

**Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität
Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Andreas K. Buck

**Einfluss der PSMA-Expression auf die Docetaxel-Sensitivität sowie
systemischer Medikamente auf die Expression von PSMA, CXCR4 und
SSTR2**

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von Konstantin Felix Messerschmidt aus Jena

Würzburg, März 2022

Referent: Prof. Dr. med. Andreas K. Buck

Korreferent: Prof. Dr. med. Hubert Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2022

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie des Prostatakarzinoms.....	1
1.2	Ätiologie und Prävention des Prostatakarzinoms.....	1
1.3	Klinik des Prostatakarzinoms.....	2
1.4	Histologie und Malignität des Prostatakarzinoms.....	2
1.5	Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	3
1.5.1	PSA.....	3
1.6	Stadieneinteilung und Ausbreitung des Prostatakarzinoms.....	3
1.7	Bildgebung des Prostatakarzinoms.....	4
1.7.1	Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	4
1.8	Therapie und Prognose des Prostatakarzinoms.....	6
1.8.1	In dieser Arbeit verwendete Medikamente zur Behandlung des Prostatakarzinoms.....	7
1.9	Nuklearmedizinische Angriffspunkte des Prostatakarzinoms.....	10
1.9.1	PSMA.....	10
1.9.2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4, CD184).....	11
1.9.3	Somatostatinrezeptor Typ 2 (SSTR2).....	13
1.10	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	15
1.10.1	Teil 1: Einfluss der PSMA-Expression auf die Docetaxel- Sensitivität.....	15
1.10.2	Teil 2: Einfluss systemischer Medikamente auf die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2.....	17
2	Materialien und Methoden.....	18
2.1	Materialien.....	18
2.1.1	Geräte.....	18
2.1.2	Verbrauchsmittel.....	20
2.1.3	Chemikalien.....	22
2.1.4	Kommerzielle Kits.....	24
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	25
2.1.6	Antikörper.....	26
2.1.7	Small interfering RNA (siRNA).....	27

2.1.8	Software	27
2.1.9	Zelllinien	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellkultur	28
2.2.2	Ermittlung der Behandlungskonzentrationen der Medikamente	30
2.2.3	Behandlung der Zellen mit Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid	32
2.2.4	Transiente Transfektion von LNCaP Zellen	32
2.2.5	Zelloberflächenfärbung	33
2.2.6	Intrazelluläre Färbung	33
2.2.7	Messung der Zellproliferation mittels CFSE	34
2.2.8	Nicoletti Assay zur Quantifizierung von Zelltod und Zellzyklusstatus	34
2.2.9	Proteinbiochemische Methode	35
2.2.10	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Charakterisierung der Zelllinien	39
3.2	Einfluss der PSMA-Expression auf die Docetaxel-Sensitivität	40
3.2.1	Etablierung eines transienten PSMA kd in LNCaP Zellen	40
3.2.2	Bestimmung der PSMA-Expression auf der Zelloberfläche	42
3.2.3	Bestimmung der Menge von phosphoryliertem Akt, ERK1/2 und p38	43
3.2.4	Einfluss der Expression von PSMA auf die Expression von AR und CXCR4	46
3.2.5	Einfluss des PSMA kd auf das Proliferationsverhalten von LNCaP Zellen	47
3.3	Einfluss systemischer Medikamente auf die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2	47
3.3.1	Docetaxel	48
3.3.2	Dexamethason	49
3.3.3	Metformin	49
3.3.4	Abirateron	50

3.3.5	Enzalutamid.....	50
4	Diskussion	55
4.1	Einfluss der PSMA-Expression auf die Docetaxel-Sensitivität.....	55
4.1.1	PSMA-Expression in LNCaP, LNCaP-PSMA kd, C4-2 und PC-3 Zellen.....	55
4.1.2	Akt	55
4.1.3	ERK1/2	58
4.1.4	Mitogenaktivierte Proteinkinase (p38, p38 MAPK).....	59
4.1.5	Proliferationsverhalten.....	60
4.1.6	AR.....	60
4.1.7	CXCR4	62
4.2	Einfluss systemischer Medikamente auf die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2	63
4.2.1	Docetaxel.....	63
4.2.2	Dexamethason	64
4.2.3	Metformin.....	65
4.2.4	Antiandrogene der zweiten Generation	66
4.3	Ausblick.....	68
5	Zusammenfassung.....	71
6	Literaturverzeichnis	72
I	Abkürzungsverzeichnis	
II	Abbildungsverzeichnis	
III	Tabellenverzeichnis	
IV	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Männern in Deutschland und macht insgesamt über ein Viertel aller diagnostizierten Malignome aus. Es steht an zweiter Stelle der tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen und ist für 3,1 % aller Todesursachen in Deutschland verantwortlich. Die altersstandardisierte Inzidenz stieg von 1970 über drei Jahrzehnte kontinuierlich an und verlief seitdem weitgehend konstant. Ein Grund für diesen Verlauf scheint die verbesserte Früherkennung durch Messung des Prostataspezifischen Antigen- (PSA-) Wertes seit Ende der 1980er Jahre zu sein. 2014 registrierte das Robert-Koch-Institut (RKI) 57.370 Neuerkrankungen in Deutschland. Das Lebenszeitrisko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, beträgt 11,9 % und das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren. Vor dem 50. Lebensjahr ist das Risiko sehr gering. So erkrankt ein 35-jähriger Mann in den nächsten zehn Jahren zu < 0,1 %, ein 75-jähriger jedoch zu über 5 %. Die Mortalität betrug im Jahr 2014 19,7 pro 100.000 Personen bei insgesamt 13.704 Sterbefällen. Damit ist die altersstandardisierte Sterblichkeit niedriger als vor 40 Jahren, aber durch die Entwicklung des demographischen Wandels sterben absolut gesehen fast doppelt so viele Männer an den Folgen eines Prostatakarzinoms. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt in Deutschland laut RKI momentan bei 91 %. Bei Männern ist Prostatakrebs zudem das Malignom mit den höchsten Krankheitskosten [1, 2].

1.2 Ätiologie und Prävention des Prostatakarzinoms

Die genauen Ursachen für die Entstehung des Prostatakarzinoms sind bisher weitestgehend unbekannt. Einen wichtigen Einfluss haben genetische Faktoren [2]. Mutationen der Gene von u.a. TP53 (tumor protein 53), PTEN (phosphatase and tensin homolog), TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2), MYC (c-myc) und PIK3CA (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha) scheinen das Auftreten von Prostatakarzinomen zu begünstigen [3]. Es konnte zudem eine Erkrankungshäufung unter nahen Verwandten

beobachtet werden. So ist das Erkrankungsrisiko bei erkrankten Brüdern oder einem erkrankten Vater über das Zweifache erhöht [4]. Zudem sind Männer schwarzafrikanischer Herkunft, vor Europäern oder weißen Nordamerikanern am häufigsten betroffen, während Asiaten eher selten erkranken [2]. Das Prostatakarzinom tritt geographisch in unterschiedlicher Häufigkeit auf und ist in den westlichen Industrienationen eines der häufigsten Malignome, während es in asiatischen Ländern deutlich seltener vorkommt [5]. Risikofaktoren scheinen außerdem u.a. ein höheres Alter, chronische Prostatitiden und sexuell übertragbare Erkrankungen zu sein [2].

Zu den beeinflussbaren präventiven Faktoren zählen offenbar die Ernährung, die psychosoziale Situation, körperliche Bewegung und ein normales Körpergewicht [2, 6].

1.3 Klinik des Prostatakarzinoms

Die frühen Stadien des Prostatakarzinoms verlaufen oft symptomlos, da die Mehrzahl in der peripheren Zone der Prostata entsteht und anfangs langsam wächst. Durch den Primärtumor kann es zu Miktionsbeschwerden, blutigem und/oder vermindertem Ejakulatvolumen, Impotenz und Harnstauung kommen. Zusätzlich können Patienten in fortgeschrittenen Stadien durch Schmerzen, Müdigkeit, Erschöpfung, Gewichtsverlust, Angst und Depressionen beeinträchtigt sein. Mit der Ausbildung von Knochenmetastasen kommt es oft zu Knochenschmerzen und zur Anämie. Lymphödeme der unteren Extremitäten können durch Metastasen im pelvinen Lymphgewebe verursacht werden. Eine maligne retroperitoneale Fibrosierung durch lymphatische Ausbreitung der Erkrankung kann zur Harnleiterobstruktion führen [6, 7].

1.4 Histologie und Malignität des Prostatakarzinoms

In der Prostata kann man die zentrale Zone von der Transitionszone, dem anterioren fibromuskulären Stroma und der peripheren Zone abgrenzen [7]. In letzterer entsteht der Großteil aller Prostatakarzinome, bei denen es sich zu über 90 % um Adenokarzinome aus den Prostatadrüsenzellen handelt [8]. Die histologische Einteilung der Malignität wird nach dem revidierten Gleason-Score durchgeführt [7].

1.5 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Die Vorsorgeuntersuchung zur Früherkennung des Prostatakarzinoms wird Männern in Deutschland ab dem 45. Lebensjahr empfohlen. Sie umfasst einmal jährlich die Frage nach Beschwerden, die Untersuchung der äußeren Geschlechtsorgane, die digital-rektale Tastuntersuchung der Prostata sowie das Abtasten der entsprechenden Lymphknoten. Der Nutzen des bevölkerungsweiten Screenings durch Messung des PSA-Wertes ist bisher nicht zweifelsfrei belegt [9]. Bei Karzinomverdacht kann ergänzend eine transrektale Ultraschalluntersuchung durchgeführt werden. Bei begründetem Verdacht wird die Diagnose durch eine transrektale Stanzbiopsie und die anschließende histologische Einstufung mittels Gleason-Score gesichert [6].

1.5.1 PSA

Das PSA ist eine Serinprotease aus der Prostata und dient der Verflüssigung des Prostatasekrets. Sie ist organspezifisch, jedoch nicht tumorspezifisch. So kann es auch bei benigner Prostatahyperplasie, durch Entzündungen, Manipulation oder Reizung anderer Art (z.B. nach digital-rektaler Tastuntersuchung) zu erhöhten Werten kommen [8, 10]. Dennoch spielt der PSA-Wert eine wichtige Rolle beim Screening, der Risikoeinschätzung, der Beurteilung des Therapieansprechens und insbesondere in der Tumornachsorge von Prostatakarzinomen. Nach definitiver lokaler Therapie sollte der PSA-Wert unter die Nachweisgrenze sinken, da kein Prostatagewebe mehr vorhanden sein sollte. Ein erneuter Anstieg wird als biochemisches Rezidiv bezeichnet und gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen [6, 8].

1.6 Stadieneinteilung und Ausbreitung des Prostatakarzinoms

Die Stadieneinteilung erfolgt beim Prostatakarzinom nach der Union internationale contre le cancer (UICC)-Klassifikation und den TNM-Kriterien (**Tabelle 1**). T steht für Tumor und beschreibt die Größe und lokale Ausbreitung des Primärtumors. N gibt die Anzahl der Lymphknotenmetastasen an. Hierbei werden typischerweise erst lokoregionäre Lymphknoten im kleinen Becken und später auch retroperitoneale Lymphknoten befallen. M beschreibt den Status der Fernmetastasierung. Am häufigsten sind Metastasen des Skelettsystems,

welche sich erst zentral und später auch peripher bilden. So sind in absteigender Häufigkeit Lendenwirbelkörper, proximaler Femur, das Becken, die thorakalen Wirbelkörper, die Rippen, das Sternum, der Schädel und der Humerus betroffen. Seltener treten viszerale Metastasen wie beispielsweise in Lunge, Leber oder Nebennieren auf [6, 8, 11].

Tabelle 1 Vereinfachte Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms.

