

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Stefan Frantz

**Sterol O-Acyltransferasen als Zielmoleküle in der  
Tumorthherapie sowie die klinische Relevanz ihrer Expression  
beim Prostatakarzinom**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Carolin Eckhardt

aus Filderstadt

Würzburg, Dezember 2020

Referent/Referentin: Prof. Dr. Dr. Matthias Kroiß

Koreferent/Koreferentin: Prof. Dr. Hubert Kübler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2021

Die Promovendin ist Ärztin.

Allen Lieben, die mein Leben bereichern.

**Inhaltsverzeichnis**

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Kennzeichen und metabolische Anpassungen von Tumorzellen .....	1
1.1.1 Hallmarks of Cancer – Kennzeichen von Tumorzellen .....	1
1.1.2 Die Warburg-Hypothese .....	3
1.1.3 Anpassungen des Lipidstoffwechsels .....	4
1.1.4 Gründe für die metabolischen Anpassungen von Tumorzellen .....	6
1.2 Zielmoleküle in der Tumorthherapie .....	7
1.3 Funktion und Lokalisation von SOAT1 bzw. SOAT2 .....	9
1.4 Verwendung und Eigenschaften bestimmter SOAT-Inhibitoren .....	11
1.5 Prostatakarzinom .....	14
1.6 Fragestellungen und Zielsetzung dieser Arbeit .....	19
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Material .....	20
2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen .....	20
2.1.2 Zellkulturmedien .....	21
2.1.3 Puffer für die Protein-Analytik .....	22
2.1.4 Antikörper und Plasmide .....	22
2.1.4.1 Primärantikörper .....	22
2.1.4.2 Sekundärantikörper .....	22

2.1.4.3	Plasmide.....	22
2.1.5	Gebrauchsfertige Kits.....	23
2.1.6	Genexpressionsproben .....	23
2.1.7	Routinematerialien.....	23
2.1.8	Geräte .....	24
2.2	Methoden .....	25
2.2.1	Zellkultur.....	25
2.2.1.1	Auswahl der Zelllinien.....	25
2.2.1.2	Routinearbeiten der Zellkultur.....	26
2.2.1.3	Transiente Transfektion von AD-293 Zellen .....	27
2.2.1.4	Inkubation der Zellen mit fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin und SOAT-Inhibitoren.....	27
2.2.2	RNA-Analytik .....	28
2.2.2.1	RNA-Isolierung .....	28
2.2.2.2	Reverse Transkription .....	29
2.2.2.3	Real-Time-PCR .....	29
2.2.3	Protein-Analytik .....	31
2.2.3.1	Gewinnung von Proteinproben .....	31
2.2.3.2	BCA Protein Assay .....	32
2.2.3.3	Probenvorbereitung .....	32

2.2.3.4	Gelelektrophorese .....	33
2.2.3.5	Westernblot .....	33
2.2.3.6	Immunodetektion der transferierten Proteine und Entwicklung des Westernblots .....	33
2.2.4	Nachweis und Quantifizierung von Cholesterinester mittels Dünnschichtchromatographie.....	34
2.2.4.1	Vorbereitung der Proben .....	35
2.2.4.2	Durchführung der Dünnschichtchromatographie .....	35
2.2.4.3	Auswertung der Dünnschichtchromatographie .....	36
2.2.5	Immunhistochemische Detektion der SOAT Expression im Hochrisiko Prostatakarzinom.....	37
2.2.5.1	Verwendetes Patientenmaterial und klinische Daten.....	37
2.2.5.2	Immunhistochemie für Paraffinschnitte.....	40
2.2.5.3	Auswertung und Score-Einteilung .....	41
2.2.6	Software/Statistik.....	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1	Etablierung eines <i>in-vitro</i> Assays zur Untersuchung der SOAT katalysierten Veresterung von Cholesterin.....	44
3.1.1	Bestimmung einer geeigneten Plasmid-Menge und Transfektionsdauer für die Transfektion der AD-293 Zellen .....	44
3.1.2	Mikroskopische Detektion der SOAT katalysierten Cholesterinester-Bildung .....	48

3.1.2.1	Cholesterinester-Bildung ohne SOAT-Inhibitoren (Kontrolle) ...	48
3.1.2.2	Cholesterinester-Bildung bei SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen 50	
3.1.2.3	Cholesterinester-Bildung bei NCI-H295R Zellen .....	51
3.1.3	Nachweis der gebildeten Cholesterinester mittels Dünnschichtchromatographie.....	52
3.2	IC <sub>50</sub> -Bestimmung der SOAT-Inhibitoren Mitotane, Sandoz58-035, ATR101 und AZD3988 .....	54
3.3	SOAT Expression in Prostatakarzinomzellen in Korrelation zu klinischen Parametern bei Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten .....	58
3.3.1	Immunhistochemische Detektion von SOAT1 und SOAT2.....	58
3.3.2	Korrelation zwischen der SOAT Expression und dem biochemischen Progress bei Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom .....	59
3.3.3	Korrelation zwischen der SOAT Expression und dem klinischen Progress bei Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom .....	63
3.3.4	Korrelation zwischen der SOAT Expression und dem Gesamtüberleben bei Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom ..	64
3.3.5	Korrelation zwischen der SOAT Expression und dem Gleason-Score 65	
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
4.1	Methodendiskussion.....	66
4.1.1	<i>In-vitro</i> Fluoreszenz-Assay zur Untersuchung der SOAT-Aktivität .	66

4.1.2	Bestimmung der Hemmstärken ausgewählter SOAT-Inhibitoren mittels Dünnschichtchromatographie .....	68
4.1.3	Alternative Möglichkeiten zur Quantifizierung der SOAT-Aktivität ..	70
4.2	Diskussion der Relevanz der SOAT Expression in Hochrisiko Prostatakarzinomen .....	70
4.2.1	SOAT1 Expression im Zusammenhang mit biochemischen bzw. klinischen Parametern .....	72
4.2.2	SOAT2 Expression im Zusammenhang mit biochemischen bzw. klinischen Parametern .....	74
4.2.3	Diskussion weiterer Parameter und deren Korrelation mit einer Progression beim Hochrisiko Prostatakarzinom .....	75
4.2.4	Diskussion der Rolle von SOAT1 als potenziell prognostischer molekularer Marker beim Hochrisiko Prostatakarzinom .....	77
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>82</b>
6.1	ER-Stress durch intrazellulär freies Cholesterin .....	82
6.2	Chromatographische Darstellung der Cholesterinester-Abnahme in SOAT-Inhibitor behandelten NCI-H295R Zellen.....	83
6.3	Patientencharakteristika von Karlsruhe und Leuven im Vergleich .....	86
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>87</b>
<b>I.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>102</b>
<b>II.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>104</b>

<b>III. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>IV. Danksagung.....</b>	<b>108</b>
<b>V. Veröffentlichungen.....</b>	<b>109</b>

## 1. Einleitung

---

### 1.1 Kennzeichen und metabolische Anpassungen von Tumorzellen

#### 1.1.1 Hallmarks of Cancer – Kennzeichen von Tumorzellen

Im Jahr 2000 veröffentlichten Hanahan und Weinberg die „Hallmarks of Cancer“, in denen sie Grundlagen der Transformation von normalen Zellen in maligne Zellen beschreiben. Sie sehen genetische Alterationen, welche zu defekten Regelkreisen und einer damit verbundenen gestörten Proliferation sowie Homöostase führen, als ursächlich für die maligne Transformation von Zellen und deren Metabolismus an. Schließlich legen sie nahe, dass die zahlreichen Genveränderungen durch sechs essenzielle Modifizierungen in Zellabläufen bedingt sind, welche in nahezu allen Tumortypen in einem mehrschrittigen Prozess mit unterschiedlichen Mechanismen während der Tumorgenese entfaltet werden und schließlich in Malignität resultieren [1].

Als erstes Kennzeichen wird die Fähigkeit von Krebszellen, ein *eigenständiges Wachstumssignal* zu regenerieren, genannt. Durch eine Überexpression von Transmembranproteinen mit Wachstumsrezeptorfunktion bzw. veränderte Signalkaskaden im Zellinneren, welche das äußere Signal übersetzen, schaffen transformierte Zellen so eine Unabhängigkeit von der Zellumgebung und führen zu einer Störung der Homöostase im benachbarten Gewebe.

Das zweite Kennzeichen beinhaltet das *Nicht-Ansprechen auf wachstumshemmende Signale*. So ist eine Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins (pRb), welches in seiner aktiven Form als Wachstumssuppressor Transkriptionsfaktoren bindet, diese inhibiert und damit das Voranschreiten des Zellzyklus verhindert, mit einer unkontrollierten Zellteilung verbunden.

Als drittes Kennzeichen von Tumorzellen wird das *Umgehen des programmierten Zelltodes (Apoptose)* aufgeführt. Während bei normalen Körperzellen die Apoptose bei DNA-Schäden, Hypoxie oder gestörten Zellsignalen eingeleitet wird, sorgt in Tumorzellen eine Mutation des

Tumorsuppressors p53 („Hüter des Genoms“) oder die Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs zu einem Verlust der proapoptotischen Regulierung. Der Zellzyklus wird somit nicht unterbrochen, entartete Zellen entgehen dem programmierten Zelltod und können ungehindert proliferieren.

Die vierte Fähigkeit beschreibt das *unbeschränkte Replikations-Potenzial*. In normalen Zellen existiert ein zellinternes Programm, das die Zellteilung reguliert. Ein fortwährender Verlust nicht kodierender, repetitiver endständiger DNA-Elemente in jedem Zellzyklus verhindert, dass die DNA-Polymerase DNA-Stränge unbeschränkt replizieren kann, wodurch die Lebenszeit von Zellen kontrolliert wird. Dieser zelluläre Schutzmechanismus fehlt in proliferierenden Zellen insofern, als das Enzym Telomerase die Verkürzung der Telomer-DNA verhindert und somit eine Chromosomen-Instabilität mit sich bringt.

Das fünfte Markenzeichen ist die *anhaltende Angiogenese*, welche für ein beständiges Sauerstoff- und Nährstoffangebot sorgt. Transkriptionsveränderungen verursachen eine Gleichgewichtsverschiebung zugunsten von Angiogenese induzierenden Faktoren. Die Aktivierung des Protoonkogens Ras z.B. bewirkt über den Ras/Raf/MAPK-Signalweg eine vermehrte Expression des Endothelwachstumsfaktors VEGF und durch den Verlust von p53 verliert der Tumorsuppressor Thrombospondin-1 seine antiproliferative Wirkung. Die daraus resultierende Neovaskularisation begünstigt eine rasche klonale Expansion.

Das sechste Kennzeichen umfasst die Fähigkeit zur *Gewebeinvasion und Metastasierung*, welches durch Veränderungen von Proteinen, die zum Zusammenhalt der Zellen und ihrer Umgebung beitragen (CAMs, Cadherine, Integrine) sowie der Hochregulierung extrazellulärer Proteasen begünstigt wird [1].

Hanahan und Weinberg postulieren, dass durch die vielfältigen genetischen Veränderungen in Tumorzellen eine Instabilität des Genoms mit Defekten in Erkennungsmechanismen von DNA-Schäden, Reparatursystemen als auch der Inaktivierung kanzeröser Zellen hervorgerufen wird [1]. Einige Jahre später diskutierten sie die Rolle zweier weiterer „Hallmarks of Cancer“. Zum einen die sich von der nachfolgend aufgeführten Warburg-Hypothese ableitende

*Umprogrammierung des Energie-Metabolismus* und zum anderen die Fähigkeit, der Detektion und *Zerstörung durch Immunzellen zu entfliehen*. Eine Funktionseinschränkung von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und natürlichen Killerzellen ist demnach mit einer erhöhten Tumorzinzidenz verbunden. Gleichzeitig gibt es aber auch Hinweise, dass eine chronische Inflammation durch die Abgabe verschiedenster Signalmoleküle durch Immunzellen die Tumorprogression begünstigt [2].

### **1.1.2 Die Warburg-Hypothese**

Bereits weit mehr als vor einem halben Jahrhundert beschäftigte sich der deutsche Arzt, Biochemiker und Physiologe Otto Heinrich Warburg mit den Stoffwechselfvorgängen in Tumoren [3, 4]. So fand er heraus, dass Tumorzellen trotz eines ausreichenden Sauerstoffangebots durch eine veränderte Energiegewinnung vermehrt Laktat produzieren. Laut seiner „Warburg-Hypothese“ wird die verstärkt aufgenommene Glukose nicht wie bei gesunden Zellen aerob verstoffwechselt und schließlich der oxidativen Phosphorylierung zugeführt, sondern das entstehende Pyruvat in Laktat umgewandelt. ATP wird also durch eine fortlaufende Glykolyse in den transformierten Zellen regeneriert, was einerseits schneller, andererseits jedoch sehr viel ineffizienter als bei der aeroben Verstoffwechslung abläuft. Diese sogenannte „aerobe Glykolyse“ erklärte Warburg mit einer Funktionsstörung der Mitochondrien, welche er als Ursache für die Entstehung von Tumoren betrachtete [5, 6]. Zahlreiche Jahre und viele wissenschaftliche Arbeiten später wird auch heute noch über die Bedeutung der Warburg-Hypothese diskutiert [7, 8]. Da Mitochondriendefekte selten, jedoch nicht ausgeschlossen sind, versucht man den veränderten Glukosestoffwechsel von Tumorzellen z.B. als Anpassung an die hypoxischen Zustände in der frühen Tumorgenese zu erklären. Ebenso könnten die Zellen den durch den hohen Substratfluss während der Glykolyse anfallenden Kohlenstoff als Ausgang weiterer Biosyntheseschritte nutzen, was durchaus vorteilhaft wäre [9]. Wengleich die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, scheinen Veränderungen in den Genen, welche für p53, MYC sowie HIF-1 kodieren, entscheidend für diese metabolische Anpassungen von Tumorzellen

zu sein [10]. Kliniker machen sich diesen erhöhten Glykolysestoffwechsel in Tumorzellen zu Nutze, indem sie mittels  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucose PET Imaging (FDG-PET) Tumore erfassen und eine Therapieplanung erstellen können [11].

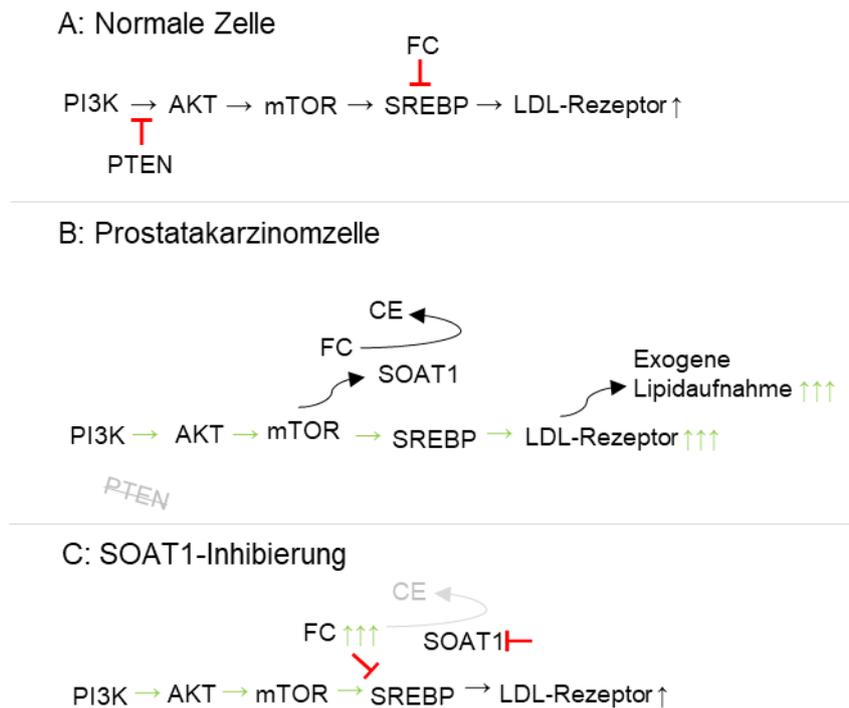
### 1.1.3 Anpassungen des Lipidstoffwechsels

Neben der wohl am bekanntesten und besten erforschten Warburg-Hypothese gibt es eine Reihe weiterer metabolischer Anpassungen von Tumorzellen, darunter vor allem Änderungen im Lipidstoffwechsel. Unter dem Begriff „Lipide“ versteht man eine heterogene Gruppe von Stoffen, welche fettlöslich sind. Sie haben eine Vielzahl an Funktionen in unserem Körper, so sind sie in Form von Cholesterin Bestandteil von Membranen, stehen als *Lipid droplets* zur Energiespeicherung und -bereitstellung zur Verfügung oder nehmen wichtige Rollen in den Zellsignalketten in Form von Hormonen ein. Man unterscheidet Lipide, die aus einfachen Fettsäuren aufgebaut sind von solchen, die Glycerin, Sphingosin oder Isopren als Grundbaustein haben [12]. In vielen Tumorzellen sind nun die Lipid-de-novo-Synthese sowie die Cholesterinbiosynthese durch die Überexpression sogenannter SREBPs (Sterol regulatory element-binding proteins) stark aktiviert. Diese regulieren die an dieser Biosyntheseketten beteiligten Gene [13]. Die neu synthetisierten Cholesterinester und Triacylglyceride werden daraufhin in intrazellulären Zellstrukturen, den *Lipid droplets*, verlagert. Es gibt schließlich Hinweise, dass auch der umgekehrte Weg der Lipolyse in einigen neoplastischen Geweben verstärkt betrieben wird, um die Zellen bei Bedarf mit den gespeicherten Lipiden auszustatten [14]. Die vielfältigen Aufgaben und Funktionen von Lipiden sind Gründe für den gesteigerten Lipidmetabolismus von Tumorzellen. So können transformierte Zellen das Zellwachstum durch intensive Membransynthesen vorantreiben, während Phasen von Energieknappheit mittels Lipolyse und darauffolgender  $\beta$ -Oxidation der in *Lipid droplets* gespeicherten Lipide überleben oder durch die gesteigerte Bildung von Lipiden mit Signalfunktion die Zellinvasion und -kommunikation aufrechterhalten. Darüber hinaus dient das bei der Fettsäuresynthese anfallende Redoxcoenzym NADP<sup>+</sup> als Elektronenfänger und stabilisiert den Redoxstatus der Zellen [13]. Da bei der Fettsäuresynthese vor

allem gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren produziert werden, schützen sich die Tumorzellen vor einer ausgeprägten Lipidperoxidation, welche bevorzugt an durch die Nahrung aufgenommenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren stattfindet. Sie bauen durch das Verschieben des Gleichgewichtes zugunsten der gesättigten Fettsäuren somit eine Resistenz gegen die bei diesem Vorgang gebildeten Radikale und der damit verbundenen Membranschädigung auf [15, 16].

Yue et al. untersuchten den Lipidmetabolismus in Prostatakarzinomzellen und stellten eine starke Cholesterinester-Akkumulation in Form von *Lipid droplets* in diesen Zellen fest [17]. Diese Beobachtung beschränkte sich auf neoplastische Zellen, denn in normalem Drüsengewebe der Prostata, Gewebeproben einer benignen Prostata Hyperplasie sowie einer Prostatitis oder präkanzerösen epithelialen Veränderungen konnte eine solche Akkumulation nicht beobachtet werden. Als potenziell wesentliche Ursache dieser mit einer erhöhten Tumoraggressivität verbundenen Stoffwechseleränderung scheint der Verlust von PTEN, einer Phosphatase mit Tumorsuppressorfunktion, mit daraus resultierender Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges und abschließender Überexpression von SREBP eine zentrale Rolle zu spielen [18, 19]. So zeigte sich, dass in gesunden Prostataadrüsenzellen die Aktivierung der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade durch PTEN verhindert wird und freies Cholesterin in den Zellen die SREBP Aktivität unterdrückt (Abbildung 1A). Hingegen sorgt der Verlust von PTEN in Prostatakarzinomzellen für die Hochregulierung von SREBP und damit verbunden eine gesteigerte Lipidsynthese [20]. Die von den Zellen durch vermehrte Expression von LDL-Rezeptoren aufgenommenen Lipide beinhalten essenzielle Fettsäuren, welche die Tumorproliferation und -invasion unterstützen sowie freies Cholesterin, welches von Sterol O-Acyltransferasen (SOAT) zu Cholesterinestern umgewandelt und in *Lipid droplets* gelagert wird (Abbildung 1B). Letztlich konnten die Autoren zeigen, dass durch die Inhibierung von SOAT eine reduzierte Cholesterinester-Bildung sowie eine daraus resultierende Anhebung des freien Cholesterin-Spiegels in den Zellen, zu einer Abnahme der Tumorzellproliferation und -aggressivität führt (Abbildung 1C) [17, 21].

Durch die große Menge an freiem Cholesterin nach SOAT-Inhibition kommt es nach diesem Modell zu einer starken Einschränkung der SREBP-Aktivität und folglich sinkt die Aufnahme wichtiger ungesättigter Fettsäuren, welche das Tumorwachstum aufrechterhalten [22, 23]. Zum anderen gibt es Hinweise, dass das freie Cholesterin toxischen Stress verursacht und folglich die Apoptose der Tumorzellen herbeiführt (siehe 6.1).



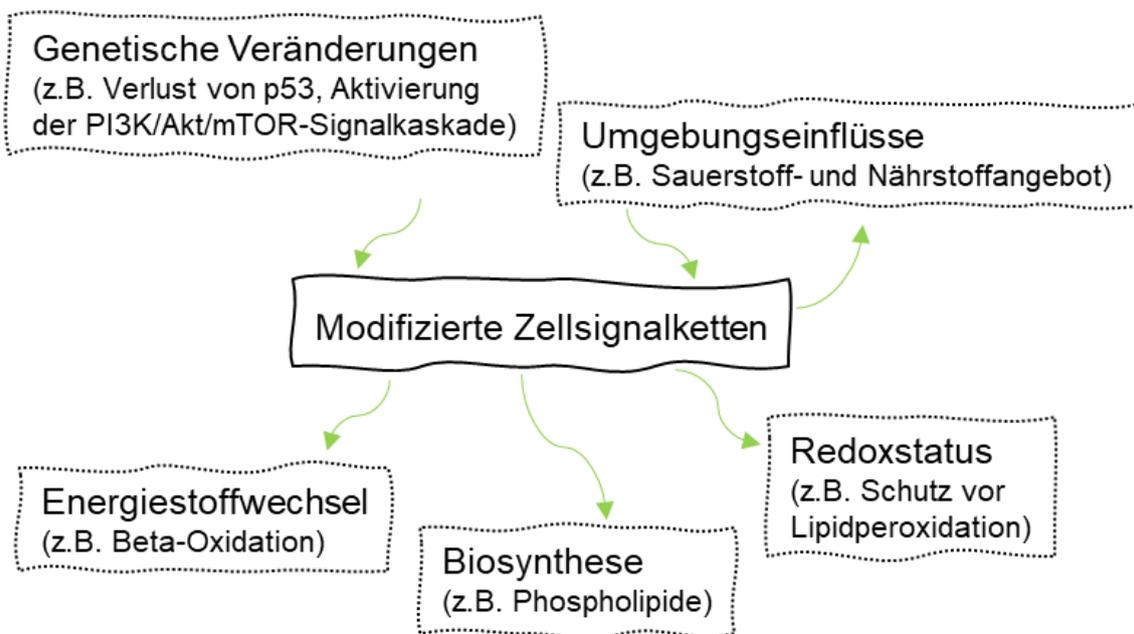
**Abbildung 1: Die PI3K/Akt/mTOR-abhängige SREBP-Aktivität reguliert die Lipidaufnahme und anschließende Veresterung in Prostatakarzinomzellen**

**A** In normalen Prostatakarzinomzellen inhibiert PTEN die Signalkette und freies Cholesterin (FC) wiederum die SREBP Aktivität. **B** In Prostatakarzinomzellen wird durch den PTEN-Verlust SREBP kontinuierlich aktiviert, was zu einer vermehrten Lipidaufnahme (essenzielle Fettsäuren) durch LDL-Rezeptoren führt, welche das Tumorwachstum fördern. SOAT1 verestert freies Cholesterin zu Cholesterinester (CE). **C** Die SOAT1-Inhibierung verhindert die Cholesterinveresterung und unterdrückt somit die SREBP Aktivität sowie das Tumorwachstum. Eigene Darstellung, modifiziert nach [21].

#### 1.1.4 Gründe für die metabolischen Anpassungen von Tumorzellen

Festzuhalten ist, dass die Tumorgenese nicht auf einzelne Faktoren beschränkt werden kann, vielmehr führt eine Vielzahl genetischer Veränderungen von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen zu modifizierten Signalwegen

innerhalb von Zellen, welche wiederum eine Änderung des Wachstums, der Teilung und des Metabolismus dieser Zellen und somit eine Tumorentstehung nach sich ziehen können. Neben Veränderungen auf genetischer Ebene sind proliferierende Zellen auch äußeren Umgebungseinflüssen, wie etwa dem Sauerstoffgehalt oder dem Nährstoffangebot ausgesetzt. Die oben aufgeführten Beispiele für metabolische Anpassungen von Tumorzellen ermöglichen es ihnen unter anderem, ihre Grundbedürfnisse zu decken sowie ihr Überleben zu sichern, indem sie eine ausreichende Energiegewinnung und eine gesteigerte Biosyntheserate um Wachstum und Proliferation sichern sowie reaktive Sauerstoffspezies im Gleichgewicht halten (Redoxstatus) (Abbildung 2) [9].



**Abbildung 2: Einflüsse auf die metabolische Anpassung von Tumorzellen**

Genetische Veränderungen führen zu Änderungen in Zellsignalketten, welche wiederum das Zellwachstum und -überleben beeinflussen. Ebenso führen äußere Zelleinflüsse zur Anpassung des Metabolismus von Tumorzellen. Letztere versuchen damit ihren Energiehaushalt zu decken und die Biosyntheserate anzukurbeln, um Wachstum und Proliferation zu erzielen sowie einen ausgeglichenen Redoxstatus sicherzustellen. Eigene Darstellung, modifiziert nach [9].

### 1.2 Zielmoleküle in der Tumorthherapie

„Targeted therapies“ - molekular zielgerichtete Krebstherapien spielen heute aufgrund der führenden Todesursache „Krebs“ eine bedeutende Rolle. Diese

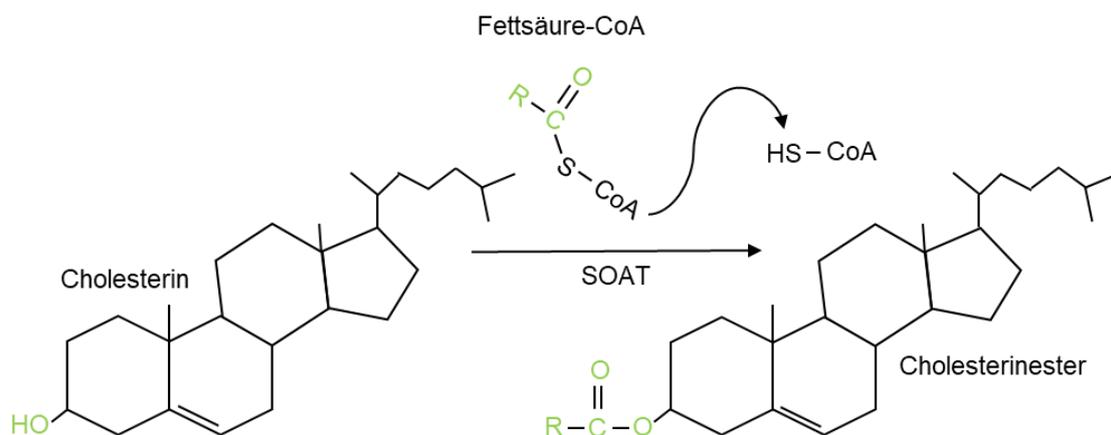
Therapieformen umfassen im Gegensatz zur herkömmlichen Chemotherapie Medikamente, die mit bestimmten Molekülen interferieren, welche das Tumorwachstum, die Proliferation und die damit verbundene Tumoraggressivität bedingen. Man unterscheidet hierbei monoklonale Antikörper, welche an ein einzelnes Epitop am Zelläußeren der Tumorzellen binden und die Funktion des Zielmoleküls hemmen von niedermolekularen Verbindungen. Letztere können die Zellmembran der Zielzellen passieren und z.B. spezifische Enzyme, die an wichtigen Tumorsignalketten beteiligt sind, inhibieren [24]. Die Entwicklung solcher Medikamente, die mit großer Genauigkeit und einem gleichzeitig geringen Nebenwirkungsprofil Krebszellen zerstören, erfordert das Verständnis der molekularen Grundlage der Tumorzellentstehung. Auf diese Weise konnten bisher zahlreiche vielversprechende Medikamente auf den Markt gebracht werden [25].

SOAT1 wurde erst in jüngerer Zeit als Zielmolekül von Krebstherapien entdeckt. Seine Rolle als zentrales Enzym des Cholesterinmetabolismus lässt es allerdings als ein potenziell bedeutendes Target in der Therapie verschiedener Tumorerkrankungen erscheinen. In Versuchen mit SOAT1 exprimierenden Glioblastomzellen zeigte sich, dass der SOAT-Inhibitor Avasimib das Zellwachstum dieser malignen Zellen hemmt, indem ein Zellzyklusarrest herbeigeführt wird [26]. Erst kürzlich konnte SOAT1 außerdem als möglicherweise vielversprechendes therapeutisches Target in der Therapie bestimmter Untergruppen des Hepatozellulären Karzinoms postuliert werden - die Herunterregulierung von SOAT1 durch Avasimib resultierte in der Arbeit von Jiang et al. signifikant mit einer reduzierten Proliferation der Tumorzellen [27]. Ebenso konnte durch eine Untersuchung von Patientenproben mit chronisch lymphatischer Leukämie SOAT1 als vielversprechende Zielstruktur in der Tumorthherapie ermittelt werden. Maligne Zellen mit einem hohen Spiegel an Cholesterinestern und einer geringen Konzentration an freiem Cholesterin konnten durch Inkubation mittels zweier SOAT-Inhibitoren vergleichbar in ihrer Proliferation eingeschränkt werden, wie dies durch den Proliferationsinhibitor Everolimus mit m-TOR als molekulares Target möglich war [28]. Des Weiteren konnte die gesteigerte Proliferation von Östrogenrezeptor-positiven

Brustkrebszellen mit einer vermehrten SOAT1 Expression und *Lipid droplet* Formation in Verbindung gebracht werden. Folglich zeigte sich erneut eine Proliferationshemmung durch die Anwendung des SOAT-Inhibitors CP-113,818 in *ex vivo* kultivierten Tumorzellen [29]. Wie bereits oben erwähnt führte die Inhibition von SOAT mit Avasimib bzw. Sandoz58-035 zu einer Abnahme der Cholesterinester-Akkumulation und reduzierte zudem auch die Aggressivität von untersuchten Prostatakarzinomzellen [17]. Und auch in sehr aktuellen Arbeiten wurde SOAT1, welches als Marker für Aggressivität und unabhängiger Prognosefaktor im Nebennierenrindenzellkarzinom herausgearbeitet wurde [30], in einer klinischen Phase-I-Studie getestet, wenn auch bislang ohne bedeutsame Wirksamkeit [31]. Diese Beispiele verdeutlichen den potenziellen Stellenwert von SOAT1 als molekulares Target in der Tumorthherapie und geben Hoffnung, die Entwicklung solcher Medikamente weiter voranzutreiben.

### 1.3 Funktion und Lokalisation von SOAT1 bzw. SOAT2

Das membrangebundene Enzym Sterol O-Acyltransferase (SOAT), welches auch unter dem Namen Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) bekannt ist, besitzt eine Schlüsselrolle im zellulären Cholesterinmetabolismus. Es katalysiert die Veresterung von langkettigem Acyl-CoA und Cholesterin (Abbildung 3).

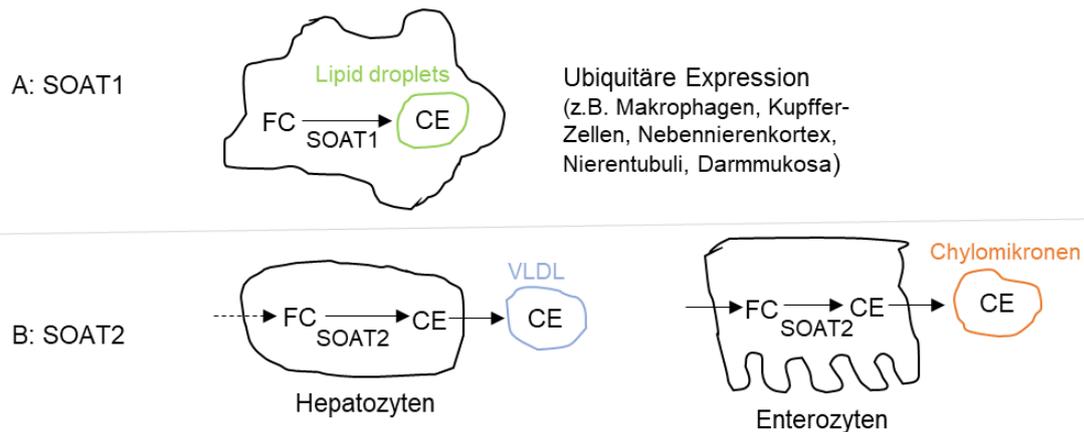


**Abbildung 3: SOAT katalysiert die Veresterung von freiem Cholesterin**

Die polare Hydroxygruppe (-OH) von Cholesterin am C-Atom 3 wird mit einer aktivierten Fettsäure (Fettsäure-CoA) zum Cholesterinester verestert. Eigene Darstellung.

