**; 33: 418-435.
122. Wu C, Xie T, Guo Y, Wang D, Qiu M, Han R *et al*. CDK13 phosphorylates the translation machinery and promotes tumorigenic protein synthesis. *Oncogene*, **2023**; 42: 1321-1330.
123. Blazek D. Transcriptional kinases: Caught by a sticky drug. *Nat Chem Biol*, **2016**; 12: 765-766.
124. Iniguez AB, Stolte B, Wang EJ, Conway AS, Alexe G, Dharia NV *et al*. EWS/FLI Confers Tumor Cell Synthetic Lethality to CDK12 Inhibition in Ewing Sarcoma. *Cancer Cell*, **2018**; 33: 202-216 e206.
125. Shyamsunder P, Sridharan SP, Madan V, Dakle P, Zeya C, Kanojia D *et al*. THZ531 Induces a State of BRCAness in Multiple Myeloma Cells: Synthetic Lethality with Combination Treatment of THZ 531 with DNA Repair Inhibitors. *Int J Mol Sci*, **2022**; 23.
126. Wang C, Wang H, Lieftink C, du Chatinier A, Gao D, Jin G *et al*. CDK12 inhibition mediates DNA damage and is synergistic with sorafenib treatment in hepatocellular carcinoma. *Gut*, **2020**; 69: 727-736.
127. Xiang X, Deng L, Zhang J, Zhang X, Lei T, Luan G *et al*. A distinct expression pattern of cyclin K in mammalian testes suggests a functional role in spermatogenesis. *PLoS One*, **2014**; 9: e101539.
128. Castillo J, Knol JC, Korver CM, Piersma SR, Pham TV, de Goeij-de Haas RR *et al*. Human Testis Phosphoproteome Reveals Kinases as Potential Targets in Spermatogenesis and Testicular Cancer. *Mol Cell Proteomics*, **2019**; 18: S132-S144.
129. Lei T, Zhang P, Zhang X, Xiao X, Zhang J, Qiu T *et al*. Cyclin K regulates prereplicative complex assembly to promote mammalian cell proliferation. *Nat Commun*, **2018**; 9: 1876.
130. Yao G, Tang J, Yang X, Zhao Y, Zhou R, Meng R *et al*. Cyclin K interacts with beta-catenin to induce Cyclin D1 expression and facilitates tumorigenesis and radioresistance in lung cancer. *Theranostics*, **2020**; 10: 11144-11158.
131. Schecher S, Walter B, Falkenstein M, Macher-Goepfing S, Stenzel P, Krumpelmann K *et al*. Cyclin K dependent regulation of Aurora B affects apoptosis and proliferation by induction of mitotic catastrophe in prostate cancer. *Int J Cancer*, **2017**; 141: 1643-1653.
132. Ji J, Zhou C, Wu J, Cai Q, Shi M, Zhang H *et al*. Expression pattern of CDK12 protein in gastric cancer and its positive correlation with CD8(+) cell density and CCL12 expression. *Int J Med Sci*, **2019**; 16: 1142-1148.

133. Choi HJ, Jin S, Cho H, Won HY, An HW, Jeong GY *et al.* CDK12 drives breast tumor initiation and trastuzumab resistance via WNT and IRS1-ErbB-PI3K signaling. *EMBO Rep*, **2019**; 20: e48058.
134. Ekumi KM, Paculova H, Lenasi T, Pospichalova V, Bosken CA, Rybarikova J *et al.* Ovarian carcinoma CDK12 mutations misregulate expression of DNA repair genes via deficient formation and function of the Cdk12/CycK complex. *Nucleic Acids Res*, **2015**; 43: 2575-2589.
135. Lui GYL, Grandori C, Kemp CJ. CDK12: an emerging therapeutic target for cancer. *J Clin Pathol*, **2018**; 71: 957-962.
136. Joshi PM, Sutor SL, Huntoon CJ, Karnitz LM. Ovarian cancer-associated mutations disable catalytic activity of CDK12, a kinase that promotes homologous recombination repair and resistance to cisplatin and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *J Biol Chem*, **2014**; 289: 9247-9253.
137. Chirackal Manavalan AP, Pilarova K, Kluge M, Bartholomeeusen K, Rajecky M, Oppelt J *et al.* CDK12 controls G1/S progression by regulating RNAPII processivity at core DNA replication genes. *EMBO Rep*, **2019**; 20: e47592.
138. Naidoo K, Wai PT, Maguire SL, Daley F, Haider S, Kriplani D *et al.* Evaluation of CDK12 Protein Expression as a Potential Novel Biomarker for DNA Damage Response-Targeted Therapies in Breast Cancer. *Mol Cancer Ther*, **2018**; 17: 306-315.
139. Popova T, Manie E, Boeva V, Battistella A, Goundiam O, Smith NK *et al.* Ovarian Cancers Harboring Inactivating Mutations in CDK12 Display a Distinct Genomic Instability Pattern Characterized by Large Tandem Duplications. *Cancer Res*, **2016**; 76: 1882-1891.
140. Sokol ES, Pavlick D, Frampton GM, Ross JS, Miller VA, Ali SM *et al.* Pan-Cancer Analysis of CDK12 Loss-of-Function Alterations and Their Association with the Focal Tandem-Duplicator Phenotype. *Oncologist*, **2019**; 24: 1526-1533.
141. Wu YM, Cieslik M, Lonigro RJ, Vats P, Reimers MA, Cao X *et al.* Inactivation of CDK12 Delineates a Distinct Immunogenic Class of Advanced Prostate Cancer. *Cell*, **2018**; 173: 1770-1782 e1714.
142. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **2011**; 144: 646-674.
143. Choi SH, Kim S, Jones KA. Gene expression regulation by CDK12: a versatile kinase in cancer with functions beyond CTD phosphorylation. *Exp Mol Med*, **2020**; 52: 762-771.
144. O'Connor MJ. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol Cell*, **2015**; 60: 547-560.
145. Paculova H, Kohoutek J. The emerging roles of CDK12 in tumorigenesis. *Cell Div*, **2017**; 12: 7.
146. Greenleaf AL. Human CDK12 and CDK13, multi-tasking CTD kinases for the new millenium. *Transcription*, **2019**; 10: 91-110.
147. Bradner JE, Hnisz D, Young RA. Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell*, **2017**; 168: 629-643.
148. Bostwick BL, McLean S, Posey JE, Streff HE, Gripp KW, Blesson A *et al.* Phenotypic and molecular characterisation of CDK13-related congenital heart defects, dysmorphic facial features and intellectual developmental disorders. *Genome Med*, **2017**; 9: 73.
149. Hamilton MJ, Suri M. CDK13-related disorder. *Adv Genet*, **2019**; 103: 163-182.
150. Insko ML, Abraham BJ, Dubbury SJ, Kaltheuner IH, Dust S, Wu C *et al.* Oncogenic CDK13 mutations impede nuclear RNA surveillance. *Science*, **2023**; 380: eabn7625.
151. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, **2009**; 461: 1071-1078.
152. Pilie PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, **2019**; 16: 81-104.
153. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*, **2016**; 16: 20-33.
154. Groelly FJ, Fawkes M, Dagg RA, Blackford AN, Tarsounas M. Targeting DNA damage response pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*, **2023**; 23: 78-94.
155. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*, **2006**; 12: 440-450.
156. Sulli G, Di Micco R, d'Adda di Fagagna F. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nat Rev Cancer*, **2012**; 12: 709-720.
157. Abraham RT. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)*, **2004**; 3: 883-887.
158. Fanning E, Klimovich V, Nager AR. A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res*, **2006**; 34: 4126-4137.
159. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, **2001**; 276: 42462-42467.
160. Ward IM, Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, **2001**; 276: 47759-47762.
161. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids*, **2010**; 2010.
162. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, **2008**; 22: 305-309.
163. Choi W, Lee ES. Therapeutic Targeting of DNA Damage Response in Cancer. *Int J Mol Sci*, **2022**; 23.