Stadium des Prostatakarzinoms	Erklärung [6, 11]
lokal begrenzt	T1: klinisch nicht erkennbarer Tumor, weder tastbar noch in der Bildgebung ersichtlich oder T2: Tumor begrenzt auf Prostatakapsel und N0 und M0
lokal fortgeschritten	T3: Tumor durchbricht Prostatakapsel und/oder T4: Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen als Samenblase und N0 und M0
fortgeschritten/metastasiert	jedes T, N1 und/oder M1

1.7 Bildgebung des Prostatakarzinoms

Neben der transrektalen Ultraschalluntersuchung kann in der Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms auch eine Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden. Diese wird aktuell laut Leitlinie jedoch nicht als Routinediagnostik empfohlen. Im Rahmen des Stagings sollte jedoch routinemäßig in Abhängigkeit von der Fragestellung und der Risikogruppe eine MRT bzw. Computertomographie (CT) durchgeführt werden. Zum Nachweis von Knochenmetastasen sollte in Abhängigkeit von der Risikogruppe zudem eine Skelettszintigraphie erfolgen [6].

1.7.1 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Die PET-Untersuchung gehört außerhalb von kontrollierten Studien noch nicht zur Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms. Für die Rezidivdiagnostik empfiehlt die Leitlinie jedoch bereits die Prostataspezifisches Membranantigen (PSMA)-Hybrid-Bildgebung [6].

Die PET-Untersuchung basiert auf Molekülen (Radiotracer), die sich gezielt in speziellen Geweben anreichern und mit Nukliden radioaktiv markiert werden. Beim Zerfall der Positronenstrahler treffen die Positronen auf Elektronen im

Körper und werden unter Aussendung eines Paares γ -Quanten vernichtet. Diese sogenannte Vernichtungsstrahlung wird exakt 180° zueinander ausgesendet. Ringförmig um den Patienten angeordnete Detektionskristalle erkennen die Strahlung und ermöglichen eine Verarbeitung zu Schnittbildern. Nicht alle anatomischen Strukturen sind eindeutig anhand ihres Stoffwechsels voneinander zu unterscheiden. Daher haben sich Hybrid-Systeme wie SPECT (*single photon emission computed tomography*, Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)/CT; PET/CT und PET/MRT bewährt, bei denen nuklearmedizinische Geräte mit den jeweiligen radiologischen Geräten kombiniert werden und so durch Fusion der Bilder eine sichere anatomische Zuordnung der Anreicherung ermöglicht wird [12].

Die [^{18}F]2'-Fluor-2'-desoxy-D-glucose- ([^{18}F]FDG-) PET/CT ist das Standardverfahren in der Nuklearmedizin. Tumorzellen weisen häufig eine erhöhte Stoffwechselaktivität auf, wodurch sie eine größere Menge des radioaktiv markierten Zuckers aufnehmen als andere Körperzellen und so in der PET/CT sichtbar gemacht werden können [13, 14]. Viele Tumorentitäten lassen sich mittels [^{18}F]FDG-PET/CT sensitiv darstellen. Beim Prostatakarzinom werden jedoch, in Abhängigkeit vom Tumorstadium, Sensitivitätswerte zwischen 4 % und 83 % beschrieben, was problematisch für den Nutzen in der Diagnostik und in der Stadieneinteilung ist und eine Abgrenzung zu benignem Prostatagewebe nicht immer möglich macht [15]. So beschrieben Kao et al. eine diffus erhöhte [^{18}F]FDG-Aufnahme bei Prostatitis und Effert et al. konnten mittels [^{18}F]FDG-PET/CT nicht zwischen benignem hyperplastischem Prostatagewebe und Prostatakarzinomen differenzieren, während manche Prostatakarzinome wiederum eine limitierte [^{18}F]FDG-Aufnahme zeigten [15-18]. Trotzdem kann die Bildgebung durch [^{18}F]FDG-PET/CT z.B. für die Diagnose schlecht differenzierter Karzinome mit hohem Gleason-Score und im Therapiemonitoring nach (chemo-) hormonaler Therapie nützlich sein [16].

Cholin-basierte PET-Verfahren mit [^{18}F]Cholin ([^{18}F]Fluorethylcholin, [^{18}F]Fluormethylcholin) oder [^{11}C]Cholin stellen Alternativen für die Bildgebung dar. Die Zellmembran enthält Phosphatidylcholin, welches aus Cholin synthetisiert wird. Prostatazellen nehmen mehr Cholin auf als andere

Körperzellen und durch die erhöhte Cholinaseaktivität in Prostatakarzinomzellen ist hier der Cholinumsatz nochmals gesteigert [19]. Die [¹⁸F]Cholin-PET/CT weist für das initiale Staging des Prostatakarzinoms eine Sensitivität von 84 % und eine Spezifität von 79 % auf. Für das Restaging beim Rezidiv verbessern sich diese Werte auf 85 % Sensitivität und 88 % Spezifität, wodurch sie der [¹⁸F]FDG-PET/CT überlegen ist [20]. Oprea-Lager et al. beschrieben zudem einen Zusammenhang zwischen Cholinaufnahme und Docetaxelexposition in Prostatakarzinom-Zelllinien, welcher zur Überprüfung des Therapieansprechens dienen könnte [21]. In einer ersten klinischen Studie konnte dies jedoch nicht bestätigt werden [22]. Limitiert ist der Einsatz der [¹⁸F]Cholin-PET/CT durch die niedrige Sensitivität und Spezifität beim initialen Staging, der Detektion von Lymphknoten und beim Restaging von Rezidivpatienten mit niedrigem PSA-Wert [20, 23]. Außerdem führten Prostatitis und benigne Prostatahyperplasie zu erhöhter Cholinaufnahme [24].

Aktuell werden spezifische Radiotracer erforscht, welche u.a. gegen PSMA oder den Gastrin Releasing Peptide Rezeptor gerichtet sind (z.B. Bombesin-Analoga) wie [⁶⁸Ga]Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-HBED-CC (PSMA-11), [⁶⁸Ga]PSMA I&T und [⁶⁸Ga]NOTA-Bombesin. So können Prostatakarzinomzellen detektiert werden, indem beispielsweise PSMA-Inhibitoren radioaktiv markiert und spezifisch in die Tumorzellen internalisiert werden [25-27]. Die Sensitivität und Spezifität der [⁶⁸Ga]PSMA-PET/CT liegen jeweils bei 86 % [28]. Klinisch ist sie der [¹⁸F]Cholin-PET/CT vor allem bei niedrigen PSA-Werten in der Detektionsrate für Rezidiverkennung und dem Kontrast der Bildgebung überlegen [28, 29]. Zudem scheint die [⁶⁸Ga]PSMA-PET/CT u.a. für die Visualisierung von Lymphmetastasen besser geeignet zu sein als die morphologische Bildgebung [30].

1.8 Therapie und Prognose des Prostatakarzinoms

Die Wahl des Therapieverfahrens hängt von der Ausbreitung des Tumors, der Graduierung sowie von Begleitfaktoren des Patienten wie Alter, Vorerkrankungen und Lebenserwartung ab. Es gibt Möglichkeiten der lokalen kurativen Therapie wie die radikale Prostatektomie, die perkutane Strahlentherapie oder die Brachytherapie. Demgegenüber stehen die aktive

Überwachung („Active Surveillance“) oder, bei einer voraussichtlichen Lebenserwartung von unter zehn Jahren, das abwartende Verhalten mit sekundärer symptomorientierter Therapie („Watchful Waiting“) [6]. Die hormonablative Therapie nutzt das hormonabhängige Wachstum der meisten Prostatakarzinomzellen aus und reicht von einer bilateralen Orchiectomie über luteinisierendes Hormon Releasing Hormon-Analoga oder Gonadotropin Releasing Hormon-Antagonisten bis hin zu Antiandrogenen [6, 8]. Häufig entwickelt sich innerhalb von zwei bis drei Jahren jedoch eine Kastrationsresistenz mit Tumorprogression trotz hormonablativer Therapie [31]. Hier kann ebenso wie bei metastasierter oder rezidivierter Erkrankung eine Chemotherapie oder eine Therapie mit Antiandrogenen der zweiten Generation angeboten werden. Bei kastrationsresistentem und trotz Ausschöpfen der empfohlenen Therapieoptionen progredientem Prostatakarzinom, wird von der Leitlinie ein nuklearmedizinischer Therapieversuch vorgeschlagen [6]. Dieser basiert auf dem theranostischen Prinzip im Sinne einer Verknüpfung von Diagnostik und Therapie (siehe 1.9.1).

Die Prognose des Prostatakarzinoms ist bei früh erkanntem, begrenzten (T1 und T2) und niedriggradigen (Gleason-Score < 8) Karzinomen sehr gut. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei fast 100 % und die Lebenserwartung ist kaum beeinträchtigt. Wenn jedoch schon Metastasen zum Diagnosezeitpunkt bestehen, verringert sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf 31 % [32].

1.8.1 In dieser Arbeit verwendete Medikamente zur Behandlung des Prostatakarzinoms

1.8.1.1 Docetaxel

Das Chemotherapeutikum Docetaxel ist ein semisynthetisches Taxan und wird von der Leitlinie als Erstlinientherapie empfohlen [6]. Taxane binden die β -Tubulin Untereinheit der Mikrotubuli und verhindern die Depolymerisation und damit den Abbau der Mitosespindel. Proliferierende Zellen arrestieren somit in der G2-M Phase des Zellzyklus, wodurch Apoptose und Zelltod ausgelöst werden [33]. In Zulassungsstudien zeigte die Therapie mit Docetaxel/Prednisolon (gehört zu den Glukokortikoiden) bzw. Docetaxel/Estramustin (gehört zu den Zytostatika)

einen Überlebensvorteil im Gegensatz zur Therapie mit Mitoxantron (gehört zu den Zytostatika)/Prednisolon [34, 35]. Docetaxelbehandlung in Kombination mit Hormonablationstherapie zeigte ebenfalls längere Überlebenszeiten als die alleinige Hormonablation [36].

1.8.1.2 Dexamethason

Dexamethason ist ein langwirksames, künstliches Glukokortikoid und wird laut Leitlinie für die Therapie des metastasierten/rezidierten, kastrationsresistenten Prostatakarzinoms empfohlen [6]. Es scheint in den nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells-Interleukin-6-Signalweg einzugreifen und die androgenunabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors (AR) (und damit die Ausbildung der Kastrationsresistenz) zu inhibieren, wodurch das Wachstum von Prostatakarzinomzellen negativ beeinflusst wird [37, 38]. Außerdem wurde in Untersuchungen die antiangiogenetische Aktivität von Docetaxel durch Dexamethason potenziert [39]. Die Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und niedrig dosiertem Docetaxel scheint eine Alternative zur alleinigen Docetaxel-Gabe in der Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms zu sein [40]. Auch die niedrig dosierte Dexamethasonbehandlung führte zum akzeptablen Rückgang des PSA-Wertes und könnte eine Alternative für Patienten darstellen, welche eine Chemotherapie nicht vertragen [41].

1.8.1.3 Metformin

Metformin ist ein Biguanid und wird in der Therapie des Typ-2-Diabetes mellitus eingesetzt [42]. Es wird vermutet, dass es außerdem zu einer Verminderung des Prostatakrebsrisikos, der biochemischen Rezidive und der PSA-Werte führen könnte [43, 44]. Metformin schien die Proliferation, Migration und Invasion von Prostatakrebszellen zu unterdrücken und deren Apoptose zu induzieren. Auch das Wachstum benigner Prostatazellen wurde vermindert [45, 46]. Als Wirkmechanismus wird unter anderem eine Störung der Translation und der intrazellulären Signalwege des AR vermutet [47]. Zudem reduziert Metformin das Auftreten von Hyperinsulinämien und Hyperglykämien, welche beide potenzielle Risikofaktoren für Mortalität beim Prostatakarzinom sind [48, 49].

1.8.1.4 Antiandrogene der zweiten Generation

Kastrationsresistente Prostatakarzinome scheinen in Abhängigkeit von Androgenen zu wachsen. So werden AR-assoziierte Signalwege weiterhin aktiviert, u.a. durch geringere Spezifität für Liganden, erhöhte Sensitivität für Androgene, aberrante Androgenproduktion im Tumorgewebe, Amplifikation und erhöhte Expression des AR-Gens, strukturelle Veränderungen des Rezeptors durch Mutationen, durch Überexpression von Koaktivatoren und durch Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen [50, 51]. Es wurden daher Antiandrogene der zweiten Generation entwickelt, welche die Androgensynthese und die Signalwege des AR direkt angreifen und zu signifikanten Überlebensvorteilen bei Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom führten [52, 53].