Zellen speichern Cholesterin in Form von Cholesterinestern in bestimmten Zellorganellen, den *Lipid droplets*, während Cholesterin im Plasma als Bestandteil von Lipoproteinen zirkuliert. So dient Cholesterin Steroidgeweben wie der Nebenniere der Produktion wichtiger Steroidhormone [32, 33]. Es existieren zwei Isoformen von SOAT, deren kodierenden Gene vor einigen Jahren isoliert werden konnten [34, 35]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Gewebeverteilung sowie Membranlokalisation wird den Enzymen eine jeweils spezifische Funktion zugesprochen. Die genaue differenzielle Expression ist Gegenstand von Diskussionen. SOAT1 ist in vielen Geweben und diversen Zelltypen vertreten und weist eine relativ konstante Enzymaktivität auf. So wird es z.B. in Kupffer-Zellen der Leber, in Becherzellen, Makrophagen sowie Paneth-Körnerzellen der Darmmukosa, im Kortex der Nebenniere oder in den distalen Nierentubuli exprimiert. Im Gegensatz zur ubiquitären SOAT1 Expression wird SOAT2 nur in bestimmten Geweben und einer sehr variablen Enzymaktivität exprimiert. Man findet es vor allem in Hepatozyten der Leber sowie dem oberen Drittel der Dünndarmmukosa [36]. Nachdem frühere experimentelle Untersuchungen die Existenz von fünf bzw. sieben Transmembrandomänen postulierten [37, 38], gibt es nun Hinweise, dass sich SOAT1 mit neun Transmembrandomänen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) erstreckt und ein His-Rest vermeintlich entscheidend für die Enzymaktivität ist [39].

Wenngleich sich die Nukleotidsequenzen der Gene für SOAT1 und SOAT2 in etwa 50% gleichen [40], weisen die beiden Isoenzyme unterschiedliche Enzymfunktionen auf. SOAT1 hat die Aufgabe, überschüssiges Cholesterin in Zellen zu verestern, welches daraufhin in zytoplasmatischen *Lipid droplets* gespeichert wird. Es sorgt also für eine intrazelluläre Cholesterinhomöostase in vielen Zelltypen. SOAT2 dahingegen stellt in Hepatozyten Cholesterinester für den VLDL-Zusammenbau bereit und sorgt für die intestinale Cholesterinabsorption sowie den nachfolgenden Zusammenbau von Chylomikronen. Es koppelt also die Cholesterinester-Produktion für den anschließenden Aufbau sowie die Sekretion von Apo-B-Lipoproteinen an (Abbildung 4) [41].



**Abbildung 4: Funktion und Zelllokalisierung von SOAT1 und SOAT2**

**A** SOAT1 katalysiert in vielen Geweben und Zelltypen die Veresterung von freiem Cholesterin (FC) zu Cholesterinestern (CE) und sorgt somit für eine intrazelluläre Cholesterinhomöostase. **B** SOAT2 kommt hauptsächlich in Hepatozyten der Leber und in der Mukosa von Dünndarmzellen vor. Dort koppelt es die Bereitstellung und Sekretion von Lipoproteinen (VLDL, Chylomikronen). Eigene Darstellung.

#### 1.4 Verwendung und Eigenschaften bestimmter SOAT-Inhibitoren

Die Entdeckung und Erkenntnis der Rolle der beiden SOAT-Isoenzyme im Cholesterinmetabolismus versucht man sich in der Medizin seit einiger Zeit zu Nutze zu machen, indem man die Entwicklung von SOAT-Inhibitoren vorantreibt. Man ist bestrebt, damit Volkskrankheiten wie die KHK zu reduzieren, Alzheimer zu behandeln [42] oder Tumorerkrankungen effektiv zu therapieren (1.2). Es wird viel über die mögliche Anwendung von SOAT-Inhibitoren bei der Bekämpfung der Atherosklerose diskutiert, mit dem Ziel, hohe Cholesterin-Plasmaspiegel zu senken und die Entstehung transformierter Makrophagen (Schaumzellen) mit begleitender massiver Lipidakkumulation in Arterienwänden zu verlangsamen [32, 43-45]. SOAT2-spezifische Inhibitoren betrachtet man als vielversprechende Targets um das Atheroskleroserisiko zu reduzieren, da durch deren Anwendung in Modellversuchen Hypercholesterinämien effektiv gesenkt und durch die dennoch uneingeschränkte SOAT1 Funktion in den meisten Körperzellen eine normale Membranfunktion und Zellhomöostase aufrechterhalten werden konnte [41, 46-49]. Daneben entwickelte man auch SOAT1-spezifische Inhibitoren, welche durch die reduzierte Schaumzellbildung Plaque-modulierende Effekte mit sich brachten und folglich bei der frühen Atheroskleroseentstehung eingreifen

könnten [50]. Jedoch gab es auch gegensätzliche Befunde, wonach SOAT-Inhibitoren das Plaque-Volumen und die Atherosklerose beim Menschen förderten. Schließlich ist es in einer klinischen Studie der Phase III nicht gelungen, mit dem SOAT-Inhibitor Pactimib Surrogatparameter der Atherosklerose günstig zu beeinflussen, sodass diese Strategie letztlich nicht weiter verfolgt wurde [51]. Demzufolge erfordert es wohl noch einige weiterführende Versuche und die Entwicklung weiterer spezifischer Inhibitoren, um dieses Vorhaben zu verwirklichen.

Mitotane hat bei der Behandlung des mit einer äußerst schlechten Prognose behafteten Nebennierenkarzinoms einen besonderen Stellenwert, wenngleich der genaue molekulare Wirkmechanismus lange unklar war [52, 53]. In einer kürzlich erschienenen Studie konnte unsere Arbeitsgruppe nun SOAT1 als molekulares Target von Mitotane ausfindig machen [54]. Mitotane zeigte dieselben Effekte wie der bekannte SOAT-Inhibitor Sandoz58-035 hinsichtlich der Akkumulation von freiem Cholesterin, der reduzierten Cholesterinester-Bildung sowie dessen Einfluss auf die Vitalität der untersuchten Zellen. Weiterhin konnte aufgedeckt werden, dass in Zellen einer Nebennierenrindenkarzinomzelllinie, aber weniger in anderen Zelltypen, durch Mitotane der Mechanismus des Endoplasmatischen Retikulum-Stress (ER-Stress) aktiviert wird, woraufhin der programmierte Zelltod eingeleitet wird.

Die sogenannten „adrenolytischen“ Eigenschaften von Mitotane, einem Derivat des Insektizides DDT, wurden bereits 1949 entdeckt [55]. Es kommt sowohl zu einer Reduktion der Steroidproduktion als auch einer zunehmenden Apoptose von Nebennieren- und Nebennierenkarzinomzellen. Seither wurde Mitotane in der Behandlung des Nebennierenkarzinoms eingesetzt. In einer großen multizentrischen Studie konnte retrospektiv der positive Nutzen einer adjuvanten Mitotane-Behandlung in Hinsicht auf das Erlangen eines Rezidives sowie auf das Gesamtüberleben festgestellt werden [53], woraufhin sich Mitotane als Teil der Standardtherapie des Nebennierenkarzinoms etablierte. Eine wesentliche Gefahr entsteht durch Arzneimittelinteraktionen, da Mitotane durch die Induktion von CYP3A4 einen verstärkten Metabolismus bestimmter Medikamente bewirkt. Hierzu zählen z.B. bestimmte Statine, Antibiotika, Chemotherapeutika oder

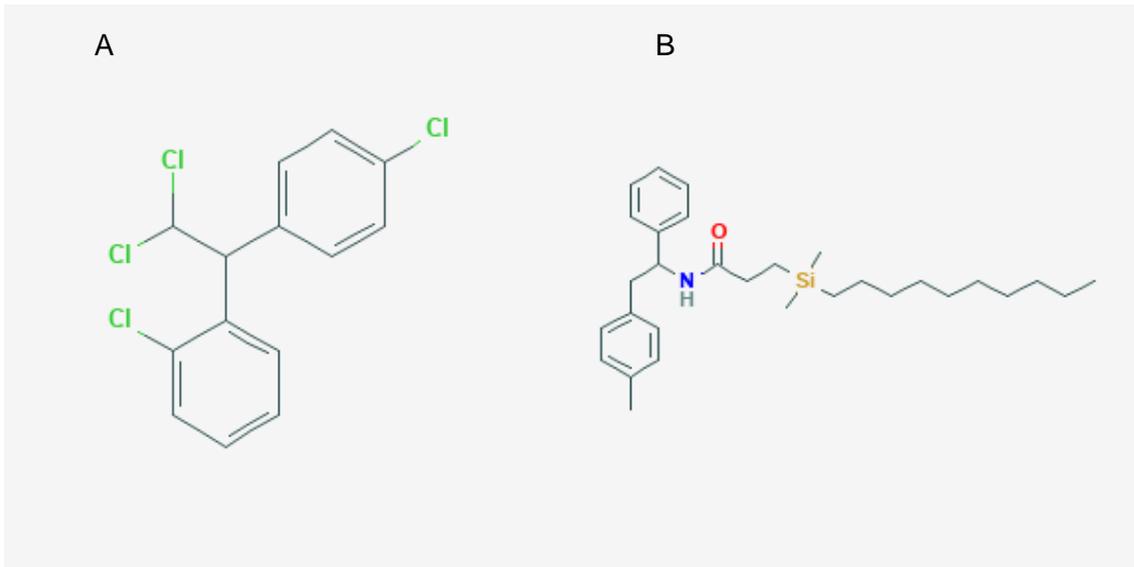
Antihypertensiva. [56]. Darüber hinaus werden die nebennierenrinden-toxischen Eigenschaften von Mitotane für die Behandlung des Cushing-Syndroms genutzt [57].

Sandoz58-035 ist ein klassischer SOAT-Inhibitor, welcher die Veresterung von Cholesterin verhindert, dadurch den Spiegel an freiem Cholesterin anhebt und folglich toxischen Zellstress auslösen kann. Der mögliche Einsatz bei der Behandlung der weitverbreiteten Atherosklerose wurde ebenso diskutiert [58] wie der mögliche Einsatz bei der Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms [17].

Eine weitere, neuartige Substanz ist ATR101. Dabei handelt es sich um einen SOAT-Inhibitor, der ursprünglich zur Behandlung der Atherosklerose entwickelt wurde [59]. Da bei diesem, wie auch anderen SOAT-Inhibitoren eine Nebennierentoxizität gefunden wurde, entstand die Strategie, diese Substanz als Therapeutikum des Nebennierenkarzinoms einzusetzen. Es konnte gezeigt werden, dass diese früher PD132301-2 bekannte Substanz zu einer massiven Cholesterinakkumulation in Zellen der Nebennierenrinde führt und dadurch mit dem programmierten Zelltod von Tumorzellen endet [60, 61].

AZD3988 ist ein selektiver Inhibitor des Enzyms DGAT 1 (Diacylglycerinacyltransferase 1), welches den letzten Schritt der Triglyzeridsynthese katalysiert [62]. Gleichzeitig besitzt diese von AstraZeneca synthetisierte Substanz die Eigenschaften eines nicht-selektiven SOAT-Inhibitors [63]. In Tiermodellversuchen konnte eine Degeneration der Nebennierenrinde beobachtet werden, welche durch eine reduzierte Cholesterinester-Akkumulation in entsprechenden Zellen in Folge der SOAT-Inhibierung bewirkt wurde [64].

Beinahe allen SOAT-Inhibitoren gemeinsam ist die strukturbedingte Hydrophobie, wodurch sie mit der Zellmembran der Zielzellen interagieren, sie durchdringen und SOAT als molekulares Target inhibieren können [65-67] (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Strukturformeln von Mitotane (A) und Sandoz58-035 (B)**

Mitotane (1,1-Dichloro-2-(o-chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl) Ethan) und Sandoz58-035 (3-(Decyldimethylsilyl)-N-(2-(4-methylphenyl)-1-phenethyl) Propanamid) besitzen hydrophobe Eigenschaften. Entnommen aus der öffentlichen gemeinfreien Datenbank PubChem [68].

## 1.5 Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom stellt die häufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste Krebstodesursache bei deutschen Männern mit einem mittleren Erkrankungsalter von 69 Jahren dar. Im Jahr 2016 gab es knapp 60 000 Neuerkrankungen mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von fast 90% [69]. Bei vielen Männern im höheren Alter liegt ein latentes Prostatakarzinom vor, das oftmals nie klinisch relevant wird. Die große Mehrheit der Patienten hat somit ein Niedrigrisiko-Prostatakarzinom mit geringer Tendenz zur Progression [70]. So beträgt das Sterberisiko des Prostatakarzinoms in den westlichen Industrienationen gerade einmal 3% [71, 72]. Nur etwa 15-30% der Patienten präsentieren ein Hochrisiko Prostatakarzinom [73, 74], wovon jedoch bis zu 30% mit der Zeit Metastasen entwickeln und schließlich ein deutlich erhöhtes Sterberisiko aufweisen [75].

Mehr als 90% aller malignen Tumore der Prostata sind Adenokarzinome epithelialen Ursprungs, welche vor allem multifokal in der peripheren Zone auftreten [76]. Die Drüsenzellen der Prostata bilden ein Protein, welches organ- jedoch nicht tumorspezifisch ist. Dieses sogenannte Prostata-spezifische Antigen

(PSA) ist eine Protease, welches das Ejakulat verflüssigt und vermehrt von Tumorzellen freigesetzt wird [77]. Zum einen spiegelt ein PSA-Wiederanstieg nach einer radikalen Prostatektomie das erneute Wachstum von Tumorzellen wieder und ist daher zum Therapiemonitoring und zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs nach einer chirurgischen Entfernung der Prostata geeignet [78], zum anderen ist die Serum-PSA-Bestimmung zentraler Bestandteil von Früherkennungsprogrammen bei Männern ab dem 45. Lebensjahr. Sollte sich nach einer digital rektalen Untersuchung (DRU) mit begleitender PSA-Bestimmung der Verdacht auf ein Karzinom erhärten, wird mittels transrektaler Sonographie gesteuerter Prostatastanzbiopsie eine histologische Sicherung suspekter Tastbefunde veranlasst [79]. Da durch die Früherkennung vermehrt Frühstadien des Prostatakarzinoms entdeckt werden, sehen Kritiker die Gefahr zur Überdiagnose und Therapie von klinisch insignifikanten Tumoren [80]. Ob ein flächendeckendes PSA-Screening-Programm von Nutzen wäre und die Sterberate dadurch effektiv gesenkt werden könnte, wird kontrovers diskutiert [70, 81].

Die Behandlung des Prostatakarzinoms richtet sich nach seiner Ausbreitung, dem sogenannten „Staging“. Diese erfolgt nach dem TNM-System und beinhaltet die Größenbestimmung des Primärtumors (T), die Bestimmung der Lymphknotenbeteiligung (N) sowie das Vorhandensein von Metastasen (M) (Tabelle 1) [82].

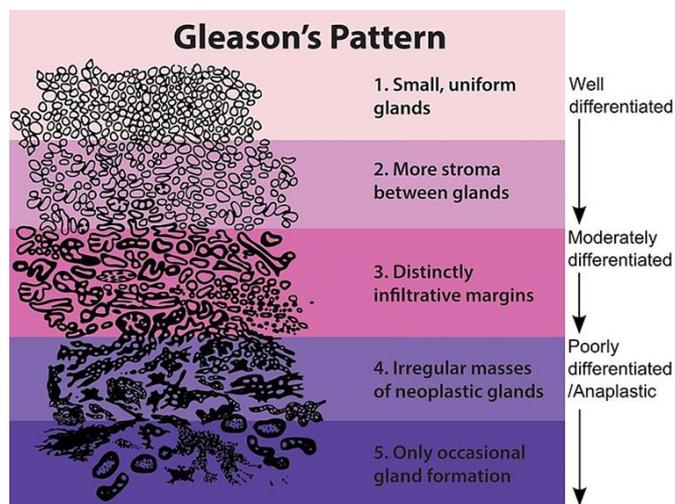
**Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms**

8. Auflage (2017). Modifiziert nach [82].

Stadium	Beschreibung
T (Tumor)	<p>T1: Tumor weder sicht- noch tastbar                      T1a: Tumor befällt ≤ 5% des Gewebes                      T1b: Tumor befällt ≥ 5% des Gewebes                      T1c: Tumor wurde durch Nadelbiopsie diagnostiziert</p> <p>T2: Tumor liegt innerhalb der Prostatakapsel                      T2a: Tumor befällt ≤ 50% eines Seitenlappens                      T2b: Tumor befällt &gt; 50% eines Seitenlappens                      T2c: Tumor befällt beide Seitenlappen</p> <p>T3: Tumor über Prostatakapsel hinaus ausgebreitet</p>

	T3a: extrakapsulärer Befall ohne Samenblasenbefall T3b: extrakapsulärer Befall der Samenblasen T4: Tumor befällt Nachbarstrukturen oder ist fixiert
N (Node)	N0: kein Befall der regionären Lymphknoten N1: Befall der regionären Lymphknoten
M (Metastasis)	M0: keine Fernmetastasen nachweisbar M1: Fernmetastasen nachweisbar

Zusätzlich erfolgt eine Einstufung der Tumoraggressivität („Grading“) anhand des Gleason-Scores, einem weltweit etablierten, bedeutsamen Prognosefaktor des Prostatakarzinoms. Dabei findet eine histopathologische Einteilung des Adenokarzinoms entsprechend seiner Drüsenmorphologie statt. Es werden je nach Abweichung vom normalen Drüsengewebe fünf verschiedene Wachstumsmuster von 1 (gering aggressiv) bis 5 (hoch aggressiv) unterschieden (Abbildung 6). Der Gleason-Score setzt sich schließlich aus dem primären, vorherrschenden Gleason-Muster, und dem sekundären Muster zusammen. Dieses umfasst bei der Stanzbiopsie die aggressivste Wuchsform und bei der Prostatektomie das zweithäufigste Gleason-Muster [83].



**Abbildung 6: Die fünf Gleason-Muster des Adenokarzinoms der Prostata**

Nach der Gleason-Graduierung wird der Malignitätsgrad des Prostatakarzinoms durch fünf definierte Zellmuster mit steigender Abweichung vom Normalgewebe bestimmt. **1** Scharf abgegrenzte, dicht nebeneinanderliegende, uniforme Einzeldrüsen. **2** Geringe Stroma-Mengen liegen zwischen den weniger uniformen Drüsen. **3** Unschärf begrenzte, unregelmäßige Drüsen mit einzelnen soliden Bezirken. **4** Wenige, unregelmäßige, verschmolzene Drüsen mit soliden Bezirken. **5** Keine klaren Drüsen erkennbar, Zellplatten mit soliden Bezirken. Gemeinfreie Darstellung entnommen aus [84], nach D.F. Gleason (1966).

Die gängigste Risikostratifizierung des lokal begrenzten Prostatakarzinoms (T1 oder T2a bzw. b) bezüglich eines Rezidivs setzt sich nun aus dem initialen PSA-Wert, dem bioptischen Gleason-Score sowie dem Tumorstadium zusammen und erfolgt nach einer Einteilung in drei Risikogruppen nach D´Amico [85] (Tabelle 2). Ab 2016 hat sich basierend auf dem Gleason-System ein neues Bewertungsschema mit 5 Gruppen als Standard bei der WHO etabliert, mit dem Ziel, die Klassifizierung des Prostatakarzinoms verständlicher zu machen und Prognoseabschätzungen in Bezug auf die biochemisch bzw. klinisch progressfreie Überlebensrate sowie den prostatakarzinomspezifischen Tod nach einer radikalen Prostatektomie zu erleichtern [86, 87]. Dieses neue Graduierungs-System konnte sich erfolgreich gegenüber der bislang gängigen Dreistufung beweisen [88] (Tabelle 3).

**Tabelle 2: Risikostratifizierung nach D´Amico**

Nach dieser Klassifizierung werden drei Risikogruppen des lokal begrenzten Prostatakarzinoms unterschieden: die Gruppe mit hohem Risiko (Gleason Score  $\geq 8$ ), mittlerem Risiko (Gleason-Score 7) und niedrigem Risiko (Gleason-Score  $\leq 6$ ). Modifiziert nach [85].

Niedriges Risiko	PSA $\leq 10$ ng/ml und Gleason-Score von $\leq 6$ und klinisches Stadium T1c oder T2a
Mittleres Risiko	PSA $>10$ -20ng/ml oder Gleason-Score von 7 oder klinisches Stadium T2b
Hohes Risiko	PSA $>20$ ng/ml oder Gleason Score $\geq 8$ oder klinisches Stadium T2c

**Tabelle 3: Neues Graduierungs-System ab 2016**

Das neue Graduierungs-System setzt sich aus 5 Gruppen mit unterschiedlichen Prognosen zusammen. Die biochemisch progressfreie 5-Jahres-Rate bezieht sich hier auf die Einteilung der Gruppen nach dem histologischen Gleason-Score. Modifiziert nach [86].

Gleason-Score	Graduierung (WHO)	Biochemisch progressfreie 5-Jahres-Rate (%)
$\leq 6$ ( $\leq 3+3$ )	1	96,6
7 (3+4)	2	88,1
7 (4+3)	3	69,7
8	4	63,7
9 oder 10	5	34,5

Als mögliche Therapieoption des lokal begrenzten Niedrigrisiko Prostatakarzinoms gilt die radikale Prostatektomie (offen, laparoskopisch oder

robotergesteuert), welche die Entfernung der Prostata-drüse, der Prostata-kapsel, der Samenblase sowie die prostatistischen Anteile der Samenleiter beinhaltet. Ebenso kann eine alleinige Strahlentherapie, auch in Form einer LDR-Brachytherapie, als primäre Therapieoption in Betracht gezogen werden. Für Patienten ohne Wunsch einer sofortigen Therapie gibt es die Möglichkeit der „Active Surveillance“, hierbei erfolgt zunächst eine alleinige Überwachung mit regelmäßigen Kontrollen von PSA, DRU und Stanzbiopsien. Bei lokal begrenzten Karzinomen mit mittlerem bzw. hohem Risikoprofil und einer Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren kann sowohl eine Strahlentherapie (perkutane Strahlentherapie, ggf. in Kombination mit einer HDR-Brachytherapie) gefolgt von einer adjuvanten hormonablativen Therapie als auch eine radikale Prostatektomie durchgeführt werden. Die Therapie des lokal fortgeschrittenen Hochrisiko Prostatakarzinoms steht nicht in einheitlichem Konsens. Nach einigen Studien scheint bei Tumoren mit niedrigem Tumolvolumen ohne Invasion des benachbarten Musculus sphincter externus und ohne eine Beckenwandfixation eine radikale Prostatektomie mit Lymphadenektomie im Rahmen einer multimodalen Therapie mit möglicher adjuvanter oder salvage Hormontherapie und/oder Bestrahlung in guten Überlebensraten zu resultieren. Eine alternative Therapieoption stellt eine externe Strahlentherapie in Kombination mit einer adjuvanten hormonablativen Therapie dar. Gegebenenfalls kann bei einer mutmaßlichen Lebenserwartung unter 10 Jahren bzw. nach Entscheidung gegen eine kurative Therapie ein „Watchful waiting“ mit symptomorientierter Vorgehensweise indiziert sein. Für das metastasierte Prostatakarzinom gibt es die Möglichkeit einer palliativen medikamentösen Androgenentzugstherapie, selten auch mittels bilateraler Orchiektomie, bzw. einer Kombinationstherapie mit Chemotherapie, anderenfalls kann ein „Watchful Waiting“ erfolgen. Begleitend sollte immer eine interdisziplinäre Supportivtherapie erfolgen. Patienten mit einem biochemischen Rezidiv nach radikaler Prostatektomie (PSA-Wiederanstieg auf  $> 0,2$  ng/ml in mindestens zwei Messungen) haben die Möglichkeit, durch eine frühzeitige Salvage-Strahlentherapie geheilt zu werden. Bei einem PSA-Anstieg nach alleiniger primärer perkutaner Strahlentherapie von

> 2 ng/ml über den postinterventionellen PSA-Nadir ist eine Salvageprostatektomie eine Therapieoption [79, 89-92].

### 1.6 Fragestellungen und Zielsetzung dieser Arbeit

SOAT-Enzyme könnten ein neues Zielmolekül in der Therapie verschiedener Tumore werden. Um die Entwicklung solcher zielgerichteten Medikamente weiter zu verbessern, ist es von großer Bedeutung, den Lipidstoffwechsel und vor allem die Lipidspeicherung in *Lipid droplets* besser zu verstehen. Im ersten Teil dieser Arbeit soll die SOAT-katalysierte Veresterung von Cholesterin sowie der veränderte Lipidmetabolismus von Zellen, die einer SOAT-Inhibierung unterliegen, untersucht werden. Dabei sollen der kürzlich als solcher entdeckte SOAT-Inhibitor Mitotane mit weiteren SOAT-Inhibitoren verglichen werden. Yue et al. konnten zeigen, dass die Inhibierung von SOAT1 mit einer verminderten Proliferation sowie Aggressivität von Prostatakarzinomzellen assoziiert ist. Im zweiten Teil dieser Arbeit war es mein Ziel herauszufinden, welche klinische Konsequenz die Expressionsstärke des SOAT-Enzyms bei ausgewählten Patienten mit einem Prostatakarzinom besitzt.

Folgende Frage- bzw. Aufgabenstellungen sollen nun also bearbeitet werden:

- ❖ Etablierung eines *in-vitro* Aktivitätsassays zur Untersuchung der SOAT katalysierten Veresterung von Cholesterin bei stattfindender SOAT-Inhibierung
- ❖ Charakterisierung der SOAT-Inhibitoren Mitotane, Sandoz58-035, ATR101 und AZD3988 hinsichtlich ihrer Hemmstärke
- ❖ Korreliert die Höhe der SOAT Expression in Prostatakarzinomzellen mit biochemischen bzw. klinischen Parametern bei Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Tabelle 4: Chemikalien Reagenzien und Lösungen

Produkt	Hersteller
22-NBD-Cholesterin	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATR101	Activate Scientific (Auftragssynthese)
AZD3988	AstraZeneca (Material Transfer Agreement)
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DPBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Entellan	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Gel-Blotting-Papier	Bezogen über A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe
Human serum type AB (male)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ITS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mini-Protean TGX Gele (4-20%)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mitotane	ISP Columbus, Wayne, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
n-Hexan	Roth, Karlsruhe

NuPAGE LDS-Probenpuffer (4x)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
NuPAGE Reduktionsagens	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Nu-Serum	Corning GmbH, Kaiserslautern
Opti-MEM Medium	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PVDF Blotting Membrane	GE-Healthcare, München
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sandoz58-035	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Steriles Wasser	Sigma-Aldrich, Taufkirchen Fresenius Kabi, Bad Homburg
TLC Silica gel 60	Merck, Darmstadt
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

### 2.1.2 Zellkulturmedien

Tabelle 5: Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung/ Hersteller
DMEM AQ Medium, modifiziert mit L-Alanyl-L-Glutamin und 4500mg/ml Glucose und 110mg/ml Natriumpyruvat	Zugabe von 10% FCS Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM/F12(1:1) (1x), modifiziert mit-Glutamin und 15mM HEPES	Zugabe von 5ml ITS und 15ml Nu-Serum Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.3 Puffer für die Protein-Analytik

Tabelle 6: Puffer für die Proteinanalytik

Puffer	Zusammensetzung
1x TBST-Puffer	250ml 4xTBS-Puffer (pH 7,6), 0,1% (1ml) Tween 20, ad 1000ml a. bidest.
4x TBS-Puffer	9,68g Tris, 32g NaCl, ad 1000ml a. bidest., pH 7,6 einstellen
5x Laufpuffer	16,25g Tris, 72g Glycin, 0,5% SDS, ad 1000ml a. bidest.
Stripping-Puffer	1,8g Glycin, ad a. bidest., pH 2,0 einstellen, 1% SDS, ad 1000ml a. bidest.
Transferpuffer	3,25g Tris, 14,4g Glycin, 20% (200ml) Methanol, ad 1000ml a. bidest.

### 2.1.4 Antikörper und Plasmide

#### 2.1.4.1 Primärantikörper

Tabelle 7: Primärantikörper

Antigen, Art, Wirt	Hersteller
Beta-Akin, mA, Kaninchen	Cell signaling (Clone D6A8), Danvers, MA, USA
SOAT1, pAK, Kaninchen	abcam (ab39327), Cambridge, UK
SOAT2, pAK, Kaninchen	Cayman Chemical Company (100027), Michigan, USA
SOAT2, pAK, Kaninchen	Acris Antibodies GmbH (bs-5020R), Herford

#### 2.1.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Antigen, Art, Kopplung, Wirt	Hersteller
Kaninchen, pAK, IgG-HRP, Ziege	Dianova GmbH, Hamburg

#### 2.1.4.3 Plasmide

Tabelle 9: Plasmide

Kodiertes Protein	Lieferant
-------------------	-----------

SOAT1	Origene (RC205774), Rockville, MD, USA
SOAT2	Origene (RC221499), Rockville, MD, USA

### 2.1.5 Gebrauchsfertige Kits

Tabelle 10: Gebrauchsfertige Kits

Produkt	Hersteller
Advance HRP Kit	Dako, Hamburg
BCA Protein Assay Kit	Merck, Darmstadt
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (K3468)	Dako, Hamburg
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq Man Gene Expression Master Mix	AppliedBiosystems, Foster City, USA
WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate	Li-Cor, Lincoln, NB, USA

### 2.1.6 Genexpressionsproben

Tabelle 11: Genexpressionsproben

Produkt	Hersteller
ACTB Sonden-Primer-Mix Hs99999903_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
SOAT1 Sonden-Primer-Mix Hs00162077_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
SOAT2 Sonden-Primer-Mix Hs01573878_m1	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

### 2.1.7 Routinematerialien

Tabelle 12: Routinematerialien

Produkt	Hersteller
Cell Counting Chamber Slides	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DC-Glaskammer mit Deckel	Desaga GmbH, Wiesloch
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen

Kunststoff-Einwegmaterial	Eppendorf, Hamburg Greiner Bio-One, Frickenhausen Sarstedt, Nimbrecht
Lab-Tek II CC <sup>2</sup> Chamber Slides (4 wells; 1,7 cm <sup>2</sup> /well)	Nunc, Wiesbaden
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.8 Geräte

Tabelle 13: Geräte

Produkt	Hersteller
Accu Jet	BRAND, Würzburg
BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen
C-Digit Chemiluminescent Western Blot Scanner	Li-Cor, Lincoln, NB, USA
Countess II FL Automated Cell Counter	Thermo Scientific, Dreieich
DNA Speed Vac	Savant Instruments Inc., Farmingdale, NY, USA
Elektrophorese-Geräte: 1. Power Pac Basic 2. Power Pac 200 3. Mini PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock (Dri-Block DB 2D	Techne, Cambridge, UK
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare, München
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope: 1. Axio Scope.A1 2. Axiovert 135 3. Leica DM IL 4. Aperio VERSA	1./2.: Carl Zeiss Microscopy GmbH, München 3./4: Leica, Wetzlar
MSC Advantage Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific, Dreieich
Nanodrop 2000C Spectrophotometer	Thermo Scientific, Dreieich
Schnellkochtopf Sicomatic T-Plus	Silit, Riedlingen
Thermal Cycler C1000, CFX96 Real-Time-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trans-Blot SD Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Ultraschall Sono Plus GM70	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortex Shaker VTX L-3000	Bezogen über A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Wippschüttler	Bezogen über A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugen: 1. Megafuge 1.OR. 2. MIKRO 200 R 3. Mikrozentrifuge	1.: Thermo Scientific, Dreieich 2.: Hettich, Tuttlingen 3.: Bezogen über A. Hartenstein GmbH, Würzburg

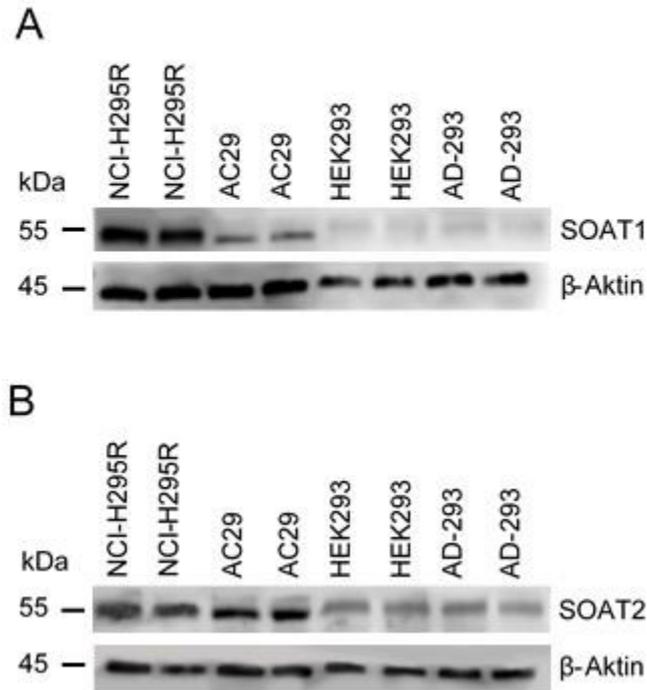
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Auswahl der Zelllinien

Für sämtliche Experimente habe ich NCI-H295R und AD-293 Zellen verwendet. Die NCI-H295R Zellen wurden ebenso wie die AD293 Zellen von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Die adhärent wachsende Nebennierenrindenkarzinomzelllinie NCI-H295R wurde 1990 erstmals von Gazdar et al. aus einem invasiven adrenokortikalen Karzinom isoliert [93]. Die AD-293 Zellen stellen ein Derivat der HEK293 Zellen dar und stammen von einer humanen embryonalen Nierenzelllinie ab, welche Kopien des Adenovirus Typ 5 Genoms enthält. Diese weisen eine im Vergleich zu den HEK293 Zellen verbesserte Zelladhärenz auf [94] und waren daher besser für meine zellbasierten in-vitro Untersuchungen geeignet. Mit dem nachfolgenden Westernblot (Abbildung 7) wurde die SOAT1 bzw. SOAT2 Expression dieser Zellen untersucht. NCI-H295R Zellen besaßen eine starke endogene SOAT1 Expression, wohingegen AD-293 Zellen fast kein SOAT1 exprimierten. AC29 Zellen, eine Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters, die von Lada et al. für einen Fluoreszenz basierten Assay zur Identifikation von SOAT-Inhibitoren verwendet wurden [34, 41], zeigten eine deutlich höhere endogene SOAT Expression als die AD-293 Zellen. Zudem waren sie durch ihr semi-adhärentes Verhalten in der Zellkultur nicht für meine Versuche geeignet. Die SOAT2 Expression war insgesamt in allen verwendeten Zellen geringer, wobei auch hier die humane embryonale Nierenzelllinie eine sehr geringe Expression aufwies.