164. Lanz MC, Dibitetto D, Smolka MB. DNA damage kinase signaling: checkpoint and repair at 30 years. *EMBO J*, **2019**; 38: e101801.
165. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*, **2012**; 12: 801-817.
166. Kinsella TJ. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin Cancer Res*, **2009**; 15: 1853-1859.
167. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*, **2003**; 193: 3-34.
168. Krokan HE, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2013**; 5: a012583.
169. Scharer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2013**; 5: a012609.
170. Caldecott KW. Causes and consequences of DNA single-strand breaks. *Trends Biochem Sci*, **2024**; 49: 68-78.
171. Cannan WJ, Pederson DS. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*, **2016**; 231: 3-14.
172. Moon J, Kitty I, Renata K, Qin S, Zhao F, Kim W. DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics. *Int J Mol Sci*, **2023**; 24.
173. Vitor AC, Huertas P, Legube G, de Almeida SF. Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox. *Front Mol Biosci*, **2020**; 7: 24.
174. Aparicio T, Baer R, Gautier J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst)*, **2014**; 19: 169-175.
175. Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2017**; 18: 495-506.
176. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol*, **2016**; 26: 52-64.
177. Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A *et al*. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J*, **2011**; 30: 1079-1092.
178. Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res*, **2008**; 18: 99-113.
179. Ranjha L, Howard SM, Cejka P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, **2018**; 127: 187-214.
180. Buisson R, Dion-Cote AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ *et al*. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, **2010**; 17: 1247-1254.
181. Clauson C, Scharer OD, Niedernhofer L. Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2013**; 5: a012732.
182. McHugh PJ, Spanswick VJ, Hartley JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol*, **2001**; 2: 483-490.
183. Hashimoto S, Anai H, Hanada K. Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders. *Genes Environ*, **2016**; 38: 9.
184. Ferguson LR, Chen H, Collins AR, Connell M, Damia G, Dasgupta S *et al*. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol*, **2015**; 35 Suppl: S5-S24.
185. Furgason JM, Bahassi el M. Targeting DNA repair mechanisms in cancer. *Pharmacol Ther*, **2013**; 137: 298-308.
186. Czajkowski D, Szmyd R, Gee HE. Impact of DNA damage response defects in cancer cells on response to immunotherapy and radiotherapy. *J Med Imaging Radiat Oncol*, **2022**; 66: 546-559.
187. Reinhardt HC, Jiang H, Hemann MT, Yaffe MB. Exploiting synthetic lethal interactions for targeted cancer therapy. *Cell Cycle*, **2009**; 8: 3112-3119.
188. Ashworth A, Lord CJ, Reis-Filho JS. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell*, **2011**; 145: 30-38.
189. Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM *et al*. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*, **2010**; 376: 245-251.
190. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh MW, Weitzel JN *et al*. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*, **2010**; 376: 235-244.
191. Jurkovicova D, Neophytou CM, Gasparovic AC, Goncalves AC. DNA Damage Response in Cancer Therapy and Resistance: Challenges and Opportunities. *Int J Mol Sci*, **2022**; 23.
192. Giudice E, Gentile M, Salutari V, Ricci C, Musacchio L, Carbone MV *et al*. PARP Inhibitors Resistance: Mechanisms and Perspectives. *Cancers (Basel)*, **2022**; 14.