1.8.1.4.1 Abirateron

Abirateronacetat kann oral eingenommen werden und ist die Vorstufe von Abirateron, einer chemischen Verbindung aus der Gruppe der Steroide. Es inhibiert selektiv und irreversibel die Steroid-17 α -Hydroxylase, welche als Enzym wichtige Schritte der Androgensynthese katalysiert [52]. Abirateron wird in Kombination mit Prednison für die Behandlung des kastrationsresistenten rezidivierten/metastasierten Prostatakarzinoms empfohlen. In klinischen Studien wurde das Ansprechen u.a. durch einen messbaren Rückgang des PSA-Wertes, eine Verlängerung der Zeit bis zur Notwendigkeit einer Docetaxeltherapie und durch ein verlängertes Gesamtüberleben nachgewiesen [6, 54].

1.8.1.4.2 Enzalutamid

Enzalutamid inhibiert den Signalweg des AR an mehreren Stellen. Es bindet an den Rezeptor und verhindert so die Bindung von Liganden; es hemmt die Translokation des AR-Komplexes in den Zellkern und es reduziert die Bindung des AR an die Desoxyribonukleinsäure (DNA) [53]. Bei kastrationsresistenten, metastasierten/rezidivierten Prostatakarzinomen wird eine Enzalutamidbehandlung von der Leitlinie empfohlen [6]. In der Zulassungsstudie konnte ein um 4,8 Monate signifikant verlängertes Gesamtüberleben im Vergleich zur Placebobehandlung nachgewiesen werden

[55]. Die Enzalutamidbehandlung verringerte außerdem das Risiko für das Auftreten von Metastasen und schien im Vergleich zur Abiraterontherapie zu einer geringeren Inanspruchnahme der Gesundheitsversorgung, weniger stationären Aufnahmen und niedrigeren Kosten in Notaufnahmen zu führen [56, 57].

1.9 Nuklearmedizinische Angriffspunkte des Prostatakarzinoms

1.9.1 PSMA

PSMA ist ein Typ II Transmembranprotein, welches aus 750 Aminosäuren (AS) besteht und in seiner glykosylierten Form ungefähr 100 kDa wiegt. Es ist auf den Chromosomen 11p11.2 und 11q14.3 kodiert und setzt sich aus einem intrazellulären (19 AS), einem transmembranären (24 AS) und einem extrazellulären Anteil (707 AS) zusammen [58, 59].

PSMA wird vor allem in der Prostata, zu geringen Mengen aber beispielsweise auch im proximalen Tubulus der Niere, im Bürstensaum des Duodenums, in den Kolonkrypten, im Gehirn, in den Speicheldrüsen, in den Ovarien und in der Brust exprimiert. Mittels PSMA-Färbung konnte eine signifikant höhere Expression in Prostatakarzinomen, Lymphknoten- und Knochenmetastasen als in normalem und hyperplastischem Prostatagewebe nachgewiesen werden [58-60]. Auch in neovaskulären Gefäßen anderer Tumorentitäten konnte PSMA-Expression nachgewiesen werden [61].

Bisher wurde kein physiologischer Ligand von PSMA identifiziert und seine Funktion konnte noch nicht endgültig geklärt werden [62]. Es wurde eine Folathydrolaseaktivität beschrieben, welche auf eine Aufgabe im Folatstoffwechsel von Prostata und Dünndarm hindeutet [63]. Außerdem scheint das PSMA-Protein zum überwiegenden Anteil mit der N-Acetyl-L-aspartyl-L-Glutamatpeptidase übereinzustimmen, was eine Funktion im Glutamatstoffwechsel und der Neurotransmission des Nervensystems vermuten lässt [64]. PSMA scheint den Zellzyklus zu beeinflussen und die Ausbildung von Aneuploidien zu begünstigen [65]. Ob die Expression und Aktivität von PSMA bei Prostatakarzinomzellen eher einen fördernden oder hemmenden Einfluss auf die Zellmigration und die Invasivität des Wachstums hat, ist auf Grund kontroverser

Studienergebnisse nicht abschließend beantwortet [66, 67]. Durch seine Expressionseigenschaften und seine pathophysiologischen Einflüsse ist PSMA ein zentraler und vielversprechender Bestandteil der Forschung, der Diagnostik (siehe 1.7.1) und der Therapie des Prostatakarzinoms. So kann die PSMA-Expression durch eine [⁶⁸Ga]PSMA-PET/CT ermittelt werden, um Patienten zu identifizieren, bei denen eine Endoradiotherapie Nutzen bringen könnte. Der gleiche Radiotracer kann anschließend an ein therapeutisches Nuklid, z.B. an ¹⁷⁷Lu, ²²⁵Ac oder ²¹³Bi gekoppelt werden und die therapeutische α- oder β-Strahlung so gezielt am Ort der höchsten PSMA-Expression, dem Prostatakarzinom, emittiert werden. Aktuell werden klinisch vor allem die PSMA Liganden [¹⁷⁷Lu]PSMA-617, [¹⁷⁷Lu]PSMA I&T, [²²⁵Ac]PSMA-617 und [²¹³Bi]PSMA-617 genutzt [68-70]. Erste Ergebnisse klinischer Studien versprechen ein großes Potenzial dieser sogenannten Endoradiotherapie. Rahbar et al. beschrieben in ihrer retrospektiven multizentrischen Analyse unter Einschluss von 145 Patienten mit metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakarzinom eine gute Wirksamkeit und Verträglichkeit der [¹⁷⁷Lu]PSMA-617 Endoradiotherapie. Bei 45 % der Patienten konnte nach der Therapie ein biochemisches Ansprechen (über 50 % Rückgang des PSA Wertes im Vergleich zum Ausgangswert) beobachtet werden [71]. Ahmadzadehfar et al. zeigten in ihren retrospektiven Studien ebenfalls die gute Wirksamkeit (Rückgang des PSA Wertes bei 70 % der Patienten) sowie die geringe Toxizität der Endoradiotherapie [72]. Weitere klinische Studien stehen damit im Einklang und zeigten das große zukünftige Potenzial der PSMA-gerichteten Endoradiotherapie für Patienten mit metastasiertem, kastrationsresistentem Prostatakarzinom im fortgeschrittenen Stadium, für welche bisher keine zufriedenstellenden Behandlungsoptionen existierten [73, 74].

1.9.2 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4, CD184)

CXCR4 ist ein G-Protein-gekoppelter Chemokinrezeptor, welcher auf Chromosom 2 kodiert ist und durch Bindung von CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12, stromal-derived-factor-1α) aktiviert wird [75]. CXCL12 wird bevorzugt in Lymphknoten und im Knochenmark exprimiert und spielt eine wichtige Rolle für die Reifung und Migration von Lymphozyten. Die CXCR4/CXCL12-Achse

scheint außerdem an der Embryonalentwicklung des Herzens und des Nervensystems beteiligt zu sein [75, 76]. Während die Expression im gesunden Gewebe häufig gering oder nicht nachweisbar ist, ist CXCR4 einer der am häufigsten überexprimierten Chemokinrezeptoren bei Krebszellen [77]. Die Mehrheit der soliden Krebsentitäten weisen eine vermehrte CXCR4-Expression auf, unter anderem Prostatakarzinome, Mammakarzinome, hämatologische Erkrankungen (z.B. Multiple Myelome), Pankreaskarzinome, Ösophaguskarzinome, Nierenzellkarzinome und Zervixkarzinome [78]. Die CXCR4/CXCL12-Achse scheint an Wachstum, Metastasierung, Vaskularisation und an der Ausbildung von Therapieresistenzen bei Tumoren beteiligt zu sein [76, 79]. Die CXCR4-Expression ist in Prostatakarzinomzellen signifikant höher als in normalem Prostatagewebe und scheint laut einer Metaanalyse von Chen et al. mit dem Tumorstadium, dem Vorhandensein von Lymph- oder Knochenmetastasen und dem krebsspezifischen Überleben assoziiert zu sein [79]. Lee et al. beschrieben dagegen in ihrer Metaanalyse zwar eine Assoziation der CXCR4-Expression mit der Existenz von Metastasen, nicht jedoch mit dem Tumorstadium [80]. Weiterhin kamen Zhao et al. durch die Auswertung von 85 Studien zu dem Ergebnis, dass die Überexpression von CXCR4 beim Prostatakarzinom, aber auch bei vielen anderen Krebsentitäten, signifikant mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben sowie mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist [78]. Da die Mehrheit der Patienten mit Prostatakarzinom nicht an den Folgen des Primärtumors, sondern an denen der Metastasen verstirbt, kann eine hohe CXCR4-Expression zusammenfassend, trotz kontroverser Ergebnisse bzgl. der Assoziation zum Tumorstadium, als negativer prognostischer Marker betrachtet werden [78, 81].

Demmer et al. und Gourni et. al entwickelten [⁶⁸Ga]Pentixafor, einen hochspezifischen und hochaffinen radioaktiv markierten Chemokinrezeptorliganden von CXCR4 und konnten damit bereits erfolgreiche PET-Untersuchungen an Mäusen mit CXCR4-exprimierenden Lungenkarzinomen durchführen [82, 83]. In weiteren Untersuchungen bestätigten Wester et al. die gute Eignung der [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT zur spezifischen und kontrastreichen Darstellung der CXCR4-Expression im Tiermodell und an

Lymphompatienten [84]. Bei der Darstellung von Multiplen Myelom-Läsionen war die [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT der [¹⁸F]FDG-PET/CT in Studien von Philipp-Abbrederis et al. am Tiermodell und am Patienten sogar überlegen [85]. Lapa et al. konnten diese Überlegenheit jedoch bei der Untersuchung von 35 Patienten mit Multiplem Myelom nicht bestätigen. Sie sehen den Nutzen der [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT eher im Sinne des theranostischen Prinzips zur Auswahl geeigneter Patienten für eine Endoradiotherapie [86]. Herrmann et al. gelang es, in ersten Studien an drei intensiv vorbehandelten Patienten mit intra- und extramedullären Manifestationen des Multiplen Myeloms den Effekt einer CXCR4-gerichteten Endoradiotherapie zu zeigen. Den Patienten wurde [¹⁷⁷Lu]Pentixather und einem Patienten zusätzlich [⁹⁰Y]Pentixather verabreicht, ohne dadurch akute Nebenwirkungen zu verursachen. In der Kontroll-PET-Bildgebung zeigte sich nach der Therapie bei zwei der Patienten eine signifikante Reduktion der [¹⁸F]FDG-Aufnahme [87]. In weiteren Untersuchungen an Patienten mit Multiplem Myelom bestätigten Lapa et al. die gute Toleranz und Antitumoraktivität der [¹⁷⁷Lu]Pentixather und [⁹⁰Y]Pentixather Endoradiotherapie. Von acht behandelten Patienten konnte bei einem eine komplette- und bei fünf weiteren Patienten eine partielle Remission erreicht werden [88]. Da fast 90 % der Prostatakarzinome eine hohe CXCR4-Expression aufweisen, könnte CXCR4 auch beim Prostatakarzinom als zukünftiger Biomarker zur nichtinvasiven Überwachung und als mögliches therapeutisches Ziel für Endoradiotherapien in Frage kommen [89].