Somit habe ich für meine zellbasierten Versuche je eine Zelllinie mit hoher endogener SOAT1 Expression (NCI-H295R) und eine mit sehr geringer SOAT1 Expression (AD-293) gewählt, welche schließlich mit entsprechenden Plasmiden transfiziert wurde (2.2.1.3).



**Abbildung 7: Expression der SOAT-Isoenzyme in verschiedenen Zelllinien**

Es wird die endogene Expression von SOAT1 (A) und SOAT2 (B) in verschiedenen Zelllinien dargestellt.

### 2.2.1.2 Routinearbeiten der Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte grundsätzlich unter aseptischen Arbeitsbedingungen und alle Versuche wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden in 250 ml (75cm<sup>2</sup>) Zellkulturflaschen kultiviert und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre aufbewahrt. Die NCI-H295R Zellen wurden in supplementiertem DMEM/F12(1:1) (1x) Medium und die AD-293 Zellen in DMEM AQ Medium (Tabelle 5) kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 80% nach einmaligem Waschen mit DPBS mit Trypsin/EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:2 bzw. 1:10 passagiert. Es wurden regelmäßig Mykoplasmen-Kontaminations-PCR-Tests durchgeführt.

### 2.2.1.3 Transiente Transfektion von AD-293 Zellen

Folgende Methodik der transienten Transfektion und anschließender Inkubation mit fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin sowie SOAT-Inhibitoren im Rahmen des *in-vitro* Aktivitätsassays wurde teilweise in [54] veröffentlicht.

Für die transiente Transfektion von AD-293 Zellen säte ich  $2 \times 10^5$  Zellen in Chamber Slides ( $1,7 \text{ cm}^2$ ) aus und ließ diese 24 Stunden im Brutschrank wachsen, bis sie eine Konfluenz von etwa 80% erreichten. In Vorversuchen habe ich die beiden Transfektionsreagenzien Lipofectamine 2000 Reagent (Life Technologies) und X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Sigma Aldrich) mit Hilfe des Countess II FL Automated Cell Counter-Gerätes hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz miteinander verglichen. Bei der Transfektion mit Lipofectamine 2000 war diese vergleichsweise rund 10% höher und wurde deshalb für die transiente Transfektion der AD-293 Zellen gewählt. Nach Herstellerangaben (Life Technologies) brachte ich dann die entsprechenden Plasmide (Tabelle 9) mittels Lipofectamine 2000 unter sterilen Bedingungen in die Zellen ein und inkubierte diese wiederum für 24 Stunden unter den üblichen Bedingungen ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Die verwendete DNA-Menge betrug jeweils  $1 \mu\text{g}$ . Diese optimale Menge ermittelte ich in weiteren Versuchen mittels RNA- und Proteinanalytik (2.2.2, 2.2.3).

### 2.2.1.4 Inkubation der Zellen mit fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin und SOAT-Inhibitoren

Die SOAT1- bzw. SOAT2-transfizierten AD-293 Zellen (2.2.1.3), untransfizierte AD-293 Zellen und  $3,5 \times 10^5$  NCI-H295R Zellen, welche zuvor ebenso in Chamber Slides ausgesät und 24 Stunden kultiviert wurden, stellten die Basis der folgenden *in-vitro* Versuche dar. Die Zellen wurden in mehreren Ansätzen jeweils mit  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin zusammen mit  $0 \mu\text{M}$  (Kontrolle),  $12,5 \mu\text{M}$ ,  $25 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$  ATR101, AZD3988, Mitotane oder Sandoz58-035 für 4 Stunden inkubiert. In SOAT exprimierenden Zellen fand daraufhin die Veresterung dieses NBD-Lipid-Analogons statt, wobei sich die entstehenden NBD-Cholesterinester in Lipidtröpfchen (*Lipid droplets*) in den

Zellen ansammeln [95]. Bei einer Inkubation mit 1 µg/ml NBD-Cholesterin wurde eine maximale Fluoreszenz in diesen Zellen hervorgerufen [41]. Zellen, die als Kontrolle nur mit 1 µg/ml 22-NBD-Cholesterin inkubiert wurden, bekamen die entsprechende Menge Lösungsmittel (Ethanol, DMSO) zugesetzt, um gleichmäßige Gesamtvolumina zu erhalten.

Anschließend wurden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen und unmittelbar mit dem Axiovert 135 Mikroskop von Zeiss betrachtet, welches mit einem Standardfiltersystem und einer AxioCamMR Digital Kamera ausgestattet ist. Auf diese Weise konnte eine Lipidtröpfchen-Formation mit darin enthaltenen fluoreszierenden NBD-Cholesterinester abgebildet werden [34, 41, 96]. Für NCI-H295R Zellen wurde eine Belichtungszeit von 750ms bei 40-facher Vergrößerung und bei AD-293 Zellen eine Belichtungszeit von 3000ms bei 40-facher Zellvergrößerung eingestellt.

### **2.2.2 RNA-Analytik**

Um den Transfektionserfolg der AD-293 Zellen zu überprüfen, stellte ich 24 Stunden, 48 Stunden bzw. 4 Tage nach der transienten Transfektion mit je 0,5 µg, 1 µg und 2,5 µg DNA (2.2.1.3) ein Zellpellet her und ermittelte das Ergebnis auf RNA- bzw. Proteinebene.

#### **2.2.2.1 RNA-Isolierung**

Für die RNA-Extraktion und -Bestimmung der Zellen verwendete ich das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden). Es wurde nur mit RNase-freiem Wasser und unter hohen Reinheitsbedingungen gearbeitet, um eine Degradation der RNA durch unspezifische RNAsen zu verhindern. Um ein Zellpellet zu gewinnen, löste ich die Zellen mit Trypsin/EDTA ab, zentrifugierte diese bei 12000 rpm für 5 min in der Megafuge 1.OR. und wiederholte den ganzen Schritt nach Waschen mit DPBS. Das Zelllysate wurde dann auf den QIAshredder-Filter geladen und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet. Nachdem die RNA schließlich mit RNase-freiem Wasser eluiert wurde, fand die Konzentrationsmessung am Spectrophotometer (Nanodrop 2000C) bei einer Absorption von 260nm sowie die Reinheitsüberprüfung der RNA über das Verhältnis der Absorption bei 260nm

und 280nm statt [97]. Die RNA wurde daraufhin unverzüglich weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

### **2.2.2.2 Reverse Transkription**

Je 500ng der aus den Zellen extrahierten RNA wurde unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transcription Kits in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden die RNA-Proben mit RNAase-freiem Wasser verdünnt. Nun wurden diese für 5 Minuten bei 42°C mit gDNA Wipeout Buffer im Mastercyclergradient inkubiert, um genomische DNA-Reste zu eliminieren. Anschließend folgte die Reverse Transkription. Hierzu wurde den Proben die Reverse Transkriptase, der Primer-Mix und der dNTP-haltige Puffer zugesetzt und alles für weitere 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben dann 3 Minuten auf 95°C aufgeheizt und anschließend direkt für die Real-Time-PCR weiterverarbeitet.

### **2.2.2.3 Real-Time-PCR**

Um eine quantitative Aussage über die RNA-Expression machen zu können, folgte eine Amplifikation der transkribierten cDNA mittels Real-Time-PCR. Je 2µl cDNA wurde jeweils als Doppelansatz in einen Reaktionsansatz (je 23µl Master Mix) auf eine 96-well-Platte gebracht, welcher Puffer, dNTPs und eine DNA-Polymerase (Taq Man Gene Expression Master Mix) sowie spezifische Primer zur Analyse der Expression von SOAT1 bzw. SOAT2 (2.1.6) enthielt. Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte dann in einem programmgesteuerten PCR-Gerät, ausgestattet mit UV-Lampe und CCD-Kamera (Thermal Cycler C1000, CFX96 Real-Time-System).

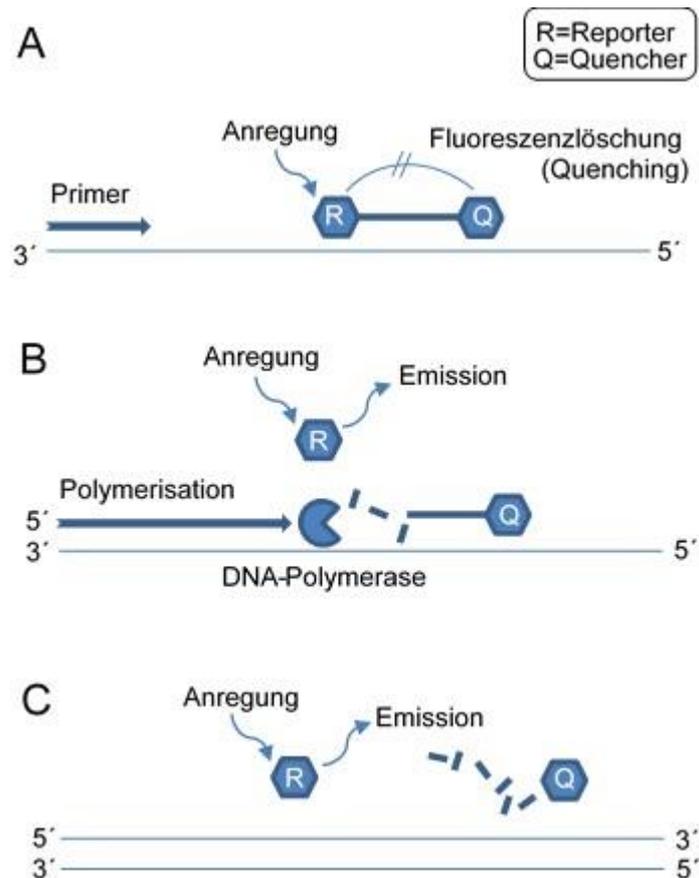
#### Schritte der PCR im Thermal Cycler C1000:

- ❖ Zuerst erfolgte die Aktivierung der DNA-Polymerase bei 50°C für 2 Minuten
- ❖ Initiale Denaturierung: Im ersten Zyklus wurden die Doppelstränge der Ausgangs-DNA sowie die Primer durch die initiale Denaturierung für 10 Minuten bei 95°C vollständig voneinander getrennt

- ❖ Denaturierung: Bei 95°C für 15 Sekunden fand die Trennung der Doppelstränge in allen folgenden Zyklen statt
- ❖ Hybridisierung und Polymerisierung: In wiederum 1 Minute bei 60°C lagerten sich die Primer komplementär an die einzelsträngige cDNA an und die Taq-Polymerase synthetisierte von den Primern ausgehend die Komplementärstränge in 5´-3´-Richtung

Schritt 3-4 wurde 44-mal durchlaufen.

Durch ein zyklisches Durchlaufen dieser Schritte vermehrte sich die DNA exponentiell. Mit der Real-Time-PCR ist eine Überwachung in Echtzeit während der PCR möglich, indem am Ende jedes Durchgangs die Menge der PCR-Produkte unter Ausnutzung des „Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers“ (FRET) nach dem sogenannten TaqMan-Prinzip [98, 99] gemessen wird. Hierzu wird eine fluoreszenzmarkierte spezifische TaqMan-Sonde eingesetzt, welche komplementär zum Matrizenstrang ist und an eine Zielsequenz zwischen den beiden Primern bindet. Am 5´-Ende der Sonde befindet sich ein Reporter- und am 3´-Ende ein Quencher-Molekül. Das Reportermolekül strahlt nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge ein Fluoreszenzsignal aus. Wenn jedoch beide Fluorochrome nebeneinander lokalisiert sind wird die emittierte Energie des Reporters vom Quencher-Farbstoff absorbiert, da dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des Reporters gleicht (FRET-Prinzip, Abbildung 8A). Sobald die herannahende Taq-Polymerase mit ihrer 5´-3´-Exonukleaseaktivität den Reporter freisetzt, steigt dessen Fluoreszenzsignal an und kann detektiert werden (Abbildung 8B). Die Intensität des Fluoreszenzsignals verhält sich proportional zur Menge der PCR-Produkte. Schließlich wird der Zeitpunkt bestimmt, bei dem die Amplifikation der DNA einen gewissen Schwellenwert überschreitet und fortan exponentiell verläuft. Anhand dieses sogenannten  $c_t$ -Wertes kann dann die Expression der RNA-Transkripte mit einem konstant exprimierten Housekeeping-Gen, in diesem Fall Beta-Aktin [100], verglichen und unter Anwendung der  $\Delta CT$ -Methode quantifiziert werden [101].



**Abbildung 8: Das TaqMan-Prinzip**

**A** Das durch Licht angeregte Reportermolekül (R) emittiert Energie, welche vom Quencherfarbstoff (Q) absorbiert wird. Es ist keine Fluoreszenzdetektion des Reporters möglich. **B** Die herannahende DNA-Polymerase setzt den Reporter frei, dessen Fluoreszenzsignal nun gemessen werden kann. **C** Der Quencher wird abgelöst und der Komplementärstrang von der DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung vervollständigt. Eigene Darstellung, modifiziert nach [102].

## 2.2.3 Protein-Analytik

### 2.2.3.1 Gewinnung von Proteinproben

Für die Proteinextraktion zur Analyse der SOAT-transfizierten AD-293 Zellen auf Proteinebene löste ich die Zellen 24 bzw. 48 Stunden nach erfolgter transients Transfektion (2.2.1.3) mit Trypsin/EDTA ab und zentrifugierte diese für 5 Minuten bei 12000 rpm in der Megafuge 1. OR. Nach dem Waschen mit 10 ml DPBS erfolgte eine erneute Sedimentierung in der Zentrifuge. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in RIPA-Puffer (1ml RIPA-Puffer pro  $10^7$  Zellen), welchem im Verhältnis 1:100 ein Protease Inhibitor Cocktail zugegeben wurde, um eine Proteindegradation zu vermeiden, resuspendiert. Die Zellen wurden

dadurch lysiert und die Proteine freigesetzt. Die Proben kamen für 3x5 Sekunden ins Ultraschallbad, um DNA zu scheren und wurden dann etwa 45 Minuten auf Eis auf dem Wippschüttler geschüttelt. Nach der Zentrifugation des Lysats für 5 Minuten bei 4°C und 13000 rpm in der MIKRO 200 R Zentrifuge wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in kleine Eppendorfgefäße überführt. Die Proben wurden daraufhin bei -80°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

### **2.2.3.2 BCA Protein Assay**

Für die weiteren Proteinexpressionsanalysen war eine Bestimmung des Proteingehalts der jeweiligen Überstände erforderlich. Hierzu wurde der BCA Protein Assay [103] unter Verwendung eines gebrauchsfertigen BCA Protein Assay Kits (Merck) angewendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Die Methode basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ - zu  $\text{Cu}^{+}$ -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung, wodurch ein violettfarbener Komplex mit Bicinchoninsäure (BCA) entsteht. Eine photometrische Messung des Komplexes erfolgte bei 562nm.

### **2.2.3.3 Probenvorbereitung**

Für die Probenvorbereitung wurden die Disulfidbrücken der Proteinextrakte reduziert und alkyliert. Hierfür wurden die bei -80°C gelagerten Proben langsam aufgetaut. Das errechnete Probenvolumen mit einem jeweiligen Gesamtproteingehalt von 15µg nahm ich dann in 5µl NuPAGE LDS-Probenpuffer (4x) auf und verdünnte es auf ein Gesamtvolumen von 18µl. Nach der Zugabe von 50mM NuPAGE Reduktionsagens denaturierte ich die Probenansätze dann für 10 Minuten bei 70°C auf einem Heizblock, wobei Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen wurden. Nach einer Abkühlung auf Raumtemperatur fügte ich jeweils 107mM 1M Iodacetamid hinzu und inkubierte die Proben für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.

#### **2.2.3.4 Gelelektrophorese**

Nun erfolgte die Auftrennung der Proteingemische anhand ihres Molekulargewichtes mit einer Gelelektrophorese. Das gebrauchsfertige 4-20% Mini-Protean TGX Gel (Bio-Rad) habe ich in die Elektrophoresekammer gespannt und diese mit Laufpuffer (1x) aufgefüllt. Die Geltaschen habe ich vorsichtig mit den Proben beladen und für die anschließende Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine zusätzlich in eine Tasche 5µl des Proteinmarkers (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bis zum Passagieren des Sammelgels für 30 Minuten bei 80V, dann für etwa eine Stunde bei einer Spannung von 160V.

#### **2.2.3.5 Westernblot**

Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde bei diesem Schritt durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran übertragen. Dazu trennte ich das Gel aus der Elektrophoresekammer heraus und tränkte dieses sowie 8 Gel-Blotting-Papiere (sogenannte Whatman-Papiere) in Transferpuffer. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol äquilibriert, um die Membran hydrophiler zu machen. Den Transferapparat belud ich, ausgehend von der Anode in Richtung Kathode, folgendermaßen: 4 Gel-Blotting-Papiere → PVDF-Membran → Gel → 4 Gel-Blotting-Papiere. Die Elektroden wurden mit Transferpuffer benetzt (semi-dry) und Luftblasen wurden beseitigt. Der Proteintransfer erfolgte dann für eine Stunde bei 100mA für ein bzw. eine Stunde bei 200mA für zwei Gele.

#### **2.2.3.6 Immunodetektion der transferierten Proteine und Entwicklung des Westernblots**

Um freie, unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wusch ich die PVDF-Membran für eine Stunde mit einer Blocklösung (5% Magermilchpulver in 1x TBST). Danach wurde die Membran über Nacht mit dem Primärantikörper (anti-SOAT1, abcam bzw. anti-SOAT2, Cayman Chemical Company, 1:200 Verdünnung) (Tabelle 7), bei 4°C unter Schwenken inkubiert.

Alle Antikörper wurden in der oben genannten Blocklösung verdünnt. Nach viermaligem Waschen für je 15 Minuten in 1xTBST wurde der an die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper (1:10000 Verdünnung) für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Nach einem abschließenden Waschvorgang (3x15 Minuten in 1xTBST, 1x15 Minuten in 1xTBS) erfolgte dann die Detektion der Proteine mit Hilfe eines WesternSure PREMIUM Chemilumineszenz Substrates in einem C-Digit Scanner (Li-Cor).

Es folgte ein als „Stripping“ bezeichneter Vorgang, bei dem die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt wurden, um die aufgetragenen Proteinmengen miteinander vergleichen zu können. Die Membran habe ich hierzu 3x20 Minuten in Stripping-Puffer und daraufhin 4x15 Minuten in 1xTBST gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit der Blocklösung erfolgte die wiederum einstündige Inkubation mit einem Primärantikörper gegen das Housekeeping-Protein Beta-Aktin (1:1000 Verdünnung). Nach einem erneuten Waschvorgang (4x15 Minuten in 1xTBST) wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper (1:10000 Verdünnung) für ebenfalls eine Stunde zugegeben. Der abschließende Waschvorgang sowie die Sichtbarmachung der Beta-Aktin-Banden erfolgten wie oben beschrieben.

### **2.2.4 Nachweis und Quantifizierung von Cholesterinester mittels Dünnschichtchromatographie**

Zur Auftrennung und quantitativen Bestimmung der durch SOAT-Enzyme katalysierten Veresterung von freiem Cholesterin zu Cholesterinester wendete ich die Methode der Dünnschichtchromatographie (DC) an. Die Methode wurde mit NCI-H295R Zellen durchgeführt. Die DC basiert auf einer Verteilung von Substanzgemischen zwischen einer mobilen Phase und einer oberflächenaktiven stationären Phase. Hierbei wandert das Fließmittel (mobile Phase) durch Kapillarkräfte an der stationären Phase aufwärts und es erfolgt eine adsorptionsabhängige Auftrennung der Substanzen, welche zuvor auf die stationäre Phase aufgetragen wurden [104].

#### **2.2.4.1 Vorbereitung der Proben**

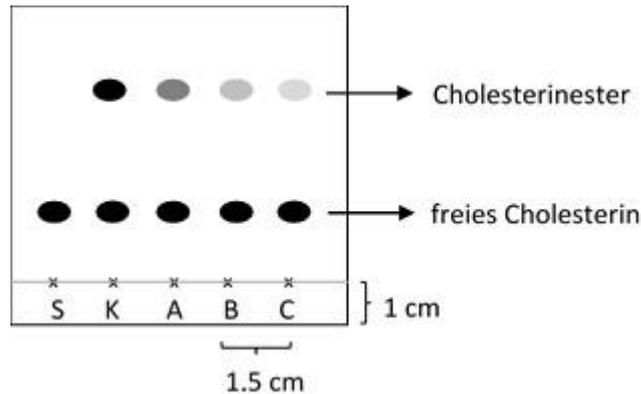
NCI-H295R Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät ( $2 \times 10^6$  Zellen pro Well) und 24 Stunden kultiviert. Im ersten Versuchsteil inkubierte ich die Zellen für den Nachweis der Cholesterinester-Bildung durch SOAT in einem Ansatz mit  $1 \mu\text{g/ml}$  22-NBD-Cholesterin und in einem zweiten Ansatz zusätzlich mit  $50 \mu\text{M}$  Mitotane für je eine Stunde. Für die Quantifizierung ( $\text{IC}_{50}$ -Bestimmung) der gebildeten Cholesterinester inkubierte ich in einem zweiten Versuchsteil je 2 Wells als Duplikat mit je  $1 \mu\text{g/ml}$  22-NBD-Cholesterin ohne SOAT-Inhibitor ( $0 \mu\text{M}$ , Kontrolle) und weitere zusätzlich mit entsprechenden SOAT-Inhibitor-Konzentrationen für eine Stunde im Dunkeln. Die SOAT-Inhibitor-Konzentrationen erprobte ich in Vorversuchen (Tabelle 17). Um schließlich einen linearen Cholesterinester-Anstieg in NCI-H295R Zellen bei steigender Inkubationsdauer mit 22-NBD-Cholesterin nachzuweisen, inkubierte ich die Zellen in einem weiteren Versuchsteil für 10, 20, 30, 60 und 120 Minuten mit je  $1 \mu\text{g/ml}$  22-NBD-Cholesterin.

Danach wurden die Zellen unverzüglich mit Trypsin/EDTA abgelöst, 5 Minuten bei 12000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von je  $100 \mu\text{l}$  Isopropanol zur Lipidextraktion wurden die Proben ca. 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 12000rpm und  $4^\circ\text{C}$  sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es folgte ein vollständiges Abdampfen der Flüssigkeit. Dann wurden die Proben mit jeweils  $10 \mu\text{l}$  Chloroform resuspendiert um die Lipidkomponenten effektiv zu lösen. Nun folgte die Auftrennung der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie.

#### **2.2.4.2 Durchführung der Dünnschichtchromatographie**

Die in  $10 \mu\text{l}$  Chloroform gelösten Proben trug ich vorsichtig 1cm oberhalb des unteren Merck-Silan-Plattenrandes in einem Abstand von je 1,5cm auf. Außerdem trug ich eine Vergleichslösung, bestehend aus  $1 \mu\text{l}$  des 22-NBD-Cholesterin-Stocks und  $9 \mu\text{l}$  Chloroform (Standard), auf jede Platte auf (Abbildung 9). Die mit Kieselgel beschichteten DC-Platten wurden dann in eine Kammer mit darin enthaltenem Fließmittel (mobile Phase) gestellt. Dieses setzte ich zuvor in

einem Verhältnis von 50:50:1 mit n-Hexan, Diethylether und Essigsäure an [41] und füllte es 1cm hoch in die Kammer. Wichtig hierbei ist, die Kammer gut zu verschließen, um eine gesättigte Atmosphäre zu erreichen. Einige Zentimeter bevor das aufsteigende Fließmittel den oberen Plattenrand erreichte, wurde die DC-Platte aus der Kammer entnommen und vollständig getrocknet.



**Abbildung 9: Chromatogramm einer Dünnschichtchromatographie**

S=Standard, K=Kontrolle (Probe ohne SOAT-Inhibitor), A-C=Proben mit ansteigender SOAT-Inhibitor-Konzentration. Es wird die Auftrennung der Proben in freies Cholesterin und Cholesterinester dargestellt. Mit ansteigender SOAT-Inhibitor-Konzentration nimmt das Fluoreszenzsignal der Cholesterinester ab. Eigene Darstellung.

### 2.2.4.3 Auswertung der Dünnschichtchromatographie

Das Chromatogramm mit den aufgetrennten fluoreszierenden Proben wurde mit Hilfe eines ImageQuant LAS 4000 Gerätes erfasst und ausgewertet. Anhand der mitgelaufenen Vergleichslösung (Standard) konnte durch den Vergleich der Laufstrecken freies Cholesterin von verestertem Cholesterin unterschieden werden. Mit der entsprechenden ImageQuant TL Software konnte dann die Intensität der Fluoreszenzsignale der aufgetrennten Cholesterinester des zweiten Versuchsteils quantifiziert werden. Hierbei wurde aus den Duplikaten je einen Mittelwert gebildet. Der Mittelwert der Kontrollproben ( $0\mu\text{M}$  SOAT-Inhibitor) diente als Referenzwert und wurde auf 100% festgelegt. Entsprechend wurde dann für alle Proben, die mit verschiedenen SOAT-Inhibitor-Konzentrationen behandelt wurden, der prozentuale Anteil des Fluoreszenzsignals am Referenzwert ermittelt und das Ergebnis graphisch als  $\text{IC}_{50}$ -Kurve dargestellt.

## **2.2.5 Immunhistochemische Detektion der SOAT Expression im Hochrisiko Prostatakarzinom**

Folgende Beschreibung des Patientenmaterials und der klinischen Daten sowie die immunhistochemische Ausarbeitung wurde als Teil eines Papers eingereicht, welches zur Publikation angenommen wurde.

### **2.2.5.1 Verwendetes Patientenmaterial und klinische Daten**

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Hochrisiko Prostatakarzinom-Gewebeschnitten konnte ich Aussagen über die Expression von SOAT in diesen Geweben treffen. Die immunhistochemischen Untersuchungen zu SOAT1 bzw. SOAT2 wurden an je fünf Tissue Microarrays (TMAs) mit den Gewebeproben radikaler Prostatektomiepräparate durchgeführt. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Martin Spahn zur Verfügung gestellt.

Bei den Patienten handelt es sich um Männer mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom, welche zwischen 1987 und 2005 eine radikale Prostatektomie erhielten. Das Hochrisiko Prostatakarzinom ist durch einen PSA-Wert  $>20$  ng/ml und/oder ein klinisches Tumorstadium T3/4 und/oder einem bioptischen Gleason-Score von 8-10 definiert [105-107]. Die hier untersuchte Kohorte umfasst 206 Patienten, welche im Städtischen Klinikum Karlsruhe (Deutschland) operiert wurden sowie 99 Patienten, welche in der Universitätsklinik Leuven (Belgien) prostatektomiert wurden. Sämtliche Patientendaten sind in der EMPaCT- (European Multicenter Prostate Cancer Clinical and Translational research group) Datenbank hinterlegt. Alle Patienten wurden präoperativ mittels DRU, CT und Knochenszintigraphie nach der TNM-Klassifikation von 2002 gestaged, die bioptischen Gleason-Scores wurden unter transrektaler Ultraschall-Führung gewonnen und die initialen PSA-Werte wurden vor der DRU gemessen. Vor der Operation hat keiner der Patienten eine neoadjuvante Chemo-/Strahlentherapie erhalten. Nach der Operation wurden während der ersten beiden Jahre im Abstand von 3 Monaten, dann alle 6 Monate und 5 Jahre postoperativ schließlich jährliche Folgeuntersuchungen durchgeführt [75]. Bei

dieser Analyse wurden all diejenigen Patienten eingeschlossen, bei denen die klinischen Daten vollständig vorhanden waren und die Gewebeproben immunhistochemisch untersucht werden konnten.

Nach erfolgter Prostatektomie wurde ein *klinischer Progress* durch ein histologisch gesichertes Lokalrezidiv bzw. durch CT- oder Knochenszintigraphie gesicherte Fernmetastasen definiert. Ein *biochemischer Progress* wurde durch einen PSA-Wert  $\geq 0,2$  ng/ml bei zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen definiert. Das *Gesamtüberleben* eines Patienten beinhaltet die Zeit zwischen radikaler Prostatektomie und dem Tod aus irgendeinem Grund bzw. der zuletzt stattgefundenen Folgeuntersuchung, während beim *krebs-spezifischen Überleben* der Tod des Patienten durch das Prostatakarzinom verursacht wird [75].

Das mittlere Alter bei der OP betrug 66 Jahre (Bereich 41-81) und die Patienten befanden sich durchschnittlich im Tumorstadium 3 (TNM Klassifikation 2002, [108]) mit einem durch zwei erfahrene Pathologen berechneten histologischen Gleason-Score von 7 (Bereich 3-9). Bei 123 Patienten (45,6%) war nach der Prostatektomie ein sicherer R0-Status (kein Residualtumor) zu verzeichnen, wobei bei 93 Patienten (30,6%) klinisch Lymphknoten befallen waren, was jedoch nicht als Ausschlusskriterium dieser Untersuchungen diente.

Bei einer medianen Überlebenszeit bzw. Zeitspanne der Folgeuntersuchungen nach der OP von 89 Monaten (Bereich 6-200) erlitten 109 Patienten (35,8%) nach einer medianen Zeitspanne von 25,5 Monaten einen biochemischen Progress. 44 Patienten (14,4%) bekamen nach einer medianen Zeitspanne von 35,5 Monaten einen klinischen Progress. Insgesamt starben im Verlauf 22 Patienten (7,2%) ursächlich an ihrem Prostatakarzinom (Tabelle 14). Für die Analysen dieser Arbeit wurden beide Kohorten bewusst zu einer gemeinsamen Gruppe zusammengefügt, um eine möglichst große Anzahl an Ereignissen zu erhalten, bei einer Trennung der Kohorten wäre dies erwartbar nicht erfüllt. Eine Power-Kalkulation hatte im Vorfeld unter Einbezug der bekannten Ereignishäufigkeit eines biochemischen Progresses dieses Kollektives von ca. 35% ergeben, dass bei einem angenommenen als klinisch relevant eingeschätzten Unterschied in der Rate des biochemischen Rezidivs von 25% gegenüber 50% 116

Beobachtungen erforderlich wären, um einen Gruppenunterschied mit einer Power von 80% und einem alpha-Irrtum von 0,05 zu erkennen.

Die Verwendung der Patientendaten und -proben wurde durch die Kantonale Ethikkommission Bern überprüft und genehmigt (Ref.-Nr. KEK-BE: 128/2015; 26.05.2015). Zudem haben alle Patienten eine schriftliche Einwilligung erteilt.

**Tabelle 14: Patientencharakteristika**

Für die Analysen wurden nur Patienten mit vollständigen klinischen Daten sowie auswertbarer immunohistochemischer Färbung der Gewebeproben eingeschlossen (Insgesamt: n=305). In modifizierter Form zur Publikation angenommen.