193. Jiang B, Jiang J, Kaltheuner IH, Iniguez AB, Anand K, Ferguson FM *et al*. Structure-activity relationship study of THZ531 derivatives enables the discovery of BSI-01-175 as a dual CDK12/13 covalent inhibitor with efficacy in Ewing sarcoma. *Eur J Med Chem*, **2021**; 221: 113481.
194. Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Characterization of a human prostate adenocarcinoma cell line (DU 145) as a monolayer culture and as a solid tumor in athymic mice. *Prog Clin Biol Res*, **1980**; 37: 67-84.
195. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*, **1979**; 17: 16-23.
196. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM *et al*. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*, **1983**; 43: 1809-1818.
197. Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, Chung LW. Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer*, **1994**; 57: 406-412.
198. Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM, Zhou HE, Kim EE, Hopwood VL *et al*. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res*, **1994**; 54: 2577-2581.
199. Klein KA, Reiter RE, Redula J, Moradi H, Zhu XL, Brothman AR *et al*. Progression of metastatic human prostate cancer to androgen independence in immunodeficient SCID mice. *Nat Med*, **1997**; 3: 402-408.
200. van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL *et al*. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate*, **2003**; 57: 205-225.
201. Li Q, Wang M, Zeng L, Guo W, Xu Y, Li C *et al*. Deletion of Wild-type p53 Facilitates Bone Metastatic Function by Blocking the AIP4 Mediated Ligand-Induced Degradation of CXCR4. *Front Pharmacol*, **2021**; 12: 792293.
202. Russell PJ, Kingsley EA. Human prostate cancer cell lines. *Methods Mol Med*, **2003**; 81: 21-39.
203. Webber MM, Bello D, Quader S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate*, **1997**; 30: 58-64.
204. Thalmann GN, Sikes RA, Wu TT, Degeorges A, Chang SM, Ozen M *et al*. LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis. *Prostate*, **2000**; 44: 91-103 Jul 10;144(102).
205. Castro F, Dirks WG, Fahrnich S, Hotz-Wagenblatt A, Pawlita M, Schmitt M. High-throughput SNP-based authentication of human cell lines. *Int J Cancer*, **2013**; 132: 308-314.
206. Bankhead P, Loughrey MB, Fernandez JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD *et al*. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*, **2017**; 7: 16878.
207. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, **2007**; 37: 120-126.
208. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **2001**; 29: e45.
209. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**; 72: 248-254.
210. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**; 227: 680-685.
211. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, **2018**; 120: 5 11-5 11 11.
212. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM *et al*. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, **1995**; 182: 1545-1556.
213. Zimmermann M, Meyer N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol*, **2011**; 740: 57-63.
214. Miller MW, Nowakowski RS. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res*, **1988**; 457: 44-52.
215. Schroeder AB, Dobson ETA, Rueden CT, Tomancak P, Jug F, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis. *Protein Sci*, **2021**; 30: 234-249.
216. Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, **2014**; 17: 779-804.
217. Vargas A, Zeisser-Labouebe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, **2007**; 59: 1162-1176.
218. Ingrid Herr CCN, Ewa Aleksandrowicz, Nathalie Bauer, Zhefu Zhao. MicroRNA in vivo delivery to human pancreas tumor xenografts on chicken eggs. *Protocol Exchange*, **2017**; PROTOCOL (Version 1).
219. Meijer TG, Naipal KA, Jager A, van Gent DC. Ex vivo tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA*, **2017**; 3: FSO190.
220. Suckert T, Rassamegevanon T, Muller J, Dietrich A, Graja A, Reiche M *et al*. Applying Tissue Slice Culture in Cancer Research-Insights from Preclinical Proton Radiotherapy. *Cancers (Basel)*, **2020**; 12.

221. Dapson RW. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotech Histochem*, **2007**; 82: 133-140.
222. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., **2022**.
223. Chao CC. Mechanisms of p53 degradation. *Clin Chim Acta*, **2015**; 438: 139-147.
224. Carroll AG, Voeller HJ, Sugars L, Gelmann EP. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate*, **1993**; 23: 123-134.
225. Hu J, Ishihara M, Chin AI, Wu L. Establishment of xenografts of urological cancers on chicken chorioallantoic membrane (CAM) to study metastasis. *Precis Clin Med*, **2019**; 2: 140-151.
226. Linnebacher A, Mayer P, Marnet N, Bergmann F, Herpel E, Revia S *et al*. Interleukin 21 Receptor/Ligand Interaction Is Linked to Disease Progression in Pancreatic Cancer. *Cells*, **2019**; 8.
227. Pawlikowska P, Tayoun T, Oulhen M, Faugeroux V, Rouffiac V, Aberlenc A *et al*. Exploitation of the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) as a platform for anti-metastatic drug testing. *Sci Rep*, **2020**; 10: 16876.
228. Burkovics P, Hajdu I, Szukacsov V, Unk I, Haracska L. Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-phosphodiesterase and 3'-5' exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*, **2009**; 37: 4247-4255.
229. Burkovics P, Szukacsov V, Unk I, Haracska L. Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs. *Nucleic Acids Res*, **2006**; 34: 2508-2515.
230. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovska A. BRCA Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer*, **2019**; 10: 2109-2127.
231. Li S, Silvestri V, Leslie G, Rebbeck TR, Neuhausen SL, Hopper JL *et al*. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. *J Clin Oncol*, **2022**; 40: 1529-1541.
232. Sims AE, Spiteri E, Sims RJ, 3rd, Arita AG, Lach FP, Landers T *et al*. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol*, **2007**; 14: 564-567.
233. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, **2003**; 421: 961-966.
234. Bilotti K, Tarantino ME, Delaney S. Human Oxoguanine Glycosylase 1 Removes Solution Accessible 8-Oxo-7,8-dihydroguanine Lesions from Globally Substituted Nucleosomes Except in the Dyad Region. *Biochemistry*, **2018**; 57: 1436-1439.
235. Weinfeld M, Mani RS, Abdou I, Aceytuno RD, Glover JN. Tidying up loose ends: the role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair. *Trends Biochem Sci*, **2011**; 36: 262-271.
236. Bowman GD, Goedken ER, Kazmirski SL, O'Donnell M, Kuriyan J. DNA polymerase clamp loaders and DNA recognition. *FEBS Lett*, **2005**; 579: 863-867.
237. Miller JM, Enemark EJ. Fundamental Characteristics of AAA+ Protein Family Structure and Function. *Archaea*, **2016**; 2016: 9294307.
238. Polkinghorn WR, Parker JS, Lee MX, Kass EM, Spratt DE, Iaquina PJ *et al*. Androgen receptor signaling regulates DNA repair in prostate cancers. *Cancer Discov*, **2013**; 3: 1245-1253.
239. Goodwin JF, Schiewer MJ, Dean JL, Schrecengost RS, de Leeuw R, Han S *et al*. A hormone-DNA repair circuit governs the response to genotoxic insult. *Cancer Discov*, **2013**; 3: 1254-1271.
240. Ta HQ, Gioeli D. The convergence of DNA damage checkpoint pathways and androgen receptor signaling in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, **2014**; 21: R395-407.
241. Maund SL, Nolley R, Peehl DM. Optimization and comprehensive characterization of a faithful tissue culture model of the benign and malignant human prostate. *Lab Invest*, **2014**; 94: 208-221.
242. Perez LM, Nonn L. Harnessing the Utility of Ex Vivo Patient Prostate Tissue Slice Cultures. *Front Oncol*, **2022**; 12: 864723.
243. Gao J, Wang MY, Ren Y, Lwin T, Li T, Yan JC *et al*. Response and resistance to CDK12 inhibition in aggressive B-cell lymphomas. *Haematologica*, **2022**; 107: 1119-1130.
244. Davidson L, Muniz L, West S. 3' end formation of pre-mRNA and phosphorylation of Ser2 on the RNA polymerase II CTD are reciprocally coupled in human cells. *Genes Dev*, **2014**; 28: 342-356.
245. Heidemann M, Hintermair C, Voss K, Eick D. Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim Biophys Acta*, **2013**; 1829: 55-62.
246. Ahn SH, Kim M, Buratowski S. Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell*, **2004**; 13: 67-76.
247. Fan Z, Devlin JR, Hogg SJ, Doyle MA, Harrison PF, Todorovski I *et al*. CDK13 cooperates with CDK12 to control global RNA polymerase II processivity. *Sci Adv*, **2020**; 6.
248. Core L, Adelman K. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: a nexus of gene regulation. *Genes Dev*, **2019**; 33: 960-982.
249. Schuller R, Forne I, Straub T, Schreieck A, Texier Y, Shah N *et al*. Heptad-Specific Phosphorylation of RNA Polymerase II CTD. *Mol Cell*, **2016**; 61: 305-314.
250. Casamassimi A, Ciccodicola A. Transcriptional Regulation: Molecules, Involved Mechanisms, and Misregulation. *Int J Mol Sci*, **2019**; 20.