1.9.3 Somatostatinrezeptor Typ 2 (SSTR2)

Somatostatin ist ein neuroendokrines Peptidhormon, welches von Pankreas und Hypothalamus sezerniert wird. Es hat hemmende Effekte auf die Wachstumshormonausschüttung, auf die meisten endokrinen und exokrinen Sekretionsmechanismen, wirkt als endogener Inhibitor der Zellproliferation vieler maligner und benigner Gewebe und hat wichtige Funktionen als Neurotransmitter und Neuromodulator im zentralen Nervensystem. Seine Wirkung wird über G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranhelix-Rezeptoren vermittelt, die Somatostatinrezeptoren Typ 1-5 (SSTR1-5) [90, 91]. Der SSTR2 ist der häufigste Subtyp beim Menschen und wird physiologisch von normalem Prostatagewebe

exprimiert [92]. In Prostatakarzinomen kann er jedoch nur selten nachgewiesen werden [92]. Außerdem zeigte sich jeweils eine niedrigere SSTR2-Expression bei Metastasen des Prostatakarzinoms als beim Primärtumor und bei einer Rezidivkrankung gegenüber einer Primärerkrankung. Die Intensität der SSTR2-Färbung scheint negativ mit der Höhe des Gleason-Scores, dem Tumorstadium, der Tumorzellproliferation, dem präoperativen PSA-Wert und der Wahrscheinlichkeit für tumorpositive Schnittränder des Operationsresektats zu korrelieren. Der Verlust der SSTR2-Expression erhöht die Häufigkeit der Metastasierung und geht mit einem ungünstigeren Tumor-Phänotyp und einer schlechteren Prognose für den Patienten einher [92]. Somatostatin und seine Rezeptoren scheinen eine wichtige Rolle in der Progression des Prostatakarzinoms zu spielen. So führte die Aktivierung von SSTR1-2 und SSTR5 zu einer Hemmung der Proliferation von PC-3, DU-145 und LNCaP Zellen [93]. Karaca et al. beschrieben synergistische Effekte bei der Induktion der Apoptose u.a. in Prostatakarzinomzellen durch Kombination des Somatostatinanalogons Octreotid mit Docetaxel. Hierdurch könnten eine niedrigere Dosierung, bessere Wirkung und geringere Resistenzbildung bezüglich Docetaxels erreicht werden [94]. Es wurden jedoch auch Fälle von SSTR2-Überexpression in Metastasen von kastrationsresistenten Prostatakarzinomen beschrieben [95]. Außerdem kann es nach längerer Krankheitsdauer oder im Rezidiv zur Entwicklung eines neuroendokrinen Prostatakarzinoms kommen, welches häufiger mit viszeralen Metastasen einhergeht und schwer zu behandeln ist. Diese Karzinome exprimieren SSTR auf ihrer Oberfläche, was diagnostisch für die Abgrenzung zu Adenokarzinomen nutzbar sein und auch ein mögliches therapeutisches Ziel darstellen könnte. Es wurden bereits Fälle beschrieben, in denen eine Darstellung von SSTR-exprimierenden Prostatakarzinomen z.B. mit Hilfe von radioaktiv markiertem Octreotid gelang [95, 96].

Andere gut differenzierte neuroendokrine Tumore exprimieren häufig SSTRs, welche hier schon vielfältig in Diagnostik und Therapie genutzt werden und als unabhängiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben gelten. Gängige Methoden sind die ^{111}In - oder ^{68}Ga - gekoppelte Bildgebung und die ^{90}Y - oder

¹⁷⁷Lu- basierte Therapie. Ziel der Endoradiotherapie ist dabei meist SSTR2 [97-99]. Somit könnte SSTR2 ebenfalls als potenzieller Biomarker der nichtinvasiven Diagnostik und bei Unterformen des Prostatakarzinoms auch als mögliches therapeutisches Ziel betrachtet werden.

1.10 Ziele der vorliegenden Arbeit

1.10.1 Teil 1: Einfluss der PSMA-Expression auf die Docetaxel-Sensitivität

Das kastrationsresistente, metastasierte und/oder rezidierte Prostatakarzinom ist bis heute nur in seltenen Fällen heilbar. Ein Grund dafür sind u.a. Chemoresistenzen gegenüber dem Standardchemotherapeutikum Docetaxel, welches dadurch lediglich zu einem Überlebensvorteil von ca. zwei Monaten führt [35]. Könnte mittels nicht-invasiver PSMA-PET/CT-Bildgebung Rückschluss auf die Docetaxel-Sensitivität gezogen werden, wäre es zukünftig möglich, individualisierte Therapiemöglichkeiten anzubieten und nebenwirkungsreiche, ineffektive und kostenintensive Therapien zu vermeiden. Hartrampf et al. haben einen Zusammenhang zwischen der Docetaxel-Sensitivität und der PSMA-Expression bei Prostatakarzinomzellen beschrieben [100]. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Kausalität dieses Zusammenhanges untersucht.

Ein Mechanismus der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika ist die Aktivierung alternativer onkogener Signalwege. Möglicherweise könnte die Phosphorylierung (Aktivierung) der Proteinkinase B (Akt), der Extracellulär signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK 1/2) und der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38, p38-MAPK) den Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA und der Sensitivität gegenüber Docetaxel vermitteln. Diese Hypothese basiert auf Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von Akt, ERK 1/2 sowie p38 und einerseits der Sensitivität gegenüber Docetaxel und andererseits der Expression von PSMA beschreiben [67, 101-103].

Weitere Mechanismen der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika sind die Überexpression von Rezeptoren und die veränderte Interaktion der Krebszelle mit ihrer Mikroumgebung. In der Arbeit wurde untersucht, ob die AR-Expression den Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA und der Sensitivität gegenüber Docetaxel vermittelt. Grundlage für diese Hypothese sind

Studien, die einen Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der AR-Expression bzw. dem Vorhandensein von Androgenen im Kulturmedium beschreiben [104]. Zudem wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die CXCR4-Expression den Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel vermittelt. Diese Hypothese gründet auf Studien, die einen Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression und der Resistenzausbildung gegenüber Docetaxel zeigen [105].

Weiterhin wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das Proliferationsverhalten den Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel vermittelt. Dieser Hypothese liegen Studien zu Grunde, die zum einen eine Verkürzung der Zellzykluszeit in der G2/M-Phase und vermehrte Aneuploidien in Zusammenhang mit erhöhter PSMA-Expression zeigen und zum anderen strukturelle Modifikationen (z.B. durch Mutationen, welche zur Expression veränderter Proteinkinasen führen) als weiteren Mechanismus der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika beschreiben [51, 65].

Zur Bestätigung der Hypothesen wurden in dieser Arbeit die Phosphorylierung von Akt, ERK 1/2 sowie p38, die AR- und die CXCR4-Expression sowie das Proliferationsverhalten in Prostatakarzinomzelllinien mit unterschiedlicher PSMA-Expression durchflusszytometrisch quantifiziert.

Für den ersten Teil der Arbeit ergaben sich folgende konkrete Fragestellungen:
Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA, der Sensitivität gegenüber Docetaxel und

1. der Phosphorylierung von Akt, ERK 1/2 und p38?
2. der Expression des AR?
3. der Expression des CXCR4?
4. dem Proliferationsverhalten?

1.10.2 Teil 2: Einfluss systemischer Medikamente auf die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2

Bisher ist PSA der wichtigste Biomarker in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Für eine genauere Einschätzung der Aggressivität und Invasivität des Tumors, seiner Potenz zur Ausbildung von Metastasen, der Androgen-Sensitivität, der Tumorbiologie, des Tumorstoffwechsels und der Tumorheterogenität ist meist zusätzlich eine Biopsie nötig [6]. Da die Risikostratifizierung des Prostatakarzinoms den Gleason-Score mitberücksichtigt, sind Einteilungen, prognostische Aussagen oder individuelle Therapieempfehlungen ohne invasive Diagnostik schlecht möglich. PSMA, CXCR4 und SSTR2 könnten hierbei potenzielle nicht-invasive diagnostische und therapeutische Möglichkeiten bieten, die klinische Strategie zu optimieren. Interessant ist dabei, wie diese neuen Biomarker durch Medikamente beeinflusst werden, welche für die Therapie und die Forschung zum Prostatakarzinom relevant sind. Führt eine Behandlung eher zur Heraufregulation der Expression oder wird diese eher unterdrückt? Die Fragestellung gründet sich auf Studien, die zum einen eine Heraufregulation der PSMA-Expression durch beispielsweise Enzalutamid- oder Abirateronbehandlung nahelegen und zum anderen auf einer Studie, die eine Verringerung der CXCR4-Expression durch Dexamethasonbehandlung beschreibt [106, 107].

Für den zweiten Teil der Arbeit ergibt sich somit folgende Fragestellung:

Wie wird die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2 durch die Medikamente Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Ezalutamid beeinflusst?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Autoklav 23	MELAG Medizintechnik, Berlin, Deutschland
Automatischer Zellzähler	Scepter™ 2.0 Cell Counter	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland
Brutschrank	Heracell	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Durchfluss- zytometer	BD FACSCalibur	BD Biosciences, New Jersey, USA
Eismaschine	AF-10	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophorese- Kammer	Mini PROTEAN 3 cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Entwickler- maschine	Protec Ecomax	Protec GmbH & Co. KG, Oberstenfeld, Deutschland
Gefrierschrank	Gram bioline (-20 °C) IIRF 200 LG E 1020344 Forma 900 series (-80 °C)	Gram Commercial A/S, Vojens, DK Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank	Öko Super Glass Line	LIEBHERR International AG, Biberach a.d. Riß, Deutschland
MacBook	MacBook Pro 4.1	Apple Inc., Cupertino, USA
Mechanischer Zellzähler	T120	Baumer IVO GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, Deutschland
Mehrfachdispenser	HandyStep	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland

Mikroplatten Lesegerät	Plate CHAMELEON™ V	Hidex Oy, Turku, Finnland
Mikroskop	Axio Vert.A1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Netzteil für Elektrophorese- Kammer und Transfer-Tank	Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Neubauer- Zählkammer	Neubauer improved, Tiefe: 0,100 mm; 0,0025 mm ²	Assistent® Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Qubit® Fluorometer		Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reagenzglas- schüttler	Mixer Uzusio VTX 3000L	LMS Co. Ltd., Tokyo, Japan
Schüttler	MS1 Minishaker	IKA – Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
sterile Arbeitsbank	Herasafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Taumel- Rollmischer		Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Thermoschüttler	TS-100C	Biosan, Riga, Lettland
Thermostat- schrank		Aqua®lytic, Dortmund, Deutschland
Timer, Stoppuhr		TFA, Dostmann GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Transfer-Tank	Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

Vakuumpumpe		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage	Sartorius BP 310 S	Data Weighing Systems, Inc., Elk Grove, USA
Wasserbad		Memmert GmbH + Co KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 2.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Fresco 21 centrifuge	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Typ	Hersteller
Blottingpapier	330 g/m ² ; GB33	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Durchflusszyto- metrie- (FACS-) Röhrchen	Flow cytometry tube 5 ml, 75x12 mm, PS	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Gewebekultur- flaschen	250 ml, 75 cm ² 250 ml, 75 cm ² cell+	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Gewebekultur- platten	6-Well 96-Well 24-Well Cellstar	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulose- Membran	GE Protran BA83	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

Pasteurpipetten	Ca. 230 mm	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Polymerase-chain-reaction – (PCR-) Caps	PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipetten	2,5 µl Research plus 1000 µl Reference 20 µl 200 µl pipetman 200	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	10 µl 200 µl 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen für PCR mit Filter	10 µl Biosphere® 100 µl Biosphere® 200 µl Biosphere® 1000 µl Biosphere®	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	SafeSeal 1,5 ml 15 ml Cellstar tubes 50 ml Cellstar tubes	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
sterile Einmalpipetten	5 ml Cell Star 10 ml Cell Star 25 ml Cell Star	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Universalfilm (Super RX)		Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan

2.1.3 Chemikalien

	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES Puffer) 1 M	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland
5(6)-Carboxyfluorescein diacetate <i>N</i> -succinimidyl ester (CFSE)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Abirateron	Selleckchem, Houston, USA
Acrylamid/Bis-acrylamid Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA [Fraction V, pH = 7])	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Chemolumineszenz-Lösung (ECL-Lösung, Western Lightning® Plus-ECL)	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Dexamethason	Selleckchem, Houston, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Docetaxel	Selleckchem, Houston, USA
Enzalutamid	Selleckchem, Houston, USA
Ethanol (96 % vergällt)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut (unvergällt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung (0,5 M) pH = 8	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
fetales Kälberserum (FCS)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Glutamax	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
HiPerFect® Transfection reagent	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Lämmli-Puffer 2x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Metformin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumzitat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumpyruvat 100 mM	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Nicht-essentielle AS (MEM NEAA 100x)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Protein-Leiter (ColorPlus Prestained)	New England Biolabs® GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Protein-Leiter (ECL™Rainbow™Marker- Full range)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
RIPA-Puffer (eng.: Radioimmunoprecipitation assay buffer)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RNase A (Ribonuklease A)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RNase Entferner (RNase-ExitusPlus)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Roswell Park Memorial Institute-Zellmedium (RPMI 1640)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland
TRIZMA®BASE	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin (10x)	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland
TWEEN®20 (Polysorbat 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Zellmedium OPTI-MEM	Gibco® by life Technologies, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Kommerzielle Kits