<u>Variablen</u>	<u>Medianwert/Anzahl</u>
<b>Alter bei OP (Bereich)</b>	66 (41-81)
<b>Klinisches Tumorstadium</b>	
T2	59 (19,3%)
T3	203 (66,6%)
T4	43 (14,1%)
<b>Gleason-Score</b>	
≤7	222 (77,6%)
8-10	64 (22,4%)
<b>R-Status</b>	
R0	123 (45,6%)
R1	147 (54,4%)
<b>LK-Status</b>	
N0	211 (69,4%)
N1	93 (30,6%)
<b>SOAT1 H-Score</b>	
<3	219 (75,0%)
3	73 (25,0%)
<b>SOAT2 H-Score</b>	
<3	249 (86,2%)
3	40 (13,8%)
<b>Biochemischer Progress</b>	
gesamt	109 (35,9%)
SOAT1 <3 vs. 3	63 vs. 39 (28,8% vs. 53,4%)
SOAT2 <3 vs. 3	83 vs. 19 (33,3% vs. 47,5%)
<b>Mediane Zeit biochemischer Progress,</b>	
Monate (Bereich)	25,5 (1-166)
<b>Klinischer Progress</b>	
gesamt	44 (14,4%)

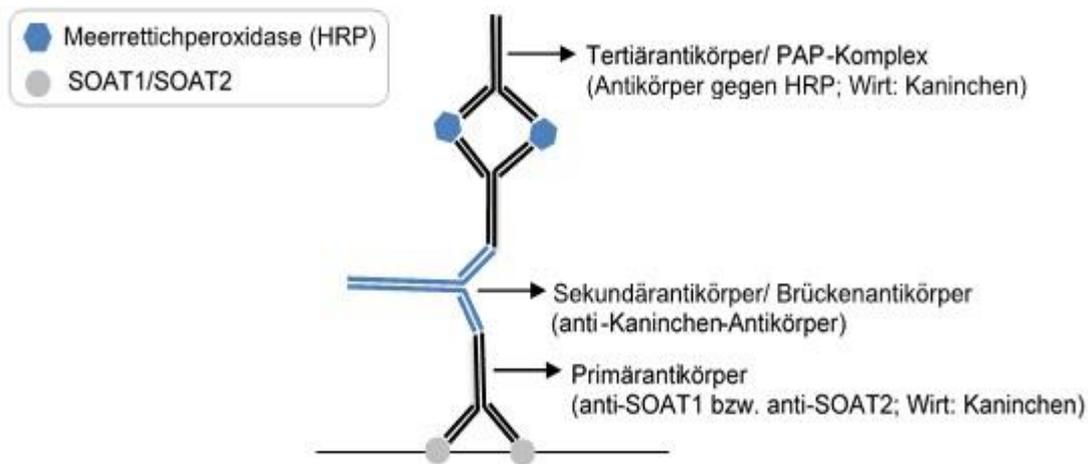
SOAT1 <3 vs. 3	32 vs. 11 (14,6% vs. 15,1%)
SOAT2 <3 vs. 3	33 vs. 10 (13,0% vs. 25,0%)
<b>Mediane Zeit klinischer Progress,</b> Monate (Bereich)	35,5 (3-144)
<b>Tod aus irgendeinem Grund</b>	30 (10,0%)
<b>Krebs-spezifischer Tod</b>	22 (7,2%)

---

### 2.2.5.2 Immunhistochemie für Paraffinschnitte

Die TMAs mit den Gewebeproben habe ich zu Beginn 2x12 Minuten in 100%igem Xylol deparaffiniert, gefolgt von einer Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (je 5 Minuten 100%, 90%, 80%, 70% Ethanol). Es folgte ein ausgiebiger Waschschrift mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 13 Minuten in 10mM Zitronensäuremonohydrat-Puffer (pH 6,5) in einem Schnellkochtopf erhitzt und dann 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Mit diesem Schritt wurden die Epitope demaskiert. Die darauffolgenden Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur in feuchten Kammern statt. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Proben 10 Minuten mit 3% Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert und dann wieder gründlich mit destilliertem Wasser gespült. Nun folgte die Blockierung unspezifischer Antikörper-Protein-Bindungen mit 20% Humanem AB Serum in PBS für eine Stunde. Schließlich folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper, welcher in PBS verdünnt wurde (anti-SOAT1, abcam, 1:1000 Verdünnung über Nacht bei 4°C; anti-SOAT2, Acris Antibodies GmbH, 1:400 Verdünnung für eine Stunde bei RT). Die entsprechenden Antikörperverdünnungen habe ich in Vorversuchen ermittelt. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS folgte die Detektionsreaktion mit Hilfe des Advance HRP Kits von Dako. Die Proben wurden 20 Minuten mit dem Advance-HRP-Link (enthält sekundäre Antikörper) inkubiert, 3x5 Minuten mit PBS gewaschen, dann wiederum 20 Minuten mit Advance-HRP-Enzyme (enthält mit HRP-gekoppelte Tertiärantikörper) im Dunkeln inkubiert und erneut 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Dieses Detektionssystem beruht auf der Peroxidase-Antiperoxidase-Färbemethode (PAP-Methode, Abbildung 10). Danach wurden

die Proben vorsichtig 10 Minuten mit dem Liquid DAB+ Substrate Chromogen System von Dako nach Herstellerangaben entwickelt. Hierbei oxidiert die im Advance-HRP-Enzyme enthaltene Meerrettichperoxidase (HRP) das Diaminobenzidin (DAB) zu einem bräunlichen Produkt, wodurch die Primärantikörperbindung an das jeweilige Antigen (SOAT1 bzw. SOAT2) detektiert wird. Nach dreimaligem Spülen der Proben mit Leitungswasser erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun (nach Mayer) für 2 Minuten sowie das Bläuen in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten. Abschließend wurde mittels einer Alkoholreihe (2 Minuten in 70% Ethanol, 4 Minuten in 100% Ethanol, 4 Minuten in 100% Xylol) dehydriert und die Gewebeschnitte wurden mit Entellan eingedeckt.



**Abbildung 10: Peroxidase-Antiperoxidase- (PAP-) Methode**

Der Primärantikörper bindet an SOAT1 bzw. SOAT2 und wird vom Sekundärantikörper erkannt. Dieser bildet eine Brücke zwischen Primär- und Tertiärantikörper, welche von derselben Spezies abstammen. Der Tertiärantikörper ist an HRP gebunden und bildet den PAP-Komplex. Eigene Darstellung.

### 2.2.5.3 Auswertung und Score-Einteilung

Die immunhistochemisch gefärbten TMAs wurden von zwei unabhängigen Untersuchern (mir und Iuliu Sbiera) getrennt voneinander analysiert. Dabei wurde die Färbung des Zytoplasmas der Tumorzellen betrachtet, in welchem sich SOAT1 und SOAT2 befinden.

Für die Quantifizierung der SOAT Expression wurde die Färbeintensität der Zellen in die Kategorien 0 bis 3 eingeteilt (Tabelle 15). Anschließend wurde der prozentuale Anteil der immunhistochemisch angefärbten (positiven) Tumorzellen

an der Gesamtzahl der Tumorzellen für jede Gewebeprobe bestimmt und wiederum in Kategorien eingeordnet (Tabelle 16). Daraufhin konnte durch die Multiplikation der beiden Kategorienwerte ein semiquantitativer H-Score berechnet werden [109]. Der so ermittelte H-Score reicht von 0 bis 3. Ein H-Score kleiner als 3 wurde für die weiteren statistischen Analysen als niedrige SOAT Expression und ein H-Score von 3 als hohe SOAT Expression festgelegt (Abbildung 21).

Bei einer unterschiedlichen Score-Vergabe der beiden Untersucher wurden die Analysen erneut zusammen mit einem weiteren Untersucher (Silviu Sbiera) geprüft und ein Konsens hergestellt.

**Tabelle 15: Färbeintensität**

0	keine Färbung
1	schwache Färbung
2	mäßige Färbung
3	starke Färbung

**Tabelle 16 Prozentsatz positiver Tumorzellen**

0	keine positiven Zellen
0,1	1-9% positive Zellen
0,5	10-49% positive Zellen
1	>50% positive Zellen

### 2.2.6 Software/Statistik

Für die zellbasierten Versuche wurden sowohl die Kontroll- als auch die Versuchszellen aus derselben Charge verwendet und stets dieselbe Menge an Zellen für entsprechende Ansätze genutzt.

Die Balkendiagramme der RNA-Expressionsanalysen zur Überprüfung des Transfektionserfolgs sowie weitere Graphiken wurden mit Microsoft Excel 2016 erstellt.

Die Interrater-Reliabilität für die Färbebeurteilung der TMAs wurde mit dem Cohens-Kappa-Koeffizient  $\kappa$  evaluiert und mit einer Korrelationsanalyse nach Pearson bestätigt. Der Cohens-Kappa-Koeffizient kann Werte zwischen -1,0 und +1,0 annehmen. Werte kleiner als 1 spiegeln eine Divergenz der beiden Beurteiler wider, während Werte zwischen 0,01 und 0,20 für eine schwache, Werte zwischen 0,21 und 0,40 für eine leichte, Werte zwischen 0,41 und 0,60 für eine mittelmäßige, Werte zwischen 0,61 und 0,80 für eine starke und Werte zwischen 0,81 und 1,0 für eine sehr starke Interrater-Reliabilität stehen [110,

111]. Für den Pearson-Korrelationskoeffizienten wurde als Grenze für eine starke Interrater-Reliabilität 0,75 gewählt [110, 112]. Werte zwischen 0,25 und 0,5 spiegeln hierbei eine schwache und Werte zwischen 0,51 und 0,75 eine mittelmäßige Übereinstimmung der Färbebeurteilung wieder.

Der Zusammenhang zwischen SOAT H-Score und histologischem Gleason-Score bzw. zwischen SOAT1- und SOAT2 H-Score wurde durch die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman analysiert, wobei bei  $r > 0$  ein positiver Zusammenhang, bei  $r < 0$  ein negativer und bei  $r = 0$  kein Zusammenhang besteht [113].

Univariate Überlebensanalysen der Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten erfolgten in Form von Kaplan-Meier-Kurven sowie Log-Rank-Tests. Durch ein Cox Proportional Hazard Modell erfolgten multivariate Analysen zur Bestimmung der Risikofaktoren Alter, Tumor Stadium, Gleason-Score, Resektionsstatus sowie Lymphknotenstatus hinsichtlich des SOAT bezogenen Überlebens. Die Ergebnisse wurden als Hazard Ratio (HR) mit einem 95%-Konfidenzintervall (KI) angegeben. Unterschiede der Patientencharakteristika zwischen den Kohorten Karlsruhe und Leuven wurden mittels Mann-Whitney-U-Test und Chi-Quadrat-Test analysiert. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem *P*-Wert von 5% festgelegt. Alle statistischen Analysen wurden von mir in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dr. Matthias Kroiß und Dr. Silviu Sbiera mit der Software IBM SPSS Statistics 23.0 bzw. GraphPad Prism 6 ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.1 Etablierung eines *in-vitro* Assays zur Untersuchung der SOAT katalysierten Veresterung von Cholesterin

SOAT katalysiert die Bildung von Cholesterinestern aus freiem Cholesterin [32]. Wenn das Enzym durch entsprechende SOAT-Inhibitoren gehemmt wird, nimmt die Cholesterinester-Bildung ab. Um die Ester-Bildung unter SOAT-Inhibierung untersuchen und erfassen zu können, entwickelte ich im ersten Schritt einen *in vitro*-Assay, wobei NCI-H295R Zellen sowie transfizierte AD-293 Zellen die Basis dieser Versuche bildeten.

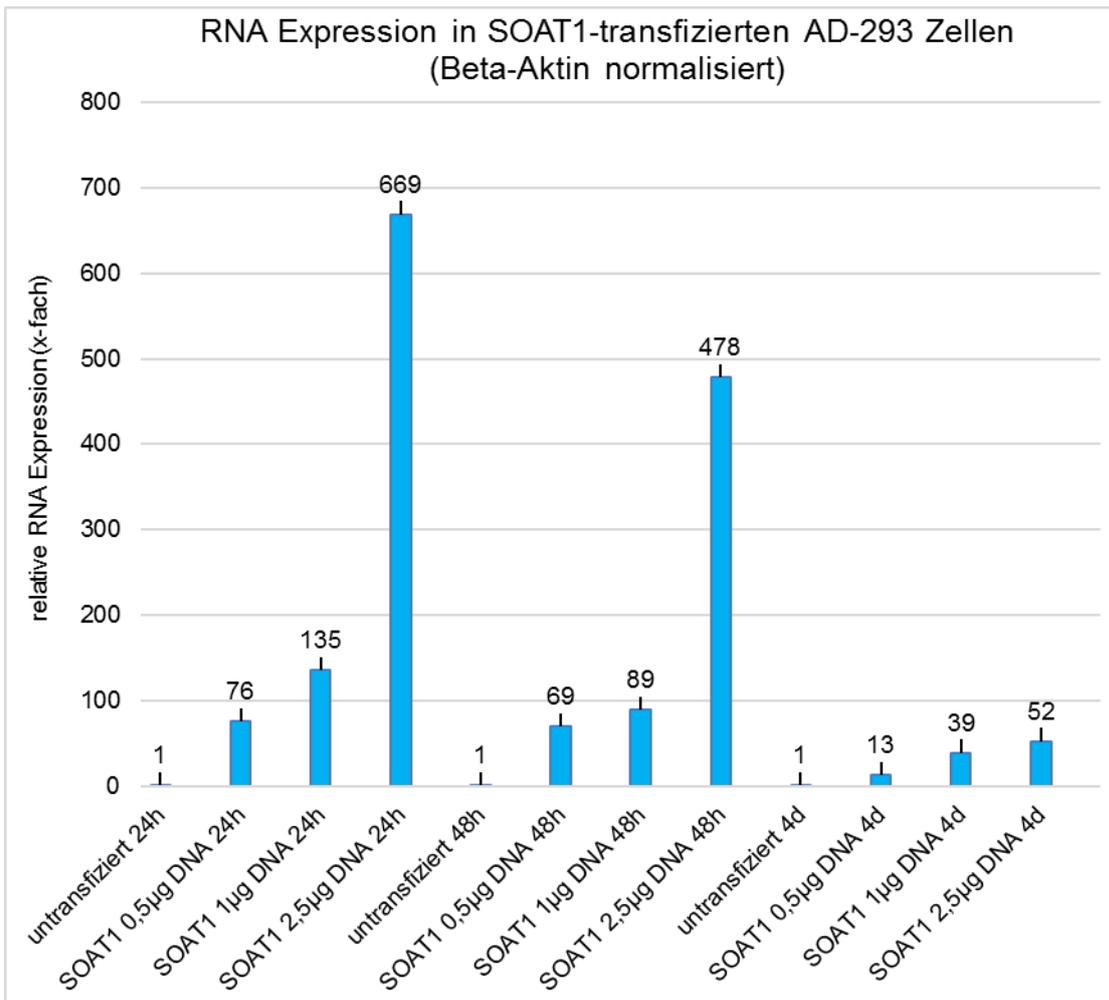
##### 3.1.1 Bestimmung einer geeigneten Plasmid-Menge und Transfektionsdauer für die Transfektion der AD-293 Zellen

Zu Beginn transfizierte ich AD-293 Zellen transient mit 0,5µg, 1µg und 2,5µg der SOAT-Plasmide und überprüfte den Transfektionserfolg nach 24 Stunden, 48 Stunden bzw. vier Tagen (Abbildung 11, Abbildung 12). Bei allen Inkubationsdauern war sowohl bei den SOAT1-, als auch bei den SOAT2-transfizierten Zellen ein Anstieg der mRNA-Expression mit steigender Plasmid-Menge zu sehen. Die transiente Transfektion ist zeitlich begrenzt, da das Plasmid nicht in das Genom der Zellen eingebaut wird [114]. 24 Stunden nach der transienten Transfektion wurden die auf dem Plasmid befindlichen Gene am stärksten in den Zellen exprimiert. Nach vier Tagen sank die RNA Expression in den Zellen deutlich ab. Es schienen bereits viele Zellen das Plasmid verloren zu haben. Aus diesem Grund wurden alle folgenden zellbasierten Versuche 24 Stunden nach erfolgter Transfektion durchgeführt, um zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung eine nachweisbare SOAT Expression in den Zellen sicher zu stellen.

Bei SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen ließ sich 24 Stunden nach erfolgter Transfektion mit 1µg DNA eine ca. 135-fach höhere RNA Expression nachweisen

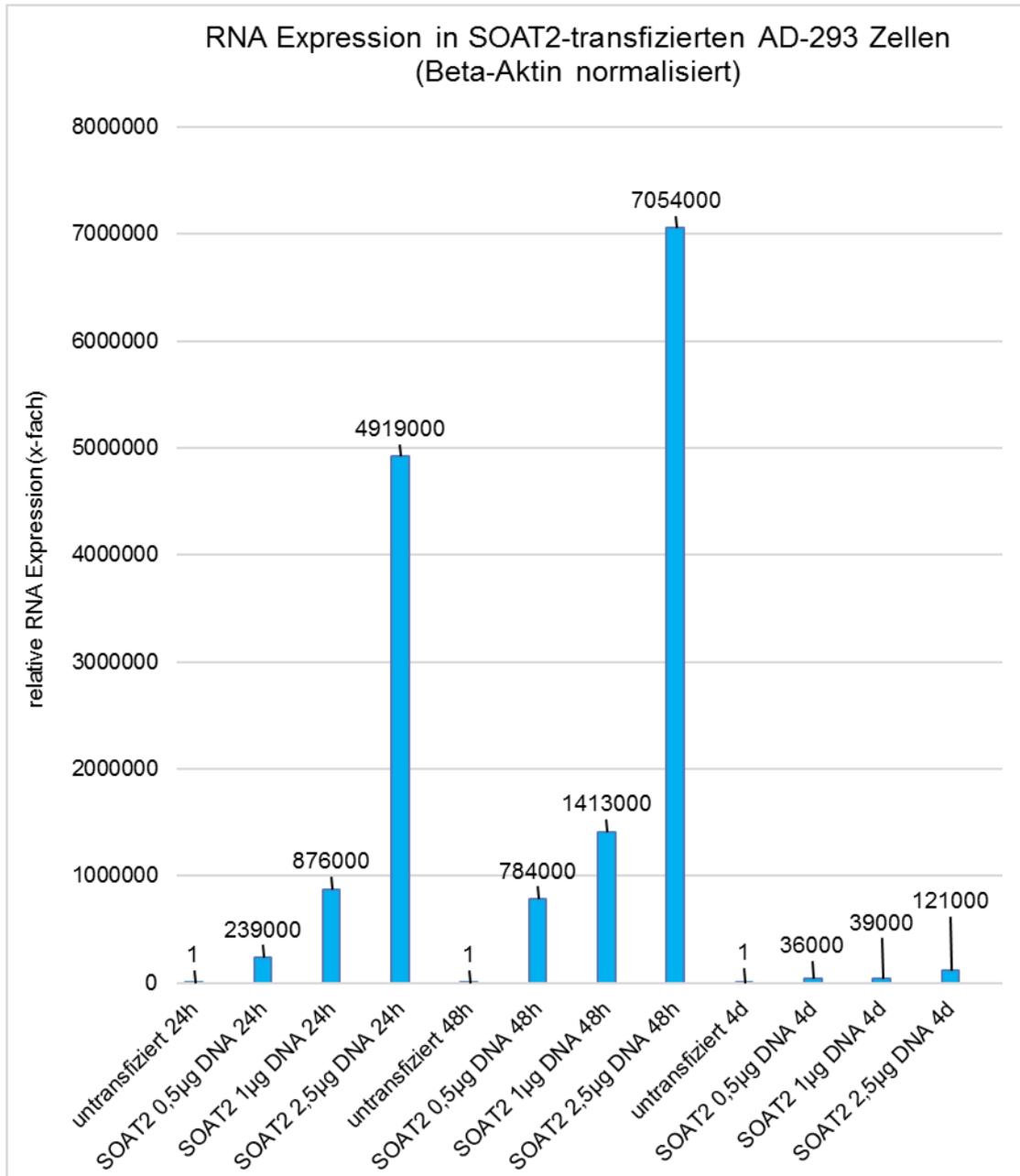
als bei den untransfizierten Zellen (Kontrolle). Bei 2,5µg DNA war die RNA-Expression sogar fast 670-fach höher als bei den Kontrollzellen.

Auch bei der Transfektion mit SOAT2 war ein deutlicher Transfektionserfolg nach 24h zu sehen. Bei 1µg DNA wiesen die Zellen eine ca. 876000-fach höhere RNA Expression im Vergleich zu den untransfizierten Zellen auf und bei 2,5µg DNA sogar fast 5000000-fach höher.



**Abbildung 11: RNA Expression in SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen**

Der Transfektionserfolg wird nach 24h, 48h und 4d mit je 0,5µg, 1µg und 2,5µg DNA/SOAT1-Plasmid dargestellt und wird mit den untransfizierten AD-293 Zellen (Kontrolle) verglichen.



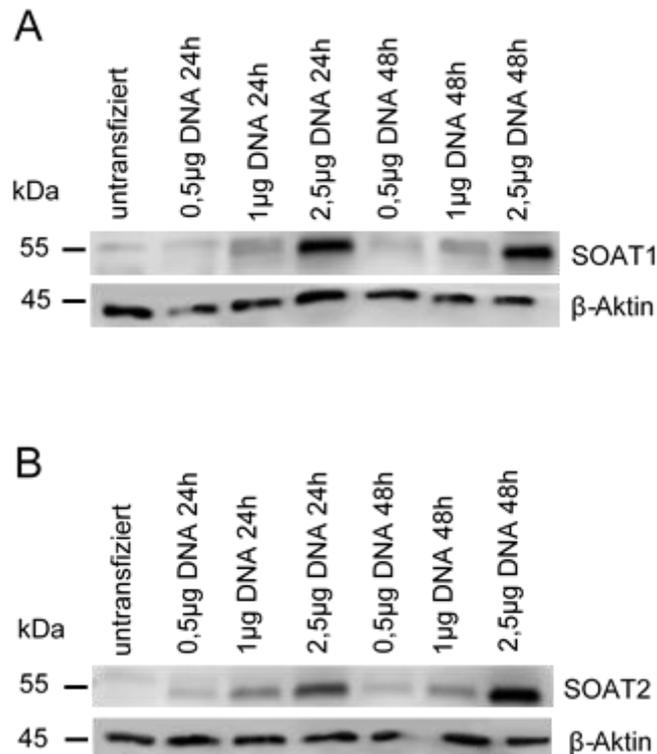
**Abbildung 12: RNA Expression in SOAT2-transfiziertem AD-293 Zellen**

Der Transfektionserfolg wird nach 24h, 48h und 4d mit je 0,5µg, 1µg und 2,5µg DNA/SOAT2-Plasmid dargestellt und wird mit den untransfiziertem AD-293 Zellen (Kontrolle) verglichen.

Im nächsten Schritt inkubierte ich die transfizierten Zellen mit fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin und betrachtete diese mit dem Axiovert 135 Mikroskop von Zeiss, um die Cholesterinester-Bildung zu beurteilen. Mikroskopisch war kein quantitativer Unterschied zwischen den SOAT1- bzw. SOAT2-transfiziertem AD-293 Zellen mit je 1µg bzw. 2,5µg DNA und der resultierenden Ester-Bildung zu

erkennen. Deshalb wurde für die weiteren Versuche 1µg Plasmid als geeignete Transfektions-Menge festgelegt. Dies entsprach hier also der kleinstmöglichen vDNA-Menge für eine maximal mikroskopisch sichtbare Cholesterinester-Bildung durch SOAT.

Nach der Analyse des Transfektionserfolgs auf RNA-Ebene überprüfte ich letzteren erneut auf Protein-Ebene. Anhand der nachfolgenden Westernblots (Abbildung 13) ließ sich wie auch bei der vorherigen RNA Expressions-Analyse nach 24- bzw. 48-stündiger Transfektion der AD-293 Zellen ein positiver Zusammenhang zwischen verwendeter Plasmid-Menge und SOAT Expression sehen. Sowohl bei SOAT1- als auch bei SOAT2-transfizierten AD-293 Zellen stieg das Bandensignal von 0,5µg DNA bis hin zu 2,5µg DNA an. Bei 0,5µg DNA unterschied sich das Bandensignal im Vergleich zu den untransfizierten Zellen jeweils nicht. Bei 1µg und 2,5µg verwendeter DNA war aber ein deutlich stärkeres Signal zu erkennen.



**Abbildung 13: SOAT Expression in AD-293 Zellen mit verschiedenen Plasmidmengen**

Es wird die Expression der SOAT-Isoenzyme in AD-293-Zellen nach Transfektion mit 0,5µg, 1µg und 2,5µg DNA nach 24h bzw. 48h dargestellt. Als Kontrolle dienen untransfizierte AD-293 Zellen. **A** zeigt die SOAT1 Expression, **B** zeigt die SOAT2 Expression.

Durch die RNA- und Protein-Analytik der transienten Transfektion von AD-293 Zellen konnte ich also eine optimale Plasmid-Menge von je 1µg und eine Inkubationsdauer von je 24 Stunden für alle weiteren *in-vitro* Versuche festlegen.

### **3.1.2 Mikroskopische Detektion der SOAT katalysierten Cholesterinester-Bildung**

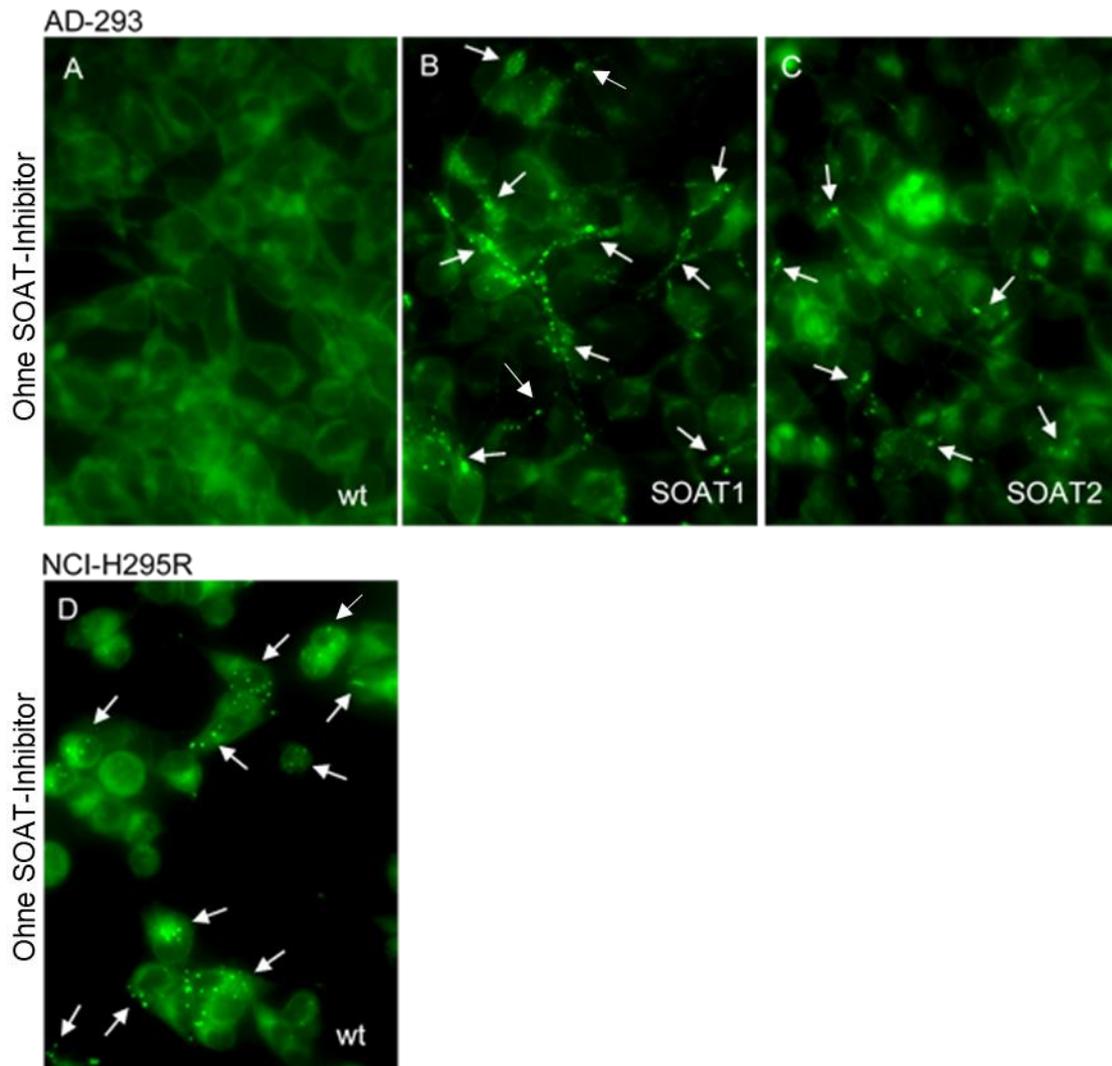
Die erfolgreich transfizierten AD-293 Zellen wurden neben NCI-H295R Zellen mit 1µg/ml 22-NBD-Cholesterin sowie 0µM (Kontrolle), 12,5µM, 25µM, 50µM und 100µM ATR101, AZD3988, Mitotane oder Sandoz58-035 für je 4 Stunden inkubiert. Die Formation von Cholesterinester betrachtete und beurteilte ich anschließend mit dem Axiovert 135 Mikroskop von Zeiss (teilweise in ähnlicher Weise veröffentlicht in Sbiera S., [...] Eckhardt, C. et al. [54]).

#### **3.1.2.1 Cholesterinester-Bildung ohne SOAT-Inhibitoren (Kontrolle)**

Untransfizierte AD-293 Zellen (wt) wiesen mikroskopisch nur ein schwaches und diffuses Fluoreszenzsignal auf, da diese aufgrund der eingeschränkten SOAT Expression das fluoreszierende 22-NBD-Cholesterin nicht bzw. kaum in Ester umwandeln konnten. Folglich konnte keine adäquate Ester-Speicherung in Form von Lipidtröpfchen stattfinden (Abbildung 14A). Das schwache, über alle Zellen gleichmäßig verteilte Signal, deutete auf eine Ansammlung des NBD-Cholesterins in polaren Zellmembranen hin [41].

Im Gegensatz hierzu war bei SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen eine deutliche Cholesterinester-Bildung zu sehen, welche sich in Form von stark fluoreszierenden Lipidtröpfchen bzw. *Lipid droplet* Formationen in den Zellen darstellte (Abbildung 14B). Auch bei SOAT2-transfizierten Zellen ließ sich eine jedoch sehr viel geringere Bildung von *Lipid droplets* mit darin enthaltenen Cholesterinestern erkennen (Abbildung 14C). Da die Bildung fluoreszierender *Lipid droplets* in SOAT2-transfizierten AD-293 Zellen nur sehr geringfügig war, wurden die Folgeversuche mit zusätzlicher Inkubation der Zellen mit SOAT-Inhibitoren ausschließlich mit SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen durchgeführt. NCI-H295R Zellen (wt) wandelten durch ihre hohe endogene SOAT1 Expression das fluoreszierende freie NBD-Cholesterin in Ester um, welche auch hier als hell

leuchtendes Signal in Form von *Lipid droplets* zu sehen waren (Abbildung 14D). Die Ergebnisse spiegeln also die bestehende Erkenntnis wieder, dass das NBD-Cholesterin in lipophiler bzw. neutraler Umgebung (*Lipid droplets*) ein starkes Fluoreszenzsignal aufweist und so die darin enthaltenen Cholesterinester mikroskopisch erfasst werden können [41].

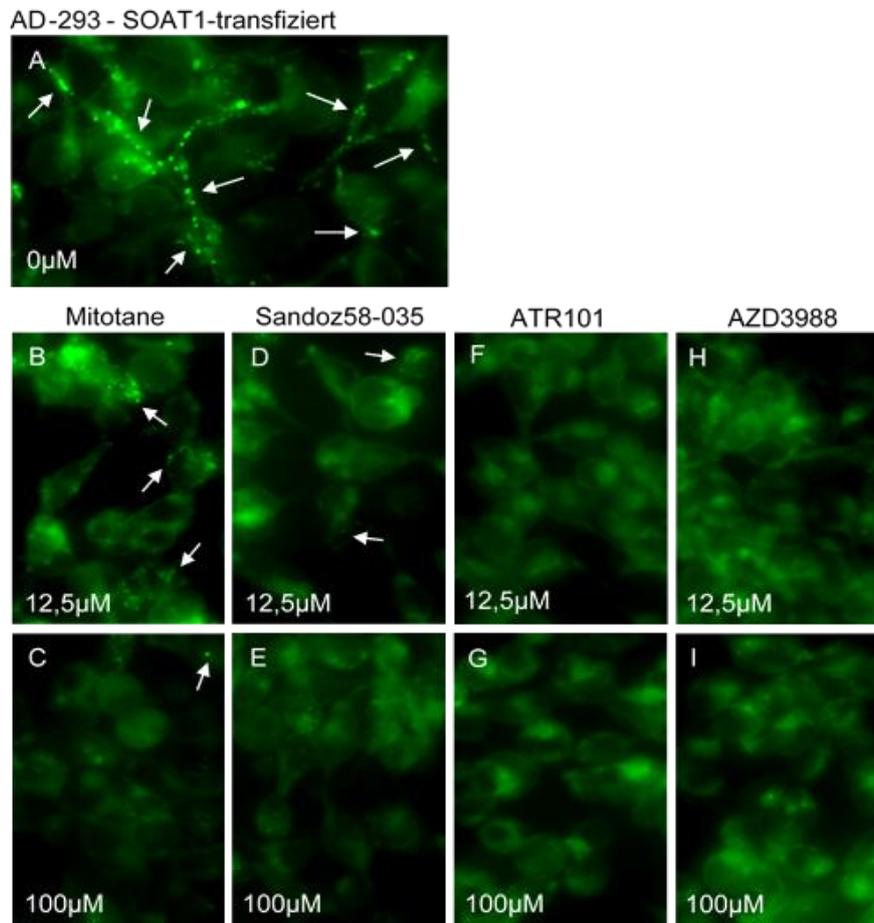


**Abbildung 14: SOAT-katalysierte CE-Bildung ohne SOAT-Inhibitor-Inkubation**

A: AD-293 Zellen untransfiziert (wt), B: AD-293 Zellen SOAT1-transfiziert, C: AD-293 Zellen SOAT2-transfiziert, D: NCI-H295R Zellen (wt). Die Pfeile zeigen auf Lipid droplets mit darin enthaltenen stark fluoreszierenden CE. Eigene Daten, ähnlich in [54] veröffentlicht.