251. Krishnan S, Horowitz S, Trievel RC. Structure and function of histone H3 lysine 9 methyltransferases and demethylases. *Chembiochem*, **2011**; 12: 254-263.
252. Komura K, Yoshikawa Y, Shimamura T, Chakraborty G, Gerke TA, Hinohara K *et al*. ATR inhibition controls aggressive prostate tumors deficient in Y-linked histone demethylase KDM5D. *J Clin Invest*, **2018**; 128: 2979-2995.
253. Spans L, Helsen C, Clinckemalie L, Van den Broeck T, Prekovic S, Joniau S *et al*. Comparative genomic and transcriptomic analyses of LNCaP and C4-2B prostate cancer cell lines. *PLoS One*, **2014**; 9: e90002.
254. Villamar Cruz O, Prudnikova TY, Araiza-Olivera D, Perez-Plasencia C, Johnson N, Bernhardt AJ *et al*. Reduced PAK1 activity sensitizes FA/BRCA-proficient breast cancer cells to PARP inhibition. *Oncotarget*, **2016**; 7: 76590-76603.
255. Schrantz N, da Silva Correia J, Fowler B, Ge Q, Sun Z, Bokoch GM. Mechanism of p21-activated kinase 6-mediated inhibition of androgen receptor signaling. *J Biol Chem*, **2004**; 279: 1922-1931.
256. Antonarakis ES, Isaacsson Velho P, Fu W, Wang H, Agarwal N, Sacristan Santos V *et al*. CDK12-Altered Prostate Cancer: Clinical Features and Therapeutic Outcomes to Standard Systemic Therapies, Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors, and PD-1 Inhibitors. *JCO Precis Oncol*, **2020**; 4: 370-381.
257. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*, **2003**; 36: 165-175.
258. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, **2007**; 35: 495-516.
259. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther*, **2023**; 8: 92.
260. Ming M, He YY. PTEN in DNA damage repair. *Cancer Lett*, **2012**; 319: 125-129.
261. Selvendiran K, Tong L, Vishwanath S, Bratasz A, Trigg NJ, Kutala VK *et al*. EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *J Biol Chem*, **2007**; 282: 28609-28618.
262. Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS *et al*. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol*, **2002**; 22: 7831-7841.
263. McKenzie S, Kyprianou N. Apoptosis evasion: the role of survival pathways in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *J Cell Biochem*, **2006**; 97: 18-32.
264. Li X, Marani M, Mannucci R, Kinsey B, Andriani F, Nicoletti I *et al*. Overexpression of BCL-X(L) underlies the molecular basis for resistance to staurosporine-induced apoptosis in PC-3 cells. *Cancer Res*, **2001**; 61: 1699-1706.
265. Yamanaka K, Rocchi P, Miyake H, Fazli L, Vessella B, Zangemeister-Wittke U *et al*. A novel antisense oligonucleotide inhibiting several antiapoptotic Bcl-2 family members induces apoptosis and enhances chemosensitivity in androgen-independent human prostate cancer PC3 cells. *Mol Cancer Ther*, **2005**; 4: 1689-1698.
266. Feiersinger GE, Trattng K, Leitner PD, Guggenberger F, Oberhuber A, Peer S *et al*. Olaparib is effective in combination with, and as maintenance therapy after, first-line endocrine therapy in prostate cancer cells. *Mol Oncol*, **2018**; 12: 561-576.
267. Yin L, Liu Y, Peng Y, Peng Y, Yu X, Gao Y *et al*. PARP inhibitor veliparib and HDAC inhibitor SAHA synergistically co-target the UHRF1/BRCA1 DNA damage repair complex in prostate cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*, **2018**; 37: 153.
268. Huang X, Tran T, Zhang L, Hatcher R, Zhang P. DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2005**; 102: 1065-1070.
269. Cheng L, Zhou S, Zhou S, Shi K, Cheng Y, Cai MC *et al*. Dual Inhibition of CDK12/CDK13 Targets Both Tumor and Immune Cells in Ovarian Cancer. *Cancer Res*, **2022**; 82: 3588-3602.
270. Pommier Y, O'Connor MJ, de Bono J. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action. *Sci Transl Med*, **2016**; 8: 362ps317.
271. Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2008**; 9: 297-308.
272. Lim JSJ, Tan DSP. Understanding Resistance Mechanisms and Expanding the Therapeutic Utility of PARP Inhibitors. *Cancers (Basel)*, **2017**; 9.
273. Lei H, Wang Z, Jiang D, Liu F, Liu M, Lei X *et al*. CRISPR screening identifies CDK12 as a conservative vulnerability of prostate cancer. *Cell Death Dis*, **2021**; 12: 740.
274. Li L, Karanika S, Yang G, Wang J, Park S, Broom BM *et al*. Androgen receptor inhibitor-induced "BRCAness" and PARP inhibition are synthetically lethal for castration-resistant prostate cancer. *Sci Signal*, **2017**; 10.
275. Schiewer MJ, Goodwin JF, Han S, Brenner JC, Augello MA, Dean JL *et al*. Dual roles of PARP-1 promote cancer growth and progression. *Cancer Discov*, **2012**; 2: 1134-1149.
276. Mayeur GL, Kung WJ, Martinez A, Izumiya C, Chen DJ, Kung HJ. Ku is a novel transcriptional recycling coactivator of the androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, **2005**; 280: 10827-10833.