	Hersteller
Inside-stain-Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Novagen® BCA Protein Assay Kit	EMD Millipore Corp., Billerica, USA

2.1.5 Puffer und Lösungen

	Konzentration, Lagerung
10x Laufpuffer für den Immunoblot	30,3 g 25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) Base/ 144 g 190 mM Glycin/ 10 g SDS in 1 l H ₂ O, RT 1x Laufpuffer: Verdünnung 1:10 mit H ₂ O
10x TRIS-Gly-Transferpuffer für den Immunoblot	30,3 g 25 mM TRIS Base/ 144 g 190 mM Glycin in 1 l H ₂ O, 4 °C 1x Transferpuffer: 200 ml TRIS-Gly-Transferpuffer/400 ml Methanol/2 ml 10 % SDS in 2 l H ₂ O
70 % Ethanol	70 % in H ₂ O, -20 °C
FACS-Puffer	3 % FBS in PBS
MACS-Puffer	0.5 % BSA/ 2 mM EDTA in PBS, 4 °C
NaOH	1 M in H ₂ O, RT
Natriumzitat (MW 258.07 g/mol)	0.1 M in H ₂ O, Raumtemperatur (RT)
Natriumzitat, Arbeitslösung	38 mM in H ₂ O, RT
para-Formaldehyd	30 % in PBS, -20 °C
PI	2.5 mg/ml in H ₂ O, 4 °C, im Dunkeln
RNaseA	10 mg/ml in DEPC- H ₂ O, -20 °C
TBS-T (TRIS-gepufferte Salzlösung mit Polysorbat 20)	24,2 g 20 mM TRIS Base/ 87,6 g 150 mM NaCl, RT TBS- T (Tris-buffered saline with Tween): mit 0,1 % Tween

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen-anti-Mensch IgG Androgen Rezeptor (D6F11) XP® Alexa Fluor® 488	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:50
Kaninchen-anti-Mensch IgG Phospho-p38 MAPK (T180/Y182) (D3F9) XP®	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:400
Kaninchen-anti-Mensch IgG Phospho- Akt (Ser473) (D9E) XP®	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:100
Kaninchen-anti-Mensch IgG Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP®	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:800
Maus-anti-Mensch CD 184 (CXCR4) Phycoerythrin (PE)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	1:10
Maus-anti-Mensch IgG _{2A} - Somatostatin R2 (SSTR2) PE	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:10
Maus-anti-Mensch PSMA	Abcam plc, Cambridge, UK	1:1500
Maus-anti-Mensch IgG2a k Isotyp Kontrolle PE	BD Pharmingen™ Biosciences, New Jersey, USA	1:10
Maus-anti-Mensch Tubulin	Abcam plc, Cambridge, UK	1:1000
Rekombinant-Mensch IgG1 Iso- typ Kontrolle VioBright™ Fluo- rescein-isothiocyanat (FITC)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	1:10
Rekombinant-Mensch IgG1 PSMA VioBright™ FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	1:10

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen-anti Mensch/Maus IgG Isotyp Kontrolle Alexa Fluor®488	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:1000
Pferd-anti-Maus Meerrettichperoxidase (HRP)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:3000

2.1.7 Small interfering RNA (siRNA)

	Hersteller
AllStars negativkontroll- siRNA	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
AllStars negativkontroll- siRNA Alexa Fluor 488	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hs_FOLH1_3 (FlexiTube siRNA) (Gene ID 2346)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.8 Software

	Hersteller
BD CellQuest™ Pro	BD Biosciences, New Jersey, USA
Microsoft Office für Mac 2015	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Mikrowin Instrument Driver for Hidex Chameleon	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland

2.1.9 Zelllinien

LNCaP (ATCC CRL-1740)

LNCaP C4-2

PC-3 (ATCC CRL-1435)

Die Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Würzburg stellte freundlicherweise die LNCaP und PC-3 Zellen zur Verfügung. Herr Prof. A. Beer aus der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Ulm stellte freundlicherweise die LNCaP C4-2 Zellen zur Verfügung.

Da in der vorliegenden Arbeit nur etablierte Zelllinien eingesetzt wurden, bestand keine Notwendigkeit für das Einholen eines Ethikvotums.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Es wurden drei verschiedene humane Prostata-Adenokarzinom-Zelllinien verwendet: LNCaP Zellen sowie C4-2 und PC3 Zellen. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ (Kohlenstoffdioxid) und einer relativen Luftfeuchte von 97 % im Brutschrank inkubiert. Das Rosewell Park Memorial Institute-Medium 1640 (RPMI-1640) zur Kultivierung enthielt 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 mM GLUTAMAX, 1 mM Natriumpyruvat, 1 % HEPES-Puffer und 1 % NEAA. Die Zellkulturflaschen besaßen einen Luftfilter im Deckel. Alle zwei bis drei Tage wurden subkonfluente Zellkulturen 1:4 (LNCaP), 1:7 (C4-2) oder 1:10 (PC3) gesplittet. Die Arbeitsschritte wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt und benötigte Materialien wurden dafür gereinigt, desinfiziert, sterilisiert und autoklaviert. Zum Ernten der Zellen wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen. Das Ablösen erfolgte durch Zugabe von 2-3 ml Trypsin, welches gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt wurde. Wenn sich die Zellen nach einigen Minuten gelöst hatten, wurde die Proteinaseaktivität durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt. Nach dem Abzentrifugieren (1800 rpm; 4 min) wurde das Zellpellet zunächst mit einer 200 µl-, dann mit einer 1 ml-Pipette resuspendiert, um eine möglichst komplette Vereinzelung der Zellen zu erreichen. Je nach gewünschter Verdünnung wurde anschließend Medium zugegeben und ein Teil der Zellsuspension mit 10-20 ml frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

2.2.1.2.1 Zellzählung mittels Hämozytometer

Nach dem Reinigen des Hämozytometers (Neubauerzählkammer improved) wurde das korrekte Aufliegen des Deckglases durch das Vorhandensein der Newtonschen Interferenzfarben überprüft. Eine Zellsuspension wurde hergestellt und 10 µl davon seitlich auf die Zählkammer pipettiert, so dass die Kapillarkräfte die Suspension in die Kammer saugen konnten. Zunächst wurde am Mikroskop bei geringer Vergrößerung kontrolliert, ob sich die Zellen gleichmäßig verteilt haben. Dann wurden die vier Eckquadranten ausgezählt, wobei jeweils nur die Zellen auf der oberen und der linken Grenzlinie berücksichtigt wurden. Die Zellzahl pro ml wurde anschließend mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

Zellzahl/ml = Mittelwert der Zellzahlen aus den vier Eckquadranten x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante (10^4).

2.2.1.2.2 Zellzählung mittels automatischem Zellzähler

Es wurde der automatische Zellzähler Scepter™2.0 Cell Counter benutzt. Er detektiert Zellen durch die Änderung der Impedanz. Wenn eine Zelle die Messstelle passiert, steigt der Widerstand und durch das Ohm'sche Gesetz auch die Spannung, wodurch jede Zelle eine Spannungsspitze verursacht, welche dann gezählt wird. Eine Zellsuspension wurde hergestellt, wobei die Zellzahl zwischen 10.000 und 500.000 Zellen/ml liegen musste, um ein sicheres Messergebnis zu erzielen. Von dieser Einzelzellsuspension wurden 100 µl in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Gerät wurde eingeschaltet, ein Sensor aufgesetzt, das Druckstück herunter geführt, der Sensor in die Zellsuspension eingeführt und das Druckstück anschließend wieder langsam heraufgelassen, wodurch der Sensor eine 50 µl Probe aufnehmen konnte. Anschließend wurde der Sensor entfernt und das Ergebnis abgelesen.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

2.2.1.3.1 Einfrieren

Die Zellen wurden geerntet und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden sie zentrifugiert (1600 rpm; 6 min). Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 0,75 ml Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend in ein vorgekühltes (-20 °C) Kryo-Röhrchen gegeben. 0,75 ml des Einfriermediums (10 % DMSO/20 % FCS/Zellkulturmedium ohne Antibiotika) wurden zugegeben und nochmals resuspendiert. Dann wurden die Kryo-Röhrchen in eine mit Isopropanol gefüllte Box gestellt und über Nacht im Gefrierschrank (-80 °C) aufbewahrt (Kühlungsrate von 1 °C/min; Reduktion der Wasserkristallbildung). Am nächsten Tag wurden sie in einen Stickstofftank zur langfristigen Aufbewahrung überführt.

2.2.1.3.2 Auftauen

Das Kryo-Röhrchen wurde aus dem Stickstofftank entnommen und zum Auftauen in ein Wasserbad (37 °C) gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurde der Inhalt des Kryo-Röhrchens in ein Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert (1800 rpm; 4 min), resuspendiert, um die toxische Kontamination mit DMSO zu beseitigen und anschließend in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium überführt. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag wurde zeitnah das Medium gewechselt.

2.2.2 Ermittlung der Behandlungskonzentrationen der Medikamente

Für die Medikamente Docetaxel und Dexamethason lagen die Behandlungskonzentrationen und Behandlungsdauern, welche in 50 %-iger Proliferationsinhibition resultieren, aus Versuchen von Hartrampf et al. vor [100]. Um die Behandlungskonzentration für Metformin, Abirateron und Enzalutamid zu finden, wurden die Zellen mit verschiedenen Medikamentenkonzentrationen für 72 h behandelt und Dosis-Wirkungs-Kurven angefertigt (**Abb. 1**). Die Behandlungskonzentrationen für Metformin, Abirateron und Enzalutamid für LNCaP Zellen mit transientem PSMA-knockdown (LNCaP-PSMA kd) stammten aus unpublizierten Daten von Stolzenburg et al. (**Tabelle 2**).