### 3.1.2.2 Cholesterinester-Bildung bei SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen

In Abbildung 15A sind erneut SOAT1-transfizierte AD-293 Zellen zu sehen, welche nicht mit einem SOAT-Inhibitor behandelt wurden und somit eine deutlich sichtbare Cholesterinester-Bildung mit starkem Fluoreszenzsignal aufwiesen. Zellen, die zusätzlich mit Mitotane behandelt wurden, wiesen eine erkennbar reduzierte Ester-Bildung auf. Bei 12,5 $\mu$ M Mitotane waren noch einige Zellen mit einer *Lipid droplet* Formation zu sehen (Abbildung 15B), wohingegen bei einer Inkubation mit 100 $\mu$ M nur noch vereinzelt ein Fluoreszenzsignal in Lipidtröpfchen vorhanden war (Abbildung 15C). Bei einer Behandlung der Zellen mit Sandoz58-035 war selbst bei einer Konzentration von 12,5 $\mu$ M nur eine sehr geringe Cholesterinester-Bildung festzustellen (Abbildung 15D), welche bei 100 $\mu$ M fast vollkommen verschwunden war (Abbildung 15E). Bei einer Behandlung der transfizierten AD-293 Zellen mit den SOAT-Inhibitoren AZD3988 sowie ATR101 war bereits bei 12,5 $\mu$ M keine Ester-Bildung mehr zu erkennen (Abbildung 15F-I). Die Zellen wiesen nur noch ein schwaches, diffuses Fluoreszenzsignal auf. Auch bei den Konzentrationen von 25 $\mu$ M bzw. 50 $\mu$ M war keine Ester-Bildung in Form von fluoreszierenden *Lipid droplets* sichtbar.



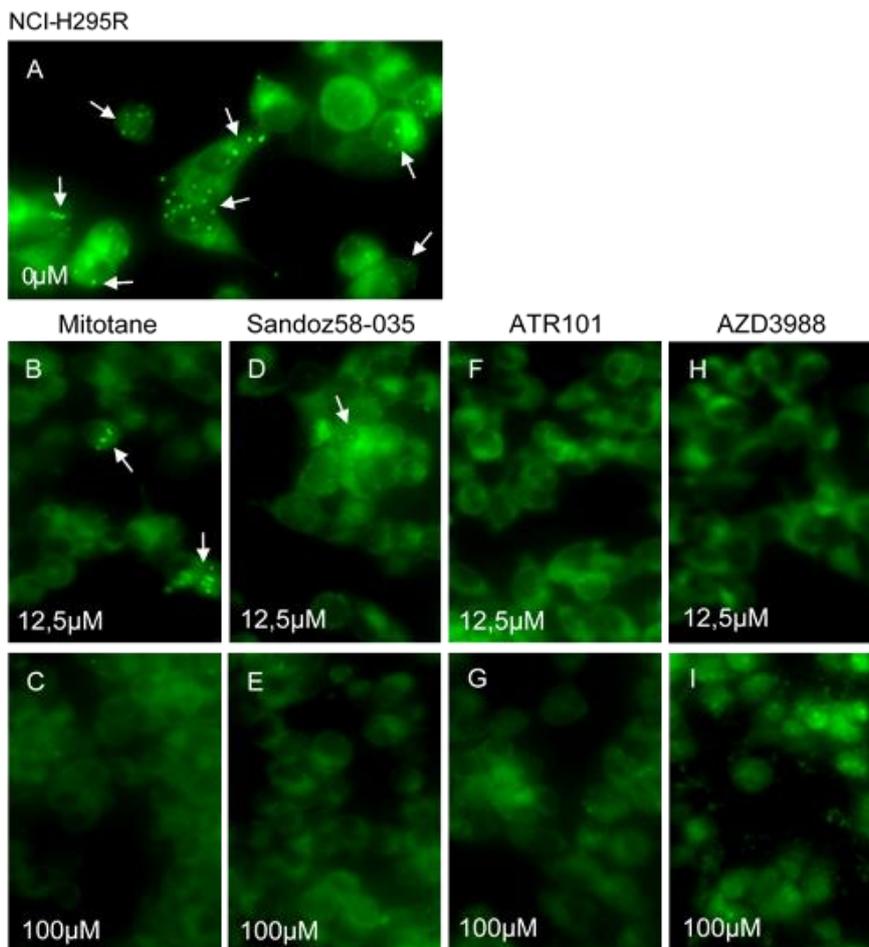
**Abbildung 15: CE-Bildung bei SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen**

A: CE-Bildung ohne SOAT-Inhibitor-Inkubation (Kontrolle), B-I: CE-Bildung bei SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen mit SOAT-Inhibitor-Inkubation. Die Pfeile zeigen auf Lipid droplets mit darin enthaltenen stark fluoreszierenden CE.

### 3.1.2.3 Cholesterinester-Bildung bei NCI-H295R Zellen

In Abbildung 16A sind NCI-H295R Zellen ohne Behandlung mit den entsprechenden SOAT-Inhibitoren als Kontrolle dargestellt. Es war eine reichliche Bildung von Cholesterinestern ersichtlich. Ähnlich wie bei den SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen zeigte sich bei der Behandlung mit den SOAT-Inhibitoren eine deutlich reduzierte bis vollkommen eingeschränkte *Lipid droplet* Formation. Bei der Behandlung mit Mitotane wiesen die Zellen bei 12,5  $\mu$ M noch einige fluoreszierende Lipidtröpfchen mit darin enthaltenen Cholesterinestern auf (Abbildung 16B), welche bei der höchst gewählten Konzentration von 100  $\mu$ M nicht mehr zu sehen waren (Abbildung 16C). Bei der Inkubation mit Sandoz58-

035 war bei 12,5µM nur noch eine geringe und bei 100µM gar keine Cholesterinester-Bildung mehr erkennbar (Abbildung 16D-E). Auch bei der Behandlung mit ATR101 bzw. AZD3988 war keine Ester-Bildung in den NCI-H295R Zellen bei allen verwendeten Inhibitor-Konzentrationen, einschließlich 25µM und 50µM, nachweisbar (Abbildung 16 F-I). Es lag nur noch ein diffuses Fluoreszenzsignal vor.



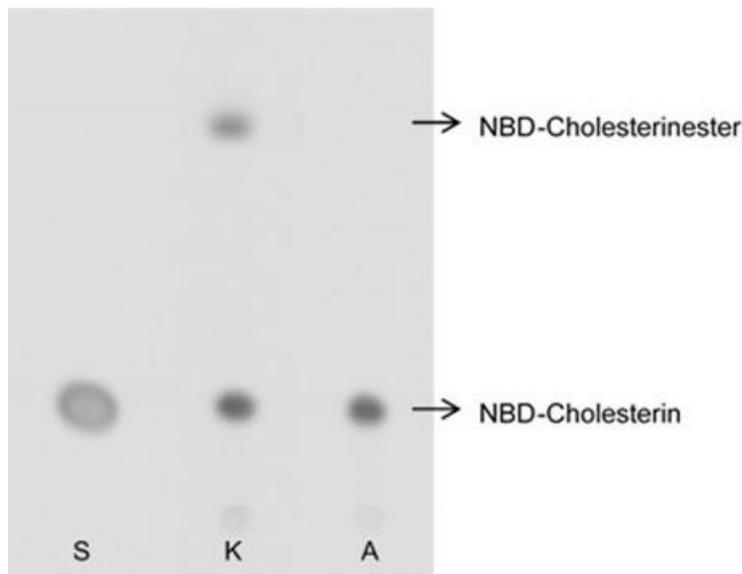
**Abbildung 16: CE-Bildung bei NCI-H295R Zellen**

A: CE-Bildung ohne SOAT-Inhibitor-Inkubation (Kontrolle), B-I: CE-Bildung bei NCI-H295R Zellen mit SOAT-Inhibitor-Inkubation. Die Pfeile zeigen auf Lipid droplets mit darin enthaltenen stark fluoreszierenden CE. Eigene Daten, ähnlich in [54] veröffentlicht.

### 3.1.3 Nachweis der gebildeten Cholesterinester mittels Dünnschichtchromatographie

Die bereits mikroskopisch sichtbare Veresterung von NBD-Cholesterin durch SOAT1 bzw. die reduzierte oder sogar fehlende Cholesterinester-Bildung bei

zusätzlicher Behandlung der Zellen mit SOAT-Inhibitoren belegte ich im darauffolgenden Schritt mittels einer Dünnschichtchromatographie. Das folgende Chromatogramm stellt die Auftrennung von Zelllipidbestandteilen in freies Cholesterin und Cholesterinester dar (Abbildung 17). Die Standardlösung (S), bestehend aus dem Lösemittel Chloroform sowie fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin, markierte die Wanderungslinie von polarem, freiem NBD-Cholesterin. Die lipophilen Cholesterinester wanderten mit der mobilen Phase weiter aufwärts. So waren bei denjenigen NCI-H295R Zellen, die ohne SOAT-Inhibitor behandelt wurden, zwei Fluoreszenzsignale im Chromatogramm zu erkennen (Abbildung 17K). Ein Signal in der Nähe der Auftragungslinie der Proben (freies NBD-Cholesterin) und eins weiter oben (NBD-Cholesterinester). Die Zellen, die exemplarisch zusätzlich mit einer großen Dosis eines SOAT-Inhibitors, nämlich 50 $\mu$ M Mitotane, behandelt wurden, stellten sich im Chromatogramm mit nur einem Fluoreszenzsignal auf Höhe der Standardlösung (freies NBD-Cholesterin) dar (Abbildung 17A). Diese Beobachtung zeigt auch deutlich, dass die nun nicht mehr vorhandene Bande der NBD-Cholesterinester ein Produkt der SOAT-Aktivität ist. Vergleichbare Ergebnisse konnten Lada et. al mit einem auf AC29 Zellen basierten Assay publizieren [41].



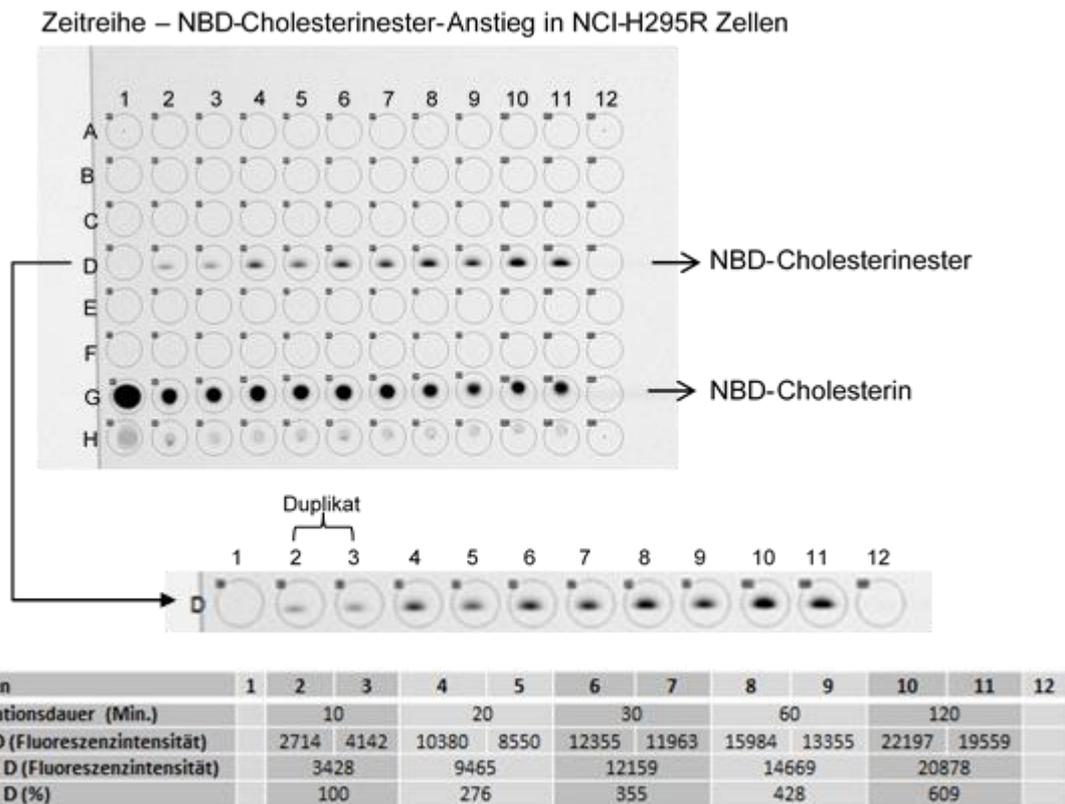
**Abbildung 17: Lipid-Auftrennung in freies Cholesterin und Cholesterinester**

S: Standard (Lösemittel und 22-NBD-Cholesterin), K: Kontrolle (NCI-H295R Zellen ohne SOAT-Inhibitor-Inkubation), A: NCI-H295R Zellen mit 50 $\mu$ M Mitotane behandelt.

### **3.2 IC<sub>50</sub>-Bestimmung der SOAT-Inhibitoren Mitotane, Sandoz58-035, ATR101 und AZD3988**

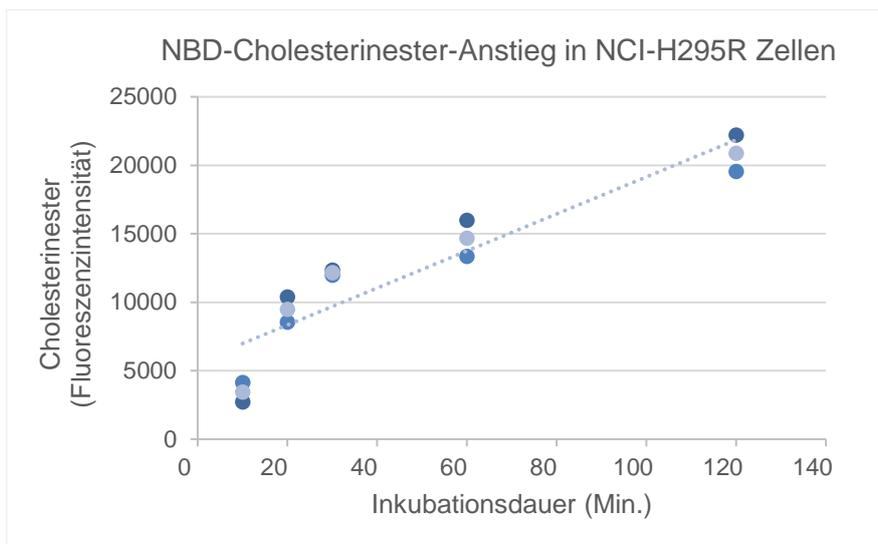
Durch die Etablierung des *in-vitro* Assays kann nun also die Cholesterinester-Formation in Zellen, die mit ausgewählten SOAT-Inhibitoren behandelt werden, nicht nur mikroskopisch dargestellt, sondern auch quantitativ beurteilt werden. Um nun noch genauere Aussagen zu den Hemmstärken der verschiedenen SOAT-Inhibitoren treffen und diese dadurch miteinander vergleichen zu können, bestimmte ich in einem zweiten Versuchsteil die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) für jeden SOAT-Inhibitor. Dies entspricht derjenigen Konzentration des Inhibitors, bei der eine halbmaximale (50%ige) Hemmung von SOAT vorliegt [115]. Dazu verwendete ich NCI-H295R Zellen.

Zunächst betrachtete ich die reine Cholesterinester-Bildung in NCI-H295R Zellen bei einer ansteigenden Inkubationsdauer mit 22-NBD-Cholesterin. Hierzu inkubierte ich die Zellen 10, 20, 30, 60 und 120 Minuten mit fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin und trennte anschließend die Lipidbestandteile der behandelten Zellen mit einer Dünnschichtchromatographie auf (Abbildung 18). Es war ein über die Zeit in der Intensität steigendes Fluoreszenzsignal mit linearem Anstieg der Cholesterinester in den Zellen zu sehen (Abbildung 19). Die Signalzunahme spiegelt erneut die SOAT-Aktivität wider.



**Abbildung 18: Chromatographische Darstellung des NBD-Cholesterinester-Anstiegs in NCI-H295R Zellen über einer Zeitreihe**

Nach 10, 20, 30, 60 und 120 Minuten Inkubation der Zellen mit fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin fand eine Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie statt. Die Proben wurden jeweils als Duplikat auf die DC-Platte aufgetragen. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt die Intensität des Fluoreszenzsignals der jeweiligen NBD-Cholesterinester an.



**Abbildung 19: NBD-Cholesterinester-Anstieg in NCI-H295R Zellen**

Nach Inkubation mit 22-NBD-Cholesterin ist ein über die Zeit linearer Anstieg der Cholesterinester in den Zellen zu sehen. Darstellung in Triplikaten.

Für die darauffolgende  $IC_{50}$ -Bestimmung der SOAT-Inhibitoren wurde auf diesem Ergebnis basierend die Inkubationsdauer der Zellen mit den SOAT-Inhibitoren von je einer Stunde festgelegt, welche im Bereich der Linearität liegt.

In einigen vorangehenden Versuchen ermittelte ich geeignete Konzentrationen der SOAT-Inhibitoren für die anstehende  $IC_{50}$ -Bestimmung (Tabelle 17).

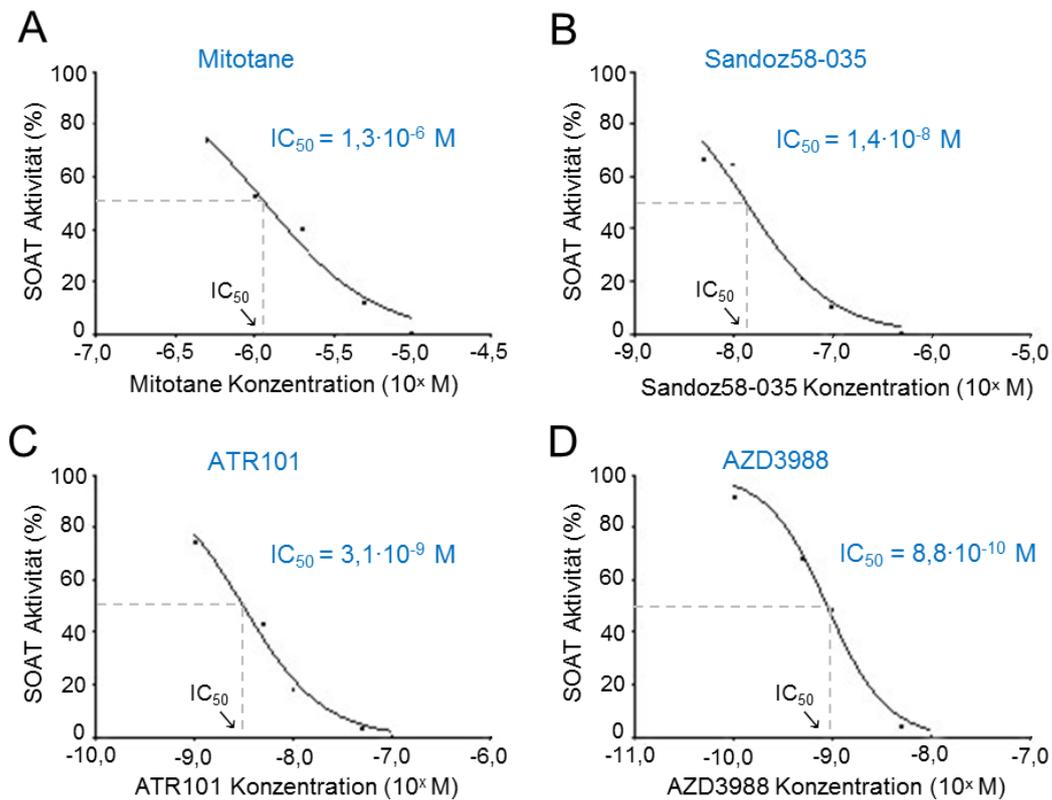
**Tabelle 17: Verwendete SOAT-Inhibitor-Konzentrationen für die  $IC_{50}$ -Bestimmung**

SOAT-Inhibitor	Konzentrationen ( $\mu M$ )
ATR101	0/ 0,001/ 0,005/ 0,01/ 0,05/ 0,1
AZD3988	0/ 0,0001/ 0,0005/ 0,001/ 0,005/ 0,01
Mitotane	0/ 0,5/ 1/ 2/ 5/ 10
Sandoz58-035	0/ 0,005/ 0,01/ 0,05/ 0,1/ 0,5

NCI-H295R Zellen wurden mit  $1\mu g/ml$  22-NBD-Cholesterin und entsprechenden Konzentrationen (Tabelle 17) von ATR101, AZD3988, Mitotane sowie Sandoz58-035 für je eine Stunde inkubiert und die Lipidbestandteile der Zellen anschließend chromatographisch aufgetrennt. Die Chromatogramme mit den Auswertungen der Fluoreszenzsignale der Cholesterinester befinden sich im Anhang (Anhang 1).

In Abbildung 20 sind die mittleren inhibitorischen Konzentrationen der SOAT-Inhibitoren mit ansteigender Hemmstärke dargestellt. Mitotane war der

schwächste SOAT-Hemmer mit einer  $IC_{50}$  von  $1,3 \times 10^{-6}$  M. Dieses Ergebnis bestätigt die mikroskopischen Resultate des vorherigen in-vitro Assays, da dort bei der Inkubation von NCI-H295R sowie AD-293 Zellen mit Mitotane eine zwar deutlich geringere, aber dennoch sichtbare Cholesterinester-Formation bestehen blieb. Sandoz58-035 wies die zweit schwächste Hemmstärke der ausgewählten SOAT-Inhibitoren mit einer  $IC_{50}$  von  $1,4 \times 10^{-8}$  M auf. Deutlich stärker hemmte ATR101 die SOAT-Aktivität ( $IC_{50} = 3,1 \times 10^{-9}$  M), gefolgt von demjenigen SOAT-Inhibitor, bei welchem die geringste Konzentration erforderlich war, um eine halbmaximale Hemmung von SOAT zu erzielen - AZD3988. Mit einer  $IC_{50}$  von  $8,8 \times 10^{-10}$  M war AZD3988 der stärkste SOAT-Inhibitor. Von AstraZeneca bereitgestellte Informationen zu diesem SOAT-Hemmer decken sich mit der von mir ermittelten Hemmstärke.



**Abbildung 20: Mittlere inhibitorische Konzentrationen ( $IC_{50}$ ) verschiedener SOAT-Inhibitoren**

A:  $IC_{50}$  Mitotane, B:  $IC_{50}$  Sandoz58-035, C:  $IC_{50}$  ATR101, D:  $IC_{50}$  AZD3988

### **3.3 SOAT Expression in Prostatakarzinomzellen in Korrelation zu klinischen Parametern bei Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten**

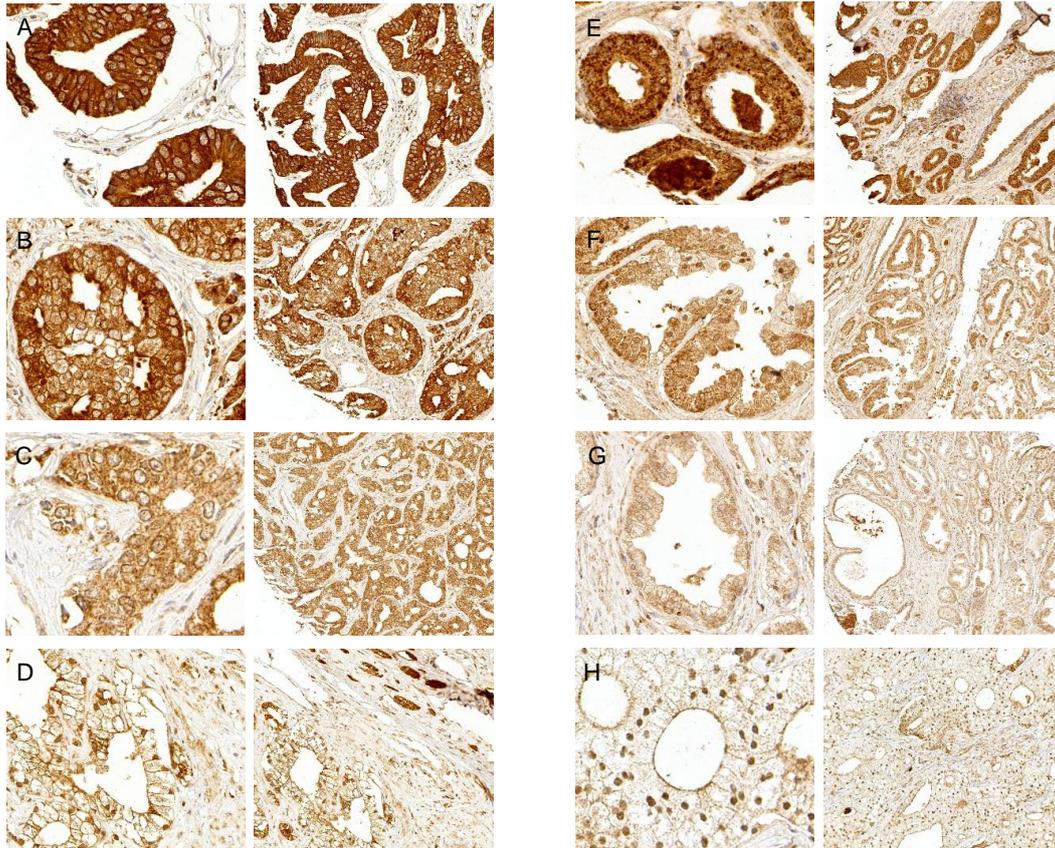
Teilergebnisse der folgenden Kapitel wurden zur Publikation angenommen.

#### **3.3.1 Immunhistochemische Detektion von SOAT1 und SOAT2**

Für die Auswertung der immunhistochemischen Detektion der SOAT-Enzyme wurde die Färbung des Zytoplasmas der Tumorzellen betrachtet, da die SOAT1- bzw. SOAT2-Enzyme am ER lokalisiert sind. Für beide Enzymen bestand eine gleichmäßige Färbung im Zytoplasma der Zellen (Abbildung 21). Die Interrater-Reliabilität für die Beurteilung des Farbe-Scores bzw. der SOAT Expression war stark bis sehr stark. Der Cohens-Kappa-Koeffizient  $\kappa$  für die SOAT1 Färbebeurteilung betrug 0,66 (95%KI 0,61-0,70) und derjenige für SOAT2 0,91 (95%KI 0,89-0,94). Diese positive Korrelation konnte durch den Pearson-Korrelationskoeffizienten  $r$ , welcher für die SOAT1-Färbung 0,78 (95%KI 0,76-0,81) und für die SOAT2-Färbung 0,94 (95%KI 0,93-0,95) betrug, bestätigt werden ( $p < 0,0001$ ) (2.2.6).

Insgesamt konnten 96% der SOAT1- und 95% der SOAT2-gefärbten TMA-Proben mit den Geweben von Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten ausgewertet werden, wobei in jeweils mehr als 99% eine SOAT Expression in den Zellen nachweisbar war. Für die folgenden Analysen wiesen 25% der Gewebeproben eine hohe ( $n=73$ , H-Score 3) und 75% eine niedrige ( $n=219$ , H-Score  $<3$ , nicht auswertbar: 13) SOAT1 Expression auf. Dahingegen zeigten 14% der Patientenproben eine hohe ( $n=40$ , H-Score 3) und 86% eine niedrige ( $n=249$ , H-Score  $<3$ , nicht auswertbar: 16) SOAT2 Expression (Tabelle 14).

Die Expression von SOAT1 und SOAT2 korrelierte mäßig miteinander (Spearman  $Rho = 0.339$ ,  $p < 0.001$ ).



**Abbildung 21: SOAT1 und SOAT2 Expression in Prostatakarzinomzellen**

Exemplarisch sind Gewebeprobe mit hoher (H-Score 3, **A** bzw. **E**), mittlerer (H-Score 2, **B** bzw. **F**), niedriger (H-Score 1, **C** bzw. **G**) bzw. fehlender (H-Score 0, **D** bzw. **H**) SOAT1 (A-D) bzw. SOAT2 (E-H) Expression dargestellt (2.2.5.3). In modifizierter Form zur Publikation angenommen.

### 3.3.2 Korrelation zwischen der SOAT Expression und dem biochemischen Progress bei Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom

Für die Überlebensanalysen wurden ausschließlich Patienten eingeschlossen, bei welchen die klinischen Daten vollständig und die dazugehörigen Prostatagewebeprobe immunohistochemisch auswertbar waren. In der Gruppe mit hoher SOAT1 Expression wiesen insgesamt 39 von 73 (53%) und in der Gruppe mit hoher SOAT2 Expression insgesamt 19 von 40 (48%) einen biochemischen Progress auf verglichen mit 63 (29%) und 83 (33%) in der Gruppe mit niedriger SOAT1 bzw. 2 Expression (Tabelle 14).

Die univariate Analyse zeigte einen statistisch hoch signifikanten Unterschied im Auftreten eines biochemischen Progresses bei den hier untersuchten Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten zwischen hoher (H-Score 3, n=72) und niedriger (H-

Score <3, n=218) SOAT1 Expression in Prostatakarzinomzellen [HR für den biochemischen Progress 2,11 (95%KI 1,42-3,15),  $p < 0,001$ ; Tabelle 18]. Das biochemisch progressfreie Überleben der Patienten mit hoher SOAT1 Expression war signifikant kürzer [93,3±9,5 Monate (95%KI 74,65-112,02) vs. 134,3±7,07 Monate (95%KI 120,47-148,19)], (Abbildung 22). In der multivariaten Analyse, welche an das Alter bei der OP, das klinische Tumorstadium, den Gleason-Score, den R-Status sowie den pathologischen LK-Status angepasst wurde, ließ sich ebenfalls die bedeutende prognostische Relevanz einer hohen SOAT1 Expression in Bezug auf den biochemischen Progress darstellen [HR für den biochemischen Progress 2,33 (95%KI 1,48-3,68),  $p < 0,001$ ; Tabelle 19A].

Ebenso ließ sich durch die univariate Analyse ein Trend ( $p = 0,052$ ) zwischen hoher SOAT2 Expression (H-Score 3, n=40) und dem Auftreten eines biochemischen Progresses bei den untersuchten Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten feststellen [HR für den biochemischen Progress 1,64 (95%KI 1,0-2,70),  $p = 0,052$ ; Tabelle 18]. Das biochemisch progressfreie Überleben der Gruppe mit hoher SOAT2 Expression (H-Score 3, n=40) betrug 91,3±11,4 Monate (95%KI 69,05-113,61) und das der Gruppe mit niedriger SOAT2 Expression (H-Score <3, n=247) 125,8±6,6 Monate (95%KI 112,9-138,7), (Abbildung 22). In der multivariaten Analyse hingegen konnte diese Korrelation wiederum nicht signifikant bestätigt werden [HR für den biochemischen Progress 1,52 (95%KI 0,86-2,67);  $p = 0,150$ ; Tabelle 19B].

Des Weiteren ließ sich anhand dieser statistischen Auswertungen darstellen, dass Patienten mit einem Tumorstadium 4 (n=43) ein deutlich größeres Risiko besitzen, einen biochemischen Progress zu erleiden als Patienten mit kleineren Tumor Stadien [HR für den biochemischen Progress 1,94 (95%KI 1,00-3,78),  $p = 0,051$ , Tabelle 18].

Für Patienten mit einem hohen, prognostisch ungünstigen Gleason-Score (Gleason-Score 8-10) konnte eine leichte Tendenz zu einem früheren Erlangen eines biochemischen Progresses aufgezeigt werden [HR für den biochemischen Progress 1,43 (95%KI 0,93-2,20),  $p = 0,103$ ; Tabelle 18].

Keine signifikante Korrelation konnte hier zwischen dem R-Status sowie dem

pathologischen LK-Status in Bezug auf einen biochemischen Progress aufgezeigt werden (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Beeinflussung des biochemischen Progresses durch verschiedene Faktoren nach einer univariaten Analyse bei Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten.**

Für die Analysen wurden nur Patienten mit vollständigen klinischen Daten sowie auswertbarer immunohistochemischer Färbung der Gewebeproben eingeschlossen (Insgesamt: n=305). In modifizierter Form zur Publikation angenommen.

<u>Univariate Analyse</u>			
<u>Variablen</u>	<u>HR</u>	<u>95% KI</u>	<u>P</u>
<b>Alter bei OP</b>	0,99	0,96-1,02	0,446
<b>Klinisches Tumorstadium</b>			
T2 (n=58) <sup>a</sup>			
T3 (n=202)	1,52	0,89-2,60	0,123
T4 (n=43)	1,94	1,00-3,78	0,051
<b>Gleason-Score</b>			
≤7 (n=221) <sup>b</sup>			
8-10 (n=64)	1,43	0,93-2,20	0,103
<b>R-Status</b>			
R0 (n=121) <sup>c</sup>			
R1 (n=147)	1,26	0,84-1,89	0,263
<b>LK-Status</b>			
N0 (n=209) <sup>d</sup>			
N1 (n=93)	0,73	0,47-1,12	0,149
<b>SOAT1 H-Score</b>			
<3 (n=218) <sup>e</sup>			
3 (n=72)	2,11	1,42-3,15	<b>&lt;0,001</b>
<b>SOAT2 H-Score</b>			
<3 (n=247) <sup>f</sup>			
3 (n=40)	1,64	1,0-2,70	0,052

<sup>a</sup> Klinisches Tumorstadium 2 diente als Referenzkategorie.