277. Yeh S, Hu YC, Rahman M, Lin HK, Hsu CL, Ting HJ *et al.* Increase of androgen-induced cell death and androgen receptor transactivation by BRCA1 in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**; 97: 11256-11261.
278. Wang L, Hsu CL, Ni J, Wang PH, Yeh S, Keng P *et al.* Human checkpoint protein hRad9 functions as a negative coregulator to repress androgen receptor transactivation in prostate cancer cells. *Mol Cell Biol*, **2004**; 24: 2202-2213.
279. Sun R, Wei T, Ding D, Zhang J, Chen S, He HH *et al.* CYCLIN K down-regulation induces androgen receptor gene intronic polyadenylation, variant expression and PARP inhibitor vulnerability in castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2022**; 119: e2205509119.
280. Smith R, Liu M, Liby T, Bayani N, Bucher E, Chiotti K *et al.* Enzalutamide response in a panel of prostate cancer cell lines reveals a role for glucocorticoid receptor in enzalutamide resistant disease. *Sci Rep*, **2020**; 10: 21750.
281. Arora VK, Schenkein E, Murali R, Subudhi SK, Wongvipat J, Balbas MD *et al.* Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell*, **2013**; 155: 1309-1322.
282. 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. *Clin Cancer Res*, **2018**; 24: 927-938.
283. Claessens F, Helsen C, Prekovic S, Van den Broeck T, Spans L, Van Poppel H *et al.* Emerging mechanisms of enzalutamide resistance in prostate cancer. *Nat Rev Urol*, **2014**; 11: 712-716.
284. Buonaiuto R, Neola G, Cecere SC, Caltavituoro A, Cefaliello A, Pietroluongo E *et al.* Glucocorticoid Receptor and Ovarian Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention. *Biomolecules*, **2023**; 13.
285. Ritter HD, Antonova L, Mueller CR. The unliganded glucocorticoid receptor positively regulates the tumor suppressor gene BRCA1 through GABP beta. *Mol Cancer Res*, **2012**; 10: 558-569.
286. Zhang W, Zhou L, Di J. Prognostic and clinicopathological value of CDK12 mutation in prostate cancer: a meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther*, **2023**; 23: 207-216.
287. Nguyen B, Mota JM, Nandakumar S, Stopsack KH, Weg E, Rathkopf D *et al.* Pan-cancer Analysis of CDK12 Alterations Identifies a Subset of Prostate Cancers with Distinct Genomic and Clinical Characteristics. *Eur Urol*, **2020**; 78: 671-679.
288. Zhu J, Tucker M, Marin D, Gupta RT, Healy P, Humeniuk M *et al.* Clinical utility of FoundationOne tissue molecular profiling in men with metastatic prostate cancer. *Urol Oncol*, **2019**; 37: e811-e813.
289. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, Luber B, Nakazawa M, Roeser JC *et al.* AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, **2014**; 371: 1028-1038.
290. Perner S, Cronauer MV, Schrader AJ, Klocker H, Culig Z, Baniahmad A. Adaptive responses of androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget*, **2015**; 6: 35542-35555.
291. Mitchell T, Neal DE. The genomic evolution of human prostate cancer. *Br J Cancer*, **2015**; 113: 193-198.
292. Moreira-Silva F, Henrique R, Jeronimo C. From Therapy Resistance to Targeted Therapies in Prostate Cancer. *Front Oncol*, **2022**; 12: 877379.
293. Chatterjee P, Choudhary GS, Alswillah T, Xiong X, Heston WD, Magi-Galluzzi C *et al.* The TMPRSS2-ERG Gene Fusion Blocks XRCC4-Mediated Nonhomologous End-Joining Repair and Radiosensitizes Prostate Cancer Cells to PARP Inhibition. *Mol Cancer Ther*, **2015**; 14: 1896-1906.
294. Chen JY, Wang PY, Liu MZ, Lyu F, Ma MW, Ren XY *et al.* Biomarkers for Prostate Cancer: From Diagnosis to Treatment. *Diagnostics (Basel)*, **2023**; 13.
295. Basourakos SP, Tzeng M, Lewicki PJ, Patel K, Al Hussein Al Awamlh B, Venkat S *et al.* Tissue-Based Biomarkers for the Risk Stratification of Men With Clinically Localized Prostate Cancer. *Front Oncol*, **2021**; 11: 676716.
296. Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*, **2009**; 29: 123-127.
297. Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X *et al.* Wnt/beta-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther*, **2022**; 7: 3.
298. Chen G, Shukeir N, Potti A, Sircar K, Aprikian A, Goltzman D *et al.* Up-regulation of Wnt-1 and beta-catenin production in patients with advanced metastatic prostate carcinoma: potential pathogenetic and prognostic implications. *Cancer*, **2004**; 101: 1345-1356.
299. Pereira RA, Ravinal RC, Costa RS, Lima MS, Tucci S, Muglia VF *et al.* Cyclin D1 expression in prostate carcinoma. *Braz J Med Biol Res*, **2014**; 47: 515-521.
300. Kypka RM, Waxman J. Wnt/beta-catenin signalling in prostate cancer. *Nat Rev Urol*, **2012**; 9: 418-428.
301. Thanindratarn P, Dean DC, Feng W, Wei R, Nelson SD, Hornicek FJ *et al.* Cyclin-dependent kinase 12 (CDK12) in chordoma: prognostic and therapeutic value. *Eur Spine J*, **2020**; 29: 3214-3228.
302. Liu M, Fan H, Li T, Sihong L, Qiao S, Bi J. Low expression of CDK12 in gastric cancer is correlated with advanced stage and poor outcome. *Pathol Res Pract*, **2020**; 216: 152962.
303. Liu H, Liu K, Dong Z. Targeting CDK12 for Cancer Therapy: Function, Mechanism, and Drug Discovery. *Cancer Res*, **2021**; 81: 18-26.