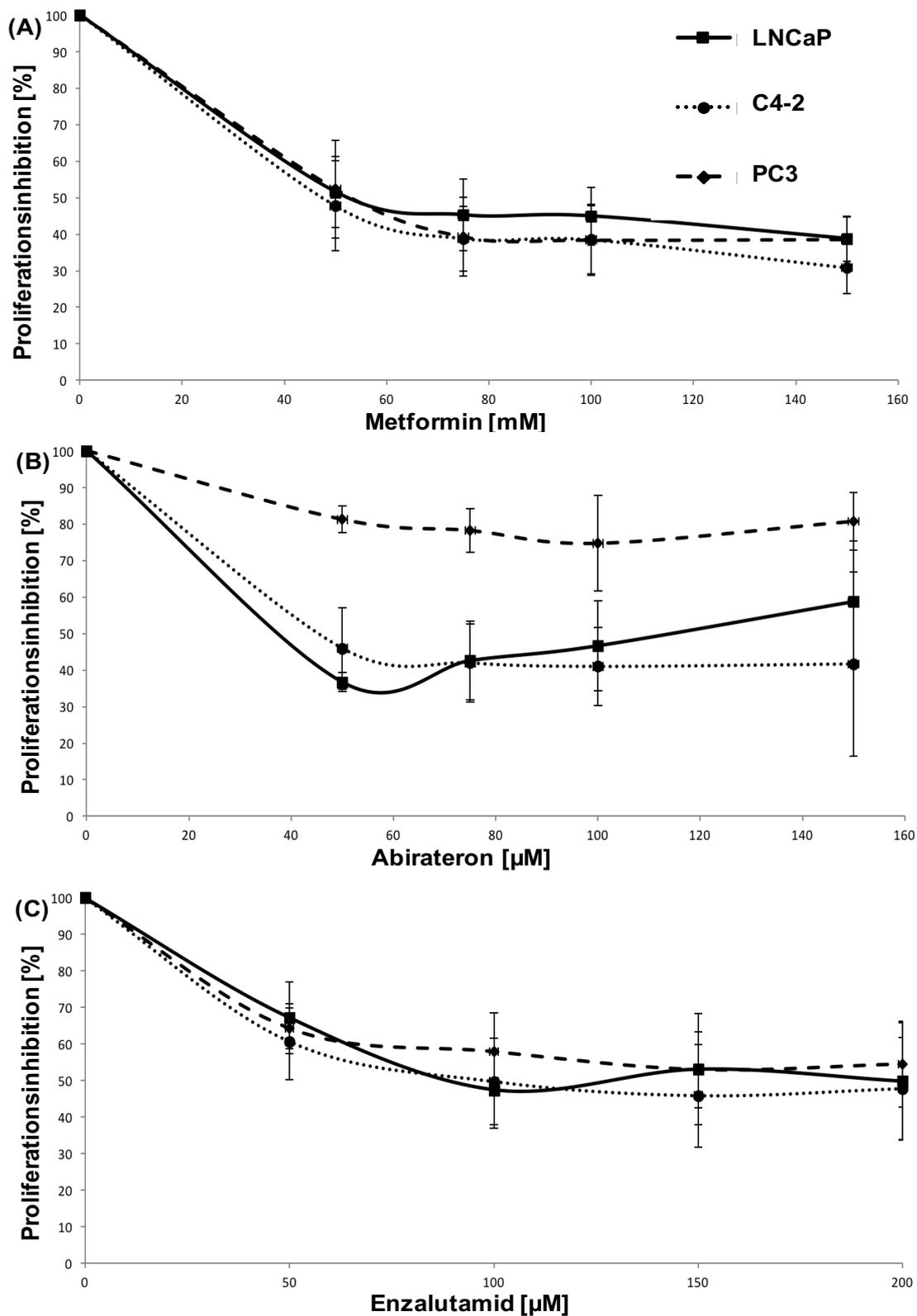


Abb. 1 Behandlungskonzentrationen von Metformin, Abirateron und Enzalutamid. Die Proliferation wurde mittels CFSE-Färbung untersucht. Dargestellt ist der Anteil proliferierender Zellen in Relation zu unbehandelten Zellen in Prozent nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Metformin (A), Abirateron (B) und Enzalutamid (C) \pm Standardabweichung (LNCaP [Metformin: n = 6, Abirateron: n = 7, Enzalutamid n = 6], C4-2 [n = 5], PC-3 [Metformin: n = 5, Abirateron: n = 4, Enzalutamid: n = 4]).

2.2.3 Behandlung der Zellen mit Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid

Um die Zellen zu behandeln, wurden sie geerntet, resuspendiert und gezählt. 1×10^5 Zellen in 500 μ l des Kulturmediums wurden pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, um erneut 500 μ l Kulturmedium mit den entsprechenden Medikamenten für eine Behandlungsdauer von 48 h (Docetaxel, Dexamethason) bzw. 72 h (Metformin, Abirateron, Enzalutamid) zuzugeben. Die verwendeten Behandlungskonzentrationen sind **Tabelle 2** zu entnehmen.

Tabelle 2 Behandlungskonzentrationen der eingesetzten Medikamente. kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.

	LNCaP	LNCaP-PSMA kd	C4-2	PC-3
Docetaxel	15 nM	15 nM	20 nM	30 nM
Dexamethason	100 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M
Metformin	50 mM	23 mM	50 mM	50 mM
Abirateron	50 μ M	25 μ M	40 μ M	100 μ M
Enzalutamid	100 μ M	85 μ M	100 μ M	150 μ M

2.2.4 Transiente Transfektion von LNCaP Zellen

LNCaP Zellen wurden laut Anweisungen des Protokolls „Fast-Forward Transfection of LNCaP cells with siRNA using HiPerFect Transfection Reagent“ (QIAGEN) transient transfiziert. Ziel war eine temporäre Herunterregulation (knockdown [kd]) der PSMA-Expression. Der physisch optimale Zustand der Zellen wurde am Mikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden geerntet, resuspendiert und gezählt. 1×10^5 Zellen pro Vertiefung wurden mit 0,5 ml des Kulturmediums in eine 24-Lochplatte pipettiert. Anschließend wurden pro Vertiefung 110 μ l OPTI-MEM Medium, 0,55 μ l siRNA (Hs_FOLH1_3 [FlexiTube siRNA] bzw. AllStars Negativkontroll- siRNA [zerstückelt und funktionsunfähig]) und 6,6 μ l HiPerFect Transfektionsreagenz angesetzt. Nach Durchmischen wurde der Ansatz für 10 min bei RT zur Bildung der Transfektionskomplexe inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und durch Schwenken verteilt. Die Zellen wurden unter den normalen Kulturbedingungen für mindestens 12 h inkubiert, um in darauffolgenden Versuchen Anwendung zu finden.

2.2.4.1 Überprüfung der transienten Transfektion

Die transiente Herunterregulation der PSMA-Expression wurde durchflusszytometrisch und mittels Immunoblot überprüft. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der AllStars Negativkontroll- siRNA Alexa Fluor 488 dargestellt. Dabei handelte es sich um direkt mit Fluophor gekoppelte siRNA. Anhand der Fluoreszenzintensität konnte durchflusszytometrisch der Anteil der LNCaP Zellen ermittelt werden, welcher die siRNA aufgenommen hatte.

2.2.5 Zelloberflächenfärbung

Zunächst wurden die Zellen geerntet, gezählt, zentrifugiert (2500 rpm; 4 min) und dann jeweils 3 bis 5 x 10⁵ Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl MACS-Puffer resuspendiert. Entsprechend der gewünschten Färbung wurden Antikörper zugegeben und die Proben gemischt. Nach 15-30 min Inkubation bei 4 °C wurden die Proben mit 1 ml MACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Anschließend wurden die Zellpellets mit 250-400 µl MACS-Puffer resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und innerhalb von 2 h am FACS-Gerät gemessen. Dabei wurden mindestens 10.000 Zellen registriert.

2.2.5.1 Fixierung oberflächengefärbter Proben

Falls die gefärbten Proben nicht am gleichen Tag gemessen werden konnten, wurden sie fixiert. Dafür wurde Para-Formaldehyd (-20 °C) bei 70 °C gelöst und im Verhältnis 1:1 zur Zellsuspension gegeben. Die Proben konnten anschließend bei 4 °C bis zur späteren Messung aufbewahrt werden.

2.2.6 Intrazelluläre Färbung

Intrazelluläre Färbungen wurden mit Hilfe des Inside-Stain-Kits von Miltenyi nach Herstellerangaben durchgeführt. Dieses enthält die Bestandteile Inside Fix zur Fixierung der Zellen und Inside Perm zur Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran. Die Zellen wurden geerntet, gezählt und zentrifugiert (2500 rpm; 4 min) und jeweils 3-5 x 10⁵ Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Je nach gewünschter Färbung wurde zunächst mit den Primärantikörpern und anschließend mit den Sekundärantikörpern inkubiert.

Handelte es sich um direkt fluoreszenzgekoppelte Antikörper, entfiel der zweite Inkubationsschritt. Die Zellen wurden mit 250-400 µl MACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Bei der nachfolgenden Auswertung am FACS-Gerät wurden mindestens 10.000 Zellen pro Probe gemessen.

2.2.7 Messung der Zellproliferation mittels CFSE

Carboxyfluorescein diazotate succinimidyl ester (CFDA-SE) wird von lebenden Zellen aufgenommen. Durch endogene Esterasen werden die beiden Acetat-Gruppen abgespalten. Dadurch entsteht CFSE, welcher stark fluoresziert und durch seine geringere Permeabilität die Zelle nicht mehr verlassen kann. Mit jeder Zellteilung wird der entstandene Fluoreszenzgehalt pro Zelle halbiert. Dadurch ist die Fluoreszenzintensität umgekehrt proportional zur Anzahl der Zellteilungen.

Zur Bestimmung der Proliferation wurden die Zellen zunächst geerntet, gezählt und zentrifugiert (1400 rpm; 4 min). Anschließend wurden sie in 5 % FCS/PBS resuspendiert und mit 5 µM CFDA-SE für 3 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 5 % FCS/ PBS wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/1 ml Kulturmedium auf einer 24-Lochplatte ausgesät. Am darauf folgenden Tag konnten die Zellen medikamentös behandelt werden und wurden erneut für 72 h inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, in FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer gewaschen und mit jeweils 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend konnte die CFSE-Fluoreszenz durchflusszytometrisch im FL1- Kanal bestimmt werden.

2.2.8 Nicoletti Assay zur Quantifizierung von Zelltod und Zellzyklusstatus

Zur Analyse und Quantifizierung des Zellzyklusstatus diente der Nicoletti Assay [108]. Dabei interkaliert Propidiumiodid (PI) die zelluläre DNA, wodurch die resultierende Fluoreszenz proportional zum DNA-Gehalt der Zellen ist. Zunächst wurden die Zellen von den Gewebekulturplatten geerntet. Dabei wurden das alte Medium, das PBS zum Waschen und die mit Trypsin gelösten Zellen komplett in ein FACS-Röhrchen überführt, um auch die toten Zellen mit zu erfassen. Unter ständigem Durchmischen wurde 1 ml eisgekühlter 70 %-iger Ethanol tröpfchenweise zu jeder Probe gegeben. Die Zellen wurden mindestens für 12 h

bei 4 °C inkubiert. Für die Färbung wurden die FACS-Röhrchen mit 38 nM Na-Citrat Puffer (pH = 7,4) aufgefüllt, zentrifugiert (1400 rpm; 4 min) und der Überstand abgenommen. Als Färbelösung wurden 50 µg/ml PI und 10 µg/ml RNaseA in 38 mM Na-Citrat Puffer angesetzt. Nachdem die Zellpellets mit jeweils 200 µl der Färbelösung resuspendiert wurden, erfolgte eine Inkubation für 20 min im Dunkeln. Die Auswertung durch das FACS-Gerät geschah quantitativ im FL-2 Kanal unter Nutzung des doublet discrimination module. Dabei wurde ein Gate so gewählt, dass ein Punktdiagramm im FL2-A/FL2-W Kanal in einem FL2-A Histogramm visualisiert werden konnte („banana gating“).

2.2.9 Proteinbiochemische Methode

2.2.9.1 Herstellung der Gele

In der Vorbereitung wurden zunächst die benötigten Trenn- und Sammelgele mit folgenden Bestandteilen hergestellt:

Trenngel (10 %) 10 ml:

- 4 ml H₂O
- 3,3 ml 30 % Acrylamid Mix
- 2,5 ml 1.5M TRIS Puffer (pH = 8,8)
- 0,1 ml 10 % SDS
- 0,1 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0,004 ml TEMED

Sammelgel 2 ml:

- 1,4 ml H₂O
- 0,33 ml 30 % Acrylamid Mix
- 0,25 ml 1.0M TRIS Puffer (pH = 6,8)
- 0,02 ml 10 % SDS
- 0,02 ml 10 % Ammoniumpersulfat
- 0,001 ml TEMED

Die einzelnen Komponenten wurden in ein 15 ml-Reaktionsgefäß gegeben und zunächst das Trenngel mit einer Einmalpipette in den Gelständer gefüllt. Eine Überschichtung mit Isopropanol diente als Schutz gegen Austrocknung und eventuelle Lufteinschlüsse und sorgte für eine glatte Oberkante des Gels. Nach ca. 30 min war das Trenngel verfestigt und konnte mit Wasser überspült werden, um das Isopropanol zu entfernen, bevor das Sammelgel mit einem entsprechenden Kamm für die Proteintaschen aufgegeben wurde. Auch dieses verfestigte sich in 30 min und konnte so weiterverwendet oder bei 4 °C feucht im Kühlschrank gelagert werden.