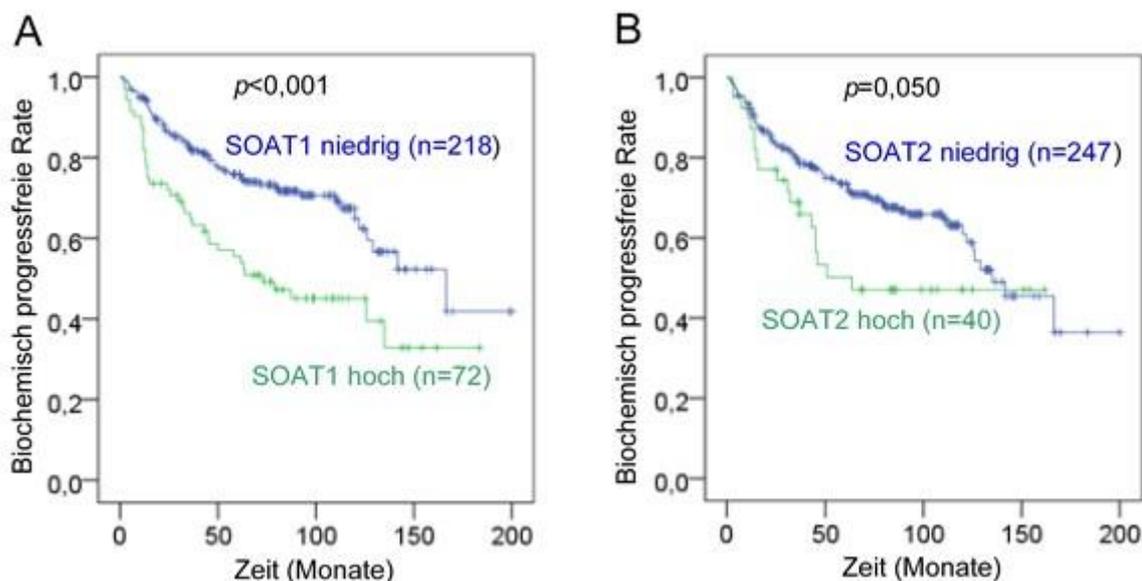
<sup>b</sup> Gleason-Score ≤7 diente als Referenzkategorie.

<sup>c</sup> R-Status R0 diente als Referenzkategorie.

<sup>d</sup> LK-Status N0 diente als Referenzkategorie.

<sup>e</sup> SOAT1 H-Score <3 diente als Referenzkategorie.

<sup>f</sup> SOAT2 H-Score <3 diente als Referenzkategorie



**Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven stellen das Auftreten eines biochemischen Progresses von Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der SOAT1 (A) bzw. der SOAT2 (B) Expression mit der Zeit dar.**

Patienten mit einer hohen SOAT1 Expression erleiden einen signifikant früheren Auftritt eines biochemischen Progresses. Die SOAT Expression der Prostatakarzinomzellen wurde durch immunhistochemische Färbungen evaluiert (2.2.5). In modifizierter Form zur Publikation angenommen.

**Tabelle 19: Beeinflussung des biochemischen Progresses durch SOAT1 (A) bzw. SOAT2 (B) nach einer multivariaten Analyse bei Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten.**

Für die Analysen wurden nur Patienten mit vollständigen klinischen Daten und auswertbarer immunhistochemischer Färbung der Gewebeproben eingeschlossen (Insgesamt: n=305). In modifizierter Form zur Publikation angenommen.

<u>A: Multivariate Analyse (SOAT1)</u>				<u>B: Multivariate Analyse (SOAT2)</u>			
<u>Variablen</u>	<u>HR</u>	<u>95% KI</u>	<u>P</u>	<u>Variablen</u>	<u>HR</u>	<u>95% KI</u>	<u>P</u>
<b>Alter bei OP</b>	0,99	0,96-1,02	0,470	<b>Alter bei OP</b>	0,99	0,96-1,01	0,313
<b>Klinisches Tumorstadium</b>				<b>Klinisches Tumorstadium</b>			
T2 (n=47) <sup>a</sup>				T2 (n=46) <sup>a</sup>			
T3 (n=155)	1,43	0,74-2,78	0,285	T3 (n=153)	1,34	0,70-2,57	0,385
T4 (n=35)	2,15	0,89-5,18	0,090	T4 (n=35)	2,08	0,86-5,05	0,106
<b>Gleason-Score</b>				<b>Gleason-Score</b>			
≤7 (n=183) <sup>b</sup>				≤7 (n=181) <sup>b</sup>			
8-10 (n=54)	1,60	0,97-2,64	0,065	8-10 (n=53)	1,41	0,86-2,31	0,178
<b>R-Status</b>				<b>R-Status</b>			
R0 (n=113) <sup>c</sup>				R0 (n=111) <sup>c</sup>			
R1 (n=124)	1,13	0,68-1,85	0,644	R1 (n=123)	1,04	0,63-1,72	0,884

<b>LK-Status</b>				<b>LK-Status</b>			
N0 (n=167) <sup>d</sup>				N0 (n=164) <sup>d</sup>			
N1 (n=70)	0,83	0,49-1,41	0,492	N1 (n=70)	0,85	0,50-1,45	0,556
<b>SOAT1 H-Score</b>				<b>SOAT2 H-Score</b>			
<3 (n=176) <sup>e</sup>				<3 (n=201) <sup>f</sup>			
3 (n=61)	2,33	1,48-3,68	<b>&lt;0,001</b>	3 (n=33)	1,52	0,86-2,67	0,150

<sup>a</sup> Klinisches Tumorstadium 2 diente als Referenzkategorie.

<sup>b</sup> Gleason-Score  $\leq 7$  diente als Referenzkategorie.

<sup>c</sup> R-Status R0 diente als Referenzkategorie.

<sup>d</sup> LK-Status N0 diente als Referenzkategorie.

<sup>e</sup> SOAT1 H-Score <3 diente als Referenzkategorie.

<sup>f</sup> SOAT2 H-Score <3 diente als Referenzkategorie.

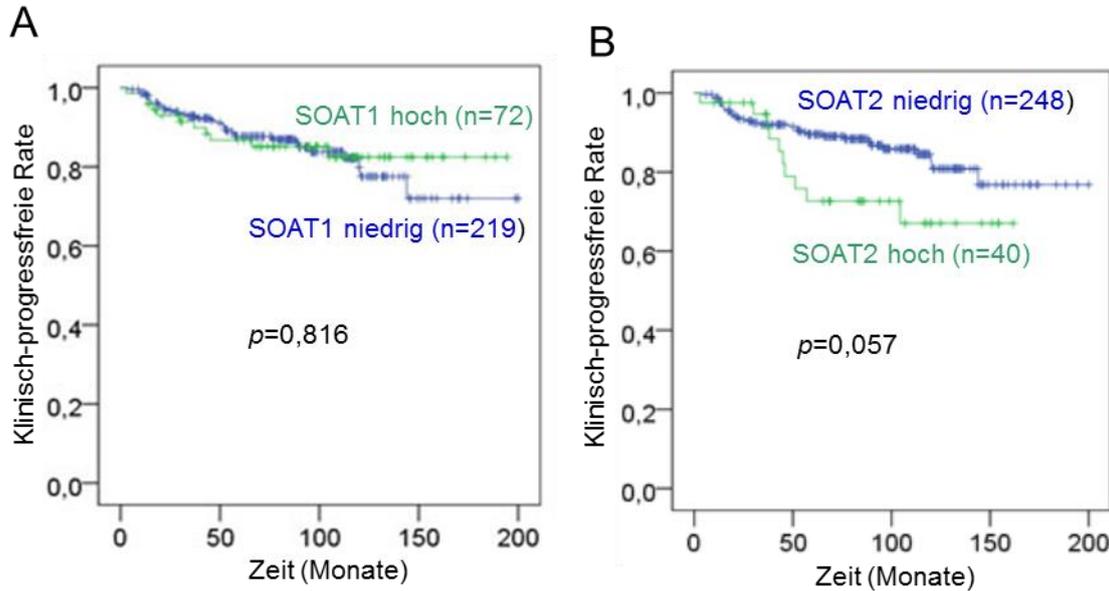
### 3.3.3 Korrelation zwischen der SOAT Expression und dem klinischen Progress bei Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom

Für eine hohe SOAT1 Expression der Prostatagewebeprobe konnte bei den hier untersuchten Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom kein signifikanter Zusammenhang bezüglich des Auftretens eines klinischen Progresses festgestellt werden. Patienten mit hoher SOAT1 Expression (H-Score 3, n=72) lebten im Medianen 167,4 $\pm$ 7,4 Monate (95%KI 152,8-182,0), während die Gruppe mit niedriger SOAT1 Expression (H-Score <3, n=219) 166,7 $\pm$ 5,8 Monate (95%KI 155,4-178,0) lebte, ohne einen klinischen Progress zu erleiden, (Abbildung 23A).

Auch für eine hohe SOAT2 Expression konnte ebenso nur eine leichte Tendenz festgestellt werden. Das klinisch progressfreie Überleben der Patienten mit hoher SOAT2 Expression (H-Score 3, n=40) betrug im Medianen 125,2 $\pm$ 9,7 Monate (95%KI 106,2-144,2) und das der Gruppe mit niedriger SOAT2 Expression (H-Score <3, n=248) 171,1 $\pm$ 4,9 Monate (95%KI 161,6-180,7), (Abbildung 23B). In einer multivariaten Analyse wurde der Zusammenhang nicht bestätigt.

Für einen hohen Gleason-Score konnte kein signifikanter Zusammenhang bezüglich des Auftretens eines klinischen Progresses festgestellt werden. Patienten mit hohem Gleason-Score (Gleason-Score 8-10, n=65) lebten im Medianen 126,6 $\pm$ 6,4 Monate (95%KI 114,14-139,10), während die Gruppe mit

niedrigem Gleason-Score (Gleason-Score  $\leq 7$ ,  $n=221$ ) bis zum Erlangen eines klinischen Progresses  $174,1 \pm 4,5$  Monate (95%KI 165,30-182,86) lebte,  $p=0,132$ .



**Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven stellen das Auftreten eines klinischen Progresses von Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der SOAT1 (A) bzw. der SOAT2 (B) Expression mit der Zeit dar.**

Für Patienten mit einer hohen SOAT1 bzw. SOAT2 Expression zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem zeitlichen Auftritt eines klinischen Progresses. Die SOAT Expression der Prostatakarzinomzellen wurde durch immunhistochemische Färbungen evaluiert (2.2.5).

### 3.3.4 Korrelation zwischen der SOAT Expression und dem Gesamtüberleben bei Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom

In Hinblick auf das Gesamtüberleben konnte kein signifikanter Zusammenhang, weder für eine hohe SOAT1 noch für eine hohe SOAT2 Expression der Prostatakarzinomzellen, festgestellt werden. Patienten mit hoher SOAT1 Expression (H-Score 3,  $n=73$ ) lebten im Medianen  $186,6 \pm 4,3$  Monate (95%KI 178,2-195,1) bzw. in dieser Zeitspanne fand das letzte Follow-up statt, während die Gruppe mit niedriger SOAT1 Expression (H-Score  $<3$ ,  $n=219$ )  $179,3 \pm 4,7$  Monate (95%KI 170,2-188,5) lebte,  $p=0,110$ , bzw. für diese Zeit Follow-up-Daten verfügbar waren. Das mediane Gesamtüberleben bzw. Follow-up der Patienten mit hoher SOAT2 Expression (H-Score 3,  $n=40$ ) betrug  $151,9 \pm 5,4$  Monate

(95%KI 141,3-162,5), während das der Gruppe mit niedriger SOAT2 Expression (H-Score <3, n=249) 183,2±3,8 Monate (95%KI 175,8-190,7) betrug,  $p=0,885$ . Hierbei ist anzumerken, dass im Verlauf nur 22 Patienten (7,2%) ursächlich an ihrem Prostatakarzinom verstarben (Tabelle 14).

### **3.3.5 Korrelation zwischen der SOAT Expression und dem Gleason-Score**

In der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman konnte bei diesem Hochrisiko Prostatakarzinom-Kollektiv keine signifikante Korrelation zwischen dem SOAT H-Score sowie dem histologischen Gleason-Score festgestellt werden.

## 4. Diskussion

---

### 4.1 Methodendiskussion

Tumorzellen unterliegen im Rahmen ihrer Tumorgenese vielfältige Änderungen ihres Metabolismus, die als Anpassung im Sinne einer Tumorevolution zu verstehen sind und das Überleben bzw. die Proliferation und Progression des Tumors mitbedingen [1]. Hierzu zählt in vielen Fällen auch eine Steigerung des Lipidstoffwechsels [13, 14]. SOAT1 besitzt aufgrund seiner Schlüsselrolle im Cholesterinmetabolismus als ein potenzielles Target in der Therapie verschiedener Tumorerkrankungen einen besonderen Stellenwert [12]. Eine ähnliche Rolle könnte auch für SOAT2 postuliert werden. Es erscheint daher lohnend, den Lipidstoffwechsel von Tumorzellen besser zu verstehen und insbesondere die Rolle von SOAT-Enzymen weiter aufzuklären. Dies könnte möglicherweise den Weg für einen klinischen Einsatz von SOAT-Inhibitoren bahnen.

#### 4.1.1 *In-vitro* Fluoreszenz-Assay zur Untersuchung der SOAT-Aktivität

Der erste Teil dieser Arbeit hatte das Ziel, einen *in-vitro* Assay zur Untersuchung der SOAT katalysierten Veresterung von Cholesterin zu etablieren. Hierzu inkubierte ich transfizierte AD-293 Zellen sowie NCI-H295R Zellen mit 1µg/ml fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin zusammen mit 0µM (Kontrolle), 12,5µM, 25µM, 50µM und 100µM ATR101, AZD3988, Mitotane oder Sandoz58-035 für 4 Stunden (2.2.1.3). In den Zellen fand daraufhin eine entsprechende Veresterung des fluoreszierenden Lipid-Analogons statt und resultierte in der Bildung von *Lipid droplets* im Zytoplasma der Zellen. Nach zweimaligem Waschen mit DBPS betrachtete und evaluierte ich diese unmittelbar mit dem Axiovert 135 Mikroskop von Zeiss.

Das in den Versuchen verwendete 22-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-23,24-bisnor-5-cholen-3-ol (NBD-Cholesterin) ist ein fluoreszierendes Sterol-Analogon, welches wichtige Eigenschaften von nativem Cholesterin

besitzt. So wird es in den Zellen in derselben Weise verstoffwechselt und transportiert [116, 117]. Weiterhin wird das NBD-Lipid-Analogon ebenso wie endogenes Cholesterin zur Lipidspeicherung durch SOAT verestert [118]. Für meinen zellbasierten Assay war das NBD-Cholesterin durch sein umgebungsabhängiges Fluoreszenzsignal gut geeignet: in polarer Umgebung (Zellmembranen) ist die Fluoreszenz schwach, während in lipophiler bzw. neutraler Umgebung, wie etwa in Lipidtröpfchen, ein starkes Fluoreszenzsignal vorherrscht [119, 120]. Auf diese Weise konnte die SOAT-Aktivität der NCI-H295R Zellen bzw. der transfizierten AD-293 Zellen anhand des Fluoreszenzsignals beurteilt und gemessen werden.

Die verwendeten NCI-H295R Zellen ließen sich äußerst gut kultivieren und waren zudem durch ihre starke endogene SOAT1 Expression (Abbildung 7) ideal für diesen *in-vitro* Assay geeignet. Die von Lada et al. verwendeten AC29 Zellen zur Untersuchung der SOAT-Aktivität [41] exprimierten im Vergleich zu AD-293 Zellen eine deutlich höhere Menge an endogenem SOAT1 und 2 und wurden daher nicht als Versuchszelllinie gewählt (Abbildung 7).

Mikroskopisch konnte bei der alleinigen Inkubation der NCI-H295R Zellen mit NBD-Cholesterin ebenso wie bei SOAT1 transfizierten AD-293 Zellen eine starke Bildung von Cholesterinester enthaltenden *Lipid droplets* beobachtet werden. Die mikroskopisch erfassbare Bildung von *Lipid droplets* verdeutlicht die Relevanz von SOAT1 bei der Bildung und zytoplasmatischen Speicherung von Cholesterinestern aus überschüssigem Cholesterin und ermöglicht eine Visualisierung dieser Enzymfunktion.

Hingegen war die Bildung von *Lipid droplets* im Zytoplasma SOAT2 transfizierter AD-293 Zellen sehr gering (Abbildung 14). Dies passt zu der in der Literatur beschriebenen Funktion von SOAT2, wonach SOAT2 in bestimmten Zelltypen die Bereitstellung und Sekretion von Lipoproteinen katalysiert und nicht für die intrazelluläre Cholesterinesterspeicherung zuständig zu sein scheint [41, 46]. In weiteren Versuchen könnte man diese Hypothese bestätigen und den Überstand letzterer Zellen mikroskopieren bzw. dort Fluoreszenz messen, um so möglicherweise in Lipoproteinen verpackte fluoreszierende Cholesterinester nachzuweisen.

Auf diese Weise habe ich als Vorstufe eines *in-vitro* Assays zunächst mikroskopisch überprüft, ob die von SOAT katalysierte Veresterung von Cholesterin *in vitro* nachvollzogen werden kann. Dementsprechend wurden arbiträr die oben genannten SOAT-Inhibitor Konzentrationen gewählt, zusammen mit dem 22-NBD-Cholesterin zu den Zellen gegeben und wiederum die Bildung intrazellulär fluoreszierender *Lipid droplets* untersucht. Sowohl in NCI-H295R Zellen als auch in SOAT1 transfizierten AD-293 Zellen konnten bei der Inkubation mit 12,5µM Mitotane noch einige Cholesterinester in den Zellen detektiert werden, während diese bei steigender Konzentration abnahmen (Abbildung 15, Abbildung 16). Eine im Vergleich etwas reduzierte *Lipid droplet* Bildung war bei der Inkubation mit Sandoz58-035 festzustellen. Bei der Inkubation der Zellen mit ATR101 bzw. AZD3988 waren bereits bei der geringsten gewählten Konzentration von je 12,5µM keine *Lipid droplets* mehr zu sehen.

Eine Grundlage dieses Experiments basiert auf der Annahme, dass das für die Veresterung von Cholesterin erforderliche Acyl-CoA intrazellulär zur Verfügung steht. Durch die mikroskopische Visualisierung der *Lipid-droplet* Bildung konnten bereits erste Rückschlüsse über die vermutlichen Hemmstärken der jeweiligen SOAT-Inhibitoren getroffen werden, wobei die Enzymaktivität durch Mitotane und Sandoz58-035 weniger als durch ATR101 bzw. AZD3988 eingeschränkt wurde. Limitierender Faktor hierbei ist allerdings, dass eine exakte Quantifizierung der Cholesterinester auf diese Weise noch nicht möglich ist.

### **4.1.2 Bestimmung der Hemmstärken ausgewählter SOAT-Inhibitoren mittels Dünnschichtchromatographie**

Um schließlich eine genaue Quantifizierung der Bildung fluoreszierender *Lipid droplets* nach Inkubation der Zellen mit entsprechenden SOAT-Inhibitor Konzentrationen zu ermöglichen, erweiterte ich die Vorstufe des *in-vitro* Fluoreszenz-Assays. Hierfür verwendete ich ausschließlich NCI-H295R Zellen. Entsprechend des zuvor etablierten Assays wurden die Zellen mit nun erprobten SOAT-Inhibitor Konzentrationen behandelt und weiterverarbeitet (2.2.4). Die Lipid-Proben wurden schließlich auf Merck-Silan-Platten aufgetragen, chromatographisch aufgetrennt und die fluoreszierenden Cholesterinester mit

einem ImageQuant LAS 4000 Gerät erfasst und mit Hilfe einer ImageQuant TL Software quantifiziert. Auf diese Weise konnten für jeden SOAT-Inhibitor eine  $IC_{50}$ -Kurve erstellt werden (Abbildung 20). Mitotane erwies sich analog zur Vorstufe des Fluoreszenz-Assays als schwächster SOAT-Inhibitor, gefolgt von Sandoz58-035, ATR101 und schließlich AZD3988.

Durch die Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen ist es nun möglich, die SOAT-Inhibitoren miteinander zu vergleichen und diese hinsichtlich ihrer Pharmakodynamik zu beurteilen. Dadurch wird nicht nur ein umfassenderes Verständnis der Enzymwirkweise ermöglicht, sondern möglicherweise auch eine potenzielle klinische Anwendung der SOAT-Inhibitoren vorangetrieben.

Die Anwendung dieser Methode zur Untersuchung der SOAT-Aktivität bzw. zur Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration zeichnet sich dadurch aus, dass das Enzym hierbei unter Einbezug der gesamten Zellstrukturen und Stoffwechselfvorgänge untersucht und nicht isoliert betrachtet wird. Es wird also eine physiologische Enzymuntersuchung ermöglicht, welche einen potenziellen klinischen Einsatz begünstigen könnte.

In zukünftigen Versuchsreihen könnte erneut eine  $IC_{50}$ -Bestimmung dieser SOAT-Inhibitoren unter Verwendung SOAT1-transfizierter AD-293 Zellen vorgenommen werden. Durch eine Manipulation der Zellen, z.B. eine Änderung des Angebots an Lipiden, könnte man untersuchen, ob es zellspezifische Unterschiede gibt, die sich auf die Wirkung der einzelnen Inhibitoren auswirken [33].

Ein Nachteil der Methode ist das Erfordernis der Zellyse und der anschließenden Chromatographie, was eine Verwendung in Hochdurchsatzanalysen verhindert. Zudem ist festzustellen, dass v.a. beim Einsatz höherer Dosierungen der Inhibitoren die Summe an freiem NBD-Cholesterin zum Teil nicht der eingesetzten Menge entspricht, sodass das NBD-Cholesterin - erwartbar - nicht quantitativ in Cholesterinester umgesetzt wird. Man könnte mutmaßen, dass während der Inkubation mit entsprechenden Inhibitoren ein geringer Anteil der Zellen zerstört wird und dadurch eine gewisse Menge des eingesetzten NBD-Cholesterins aus dem Zytoplasma in den Überstand entweicht und sich somit den anschließenden Messungen entzieht. Folglich wäre ein Verlust des

eingesetzten NBD-Cholesterins sowie der Esterfraktion denkbar. Fehler bei der IC<sub>50</sub>-Bestimmung sind diesbezüglich nicht auszuschließen, dies wäre bei einem zellfreien Assay potenziell umgebar.

#### **4.1.3 Alternative Möglichkeiten zur Quantifizierung der SOAT-Aktivität**

De Medina et al. beispielsweise untersuchten die Aktivität von SOAT unter Anwendung einer gängigen Methode, die auf der Isolation und Quantifizierung radioaktiver Substanzen beruht. Sie maßen den inhibitorischen Effekt von Tamoxifen auf SOAT mittels eines auf Rattenleber Mikrosomen basierten *in-vitro* Assays [121]. Mikrosomen sind kleine Vesikel, welche aus ER-Bruchstücken gebildet werden [122] und somit mit Sterol O-Acyltransferasen ausgestattet sind. Nach der Gewinnung eines Pellets aus Rattenleber Mikrosomen wurde an letzteren die Bildung von Cholesteryl [<sup>14</sup>C]-Oleat aus endogenem mikrosomalem Cholesterin und exogen zugeführtem [<sup>14</sup>C]-Oleoyl Coenzym A gemessen. Hierzu wurden die radioaktiv markierten Cholesterinester mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und schließlich quantifiziert.

Bei dieser Methode wird die SOAT-Aktivität am isolierten Enzym und nicht unter Einbezug der gesamten Zellmaschinerie untersucht. Zum einen wird dadurch eine genaue Untersuchung und exakte quantitative Aktivitätsbestimmung eines isolierten Enzyms, in diesem Fall SOAT, ermöglicht. Zum anderen jedoch erfordert dieser Assay den Einsatz radioaktiver Substanzen und ist mit einem nicht unerheblichen Arbeitsaufwand verbunden. Des Weiteren werden bei dieser Methode aufgrund der isolierten Enzymuntersuchung die sich in einer Zelle bzw. einem Zellverbund gegenseitig beeinflussenden Stoffwechselforgänge außer Acht gelassen, wodurch diese Methode im Gegensatz zu der hier angewendeten Methode eher modellhaft und enzymologisch orientiert erscheint als physiologisch.

#### **4.2 Diskussion der Relevanz der SOAT Expression in Hochrisiko Prostatakarzinomen**

Wie bereits erwähnt konnte insbesondere SOAT1 in einigen experimentellen Studien als potenzielles Zielmolekül in der Therapie von Tumoren identifiziert

werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit ging ich diesbezüglich der Fragestellung nach, ob auch der Expression von SOAT1 und 2 eine prognostische Relevanz in einem bestimmten humanen Tumor, dem Hochrisiko Prostatakarzinom, zukommt. Dazu ermittelte ich die Stärke der SOAT Expression in formalinfixierten, paraffin eingebetteten Proben von radikalen Prostatektomien bei Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten. Anhand von immunhistochemisch gefärbten TMAs konnte ein semiquantitativer H-Score bestimmt und schließlich zu den klinischen Daten des Patientenmaterials in Bezug gesetzt werden (2.2.5). Endpunkte waren das Auftreten eines biochemischen bzw. klinischen Progresses.

Die verwendeten TMAs sind durch die gleichzeitige Untersuchung vielzähliger Proben einerseits zeit- und materialsparend und reduzieren andererseits die Variabilität der Färbeergebnisse. Die Herstellung ist jedoch verglichen mit den klassischen Objektträgern mit einer einzigen Probe technisch aufwändiger und bedarf aufgrund der begrenzten Größe eine präzise Auswahl der Probenausschnitte [123]. Im Rahmen dieser Studie wandte ich zur immunhistochemischen Detektion der Proben die PAP-Methode, eine Erweiterung der indirekten Methode der Immunhistochemie an. Im Gegensatz zur direkten Methode, bei welcher der Primärantikörper gegen das Zielantigen direkt mit einem Marker gekoppelt ist und in einem einschrittigen Vorgang visualisiert werden kann, ist die indirekte Methode deutlich sensitiver. Hierbei interagieren mehrere Moleküle des Primärantikörpers mit einem Sekundär- bzw. bei der aufwendigeren aber noch deutlich sensitiveren PAP-Methode zusätzlich mit einem an den Sekundärantikörper gerichteten Tertiärantikörper, welcher mit einem Enzym oder Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und somit das entstehende Signal amplifizieren kann [124, 125]. Als Primärantikörper zur SOAT Detektion dienten polyklonale Antikörper. Sie sind in der Lage, an mehrere Epitope des Zielantigens zu binden, weshalb sie aber auch eine höhere Tendenz zur Bildung von Kreuzreaktivitäten mit weiteren Antigenen besitzen und somit falsch positive Signale bedingen können. Im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern zeichnen sich diese also durch eine höhere Affinität bei gleichzeitig niedrigerer Spezifität aus [125].

Insgesamt wiesen 25% der Proben eine hohe SOAT1 und 14% eine hohe SOAT2 Expression auf. Veränderungen des Lipidmetabolismus scheinen beim Prostatakarzinom vor allem unter hypoxischen Bedingungen entscheidend zur Überlebensstrategie beizutragen [126]. Yue et al. konnten einen positiven Zusammenhang zwischen einer Inhibierung von SOAT1 und der daraus resultierenden Anhebung des freien Cholesterin-Spiegels in Prostatakarzinomzellen sowie einer Abnahme der Tumorzellproliferation und -aggressivität aufzeigen [17]. Dass selbst bei der hier untersuchten Gruppe von Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom nur ein Viertel eine hohe SOAT1 Expression aufwies, verdeutlicht die Notwendigkeit, Patienten nach einem potenziellen Nutzen einer auf die Inhibition von SOAT1 gerichteten Therapie zu selektieren im Sinne einer personalisierten Therapie.

### **4.2.1 SOAT1 Expression im Zusammenhang mit biochemischen bzw. klinischen Parametern**

Die Überexpression von SOAT1 (H-Score 3) ging in der univariaten Analyse mit einem hoch signifikant verkürzten biochemisch progressfreien Überleben der Patienten einher. Der Zusammenhang zwischen der Stärke der SOAT Expression und dem biochemisch progressfreien Überleben hatte auch in der multivariaten Analyse nach Adjustierung für das Alter bei der OP, das Tumorstadium, den Gleason-Score, den Residual-Status sowie den pathologischen Lymphknoten-Status Bestand (3.3.2). Diese Korrelation könnte damit erklärt werden, dass die Tumorzellen vor der radikalen Prostatektomie durch die ausgeprägte Cholesterinveresterung durch SOAT1 einen Schutz vor Cholesterin getriggertem endoplasmatischen Zellstress hatten und folglich die Tumoraggressivität anstieg (6.1). Es könnte demnach eine erhöhte Tendenz zum erneuten Tumorwachstum bestehen.

Das Ergebnis lässt sich auch gut mit der Hypothese von Yue et al. vereinbaren, dass eine durch die Abnahme des freien Cholesterins bedingte Hochregulierung von SREBP zu einer gesteigerten Lipidsynthese und vermehrten Expression von LDL-Rezeptoren führt, welche wiederum eine vermehrte Aufnahme essentieller Fettsäuren und eine damit verbundene Tumorzellproliferation und -invasion bedingt

(Abbildung 1B) [17, 22].

Die Arbeitsgruppe von Stopsack et al. beschreibt gegensätzlich hierzu einen positiven Zusammenhang zwischen hohem Gleason-Score und der damit einhergehenden erhöhten Tumoraggressivität sowie niedriger SOAT1 und LDL-Rezeptor-Expression. Auch führen sie die erhöhte intrazelluläre Cholesterinsynthese in Prostatatumoren vorwiegend auf De-novo-Synthese über den Mevalonatweg zurück und nicht auf transmembranäre Aufnahme via gesteigerter LDL-Rezeptor Expression [127]. Allerdings basieren die Ergebnisse dieser Arbeit auf reinen mRNA-Analysen, welche bekanntermaßen nicht unbedingt die tatsächliche Protein-Expression widerspiegeln und die Aussagekraft daher unklar ist [128].

Denkbar ist darüber hinaus, dass die Expression von SOAT1 und die damit einhergehende Bildung intrazellulärer Cholesterinester-Depots eine wesentliche Voraussetzung für eine intratumorale Steroidbiosynthese darstellen könnte. Es ist derzeit nicht klar, inwieweit bestimmte Prostatakarzinome zumindest partiell in der Lage sind, selbst Androgene zu produzieren. Jedenfalls hat sich erwiesen, dass eine Inhibition des in der frühen Steroidbiosynthese beteiligten Enzyms CYP17 durch das Medikament Abirateron über die medikamentöse Kastration hinaus einen Vorteil in Bezug auf das progressionsfreie und das Gesamtüberleben bei Patienten mit metastasiertem hormonsensitivem Prostatakarzinom darstellt [129, 130]. Für den Therapieeffekt scheint neben einer Steroidbiosynthese aus adrenalen Vorläuferandrogenen auch eine Androgensynthese aus intratumoralem Cholesterin denkbar zu sein [131-133]. In einigen Studien konnte diesbezüglich eine veränderte Expression verschiedener Schlüsselenzyme, vor allem CYP11A1, CYP17A1, HSD3 und HSD173, in Prostatakarzinomzellen detektiert werden, welche an der De-novo-Androgensynthese beteiligt sind [134, 135]. Daneben konnte IGF2 in zellbasierten Versuchen als Aktivator der intratumoralen Steroidbiosynthese ermittelt werden [136].

Während eine hohe SOAT1 Expression in den hier verwendeten humanen Hochrisiko Prostatakarzinomproben als unabhängiger Prädiktor eines postoperativen biochemischen Progresses nachgewiesen werden konnte,

bestand bei diesem Kollektiv keine positive Korrelation zwischen einer hohen SOAT1 Expression und dem klinischen Progress (3.3.3). Hierbei ist darauf zu achten, dass nach der radikalen Prostatektomie von den 109 Patienten mit einem biochemischen Progress nur 44 Patienten (insgesamt 14,4%) einen klinischen Progress erlitten, welcher nach einer medianen Zeitspanne von 35,5 Monaten manifest wurde (Tabelle 14). Die insgesamt geringe Anzahl von Patienten mit einem definitiven, klinisch relevanten Rezidiv trotz des Hochrisiko Patienten-Kollektivs und ein zum Ende der Folgeuntersuchungen möglicherweise noch nicht stattgehabter klinischer Progress aufgrund einer Latenz zwischen letzterem und dem biochemischen Progress könnten die statistische Aussagekraft verringern. Da bei einigen Patienten eine adjuvante Hormontherapie bzw. Bestrahlung erfolgte ist des Weiteren anzunehmen, dass eine mögliche Intervention nach der Detektion eines biochemischen Rezidivs das Ausbleiben oder Herauszögern eines Lokalrezidivs bzw. einer Fernmetastasierung bedingen könnte.

#### **4.2.2 SOAT2 Expression im Zusammenhang mit biochemischen bzw. klinischen Parametern**

Für eine hohe SOAT2 Expression (H-Score 3) konnte kein signifikanter Unterschied im Auftreten weder eines biochemischen noch eines klinischen Progresses im Vergleich zu einer niedrigen SOAT2 Expression (H-Score <3) aufgezeigt werden. Lediglich ein grenzwertig positiver Zusammenhang konnte zwischen einer hohen SOAT2 Expression und einem biochemischen Progress festgestellt werden (3.3.2, 3.3.3). Diese Ergebnisse können gut mit der bestehenden Erkenntnis und den Ergebnissen des vorherigen *in-vitro* Assays dieser Arbeit vereint werden, dass SOAT2 primär für die Bereitstellung und Sekretion von Lipoproteinen zuständig zu sein scheint [41]. Im Gegensatz zu SOAT1 ist dieses Isoenzym für die intrazelluläre Cholesterinhomöostase und der Veresterung von freiem Cholesterin von geringerer Bedeutung. Man könnte jedoch mutmaßen, dass SOAT2 möglicherweise über zusätzliche Mechanismen verfügen könnte, um bestimmte Lipide aus den Zellen heraus zu schaffen und somit protektiv für diese zu wirken.

#### **4.2.3 Diskussion weiterer Parameter und deren Korrelation mit einer Progression beim Hochrisiko Prostatakarzinom**

Bei den durchgeführten statistischen Analysen konnte kein positiver Zusammenhang zwischen dem Lymphknoten-Status bzw. dem Residual-Status und dem biochemischen Progress festgestellt werden (3.3.2). In dieser Analyse wurde jedoch nur zwischen positivem und negativem Lymphknotenstatus abgegrenzt, vielmehr scheint aber die Anzahl der tumorbefallenen Lymphknoten einen Einfluss auf das Überleben zu haben. Der Befall von mehr als drei Lymphknoten ist möglicherweise mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert [137-139].