304. Reimers MA, Yip SM, Zhang L, Cieslik M, Dhawan M, Montgomery B *et al.* Clinical Outcomes in Cyclin-dependent Kinase 12 Mutant Advanced Prostate Cancer. *Eur Urol*, **2020**; *77*: 333-341.
305. Qi JC, Yang Z, Lin T, Ma L, Wang YX, Zhang Y *et al.* CDK13 upregulation-induced formation of the positive feedback loop among circCDK13, miR-212-5p/miR-449a and E2F5 contributes to prostate carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res*, **2021**; *40*: 2.
306. Liang S, Hu L, Wu Z, Chen Z, Liu S, Xu X *et al.* CDK12: A Potent Target and Biomarker for Human Cancer Therapy. *Cells*, **2020**; *9*.
307. Tosoian JJ, Alam R, Ball MW, Carter HB, Epstein JI. Managing high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and atypical glands on prostate biopsy. *Nat Rev Urol*, **2018**; *15*: 55-66.
308. Carver BS, Tran J, Chen Z, Carracedo-Perez A, Alimonti A, Nardella C *et al.* ETS rearrangements and prostate cancer initiation. *Nature*, **2009**; *457*: E1; discussion E2-3.
309. Xie N, Shen G, Gao W, Huang Z, Huang C, Fu L. Neoantigens: promising targets for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*, **2023**; *8*: 9.
310. Manna F, Karkampouna S, Zoni E, De Menna M, Hensel J, Thalmann GN *et al.* Metastases in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **2019**; *9*.
311. Bai N, Xia F, Wang W, Lei Y, Bo J, Li X. CDK12 promotes papillary thyroid cancer progression through regulating the c-myc/beta-catenin pathway. *J Cancer*, **2020**; *11*: 4308-4315.
312. Peng F, Yang C, Kong Y, Huang X, Chen Y, Zhou Y *et al.* CDK12 Promotes Breast Cancer Progression and Maintains Stemness by Activating c-myc/beta -catenin Signaling. *Curr Cancer Drug Targets*, **2020**; *20*: 156-165.
313. Ni J, Cozzi PJ, Hao JL, Beretov J, Chang L, Duan W *et al.* CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. *Prostate*, **2014**; *74*: 602-617.
314. Geng M, Yang Y, Cao X, Dang L, Zhang T, Zhang L. Targeting CDK12-mediated transcription regulation in anaplastic thyroid carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, **2019**; *520*: 544-550.
315. Castro E, Goh C, Olmos D, Saunders E, Leongamornlert D, Tymrakiewicz M *et al.* Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J Clin Oncol*, **2013**; *31*: 1748-1757.
316. Agarwal N, Azad A, Shore ND, Carles J, Fay AP, Dunshee C *et al.* Talazoparib plus enzalutamide in metastatic castration-resistant prostate cancer: TALAPRO-2 phase III study design. *Future Oncol*, **2022**; *18*: 425-436.
317. Clarke N, Wiechno P, Alekseev B, Sala N, Jones R, Kocak I *et al.* Olaparib combined with abiraterone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, **2018**; *19*: 975-986.
318. Bourlon MT, Valdez P, Castro E. Development of PARP inhibitors in advanced prostate cancer. *Ther Adv Med Oncol*, **2024**; *16*: 17588359231221337.
319. Bajrami I, Frankum JR, Konde A, Miller RE, Rehman FL, Brough R *et al.* Genome-wide profiling of genetic synthetic lethality identifies CDK12 as a novel determinant of PARP1/2 inhibitor sensitivity. *Cancer Res*, **2014**; *74*: 287-297.
320. Cesari E, Ciucci A, Pieraccioli M, Caggiano C, Nero C, Bonvissuto D *et al.* Dual inhibition of CDK12 and CDK13 uncovers actionable vulnerabilities in patient-derived ovarian cancer organoids. *J Exp Clin Cancer Res*, **2023**; *42*: 126.
321. Taylor AK, Kosoff D, Emamekhoo H, Lang JM, Kyriakopoulos CE. PARP inhibitors in metastatic prostate cancer. *Front Oncol*, **2023**; *13*: 1159557.
322. Johnson SF, Cruz C, Greifengberg AK, Dust S, Stover DG, Chi D *et al.* CDK12 Inhibition Reverses De Novo and Acquired PARP Inhibitor Resistance in BRCA Wild-Type and Mutated Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep*, **2016**; *17*: 2367-2381.
323. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon SV, Papneja N, Miller WH, Jr. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Curr Oncol*, **2020**; *27*: S87-S97.
324. Lanka SM, Zorko NA, Antonarakis ES, Barata PC. Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer, Immune Checkpoint Inhibitors, and Beyond. *Curr Oncol*, **2023**; *30*: 4246-4256.
325. Rebuzzi SE, Rescigno P, Catalano F, Mollica V, Vogl UM, Marandino L *et al.* Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Prostate Cancer: Current Data and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*, **2022**; *14*.
326. Nguyen CB, Reimers MA, Perera C, Abida W, Chou J, Feng FY *et al.* Evaluating Immune Checkpoint Blockade in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancers with Deleterious CDK12 Alterations in the Phase 2 IMPACT Trial. *Clin Cancer Res*, **2024**.
327. Larsen TV, Maansson CT, Daugaard TF, Andresen BS, Sorensen BS, Nielsen AL. Trans-Regulation of Alternative PD-L1 mRNA Processing by CDK12 in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Cells*, **2023**; *12*.
328. Li Y, Zhang H, Li Q, Zou P, Huang X, Wu C *et al.* CDK12/13 inhibition induces immunogenic cell death and enhances anti-PD-1 anticancer activity in breast cancer. *Cancer Lett*, **2020**; *495*: 12-21.
329. Pu Y, Xu M, Liang Y, Yang K, Guo Y, Yang X *et al.* Androgen receptor antagonists compromise T cell response against prostate cancer leading to early tumor relapse. *Sci Transl Med*, **2016**; *8*: 333ra347.