2.2.9.2 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung der Proteinlysate wurden die Zellen zuerst aus den Lochplatten geerntet oder $3 - 5 \times 10^5$ Zellen aus einer Kulturflasche als Zellsuspension aufbereitet. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (2500 rpm; 4 min). Nach Abnehmen des Überstands wurde zweimal mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 30 - 50 µl (entsprechend der Größe) RIPA-Puffer resuspendiert. Weiterhin wurden die Proben 1 h auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (13.000 rpm; 4 min; 4 °C). Der Überstand konnte nun als Proteinlysate weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren werden.

2.2.9.3 Bestimmung der Proteinmenge

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den Lysaten wurde mit dem BCA Protein Assay-Kit (Novagen) gearbeitet und dabei dem Micro Scale Assay-Protokoll gefolgt. Es enthält folgende Bestandteile: BCA-Flüssigkeit (Bichinoninsäure, Natriumcarbonat, Natriumtartrat, Natriumbicarbonat), Kupfersulfat 4 % und eine Lösung zur Herstellung eines BSA-Standards (2 mg/ml). Zunächst wurde eine Standardverdünnungsreihe (0-25-125-250-500-1000 µg/ml) mit deionisiertem Wasser angefertigt. Jedes Lysat wurde 1:60 – 1:100 je nach Menge der Zellen und zu erwartender Höhe der Proteinkonzentration verdünnt. 25 µl von jeder Probe und von jeder Standardverdünnung wurden als Duplikat in eine 96-Lochplatte pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl BCA-Arbeitslösung (200 µl BCA-Lösung + 4 µl Kupfersulfat) wurde für 30 s mit dem Schüttler durchgemischt. Anschließend folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C im Brutschrank.

Gemessen wurde die Fluoreszenz bei der Wellenlänge 562 nm am Mikroplatten-Lesegerät, nachdem die Proben auf RT abgekühlt waren. Mit Hilfe der Standardgeraden konnten nun die einzelnen Proteinkonzentrationen errechnet werden.

2.2.9.4 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS PAGE wurde verwendet, um eine größenabhängige Auftrennung der Proteine zu erreichen. Dafür wurden die Proteinlysate zunächst schonend auf Eis aufgetaut und 25 µg des Lysats mit 2 x Lämmli Puffer auf 20 µl aufgefüllt. Nach kurzem Zentrifugieren (2500 rpm; 5 s) wurden die Proteine durch fünfminütiges Kochen bei 95 °C im Thermoschüttler denaturiert. Anschließend wurde erneut kurz zentrifugiert (2500 rpm; 5 s) und die Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer vorbereitet. Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt und die Taschen wurden mit der Hamiltonpipette gespült. In die beiden äußeren Taschen wurden 10 µl Proteinleiter gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 90 V gestartet. Wenn die Laufmittelfront die Grenze zum Trenngel erreicht hatte, wurde für ca. 2 h auf 140 V erhöht, bis eine ausreichende Auftrennung der Proteine erreicht war.

2.2.9.5 Immunoblot

Die folgenden Arbeitsschritte wurden alle mit befeuchteten Materialien durchgeführt. Zum Transfer der Proteine auf eine Membran wurden die benötigten Bestandteile einzeln in folgender Reihenfolge zu einem Stapel zusammengefügt: Schwamm – Blotting-Papier – Nitrozellulosemembran – SDS-Gel – Blotting-Papier – Schwamm. Der Stapel wurde in den Transfertank überführt und die Proteine mit 80 V, unter ständiger Kühlung durch Kühlakku und unter ständiger Durchmischung mit Hilfe eines Rührfischs für 1 h transferiert. Um den Proteintransfer und die gleichmäßige Ladung zu überprüfen, wurde die Membran anschließend mit Wasser gespült, mit Ponceau-S angefärbt und mit der Kamera dokumentiert. Nach Entfärben der Membran durch TBS-T (0,1 %) wurde mit 5 %-Milch in TBS-T in einem 50 ml-Reaktionsgefäß auf dem Taumelrollmischer bei RT für 1 h inkubiert. Dadurch wurden die freien Stellen für eine Proteinbindung blockiert, bevor der Primärantikörper (Maus-anti-Mensch PSMA [1:1500] bzw. Maus-anti-Mensch/Ratte/Kaninchen Tubulin [1:1000]) in

5 %-Milch in TBS-T zugegeben wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelrollmischer wurde dreimal 5 min mit 10 ml TBS-T gewaschen. Anschließend wurde für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper ([HRP; 1:3000) in 5 %-Milch in TBS-T inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit TBS-T für 5 min wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min in ECL-Lösung eingelegt, um die HRP-vermittelte Chemolumineszenz zu detektieren. Nun konnte der Immunoblot in der Dunkelkammer an der Entwicklermaschine entwickelt werden.

2.2.10 Statistische Auswertung

Mit Hilfe von Microsoft Excel (Version 15.21.1) wurde die statistische Auswertung durchgeführt. Im Ergebnisteil werden quantitative Werte entweder als Median mit den entsprechenden höchsten und niedrigsten Messwerten oder als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, als Maß für den Umfang des Messbereichs. Mit Hilfe des Mann-Whitney-U Tests wurden die Messwerte und die sich daraus ergebenden statistischen Werte zueinander in Beziehung gesetzt. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0.05 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Zelllinien

Für die Zellkultur-Experimente wurden, um Heterogenität und verschiedene Stadien des Prostatakarzinoms abzubilden, Prostatakarzinomzelllinien ausgewählt, welche sich u.a. in ihren histologischen Eigenschaften, ihrer Herkunft, der PSMA-Expression, der Menge sezernierten PSAs, der AR-Expression, der Abhängigkeit ihres Wachstums von Androgenen und ihrer biologischen Aggressivität unterschieden (**Tabelle 3**). Das isogene System, bestehend aus LNCaP-PSMA kd Zellen und parentalen LNCaP Zellen, sollte zudem Unterschiede in den Experimenten verdeutlichen, welche ausschließlich durch unterschiedliche PSMA-Expression bedingt waren.

Tabelle 3 Charakteristika der Zelllinien LNCaP, LNCaP-PSMA kd, C4-2 und PC-3. AR = Androgenrezeptor; kd = knockdown; PSA = Prostataspezifisches Antigen; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; ? = bisher nicht untersucht; + = vorhanden/ Expression vorhanden; - = nicht vorhanden/ keine Expression; (-) = PSMA-Expression deutlich vermindert.

	LNCaP	LNCaP-PSMA kd	C4-2	PC-3
Typ des Karzinoms	Adenokarzinom [109]	Adenokarzinom	Adenokarzinom	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom [109]
Herkunft	Lymphknoten-metastase [110]	Lymphknoten-metastase	Sub-Zelllinie von LNCaP [111]	Knochenmetastase [112]
PSMA-Expression	+ [58]	(-)	+ [113]	- [58]
PSA	+ [114]	?	+ [111]	- [114]
AR	+ [110, 114]	+	+ (weniger als LNCaP) [111]	- [112, 114]
androgenabhängiges Wachstum	+ [110]	?	- [111]	- [112]
biologische Aggressivität	niedrig [111]	?	mittel [111]	hoch [112]

LNCaP Zellen wurden 1977 aus einer Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen, kaukasischen Mannes mit androgensensitivem Adenokarzinom der Prostata gewonnen. Sie exprimieren PSMA und PSA, weisen eine vergleichsweise niedrige biologische Aggressivität auf und neigen nicht zur Bildung von Skelettmetastasen.

LNCaP-PSMA kd Zellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgehend von LNCaP Zellen in vitro etabliert. Sie exprimieren den AR und eine Restmenge

PSMA. Biologische Aggressivität, Metastasierungsverhalten und PSA-Expression wurden in diesen Zellen noch nicht untersucht.

Bei der C4-2 Zelllinie handelt es sich um eine androgenunabhängige Sublinie von LNCaP. Sie entstand durch Koinjektion von LNCaP- und menschlichen Knochenstromazellen in immunkomprimierte Mäuse, die kastriert waren. Trotz des androgenunabhängigen Wachstums wird der AR exprimiert, ebenso wie PSMA und PSA. C4-2 Zellen bilden im Gegensatz zu LNCaP Zellen Knochenmetastasen und weisen eine höhere biologische Aggressivität auf.

PC-3 Zellen haben eine hohe biologische Aggressivität und ein hohes Metastasierungspotential. Die Zellen wurden 1979 aus einer Knochenmetastase eines 69-jährigen Mannes mit einem Prostatakarzinom Grad 4 gewonnen und repräsentieren somit eine höhergradige Tumorbiologie. Sie exprimieren weder PSMA, PSA noch den AR.

3.2 Einfluss der PSMA-Expression auf die Docetaxel-Sensitivität

3.2.1 Etablierung eines transienten PSMA kd in LNCaP Zellen

Um den Einfluss der PSMA-Expression auf zelluläre Signalwege gezielt zu untersuchen, wurde zunächst ein transienter, siRNA-vermittelter PSMA kd etabliert.

3.2.1.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz

Die Effizienz der Transfektion wurde mit Hilfe einer Alexa Fluor 488- gekoppelten Kontroll-siRNA durchflusszytometrisch überprüft. In Zellen, welche siRNA aufgenommen hatten, war Fluoreszenz nachweisbar. Darauf basierend, betrug die Transfektionseffizienz > 90 % (**Abb. 2**)

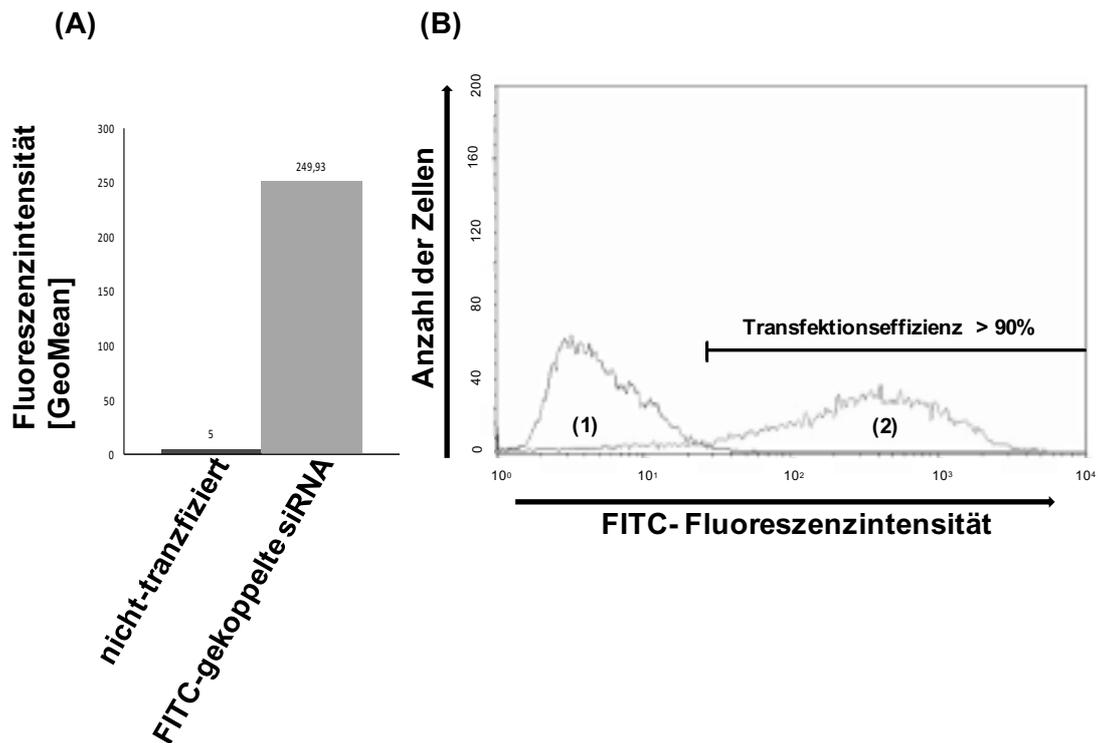


Abb. 2 Überprüfung der Transfektionseffizienz. LNCaP Zellen wurden mit Alexa Fluor 488-gekoppelter Kontroll-siRNA transfiziert. **(A)** Die Abbildung zeigt die fast 50-fach höhere Fluoreszenzintensität der transfizierten Zellen gegenüber den nicht-transfizierten LNCaP-Kontrollzellen ($n = 1$). **(B)** Dargestellt sind Histogramme von nicht-transfizierten Zellen (1) und Zellen, welche mit FITC-gekoppelter siRNA transfiziert wurden (2). Die Transfektionseffizienz betrug über 90 % ($n = 1$). FITC = Fluoresceinisothiocyanat; siRNA = small interfering RNA.