Der Einfluss eines positiven Resektionsrands auf den biochemischen Progress ist derzeit noch nicht endgültig geklärt [140]. Einerseits gibt es Studien, die ähnlich wie in dieser Arbeit keine Korrelation zeigen [141-143], andererseits postulieren andere Arbeiten einen positiven Zusammenhang, welcher vor allem abhängig vom Ausmaß und der Verteilung zu sein scheint [144, 145]. Es werden weitere Untersuchungen bezüglich des Einflusses eines positiven Resektionsstatus nach einer radikalen Prostatektomie auf den biochemischen Progress bzw. das klinische Outcome notwendig zu sein, um eine mögliche therapeutische Konsequenz daraus ziehen zu können.

In Hinblick auf einen hohen, prognostisch ungünstigen Gleason-Score (Gleason Score 8-10) konnte bei diesem Kollektiv nur eine Tendenz zum früheren Auftreten eines biochemischen Progresses festgestellt werden (3.3.2). Der sonst so bedeutsame und etablierte Gleason-Score zur präoperativen Risikostratifizierung von Prostatakarzinomen scheint, wie auch in anderen Studien [141], bei diesem vorselektierten Kollektiv alleine klinisch keine ausreichende prognostische Relevanz bezüglich des rezidivfreien Überlebens zu besitzen. Demgegenüber wurde der Gleason-Score wiederum in anderen Studien als unabhängiger Risikofaktor eines postoperativen prostatakrebspezifischen Todes bei Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom postuliert [146, 147]. Mehrere Ursachen sind denkbar, weshalb der Gleason-Score in meiner Studie nicht signifikant mit dem biochemisch rezidivfreien Überleben korreliert. So ist bekannt, dass die histopathologische Erhebung des Gleason-Scores mit einer hohen Inter-

Observer-Variabilität behaftet ist, weshalb in unterschiedlichen Kohorten unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten sind [148]. Die hier untersuchten Kohorten wurden jeweils von einem Pathologen evaluiert, so dass die Heterogenität innerhalb der Kohorte möglicherweise geringer ist. Insgesamt ist die hier untersuchte Gruppe relativ klein, sodass an größeren Kohorten gewonnene Ergebnisse nicht zwingend auch auf die vorliegende Probenserie übertragbar sein müssen. In der Tat dient, wie oben ausgeführt, der Gleason-Score nur als einer der relevanten prognostischen Faktoren, um die große Heterogenität der Prostatakarzinome besser abzubilden. In vielen Studien konnte die klassische Triade aus Gleason-Score, prä-operativem PSA und Tumorstadium zusammen als verlässliche Abschätzung eines postoperativen Rezidivs herausgearbeitet werden [149].

Eine Korrelation zwischen dem SOAT H-Score und dem Gleason-Score wurde in dieser Studie nicht festgestellt.

Weiterhin konnte bei diesen Analysen keine Korrelation zwischen der Expression von SOAT und dem Gesamtüberleben der Patienten aufgezeigt werden, was jedoch durch die insgesamt geringe krebs-spezifische Sterberate von nur 7,2% aller Patienten bedingt sein könnte.

In den letzten Jahren wurden in einigen Studien potenziell prognostische Biomarker des Prostatakarzinoms untersucht, jedoch ohne bisher Relevanz in der klinischen Etablierung zu erzielen [150-152]. So konnte in Studien neben der Expression großer Mengen des Oberflächenglykans PD60 Polysialinsäure beispielsweise die Herunterregulierung der Tumorsuppressorgene miR-221 bzw. mir-203 als unabhängige Prognosefaktoren des krebspezifischen Todes bzw. PSA-Progresses beim Hochrisikoprostatakarzinom detektiert werden [75, 153, 154], die Assoziation der Expression von DCLK1 mit einem verkürzten biochemisch rezidivfreien Überleben dargestellt werden [155] oder die Korrelation zwischen einer hohen SLCO2B1-Expression bei Prostatakarzinomen mit einem prognostisch ungünstigem Gleason-Score und dem Auftreten eines biochemischen Progresses bzw. einer Metastasierung gezeigt werden [156].

Gerade bei Patienten mit einem Hochrisiko Prostatakarzinom scheint für eine adäquate, personalisierte Therapie die Etablierung verlässlicher prognostischer

Marker entscheidend zu sein, wodurch die Bedeutsamkeit von SOAT1 als möglicher prognostischer Marker bei diesem Kollektiv unterstrichen wird.

#### **4.2.4 Diskussion der Rolle von SOAT1 als potenziell prognostischer molekularer Marker beim Hochrisiko Prostatakarzinom**

Es ist wichtig zu beachten, dass die Diagnose eines Hochrisiko Prostatakarzinoms mit einem heterogenen Patientenkollektiv und unterschiedlichem Outcome nach einer Primärtherapie verbunden ist, was durch eine Vielzahl variierender Definitionen des Hochrisiko Prostatakarzinoms mitbedingt wird [157-160]. Obwohl stets neue, teils vielversprechende Publikationen bezüglich der postoperativen Prognoseabschätzung des Hochrisiko Prostatakarzinoms veröffentlicht werden [161-165], hat sich derzeit noch kein zuverlässiges Klassifikationsschema etabliert [159]. In Studien wurde diesbezüglich kürzlich die Subklassifikation des Hochrisiko Prostatakarzinoms in drei multifaktorielle Prognosegruppen vorgeschlagen, um das perioperative Patientenmanagement und die Entscheidung für oder gegen eine mögliche adjuvante Therapie zu optimieren [146, 166]. Des Weiteren stellten Alam et al. ein neues Nomogramm zur postoperativen Abschätzung des biochemischen Rezidivs beim lokalisierten Hochrisiko Prostatakarzinom vor, welches Alter, Rasse, PSA-Wert, Gleason Graduierung, klinisches Tumorstadium und die Anzahl der Cores mit Gleason-Score 8–10 einschließt [167]. Um bei diesem heterogenen Krankheitsbild ein optimales Follow-up und eine entsprechende personalisierte Therapie zu gewährleisten ohne Patienten aber zu übertherapieren, sollte neben den bewährten Prognosefaktoren das Augenmerk ergänzend auf biochemische Marker gelegt werden, um so die Voraussagekraft des Rezidivrisikos und die Spezifität des krebsspezifischen Überlebens zu steigern [168].

Bei diesem bestimmten Kollektiv korrelierte eine Überexpression von SOAT1 hochsignifikant mit einem verkürzten biochemisch progressfreien Überleben nach radikaler Prostatektomie und könnte als molekularer Marker demnach einerseits als effektives Therapietarget fungieren und andererseits als prognostischer Marker hilfreich sein. Dadurch könnten diejenigen Patienten mit

einer hohen SOAT1 Expression identifiziert werden, welche als Folge ein erhöhtes Risiko für eine Progression im Sinne einer Metastasierung bzw. dem prostataspezifischen Tod zu haben scheinen und folglich von einer zielgerichteten Therapie bzw. forcierten adjuvanten Therapie profitieren könnten [78].

Als primärer Endpunkt dieser Studie diente der biochemische Progress, dieser ist das erste Anzeichen eines Rezidivs nach radikaler Prostatektomie. Es ist allerdings zu beachten, dass ein biochemischer Progress nicht immer unmittelbar mit einem krebspezifischen Tod assoziiert ist und Patienten trotz PSA-Progress teilweise nur kaum oder erst Jahre später von ihrer Krankheit beeinträchtigt werden [169-171]. Das Zeitintervall nach der radikalen Prostatektomie von Hochrisiko Prostatakarzinomen bis zum Auftreten eines biochemischen Progresses scheint hierbei aussagekräftig hinsichtlich des krebspezifischen Überlebens zu sein [171, 172]. In weiteren Untersuchungen könnte demnach ergänzend die SOAT1 Expression in Bezug auf eine definierte Zeitspanne des PSA-Progresses als Endpunkt evaluiert werden, um so eine noch aussagekräftigere Prognoseabschätzung zu erzielen.

Durch den möglichen Einsatz von SOAT1 als prognostischer Marker beim Hochrisiko Prostatakarzinom könnten ebenso Übertherapien und damit assoziierte hohe Kosten und Therapienebenwirkungen reduziert werden, welche voraussichtlich ein geringes Risiko einer Progression und der damit verbundenen Mortalität aufweisen werden, denn nicht alle Patienten mit der Diagnose eines Hochrisiko Prostatakarzinoms haben eine schlechte Prognose [160, 173, 174]. Um eine zuverlässige Aussage über das postoperative Outcome von Hochrisiko Prostatakarzinompatienten treffen zu können, sollte SOAT1 als unabhängiger Prädiktor eines biochemischen Progresses in Zusammenschau mit weiteren klinischen Parametern, wie beispielsweise dem Gleason-Score, präoperativen PSA-Wert und dem klinischen Tumorstadium betrachtet werden.

Darüber hinaus scheinen SOAT-Inhibitoren auch in einigen anderen Tumoren wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom, dem Glioblastom, dem hepatozellulären Karzinom, dem Mammakarzinom, dem Nebennierenrindenzellkarzinom oder der chronisch lymphatischen Leukämie eine

vielversprechende Rolle in der modernen zielgerichteten Therapie zu haben [26-30, 175].

Das Kollektiv dieser Arbeit umfasst über 300 Patienten, welche alle samt die Diagnose eines Hochrisiko-Prostatakarzinoms erhielten, das nur 15-30% aller Prostatakarzinome ausmacht [73, 74]. Aufgrund dieser Fallzahl ist das Kollektiv dieser Arbeit nicht nur repräsentativ, sondern eignet sich durch vergleichsweise hohe Ereignisraten gegenüber Niedrigrisiko Karzinom-Kollektiven besonders gut zur Abschätzung der prognostischen Relevanz von Biomarkern wie SOAT1. Trotz der teilweise signifikant unterschiedlichen Verteilung der Patientencharakteristika zwischen den beiden Kohorten Karlsruhe und Leuven (Anhang 2) wurden diese hier bewusst zu einer gemeinsamen Gruppe kombiniert, um ein möglichst großes Gesamtspektrum sowie eine große Ereignisrate des doch interindividuell sehr unterschiedlichen und wie bereits zuvor erwähnt heterogenen Kollektivs des Hochrisiko Prostatakarzinoms abzubilden. Da SOAT1 dennoch über alle Stadien und Prognoseunterscheide hinweg als unabhängiger hochsignifikanter Prognoseparameter herausgearbeitet werden konnte, unterstreicht die Bedeutsamkeit als vielversprechender und übergreifender Marker für die Aggressivität des Hochrisiko Prostatakarzinoms.

Die Expression von SOAT wurde im Rahmen dieser Arbeit an radikalen Prostatektomiepräparaten untersucht. Aktuell stellt leitliniengerecht neben einer Strahlentherapie mit Kombination einer Androgenentzugstherapie die radikale Prostatektomie im Rahmen einer multimodalen Therapie mit möglicher adjuvanter oder salvage Hormontherapie und/oder Bestrahlung eine Therapieempfehlung des Hochrisiko Prostatakarzinoms dar [79, 91, 159]. Insofern ist dieses Kollektiv für all diejenigen Hochrisiko Prostatakarzinompatienten repräsentativ, welche eine radikale Prostatektomie erhalten. Damit SOAT1 nicht nur bei Patienten nach einer Prostatektomie als prognostischer Marker bzw. therapeutisches Target dienen, sondern bereits präoperativ als auch für Patienten mit einer Strahlen-/Androgenentzugstherapie einen Stellenwert in der Therapieplanung erzielen könnte, sollte der prädiktive Nutzen von SOAT1 in weiteren Studien auch an Biopsaten evaluiert werden. Des

Weiteren wäre es interessant zu untersuchen, ob SOAT1 auch in Prostatakarzinomen der niedrig- bzw. mittelgradigen Risikogruppe mit klinischen Parametern assoziiert ist und möglicherweise als therapeutische Entscheidungshilfe zum Einsatz kommen könnte.

Zusammenfassend konnte durch die Untersuchungen von radikalen Prostatektomiepräparaten eines breit gefächerten Hochrisiko Prostatakarzinom-Kollektivs mit einer Folgeuntersuchungszeit von durchschnittlich 89 Monaten gezeigt werden, dass eine starke Expression von SOAT1 mit einer hochsignifikanten Verkürzung des biochemisch rezidivfreien Überlebens der Patienten einhergeht und SOAT1 demnach als unabhängiger und übergreifender Prognosefaktor in Zusammenschau mit weiteren klinischen Parametern entscheidend zur Therapieplanung im Sinne einer individualisierten Behandlung beitragen kann.

## 5. Zusammenfassung

---

Sterol O-Acyltransferasen (SOATs) spielen eine zentrale Rolle im Cholesterinstoffwechsel von Zellen, indem sie die Veresterung von freiem Cholesterin und Speicherung in *Lipid droplets* katalysieren. In Tumorzellen findet häufig eine Aktivierung alternativer Pfade des Energiestoffwechsels, unter anderem des Lipidstoffwechsels statt. Präklinische und klinische Daten unterstützen den Mechanismus der SOAT-Inhibierung als Therapiekonzept für bestimmte Tumore. Eine genaue Kenntnis sowohl dieser Inhibitoren als auch der Expression des Zielmoleküls ist Voraussetzung für eine klinische Anwendung.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein *in-vitro* SOAT-Aktivitätsassay etabliert und auf Grundlage dessen ein Vergleich der mittleren Hemmstärken ausgewählter SOAT-Inhibitoren gezogen. SOAT-transfizierte AD-293 Zellen sowie NCI-H295R Nebennieren-Zellen wurden mit dem fluoreszierenden 22-NBD-Cholesterin sowie den SOAT-Inhibitoren inkubiert und die Veresterung des Lipid-Analogons dann zunächst mikroskopisch und anschließend quantitativ mittels chromatographischer Auftrennung untersucht. Mitotane stellte sich mit einer  $IC_{50}$  von  $1,3 \times 10^{-6}$  M als schwächster SOAT-Inhibitor dar, gefolgt von Sandoz58-035 ( $IC_{50}=1,4 \times 10^{-8}$  M), ATR101 ( $IC_{50}= 3,1 \times 10^{-9}$  M) und schließlich AZD3988 ( $IC_{50}=8,8 \times 10^{-10}$  M).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die SOAT-Expression in Prostatektomiepräparaten von Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten mittels Immunhistochemie bestimmt. Eine starke SOAT1 Expression (SOAT H-Score 3) war sowohl in der univariaten als auch in der multivariaten Analyse hoch signifikant mit einem kürzeren biochemisch progressfreien Überleben der Patienten assoziiert unabhängig von etablierten Prognoseparametern [HR für den biochemischen Progress 2,33 (95%KI 1,48-3,68),  $p<0,001$ ]. Für SOAT2 war dies erwartungsgemäß nicht der Fall. SOAT1 scheint bei diesem bestimmten Kollektiv einen vielversprechenden Stellenwert als prognostischer Marker zu haben und könnte darüber hinaus zukünftig als Zielmolekül im Rahmen einer individualisierten Therapie des Prostatakarzinoms in Frage kommen.

## 6. Anhang

---

### 6.1 ER-Stress durch intrazellulär freies Cholesterin

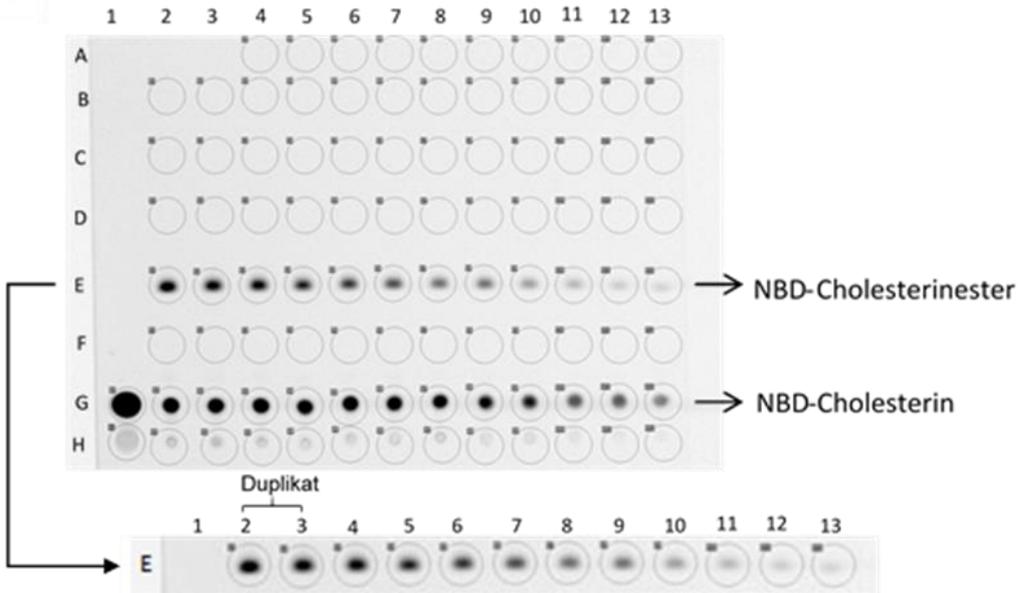
Das endoplasmatische Retikulum (ER) reguliert die Faltung, Modifizierung und Translokation von sekretorischen Proteinen sowie Membranproteinen. Bei einer Störung der ER-Funktion akkumulieren nicht bzw. falsch gefaltete Proteine im ER-Lumen und führen zu einem unausgeglichene Zustand der Zellen, dem ER-Stress. Daraufhin wird eine Zellantwort, die „Unfolded Protein Response (UPR)“ in Gang gesetzt, um den Zellstress zu reduzieren und die ER-Homöostase wieder zu stabilisieren [176]. Dabei wird die UPR durch die drei Transmembranproteine IRE1, PERK und ATF6 eingeleitet. Wenn die Aktivierung dieser Zellsignalkette erfolgreich war, wird die UPR wieder ausgeschaltet und die Zelle lebt weiter. Bei unzureichendem Erfolg und Fortbestehen des ER-Stresses findet die Einleitung des programmierten Zelltodes mit entsprechender Hochregulierung proapoptischer Gene statt [176-178]. Das ER kann durch verschiedene Einflüsse in der Aufrechterhaltung seines Gleichgewichtes gestört werden. Wichtige Stressoren sind neben der übermäßigen Akkumulation von intrazellulärem freiem Cholesterin das Vorliegen einer Hypoxie, eine Ansammlung von gesättigten Fettsäuren, exogenen Toxinen, inflammatorischen Zytokinen sowie dem oxidativen Stress, also einer erhöhten Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies [177, 179, 180].

In einer Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe mit NCI-H295R Zellen führte der ernannte SOAT1-Inhibitor Mitotane zur Aktivierung des ER-Stress-Signalwegs und nachfolgender Apoptose dieser Tumorzellen. Dies wurde zum einen vermutlich durch die intrazelluläre Akkumulation von zelltoxisch freiem Cholesterin aufgrund der SOAT-Inhibierung und zum anderen durch eine lipidinduzierte Herunterregulierung der SREBP Aktivität mit nachfolgend eingeschränkter Aufnahmefähigkeit essenzieller Fettsäuren erreicht [54]. Diese Ergebnisse veranschaulichen die mögliche Wirkweise von SOAT-Inhibitoren,

welche zu einem beträchtlichen Anteil auf der Auslösung eines Zellstresses aufgrund einer massiven Cholesterinakkumulation basieren könnte [181].

## 6.2 Chromatographische Darstellung der Cholesterinester-Abnahme in SOAT-Inhibitor behandelten NCI-H295R Zellen

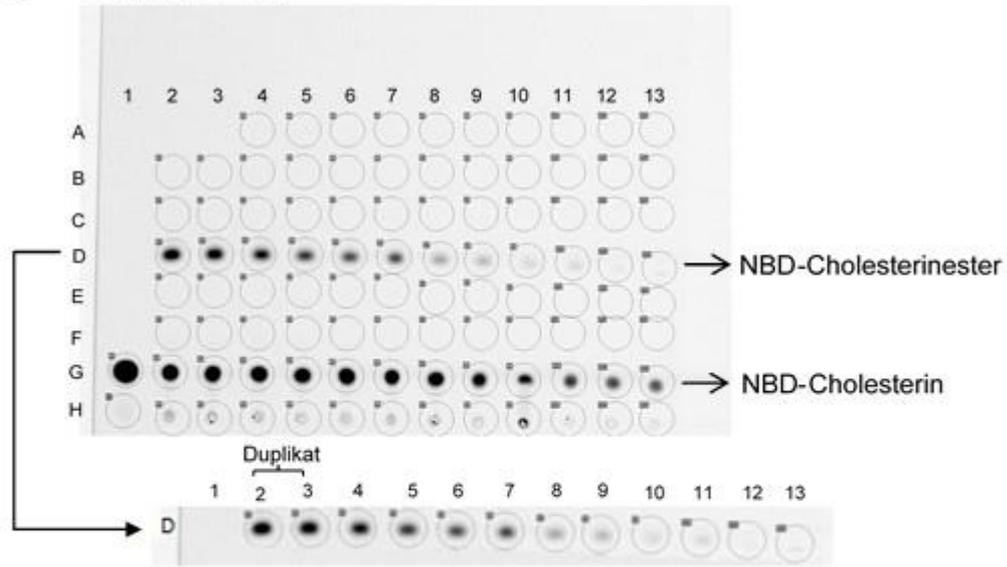
### A Mitotane



Spalten	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
[Mitotane] (µM)		0	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Zelle E (Fluoreszenzintensität)		45127	39864	37666	31020	28160	24610	19072	17492	10324	7943	4195	3409
Maus E (Fluoreszenzintensität)		42496		34343		26385		18282		9134		3802	
Maus E (%)		100		81		62		43		21		9	

Inkubationsdauer: 1h

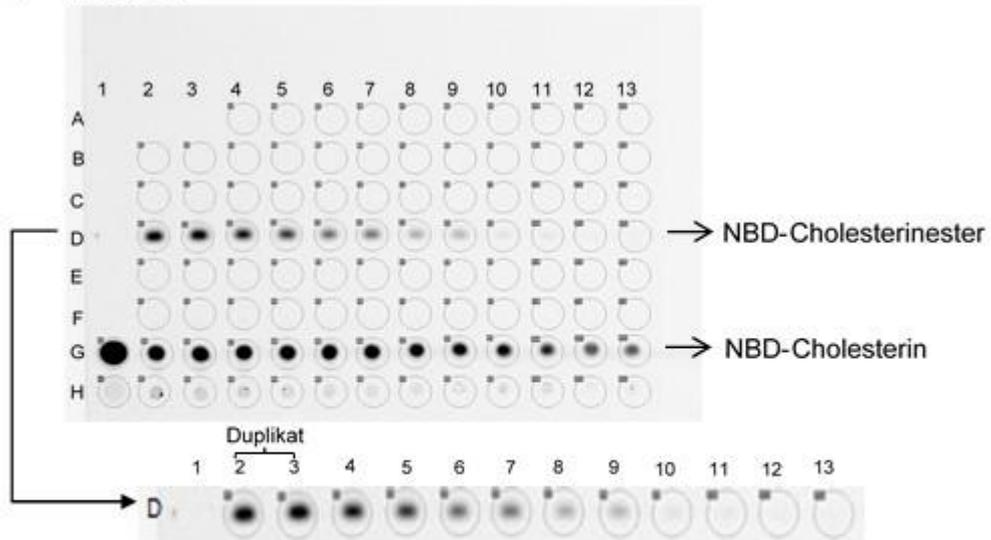
**B Sandoz58-035**



Spalten	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
[Sandoz58-035] ( $\mu\text{M}$ )		0		0,005		0,01		0,05		0,1		0,5	
Zeile D (Fluoreszenzintensität)		43184	39789	32003	26201	22673	21441	9971	6742	3065	2992	1016	991
<i>M</i> aus D (Fluoreszenzintensität)		41486		29102		22056		8356		3028		1003	
<i>M</i> aus D (%)		100		68		66		24		14		4	

Inkubationsdauer: 1h

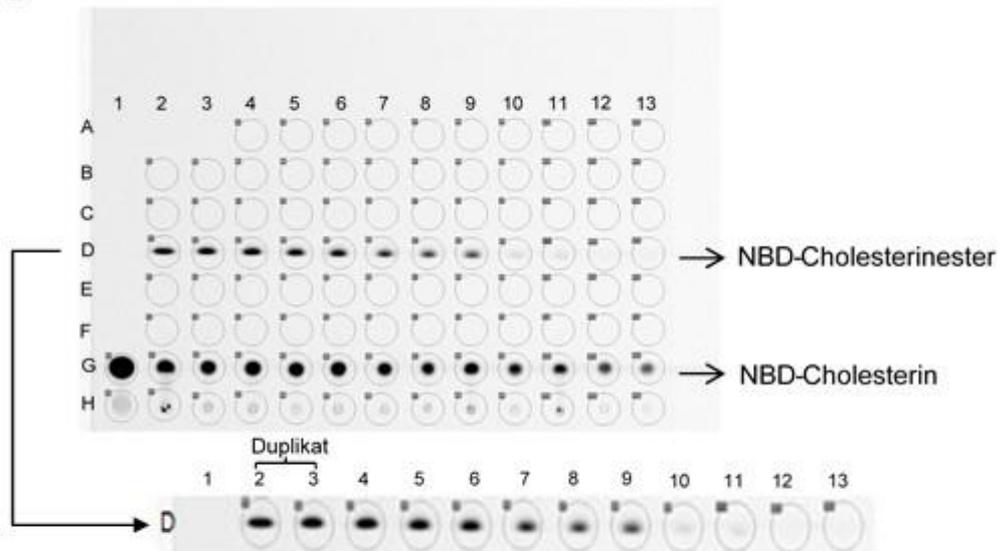
**C ATR101**



Spalten	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
[ATR101] ( $\mu\text{M}$ )		0		0,001		0,005		0,01		0,05		0,1	
Zeile D (Fluoreszenzintensität)		43900	43752	35903	29851	19737	18918	9484	8250	2429	1832	717	967
<i>M</i> aus D (Fluoreszenzintensität)		43826		32877		19328		8867		2131		842	
<i>M</i> aus D (%)		100		75		44		20		5		2	

Inkubationsdauer: 1h

**D AZD3988**



Spalten	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
[AZD3988] (µM)		0		0,0001		0,0005		0,001		0,005		0,01	
Zelle D (Fluoreszenzintensität)	1014673	998800	1004137	854805	811968	588032	511511	504525	74116	62666	29423	22842	
Maus D (Fluoreszenzintensität)		1006736		929471		700000		508018		68391		26132	
Maus D (%)		100		92		69		50		7		3	

Inkubationsdauer: 1h

**Anhang 1: Chromatographische Darstellung der NBD-Cholesterinester-Abnahme in NCI-H295R Zellen.**

Nach einstündiger Inkubation der Zellen mit fluoreszierendem 22-NBD-Cholesterin und **A** Mitotane, **B** Sandoz58-035, **C** ATR101 bzw. **D** AZD3988 fand eine Lipidauftrennung mittels Dünnschichtchromatographie statt. Die Proben wurden jeweils als Duplikat auf die DC-Platte aufgetragen. Mit zunehmender Konzentration der jeweiligen SOAT-Inhibitoren sinkt die Intensität des Fluoreszenzsignals der entsprechenden NBD-Cholesterinester ab.

### 6.3 Patientencharakteristika von Karlsruhe und Leuven im Vergleich

#### Anhang 2: Patientencharakteristika von Karlsruhe (A) und Leuven (B) im Vergleich.

Für die Analysen wurden nur Patienten mit vollständigen klinischen Daten sowie auswertbarer immunohistochemischer Färbung der Gewebeproben eingeschlossen (n gesamt=305, n Karlsruhe=206, n Leuven=99). In modifizierter Form zur Publikation angenommen.

Variable	Karlsruhe (A)	n	SD	M	Leuven (B)	n	SD	M	
<b>Alter bei OP (Bereich)</b>	67 (47-81)	206	6,5	66,2	66 (41-76)	99	8,2	64,0	Mann-Whitney-U: p=0,08
<b>Klinisches Tumorstadium</b>									
T2	33 (16,0%)				26 (26,2%)				χ <sup>2</sup> =10,37 p=0,005**
T3	136 (66,0%)				67 (67,7%)				
T4	37 (18,0%)				6 (6,1%)				
<b>Gleason-Score</b>									
≤7	143 (76,5%)				79 (79,8%)				χ <sup>2</sup> =0,41 p=0,52
8-10	44 (23,5%)				20 (20,2%)				
<b>R-Status</b>									
R0/RX	106 (51,5%)				52 (52,5%)				χ <sup>2</sup> =0,03 p=0,86
R1	100 (48,5%)				47 (47,5%)				
<b>LK-Status</b>									
N0	124 (60,2%)				87 (87,9%)				χ <sup>2</sup> =25,5 p<0,00001***
N1	82 (39,8%)				11 (11,1%)				
<b>SOAT1 H-Score</b>									
<3	167 (81,1%)				52 (60,5%)				χ <sup>2</sup> =13,7 p=0,00021***
3	39 (18,9%)				34 (39,5%)				
<b>SOAT2 H-Score</b>									
<3	181 (87,9%)				68 (81,9%)				χ <sup>2</sup> =1,74 p=0,18
3	25 (12,1%)				15 (18,1%)				
<b>Biochemischer Progress</b>	<u>ja</u> 62 (30,1%)	<u>nein</u> 144 (69,9%)			<u>ja</u> 47 (48,0%)	<u>nein</u> 51 (52,0%)			χ <sup>2</sup> =9,2 p=0,0024**
<b>Mediane Zeit biochemischer Progress, Monate (Bereich)</b>	31,5 (4-129)	62	34,0	39,7	24,0 (1-166)	47	39,9	36,9	Mann-Whitney-U: p=0,23
<b>Klinischer Progress</b>	<u>ja</u> 33 (16,0%)	<u>nein</u> 173 (84,0%)			<u>ja</u> 11 (11,1%)	<u>nein</u> 88 (88,9%)			χ <sup>2</sup> =1,30 p=0,25
<b>Mediane Zeit klinischer Progress, Monate (Bereich)</b>	38,0 (3-144)	33	36,8	45,2	29,9 (9-120)	11	35,4	45,3	Mann-Whitney-U: p=0,72
<b>Tod aus irgendeinem Grund</b>	15 (7,3%)				15 (15,2%)				χ <sup>2</sup> =3,26 p=0,07
<b>Krebs-spezifischer Tod</b>	14 (6,8%)				8 (8,1%)				χ <sup>2</sup> =0,07 p=0,78

n=Anzahl, SD=Standardabweichung, M=Mittelwert

\*= signifikant, \*\*= sehr signifikant, \*\*\*= sehr sehr signifikant

## 7. Literaturverzeichnis

---

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
4. Warburg, O., *On respiratory impairment in cancer cells*. Science, 1956. **124**(3215): p. 269-70.
5. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends Biochem Sci, 2016. **41**(3): p. 211-8.
6. Otto, A.M., *Warburg effect(s)—a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism*. Cancer Metab, 2016. **4**.
7. Asgari, Y., et al., *Alterations in cancer cell metabolism: the Warburg effect and metabolic adaptation*. Genomics, 2015. **105**(5-6): p. 275-81.
8. Schulz, T.J., et al., *Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 977-81.
9. Cairns, R.A., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Regulation of cancer cell metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(2): p. 85-95.
10. Yeung, S.J., J. Pan, and M.H. Lee, *Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(24): p. 3981-99.
11. Zhu, A., D. Lee, and H. Shim, *Metabolic PET Imaging in Cancer Detection and Therapy Response*. Semin Oncol, 2011. **38**(1): p. 55-69.
12. Horn, F., *Biochemie des Menschen*. 4. Auflage ed. 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
13. Santos, C.R. and A. Schulze, *Lipid metabolism in cancer*. Febs j, 2012. **279**(15): p. 2610-23.
14. Nomura, D.K., et al., *Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis*. Cell, 2010. **140**(1): p. 49-61.

15. Barrera, G., *Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy*. ISRN Oncol, 2012. **2012**.
16. Rysman, E., et al., *De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 8117-26.
17. Yue, S., et al., *Cholesteryl ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness*. Cell Metab, 2014. **19**(3): p. 393-406.
18. Porstmann, T., et al., *SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth*. Cell Metab, 2008. **8**(3): p. 224-36.
19. Chalhoub, N. and S.J. Baker, *PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer*. Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 127-50.
20. Schmitz, M., et al., *Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis*. Int J Cancer, 2007. **120**(6): p. 1284-92.
21. Peck, B. and A. Schulze, *Cholesteryl esters: fueling the fury of prostate cancer*. Cell Metab, 2014. **19**(3): p. 350-2.
22. Abel, S., S. Riedel, and W.C. Gelderblom, *Dietary PUFA and cancer*. Proc Nutr Soc, 2014. **73**(3): p. 361-7.
23. Bartsch, H., J. Nair, and R.W. Owen, *Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers*. Carcinogenesis, 1999. **20**(12): p. 2209-18.
24. *My Cancer Genome - Genetically Informed Cancer Medicine*. [cited 20.12.2020; Available from: <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/overview-of-targeted-therapies-for-cancer/>].
25. Padma, V.V., *An overview of targeted cancer therapy*. Biomedicine (Taipei), 2015. **5**(4).
26. Bemlih, S., M.D. Poirier, and A. El Andaloussi, *Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor Avasimibe affect survival and proliferation of glioma tumor cell lines*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(12): p. 1025-32.
27. Jiang, Y., et al., *Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma*. Nature, 2019. **567**(7747): p. 257-261.