330. Czerwinska M, Bilewicz A, Kruszewski M, Wegierek-Ciuk A, Lankoff A. Targeted Radionuclide Therapy of Prostate Cancer-From Basic Research to Clinical Perspectives. *Molecules*, **2020**; 25.
331. Teo MY, Morris MJ. Prostate-Specific Membrane Antigen-Directed Therapy for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer J*, **2016**; 22: 347-352.
332. Autio KA, Dreicer R, Anderson J, Garcia JA, Alva A, Hart LL *et al.* Safety and Efficacy of BIND-014, a Docetaxel Nanoparticle Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol*, **2018**; 4: 1344-1351.
333. Gao Y, Zhang T, Terai H, Ficarro SB, Kwiatkowski N, Hao MF *et al.* Overcoming Resistance to the THZ Series of Covalent Transcriptional CDK Inhibitors. *Cell Chem Biol*, **2018**; 25: 135-142 e135.

7 ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Schematische Darstellung des histologischen Aufbaus der Prostata-drüse.....	6
Abbildung 1-2 Schematischer Aufbau des humanen <i>AR</i> -Gens, des Wildtyp (WT) <i>AR</i> -Proteins und einer <i>AR</i> -Spleißvariante (<i>AR-V7</i>).....	8
Abbildung 1-3 Schematische Darstellung des histologischen Gleason-Wachstumsmuster des PCas, das als Grundlage für das ISUP 2014/WHO 2016 Graduierungssystem verwendet wird.	10
Abbildung 1-4 Schematische Darstellung der Androgen-Signalkaskade und der Wirkmechanismen von Enzalutamid (<i>AR</i> -Inhibitor) und Abirateron (<i>CYP17</i> -Inhibitor).....	13
Abbildung 1-5 Schematische Darstellung der Domänenzusammensetzung der humanen CycK, CDK12 und CDK13 Proteine.	16
Abbildung 1-6 Schematische Darstellung des Wirkmechanismus des CDK12/CDK13-Inhibitors THZ531.....	18
Abbildung 1-7 Schematische Darstellung der DDR.	23
Abbildung 4-1 Endogene Proteinexpression von <i>AR</i> , <i>PSA</i> , <i>p53</i> , CycK, CDK12 und CDK13 in verschiedenen <i>PCa</i> -Zelllinien.....	64
Abbildung 4-2 THZ531 beeinflusst die Phosphorylierung der CTD der RNAP II in den <i>PCa</i> -Zelllinien.....	65
Abbildung 4-3 THZ531 reduziert die Zellviabilität der <i>PCa</i> -Zelllinien.....	66
Abbildung 4-4 THZ531 induziert Apoptose in DU-145- und C4-2B-Zellen.....	67
Abbildung 4-5 THZ531 verursacht einen Zellzyklusarrest in PC-3- und LAPC4-Zellen.	68
Abbildung 4-6 THZ531 erhöht die Menge des Zelltods in Tumorxenografts des CAM-Modells.	70
Abbildung 4-7 THZ531 induziert antitumorale Effekte in Tumorxenografts des CAM-Modells.	71
Abbildung 4-8 CycK-CDK12/CDK13-Komplexe regulieren die Expression essenzieller DDR-Gene.	74
Abbildung 4-9 Repräsentative Aufnahmen der THZ531-induzierten DNA-Schäden der <i>PCa</i> -Zelllinien.....	76
Abbildung 4-10 THZ531 verursacht die Akkumulation von DNA-Schäden in den <i>PCa</i> -Zelllinien.....	77
Abbildung 4-11 THZ531 beeinflusst die Aktivierung der DDR-Signalwege.....	78
Abbildung 4-12 Die kombinierte Behandlung aus THZ531 und Olaparib erhöht die Apoptoserate in DU-145- und C4-2B-Zellen und verursacht die Apoptoseinduktion in LNCaP-Zellen.....	80
Abbildung 4-13 Enzalutamid und Abirateron verursachen die Abnahme der androgenabhängigen <i>PSA</i> -Expression.	82
Abbildung 4-14 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid induziert Apoptose in den androgensensitiven <i>PCa</i> -Zellen und erhöht die Apoptoserate in DU-145-Zellen.....	83
Abbildung 4-15 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Abirateron induziert Apoptose in den androgensensitiven <i>PCa</i> -Zellen und erhöht die Apoptoserate in DU-145-Zellen.....	84
Abbildung 4-16 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid verursacht eine verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpression der DNA-Reparaturgene in den androgensensitiven Zelllinien.....	86
Abbildung 4-17 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Abirateron verursacht eine verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpression der DNA-Reparaturgene in den androgensensitiven Zelllinien.....	87
Abbildung 4-18 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid verursacht eine marginal verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpression der DNA-Reparaturgene in den androgenunabhängigen Zelllinien.	88
Abbildung 4-19 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Abirateron verursacht eine marginal verstärkte Reduktion der mRNA- und Proteinexpression der DNA-Reparaturgene in den androgenunabhängigen Zelllinien.	89