28. Mulas, M.F., et al., *Cholesterol esters as growth regulators of lymphocytic leukaemia cells*. Cell Prolif, 2011. **44**(4): p. 360-71.
29. Antalis, C.J., et al., *High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal-like breast cancer cells is associated with LDL-induced proliferation*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(3): p. 661-70.
30. Lacombe, A.M.F., et al., *Sterol O-Acyl Transferase 1 as a Prognostic Marker of Adrenocortical Carcinoma*. Cancers (Basel), 2020. **12**(1).
31. Smith, D.C., et al., *A phase 1 study of nevanimibe HCl, a novel adrenal-specific sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1) inhibitor, in adrenocortical carcinoma*. Investigational New Drugs, 2020. **38**(5): p. 1421-1429.
32. Chang, T.Y., et al., *Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E1-9.
33. Rogers, M.A., et al., *Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): Enzymes with multiple sterols as substrates and as activators*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015. **151**: p. 102-7.
34. Chang, C.C., et al., *Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(28): p. 20747-55.
35. Cases, S., et al., *ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26755-64.
36. Lee, R.G., et al., *Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates*. Journal of Lipid Research, 2000. **41**(12): p. 1991-2001.
37. Joyce, C.W., *ACAT1 and ACAT2 Membrane Topology Segregates a Serine Residue*. 2000. **11**(11): p. 3675-87.
38. Lin, S., et al., *Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 in the endoplasmic reticulum contains seven transmembrane domains*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23276-85.
39. Guo, Z.Y., et al., *The active site His-460 of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 resides in a hitherto undisclosed transmembrane domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37814-26.
40. Oelkers, P., et al., *Characterization of two human genes encoding acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase-related enzymes*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26765-71.

41. Lada, A.T., et al., *Identification of ACAT1- and ACAT2-specific inhibitors using a novel, cell-based fluorescence assay: individual ACAT uniqueness*. J Lipid Res, 2004. **45**(2): p. 378-86.
42. Shibuya, Y., C.C. Chang, and T.Y. Chang, *ACAT1/SOAT1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease*. Future Med Chem, 2015. **7**(18): p. 2451-67.
43. Leon, C., J.S. Hill, and K.M. Wasan, *Potential role of acyl-coenzyme A:cholesterol transferase (ACAT) Inhibitors as hypolipidemic and antiatherosclerosis drugs*. Pharm Res, 2005. **22**(10): p. 1578-88.
44. Sliskovic, D.R. and A.D. White, *Therapeutic potential of ACAT inhibitors as lipid lowering and anti-atherosclerotic agents*. Trends Pharmacol Sci, 1991. **12**(5): p. 194-9.
45. Wu, N., R.Q. Li, and L. Li, *SOAT1 deficiency attenuates atherosclerosis by regulating inflammation and cholesterol transportation via HO-1 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **501**(2): p. 343-350.
46. Rudel, L.L., R.G. Lee, and P. Parini, *ACAT2 is a target for treatment of coronary heart disease associated with hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1112-8.
47. Ohshiro, T. and H. Tomoda, *Isoform-specific inhibitors of ACATs: recent advances and promising developments*. Future Med Chem, 2011. **3**(16): p. 2039-61.
48. Cho, K.H., et al., *Mass-production of human ACAT-1 and ACAT-2 to screen isoform-specific inhibitor: a different substrate specificity and inhibitory regulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(4): p. 864-72.
49. Willner, E.L., et al., *Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(3): p. 1262-1267.
50. Yoshinaka, Y., et al., *A selective ACAT-1 inhibitor, K-604, stimulates collagen production in cultured smooth muscle cells and alters plaque phenotype in apolipoprotein E-knockout mice*. Atherosclerosis, 2010. **213**(1): p. 85-91.
51. Nissen, S.E., et al., *Effect of ACAT inhibition on the progression of coronary atherosclerosis*. N Engl J Med, 2006. **354**(12): p. 1253-63.
52. Fassnacht, M., M. Kroiss, and B. Allolio, *Update in adrenocortical carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(12): p. 4551-64.

53. Terzolo, M., et al., *Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma*. N Engl J Med, 2007. **356**(23): p. 2372-80.
54. Sbiera, S., et al., *Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells*. Endocrinology, 2015. **156**(11): p. 3895-908.
55. Nelson, A.A. and G. Woodard, *Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE)*. Archives of Pathology, 1949. **48**: p. 387-394.
56. Kroiss, M., et al., *Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma*. Clin Endocrinol (Oxf), 2011. **75**(5): p. 585-91.
57. Igaz, P., et al., *Steroid biosynthesis inhibitors in the therapy of hypercortisolism: theory and practice*. Curr Med Chem, 2008. **15**(26): p. 2734-47.
58. Tanaka, H., et al., *Effect of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, E5324, on experimental atherosclerosis in rabbits*. Atherosclerosis, 1994. **107**(2): p. 187-201.
59. Trivedi, B.K., et al., *Inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT). 7. Development of a series of substituted N-phenyl-N'-(1-phenylcyclopentyl)methyl]ureas with enhanced hypocholesterolemic activity*. J Med Chem, 1994. **37**(11): p. 1652-9.
60. LaPensee, C.R., et al., *ATR-101, a Selective and Potent Inhibitor of Acyl-CoA Acyltransferase 1, Induces Apoptosis in H295R Adrenocortical Cells and in the Adrenal Cortex of Dogs*. Endocrinology, 2016. **157**(5): p. 1775-88.
61. Cheng, Y., R.E. Kerppola, and T.K. Kerppola, *ATR-101 disrupts mitochondrial functions in adrenocortical carcinoma cells and in vivo*. Endocr Relat Cancer, 2016. **23**(4): p. 1-19.
62. Yen, C.L.E., *DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis*. 2008. **49**(11): p. 2283-301.
63. McCoull, W., et al., *Identification, optimisation and in vivo evaluation of oxadiazole DGAT-1 inhibitors for the treatment of obesity and diabetes*. Bioorg Med Chem Lett, 2012. **22**(12): p. 3873-8.

64. Floettmann, J.E., et al., *ACAT-selective and Nonselective DGAT1 Inhibition: Adrenocortical Effects—A Cross-species Comparison*. Toxicologic Pathology, 2013. **41**(7): p. 941-950.
65. Sliskovic, D.R., J.A. Picard, and B.R. Krause, *ACAT inhibitors: the search for a novel and effective treatment of hypercholesterolemia and atherosclerosis*. Prog Med Chem, 2002. **39**: p. 121-71.
66. Homan, R. and K.L. Hamelshle, *Influence of membrane partitioning on inhibitors of membrane-bound enzymes*. J Pharm Sci, 2001. **90**(11): p. 1859-67.
67. Scheidt, H.A., et al., *The adrenal specific toxicant mitotane directly interacts with lipid membranes and alters membrane properties depending on lipid composition*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **428**: p. 68-81.
68. *PubChem - National Library of Medicine*. [cited 2020 23.12.2020]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
69. *Robert Koch Institut (RKI), Zentrum für Krebsregisterdaten, Krebs in Deutschland für 2015/2016. 12. Ausgabe. Berlin: RKI; 2019*. 2019.
70. Schröder, F.H., et al., *Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(13): p. 1320-1328.
71. Bott, S., et al., *Prostate cancer management: (1) an update on localised disease*. Postgrad Med J, 2003. **79**(936): p. 575-80.
72. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1374-403.
73. Cooperberg, M.R., et al., *High-risk prostate cancer in the United States, 1990-2007*. World J Urol, 2008. **26**(3): p. 211-8.
74. Cooperberg, M.R., J.M. Broering, and P.R. Carroll, *Time trends and local variation in primary treatment of localized prostate cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(7): p. 1117-23.
75. Kneitz, B., et al., *Survival in patients with high-risk prostate cancer is predicted by miR-221, which regulates proliferation, apoptosis, and invasion of prostate cancer cells by inhibiting IRF2 and SOCS3*. Cancer Res, 2014. **74**(9): p. 2591-603.
76. Köllermann, J. and G. Sauter, *Trends in prostate biopsy interpretation*. Der Urologe, 2009. **48**(3): p. 305-314.

77. Mulders, T.M., P.F. Bruning, and J.M. Bonfrer, *Prostate-specific antigen (PSA). A tissue-specific and sensitive tumor marker*. Eur J Surg Oncol, 1990. **16**(1): p. 37-41.
78. Partin, A.W., et al., *Serum PSA after anatomic radical prostatectomy. The Johns Hopkins experience after 10 years*. Urol Clin North Am, 1993. **20**(4): p. 713-25.
79. *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms*. [cited 2019 16.07.]; Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043-022OLk\\_S3\\_Prostatakarzinom\\_2019-06.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-022OLk_S3_Prostatakarzinom_2019-06.pdf).
80. Loeb, S., et al., *Overdiagnosis and Overtreatment of Prostate Cancer*. Eur Urol, 2014. **65**(6): p. 1046-55.
81. Lee, D.J., et al., *Recent Changes in Prostate Cancer Screening Practices and Epidemiology*. The Journal of Urology, 2017. **198**(6): p. 1230-1240.
82. Wittekind, C., *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. 8. Auflage ed. 2017, Weinheim Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
83. Schlomm, T. and G. Sauter, *Beurteilung des Prostatakarzinoms: Gleason-Score – Status 2016*. Dtsch Arztebl International, 2016. **113**(33-34): p. [14].
84. *Gleason-Score*. [cited 2020 25.12.]; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Gleason-Score>.
85. D'Amico, A.V., et al., *Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer*. Jama, 1998. **280**(11): p. 969-74.
86. Pierorazio, P.M., et al., *Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system*. BJU Int, 2013. **111**(5): p. 753-60.
87. Humphrey, P.A., et al., *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours*. European Urology, 2016. **70**(1): p. 106-119.
88. Epstein, J.I., et al., *A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score*. Eur Urol, 2016. **69**(3): p. 428-35.

89. van Poppel, H., *Locally advanced and high risk prostate cancer: The best indication for initial radical prostatectomy?* Asian Journal of Urology, 2014. **1**(1): p. 40-45.
90. Xie, L., J. Li, and X. Wang, *Updates in prostate cancer detections and treatments – Messages from 2017 EAU and AUA().* Asian J Urol, 2018. **5**(1): p. 3-7.
91. *EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Copenhagen 2018.* 2018.
92. Artibani, W., et al., *Management of Biochemical Recurrence after Primary Curative Treatment for Prostate Cancer: A Review.* Urologia Internationalis, 2018. **100**(3): p. 251-262.
93. Gazdar, A.F., et al., *Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis.* Cancer Res, 1990. **50**(17): p. 5488-96.
94. Zhang, J., et al., *Different gene expression profiles of AD293 and HEK293 cell lines that show contrasting susceptibility to apoptosis induced by overexpression of Bim L.* Acta Biochim Pol, 2006. **53**(3): p. 525-30.
95. Khor, V.K., et al., *The proteome of cholesteryl-ester-enriched versus triacylglycerol-enriched lipid droplets.* PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105047.
96. Ghosh, S., R.W. St Clair, and L.L. Rudel, *Mobilization of cytoplasmic CE droplets by overexpression of human macrophage cholesteryl ester hydrolase.* J Lipid Res, 2003. **44**(10): p. 1833-40.
97. Manchester, K.L., *Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids.* Biotechniques, 1995. **19**(2): p. 208-10.
98. Livak, K.J., et al., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.* PCR Methods Appl, 1995. **4**(6): p. 357-62.
99. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics.* 2013, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
100. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits.* J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
101. *Real-Time PCR: Applications Guide.* 2006 [cited 20.12.2020; Available from: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>.

102. Scientific, T.F. *Wichtige Informationen zur Real-Time PCR*. [cited 2020 21.12.]; Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html>.
103. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
104. Bernd Spangenberg, C.F.P., Christel Weins, *Quantitative Thin-Layer Chromatography: A Practical Survey*. 2011, Heidelberg: Springer-Verlag.
105. Meng, M.V., et al., *Treatment of patients with high risk localized prostate cancer: results from cancer of the prostate strategic urological research endeavor (CaPSURE)*. *J Urol*, 2005. **173**(5): p. 1557-61.
106. Gerber, L., L.L. Banez, and S.J. Freedland, *Defining and treating high-risk prostate cancer: can we do better?* *Eur Urol*, 2010. **58**(1): p. 8-9.
107. Spahn, M., et al., *Outcome predictors of radical prostatectomy in patients with prostate-specific antigen greater than 20 ng/ml: a European multi-institutional study of 712 patients*. *Eur Urol*, 2010. **58**(1): p. 1-7; discussion 10-1.
108. Greene, F.L. and C.M. Balch, *AJCC Cancer Staging Manual, Sixth Edition*. 2002, Springer: Philadelphia.
109. Al-Haddad, S., et al., *Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(6): p. 2057-66.
110. Sbiera, S., et al., *High Diagnostic and Prognostic Value of Steroidogenic Factor-1 Expression in Adrenal Tumors*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010: p. epub Jul 21 2010.
111. McHugh, M.L., *Interrater reliability: the kappa statistic*. *Biochem Med (Zagreb)*, 2012. **22**(3): p. 276-82.
112. Cohen, J., *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Second Edition ed. 1988: Lawrence Erlbaum Associates.
113. Mukaka, M., *A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research*. *Malawi Med J*, 2012. **24**(3): p. 69-71.
114. Buddecke, E., *Molekulare Medizin: Eine systematische Einführung*. 2002, Landsberg/Lech: Ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co.KG.
115. Cer, R.Z., et al., *IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(Web Server issue): p. W441-5.

116. van Meer, G., et al., *Sorting of sphingolipids in epithelial (Madin-Darby canine kidney) cells*. J Cell Biol, 1987. **105**(4): p. 1623-35.
117. Koval, M. and R.E. Pagano, *Sorting of an internalized plasma membrane lipid between recycling and degradative pathways in normal and Niemann-Pick, type A fibroblasts*. J Cell Biol, 1990. **111**(2): p. 429-42.
118. Sparrow, C.P., et al., *A fluorescent cholesterol analog traces cholesterol absorption in hamsters and is esterified in vivo and in vitro*. J Lipid Res, 1999. **40**(10): p. 1747-57.
119. Chattopadhyay, A. and E. London, *Spectroscopic and ionization properties of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids in model membranes*. Biochim Biophys Acta, 1988. **938**(1): p. 24-34.
120. Lin, S. and W.S. Struve, *Time-resolved fluorescence of nitrobenzoxadiazole-aminohexanoic acid: effect of intermolecular hydrogen-bonding on non-radiative decay*. Photochem Photobiol, 1991. **54**(3): p. 361-5.
121. de Medina, P., et al., *Tamoxifen Is a Potent Inhibitor of Cholesterol Esterification and Prevents the Formation of Foam Cells*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2004. **308**(3): p. 1165-1173.
122. Alberts, B., et al., *Molekularbiologie der Zelle*. 2011: Wiley-VCH-Verlag.
123. Ramos-Vara, J.A., *Technical Aspects of Immunohistochemistry*. Veterinary Pathology, 2005. **42**(4): p. 405-426.
124. Chen, X., D.B. Cho, and P.C. Yang, *Double staining immunohistochemistry*. N Am J Med Sci, 2010. **2**(5): p. 241-5.
125. Ramos-Vara, J.A. and M.A. Miller, *When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique*. Veterinary Pathology, 2013. **51**(1): p. 42-87.
126. Deep, G. and I. Schlaepfer, *Aberrant Lipid Metabolism Promotes Prostate Cancer: Role in Cell Survival under Hypoxia and Extracellular Vesicles Biogenesis*. International Journal of Molecular Sciences, 2016. **17**(7): p. 1061.
127. Stopsack, K.H., et al., *Cholesterol uptake and regulation in high-grade and lethal prostate cancers*. Carcinogenesis, 2017. **38**(8): p. 806-811.
128. Maier, T., M. Güell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. FEBS Lett, 2009. **583**(24): p. 3966-73.

129. James, N.D., et al., *Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(4): p. 338-351.
130. Fizazi, K., et al., *Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer*. New England Journal of Medicine, 2017. **377**(4): p. 352-360.
131. Armandari, I., *Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy*. 2014. **2**(3): p. 105-13.
132. Mostaghel, E.A. and P.S. Nelson, *Intracrine androgen metabolism in prostate cancer progression: mechanisms of castration resistance and therapeutic implications*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. **22**(2): p. 243-58.
133. Mostaghel, E.A., *Steroid hormone synthetic pathways in prostate cancer*. Transl Androl Urol, 2013. **2**(3): p. 212-27.
134. Mitsiades, N., et al., *Distinct patterns of dysregulated expression of enzymes involved in androgen synthesis and metabolism in metastatic prostate cancer tumors*. Cancer Res, 2012. **72**(23): p. 6142-52.
135. Bennett, N.C., et al., *Evidence for steroidogenic potential in human prostate cell lines and tissues*. Am J Pathol, 2012. **181**(3): p. 1078-87.
136. Lewis, S.R., et al., *Steroidogenic Factor 1 Promotes Aggressive Growth of Castration-Resistant Prostate Cancer Cells by Stimulating Steroid Synthesis and Cell Proliferation*. Endocrinology, 2014. **155**(2): p. 358-69.
137. von Bodman, C., et al., *Predicting Biochemical Recurrence-Free Survival in Patients With Positive Pelvic Lymph Nodes at Radical Prostatectomy*. J Urol, 2010. **184**(1): p. 143-8.
138. Moris, L., et al., *Impact of Lymph Node Burden on Survival of High-risk Prostate Cancer Patients Following Radical Prostatectomy and Pelvic Lymph Node Dissection*. Front Surg, 2016. **3**.
139. Schiavina, R., et al., *Differing risk of cancer death among patients with lymph node metastasis after radical prostatectomy and pelvic lymph node dissection: identification of risk categories according to number of positive nodes and Gleason score*. BJU Int, 2013. **111**(8): p. 1237-44.
140. Ceylan, C., S. Tonyali, and I. Keles, *Impact of positive surgical margin on biochemical recurrence following radical prostatectomy in locally advanced prostate cancer*. The Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2016. **32**(10): p. 514-517.

141. Srougi, V., et al., *The importance of surgical margins for biochemical recurrence in high-risk prostate cancer patients*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(6\_suppl): p. 75-75.
142. Sachdeva, A., et al., *Positive surgical margins and biochemical recurrence following minimally-invasive radical prostatectomy – An analysis of outcomes from a UK tertiary referral centre*. BMC Urol, 2017. **17**.
143. Salomon, L., et al., *Seminal vesicle involvement after radical prostatectomy: predicting risk factors for progression*. Urology, 2003. **62**(2): p. 304-9.
144. Boorjian, S.A., et al., *The Impact of Positive Surgical Margins on Mortality Following Radical Prostatectomy During the Prostate Specific Antigen Era*. The Journal of Urology, 2010. **183**(3): p. 1003-1009.
145. Maxeiner, A., et al., *Significant reduction in positive surgical margin rate after laparoscopic radical prostatectomy by application of the modified surgical margin recommendations of the 2009 International Society of Urological Pathology consensus*. BJU Int, 2016. **118**(5): p. 750-757.
146. Joniau, S., et al., *Stratification of high-risk prostate cancer into prognostic categories: a European multi-institutional study*. Eur Urol, 2015. **67**(1): p. 157-164.
147. Nagao, K., et al., *MP05-17 IDENTIFICATION OF TREATABLE HIGH RISK PROSTATE CANCER ONLY BY RADICAL PROSTATECTOMY- WHO ARE GOOD CANDIDATES FOR RADICAL PROSTATECTOMY IN HIGH RISK PROSTATE CANCER*. The Journal of Urology, 2018. **199**(4): p. e49-e50.
148. Sooriakumaran, P., et al., *Gleason scoring varies among pathologists and this affects clinical risk in patients with prostate cancer*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2005. **17**(8): p. 655-8.
149. Teeter, A.E., et al., *Do nomograms designed to predict biochemical recurrence (BCR) do a better job of predicting more clinically relevant prostate cancer outcomes than BCR? A report from the SEARCH database group*. Urology, 2013. **82**(1): p. 53-8.
150. Nguyen, J.K. and C. Magi-Galluzzi, *Unfavorable Pathology, Tissue Biomarkers and Genomic Tests With Clinical Implications in Prostate Cancer Management*. Adv Anat Pathol, 2018.
151. Mohler, J., et al., *Prostate Cancer*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2010. **8**(2): p. 162-200.

152. Chistiakov, D.A., et al., *New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer*. *Semin Cancer Biol*, 2018.
153. Hailer, A., et al., *Loss of tumor suppressor mir-203 mediates overexpression of LIM and SH3 Protein 1 (LASP1) in high-risk prostate cancer thereby increasing cell proliferation and migration*. *Oncotarget*, 2014. **5**(12): p. 4144-53.
154. Williams, K., et al., *PD60-10 POLYSIALIC ACID AS A NOVEL CARBOHYDRATE BIOMARKER FOR INTERMEDIATE AND HIGH-RISK PROSTATE CANCER*. *The Journal of Urology*, 2018. **199**(4): p. e1150.
155. Jiang, D., *Association of doublecortin-like kinase 1 with tumor aggressiveness and poor biochemical recurrence-free survival in prostate cancer*. 2018. **11**: p. 1077-86.
156. Terakawa, T., et al., *High expression of SLCO2B1 is associated with prostate cancer recurrence after radical prostatectomy*. *Oncotarget*, 2018. **9**(18): p. 14207-18.
157. Bastian, P.J., et al., *High-risk prostate cancer: from definition to contemporary management*. *Eur Urol*, 2012. **61**(6): p. 1096-106.
158. Joniau, S., et al., *Current role of surgery for high risk prostate cancer*. *Arch Esp Urol*, 2013. **66**(3): p. 259-73, 259-74.
159. Chang, A.J., et al., *"High-Risk" Prostate Cancer: Classification and Therapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014. **11**(6): p. 308-23.
160. Yossepowitch, O., et al., *Radical prostatectomy for clinically localized, high risk prostate cancer: critical analysis of risk assessment methods*. *J Urol*, 2007. **178**(2): p. 493-9; discussion 499.
161. Cooperberg, M.R., J.F. Hilton, and P.R. Carroll, *The CAPRA-S score: a straightforward tool for improved prediction of outcomes after radical prostatectomy*. *Cancer*, 2011. **117**(22): p. 5039-46.
162. Han, M., et al., *Biochemical (Prostate Specific Antigen) Recurrence Probability Following Radical Prostatectomy for Clinically Localized Prostate Cancer*. *The Journal of Urology*, 2003. **169**(2): p. 517-523.
163. Eggener, S.E., et al., *Predicting 15-Year Prostate Cancer Specific Mortality After Radical Prostatectomy*. *The Journal of Urology*, 2011. **185**(3): p. 869-875.
164. Nguyen, T., *Prognostic Factors for Prostate Cancer Endpoints Following Biochemical Failure: A Review of the Literature*. **7**(1).

165. Stroup, S.P., et al., *Biopsy Detected Gleason Pattern 5 is Associated with Recurrence, Metastasis and Mortality in a Cohort of Men with High Risk Prostate Cancer*. The Journal of Urology, 2017. **198**(6): p. 1309-1315.
166. Tosco, L., et al., *The EMPaCT Classifier: A Validated Tool to Predict Postoperative Prostate Cancer-related Death Using Competing-risk Analysis*. European Urology Focus.
167. Alam, R., et al., *PD07-08 A NOVEL NOMOGRAM TO PREDICT POSTOPERATIVE BIOCHEMICAL RECURRENCE IN PATIENTS WITH LOCALIZED HIGH-RISK PROSTATE CANCER*. The Journal of Urology, 2017. **197**(4): p. e130-e131.
168. Goldberg, H., J. Baniel, and O. Yossepowitch, *Defining high-risk prostate cancer*. Current Opinion in Urology, 2013. **23**(4): p. 337-341.
169. Paller, C.J. and E.S. Antonarakis, *Management of Biochemically Recurrent Prostate Cancer After Local Therapy: Evolving Standards of Care and New Directions*. Clin Adv Hematol Oncol, 2013. **11**(1): p. 14-23.
170. Pound, C.R., et al., *Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy*. Jama, 1999. **281**(17): p. 1591-7.
171. Freedland, S.J., et al., *Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy*. JAMA, 2005. **294**(4): p. 433-439.
172. Briganti, A., et al., *Natural history of surgically treated high-risk prostate cancer*. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 2015. **33**(4): p. 163.e7-163.e13.
173. Isbarn, H., H. Huland, and M. Graefen, *Results of radical prostatectomy in newly diagnosed prostate cancer: long-term survival rates in locally advanced and high-risk cancers*. Dtsch Arztebl Int, 2013. **110**(29-30): p. 497-503.
174. Yossepowitch, O., et al., *Secondary therapy, metastatic progression, and cancer-specific mortality in men with clinically high-risk prostate cancer treated with radical prostatectomy*. Eur Urol, 2008. **53**(5): p. 950-9.
175. Li, J., et al., *Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer*. Oncogene, 2016. **35**: p. 6378.
176. Beloribi-Djefafli, S., S. Vasseur, and F. Guillaumond, *Lipid metabolic reprogramming in cancer cells*. Oncogenesis, 2016. **5**: p. e189.

177. Osowski, C.M. and F. Urano, *Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system*. *Methods Enzymol*, 2011. **490**: p. 71-92.
178. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2013. **1833**(12): p. 3460-3470.
179. Tabas, I., *The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis*. *Circ Res*, 2010. **107**(7): p. 839-50.
180. Kockx, M., et al., *Cholesterol accumulation inhibits ER to Golgi transport and protein secretion: studies of apolipoprotein E and VSVGt*. *Biochemical Journal*, 2012. **447**(1): p. 51-60.
181. Warner, G.J., et al., *Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(11): p. 5772-8.

## I. Abkürzungsverzeichnis

---

22-NBD	22-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)- 23,24-bisnor-5-cholen-3-ol
95%KI	95%-Konfidenzintervall
a. bidest	Aqua Bidestillata
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
Akt/PKB	Protein Kinase B
Apo-B	Apolipoprotein-B
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
ATR101	SOAT1-Inhibitor
AZD3988	Diacylglycerol-O-acyltransferase 1 (DGAT1)-Inhibitor
CAMs	Cell Adhesion Molecules
CE	Cholesterinester
DC	Dünnschichtchromatographie
cDNA	Complementary DNA (deoxyribonucleic acid)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FC	Free Cholesterol
FCS	Fetal Calf Serum
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
IRE1	Inositol-requiring Enzyme 1
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
LK-Status	Lymphknoten-Status
mAK	Monoklonaler Antikörper

## Abkürzungsverzeichnis

---

MAPK	Mitogen-activated Protein Kinases
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MYC	Transkriptionsfaktor MYC
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
p53	Tumorsuppressorgen p53
pAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline
PERK	Proteinkinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Raf	Rat Fibrosarcoma (Proteinkinase)
Ras	Rat Sarcoma (Protoonkogen)
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonuklease
R-Status	Residual-Status
RT	Raumtemperatur
Sandoz 58-035	SOAT-Inhibitor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOAT	Sterol O-Acyltransferase
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
TMA	Tissue microarray
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very-low-density lipoprotei
wt	Wild type

## II. Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1: Die PI3K/Akt/mTOR-abhängige SREBP-Aktivität reguliert die Lipidaufnahme und anschließende Veresterung in Prostatakarzinomzellen	6
Abbildung 2: Einflüsse auf die metabolische Anpassung von Tumorzellen	7
Abbildung 3: SOAT katalysiert die Veresterung von freiem Cholesterin	9
Abbildung 4: Funktion und Zelllokalisierung von SOAT1 und SOAT2	11
Abbildung 5: Strukturformeln von Mitotane (A) und Sandoz58-035 (B)	14
Abbildung 6: Die fünf Gleason-Muster des Adenokarzinoms der Prostata	16
Abbildung 7: Expression der SOAT-Isoenzyme in verschiedenen Zelllinien	26
Abbildung 8: Das TaqMan-Prinzip	31
Abbildung 9: Chromatogramm einer Dünnschichtchromatographie	36
Abbildung 10: Peroxidase-Antiperoxidase- (PAP-) Methode	41
Abbildung 11: RNA Expression in SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen	45
Abbildung 12: RNA Expression in SOAT2-transfizierten AD-293 Zellen	46
Abbildung 13: SOAT Expression in AD-293 Zellen mit verschiedenen Plasmidmengen	47
Abbildung 14: SOAT-katalysierte CE-Bildung ohne SOAT-Inhibitor-Inkubation	49
Abbildung 15: CE-Bildung bei SOAT1-transfizierten AD-293 Zellen	51
Abbildung 16: CE-Bildung bei NCI-H295R Zellen	52
Abbildung 17: Lipid-Auftrennung in freies Cholesterin und Cholesterinester	53

Abbildung 18: Chromatographische Darstellung des NBD-Cholesterinester-Anstiegs in NCI-H295R Zellen über einer Zeitreihe.....	55
Abbildung 19: NBD-Cholesterinester-Anstieg in NCI-H295R Zellen.....	56
Abbildung 20: Mittlere inhibitorische Konzentrationen ( $IC_{50}$ ) verschiedener SOAT-Inhibitoren.....	57
Abbildung 21: SOAT1 und SOAT2 Expression in Prostatakarzinomzellen .....	59
Abbildung 22: Kaplan-Meier-Kurven stellen das Auftreten eines biochemischen Progresses von Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der SOAT1 (A) bzw. der SOAT2 (B) Expression mit der Zeit dar. ....	62
Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurven stellen das Auftreten eines klinischen Progresses von Hochrisiko Prostatakarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der SOAT1 (A) bzw. der SOAT2 (B) Expression mit der Zeit dar. ....	64

### III. Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms .....	15
Tabelle 2: Risikostratifizierung nach D´Amico .....	17
Tabelle 3: Neues Graduierungs-System ab 2016.....	17
Tabelle 4: Chemikalien Reagenzien und Lösungen .....	20
Tabelle 5: Zellkulturmedien .....	21
Tabelle 6: Puffer für die Proteinanalytik.....	22
Tabelle 7: Primärantikörper .....	22
Tabelle 8: Sekundärantikörper .....	22
Tabelle 9: Plasmide .....	22
Tabelle 10: Gebrauchsfertige Kits .....	23
Tabelle 11: Genexpressionsproben.....	23
Tabelle 12: Routinematerialien.....	23
Tabelle 13: Geräte.....	24
Tabelle 14: Patientencharakteristika .....	39
Tabelle 15: Färbeintensität    Tabelle 16: Prozentsatz positiver Tumorzellen .	42
Tabelle 17: Verwendete SOAT-Inhibitor-Konzentrationen für die IC <sub>50</sub> - Bestimmung .....	56
Tabelle 18: Beeinflussung des biochemischen Progresses durch verschiedene Faktoren nach einer univariaten Analyse bei Hochrisiko Prostatakarzinom- Patienten. ....	61

Tabelle 19: Beeinflussung des biochemischen Progresses durch SOAT1 (A)  
bzw. SOAT2 (B) nach einer multivariaten Analyse bei Hochrisiko  
Prostatakarzinom-Patienten. .... 62

## IV. Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der aufregenden und bereichernden Zeit der experimentellen und klinischen Ausarbeitung meiner Dissertation unterstützt, motiviert und gefördert haben und ohne deren Hilfe solch ein Resultat nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Matthias Kroiß. Er hat mich stets unterstützt, ist mir beratend zur Seite gestanden mit fachlichem Input und vielen guten Ideen und Gesprächen auch auf persönlicher Ebene sowohl während meiner Laborarbeiten vor Ort in Würzburg als auch während der Fertigstellung in meiner Heimat. Nicht zuletzt hat er einen großen Beitrag zum Gelingen eines Papers über den Prostatakarzinom-Part beigetragen, was mich besonders stolz macht. Ich bin froh, dass wir uns auf diesem Wege kennengelernt haben!

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Fassnacht bedanken, unter dessen Leitung mir die Ausarbeitung der Dissertation in der Abteilung für Endokrinologie und Diabetologie ermöglicht wurde.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hubert Kübler für die hilfsbereite Zweitgutachtung.

Meiner ganzen Arbeitsgruppe und vor allem Dr. rer. nat. Silviu Sbiera und Iuliu Sbiera sowie Sabine Kendl danke ich sehr für die geduldige und tolle Unterstützung und Einarbeitung in die wissenschaftliche Methodik und die guten Erinnerungen, die mir an die Zeit im Labor verbleiben.

Dr. rer. nat. Isabel Weigand und Dr. Markus Krebs möchte ich danken für die großartige Unterstützung bei der Fertigstellung des Papers.

Sehr dankbar und glücklich bin ich darüber, meine Familie an meiner Seite zu haben. Sie ist mir während meines ganzen Studiums zur Seite gestanden und in schwierigen und anstrengenden Phasen hat mich vor allem mein Mann Athanasios immer motiviert, Kraft gegeben und ist mir tatkräftig zur Seite gestanden. Ich liebe euch!

## V. Veröffentlichungen

---

- ❖ 07/2021: Eckhardt, C., Sbiera, I., Krebs, M., Sbiera, S., Spahn, M., Kneitz, B., Joniau, S., Fassnacht, M., Kübler, H., Weigand, I., Kroiss, M., *High expression of Sterol-O-Acyl transferase 1 (SOAT1), an enzyme involved in cholesterol metabolism, is associated with earlier biochemical recurrence in high risk prostate cancer*, zur Publikation angenommen in Prostate Cancer and Prostatic Diseases.
- ❖ 08/2015: Sbiera, S., Leich, E., Liebisch G., Sbiera, I., Schirbel, A., Wiemer, L., Matysik, S., Eckhardt, C., Gardill, F., Gehl, A., Kendl, S., Weigand, I., Bala, M., Ronchi, C.L., Deutschbein, T., Schmitz, G., Rosenwald, A., Allolio, B., Fassnacht, M., Kroiss, M., *Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells*, Endocrinology, 2015. **156**(11): p. 3895-908.