Abbildung 4-20 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie C4-2B.....	91
Abbildung 4-21 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie LAPC4.....	92
Abbildung 4-22 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie LNCaP.....	93
Abbildung 4-23 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron verursacht die Akkumulation von DNA-Schäden in den androgensensitiven PCa-Zelllinien.....	94
Abbildung 4-24 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie DU-145.....	95
Abbildung 4-25 Repräsentative Aufnahmen der behandlungsinduzierten DNA-Schäden der Zelllinie PC-3.....	96
Abbildung 4-26 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron verursacht die Akkumulation von DNA-Schäden in den androgenunabhängigen PCa-Zelllinien.....	97
Abbildung 4-27 Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung für AR, CycK und CDK12 im PCa-Gewebe.....	99
Abbildung 4-28 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron induziert die Caspase-3-Spaltung und vermindert die Ki67-Positivität im <i>ex vivo</i> -Gewebekulturmodell.....	100
Abbildung 4-29 Individuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung der gespaltenen Caspase-3 des Patientenkollektivs im <i>ex vivo</i> -Gewebekulturmodell (n=12).....	101
Abbildung 4-30 Individuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung der gespaltenen Caspase-3 des Patientenkollektivs im <i>ex vivo</i> -Gewebekulturmodell (n=6).....	102
Abbildung 4-31 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron induziert Apoptose im <i>ex vivo</i> -Gewebekulturmodell.....	103
Abbildung 4-32 Individuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung von Ki67 des Patientenkollektivs im <i>ex vivo</i> -Gewebekulturmodell (n=12).....	104
Abbildung 4-33 Individuelle Analyse der immunhistochemischen Färbung von Ki67 des Patientenkollektivs im <i>ex vivo</i> -Gewebekulturmodell (n=6).....	105
Abbildung 4-34 Die kombinierte Behandlung mit THZ531 und Enzalutamid oder Abirateron beeinträchtigt die Proliferation im <i>ex vivo</i> -Gewebekulturmodell.....	106
Abbildung 4-35 Der Anti-CDK12-Antikörper zeigt ein spezifisches immunreaktives Signal in FFPE-Zellpellets der PCa-Zelllinien.....	108
Abbildung 4-36 Der Anti-CDK12-Antikörper zeigt ein spezifisches immunreaktives Signal im PCa-Gewebe.....	109
Abbildung 4-37 Repräsentative Darstellung der unterschiedlichen CycK-Expressionslevel im PCa-TMA.....	111
Abbildung 4-38 Repräsentative Darstellung der unterschiedlichen CDK12-Expressionslevel im PCa-TMA.....	112
Abbildung 4-39 Eine erhöhte Expression von CycK ist mit einem aggressiveren Tumorphänotyp assoziiert.....	113
Abbildung 4-40 Die CDK12-Expression zeigt keine eindeutige Korrelation mit den klinisch-pathologischen Merkmalen.....	114
Abbildung 4-41 Die CycK- und CDK12-Expression ist in den Metastasen und <i>high-grade</i> PINs des TMA-Kollektivs erhöht.....	117

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 TNM-Klassifikation des PCas [56, 57].	11
Tabelle 2-1 Ursprung der PCa-Zelllinien.	28
Tabelle 2-2 Charakterisierung der verwendeten PCa-Zelllinien [200-202].	28
Tabelle 2-3 Oligonukleotide, die zur siRNA-vermittelten Reduktion der Genexpression verwendet wurden.	30
Tabelle 2-4 Oligonukleotide, die als Primer für die qRT-PCR verwendet wurden.	30
Tabelle 2-5 Primärantikörper, die in der Immunblot-Analyse (IB), Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF) eingesetzt wurden.	31
Tabelle 2-6 Inhibitoren.	36
Tabelle 2-7 Kits.	36
Tabelle 2-8 Verwendete Reagenzien.	37
Tabelle 2-9 Verwendete Verbrauchsmaterialien.	39
Tabelle 2-10 Verwendete Apparate und Geräte.	40
Tabelle 2-11 Verwendete Software.	41
Tabelle 3-1 Stammlösungs- und Endkonzentration der verwendeten Inhibitoren.	43
Tabelle 3-2 Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese.	45
Tabelle 3-3 Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.	45
Tabelle 3-4 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die qRT-PCR.	47
Tabelle 3-5 Temperaturprogramm der qRT-PCR.	47
Tabelle 3-6 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der SDS-Polyacrylamid-Gele.	50
Tabelle 4-1 Klinische und pathologische Informationen des Patientenkollektivs des <i>ex vivo</i> -Modells (n=12).	98
Tabelle 4-2 Zusammenfassung der klinischen und pathologischen Daten des TMA-Kollektivs (n=300).	110
Tabelle 4-3 Korrelation der CycK- und CDK12-Expression mit den klinisch-pathologischen Merkmalen des TMA-Kollektivs (n=300).	115
Tabelle 4-4 Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Daten der PCa-Patienten des TMA-Kollektivs mit Metastasen (n=34).	116
Tabelle 4-5 Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Daten der PCa-Patienten des TMA-Kollektivs mit <i>high-grade</i> PINs (n=21).	116

7.3 Veröffentlichungen

Folgende Publikation ist aus dieser Arbeit hervorgegangen:

Frei K., Schecher S., Daher T., Hörner N., Richter J., Hildebrand U., Schindeldecker M., Witzel HR., Tsaur I., Porubsky S., Gaida MM., Roth W., Tagscherer KE. (Epub 2023). Inhibition of the Cyclin K-CDK12 complex induces DNA damage and increases the effect of androgen deprivation therapy in prostate cancer. *International Journal of Cancer*. 2024; 154 (6): 1082-1096. doi: 10.1002/ijc.34778.

DANKSAGUNG

EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Katharina Maria Frei, geboren am 19.10.1991 in Lindenfels, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Cyclin K-CDK12/CDK13-Komplexe im Prostatakarzinom - Prognostische Bedeutung und Therapierelevanz-“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlichen und sinngemäßen Zitate sind als solche gekennzeichnet. Ich versichere außerdem, dass meine Dissertation bei keiner anderen Stelle veröffentlicht oder in anderer Form als Prüfungsleistung vorgelegt wurde.

Mainz, den

(Katharina Maria Frei)