3.2.1.2 Kontrolle des transienten kd

Zur Kontrolle der transienten Herunterregulation wurde die PSMA-Oberflächenexpression nach der Transfektion mittels Western Blot (**Abb. 3A**) und durchflusszytometrisch (**Abb. 3B**) bestimmt. Mit beiden Methoden konnte eine um > 50 % verringerte PSMA-Oberflächenexpression der transfizierten LNCaP Zellen nachgewiesen werden.

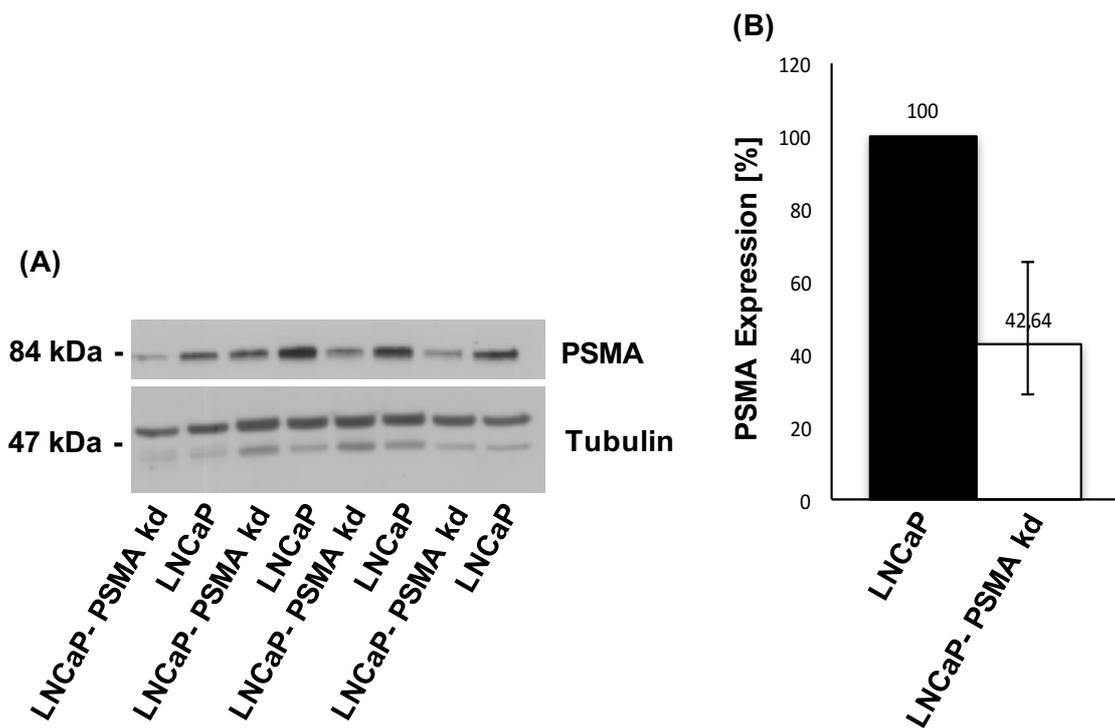


Abb. 3 Kontrolle des transienten kd. (A) Dargestellt sind nebeneinander jeweils zugehörige Versuchspaare bestehend aus LNCaP-PSMA kd und LNCaP Zellen, welche mit funktionsunfähiger Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Es zeigte sich die deutlich geringere Menge des PSMA-Proteins in den transfizierten Zellen. Tubulin diente dem Proteinnengenabgleich (dargestellt sind 4 von 6 Versuchspaaren). (B) Gezeigt ist die durchflusszytometrisch quantifizierte Verringerung der PSMA-Expression in LNCaP-PSMA kd Zellen in Prozent der ursprünglichen Expression als Median mit dem Wertebereich der Versuchswerte ($p < 0,02$; $n = 18$). kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.

3.2.2 Bestimmung der PSMA-Expression auf der Zelloberfläche

Um den Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA und der Sensitivität gegenüber Docetaxel zu untersuchen, wurde die PSMA-Oberflächenexpression der Zelllinien durchflusszytometrisch quantifiziert. In Übereinstimmung mit der Literatur war bei PC-3 Zellen keine PSMA-Oberflächenexpression nachweisbar (Median 0,24 [Wertebereich 0 – 1,47]) [58]. PC-3 Zellen können somit bezüglich der PSMA-Oberflächenexpression als Negativkontrolle betrachtet werden. LNCaP Zellen zeigten ein höheres Expressionsniveau im Vergleich zu LNCaP-PSMA kd und C4-2 Zellen (LNCaP; Median 65,9 [Wertebereich 37,91 – 84,81] vs. LNCaP-PSMA kd; Median 26,94 [Wertebereich 19,76 – 50,7]; $p < 0,02$ vs. C4-2; Median 39,33 [Wertebereich 59,51 – 23,2]; $p < 0,02$). Die PSMA-Expression in C4-2 Zellen war zudem deutlich höher als die in LNCaP-PSMA kd Zellen ($p < 0,05$; **Abb. 4**).

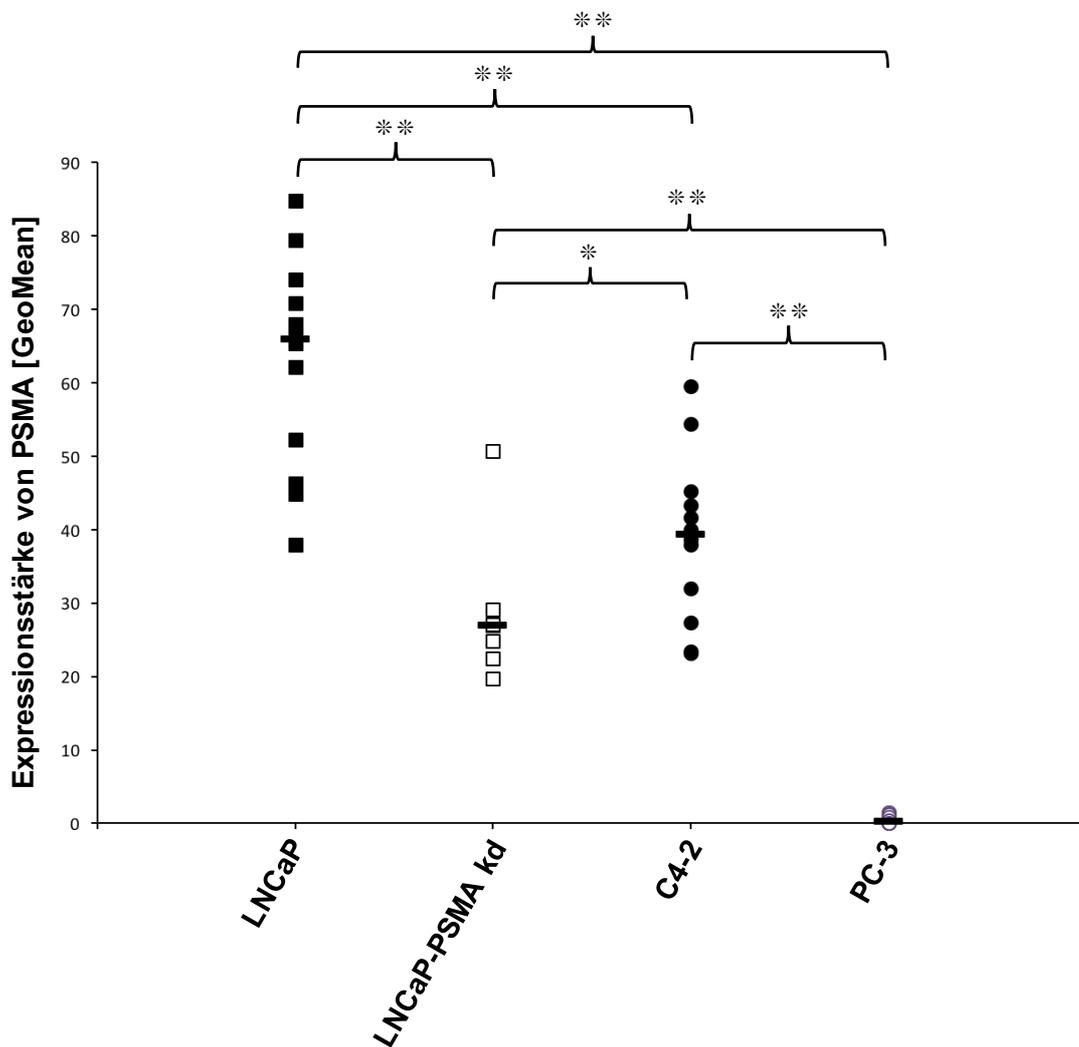


Abb. 4 PSMA Oberflächenexpression von LNCaP, LNCaP-PSMA kd, C4-2 und PC-3 Zellen. Die PSMA-Expression auf der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch mittels eines FITC-gekoppelten anti-PSMA Antikörpers quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (LNCaP [n = 12], LNCaP-PSMA kd [n = 8], C4-2 [n = 12], PC-3 [n = 15]; *p < 0,05, **p < 0,02). kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.

3.2.3 Bestimmung der Menge von phosphoryliertem Akt, ERK1/2 und p38

Um den Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA, der Sensitivität gegenüber Docetaxel und der Phosphorylierung von Akt, ERK 1/2 und p38 zu untersuchen, wurde das jeweilige Niveau aktivierter Proteinkinasen in den verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien durchflusszytometrisch quantifiziert.

Akt wies unter den untersuchten Proteinkinasen die höchste Aktivierung auf. Im Vergleich der verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien zeigte sich wiederum die höchste Akt-Aktivierung in den LNCaP-PSMA kd Zellen (Median 74,08 [Wertebereich 57,22 – 86,61]), welche gering über der von LNCaP Zellen (Median 66,44 [Wertebereich 27,47 – 103,02]; $p =$ nicht signifikant [n.s.]) und deutlich über der von C4-2 Zellen (Median 48,75 [Wertebereich 39,83 – 52,79]; $p < 0,02$) und PC-3 Zellen (Median 29,41 [Wertebereich 11,69 – 56,35]; $p < 0,02$) lag. Außerdem war die Akt-Aktivierung in LNCaP Zellen im Vergleich zu PC-3 Zellen mehr als doppelt so hoch ($p < 0,02$; **Abb. 5A**).

ERK1/2 zeigte in allen Zelllinien die geringste Aktivierung unter den untersuchten Proteinkinasen. Das P-ERK1/2-Niveau war in allen Zelllinien ähnlich. Die höchste Expression zeigten LNCaP-PSMA kd Zellen (Median 5,06 [Wertebereich 4,78 – 8,87]) gefolgt von PC-3 Zellen (Median 4,52 [Wertebereich 3,23 – 7,73]) und LNCaP Zellen. C4-2 Zellen (Median 4,25 [Wertebereich 2,92 – 4,58]) wiesen die geringste ERK1/2-Aktivierung auf **Abb. 5B**).

LNCaP-PSMA kd Zellen (Median 16,62 [Wertebereich 16,08 – 18,81]) wiesen eine tendenziell höhere Aktivierung von p38 auf als LNCaP Zellen (Median 11,54 [Wertebereich 7,28 – 20,05]; $p =$ n.s.). In C4-2- (Median 7,8 [Wertebereich 6,66 – 7,98]; $p < 0,02$) und PC-3 Zellen (Median 7,92 [Wertebereich 6,15 – 13,1]; $p < 0,05$) konnte gegenüber LNCaP Zellen eine gering verminderte Phosphorylierung von p38 beobachtet werden. Die p38-Aktivierung in LNCaP-PSMA kd Zellen war zudem mehr als doppelt so hoch wie in C4-2- und PC-3 Zellen ($p < 0,02$; **Abb. 5C**).

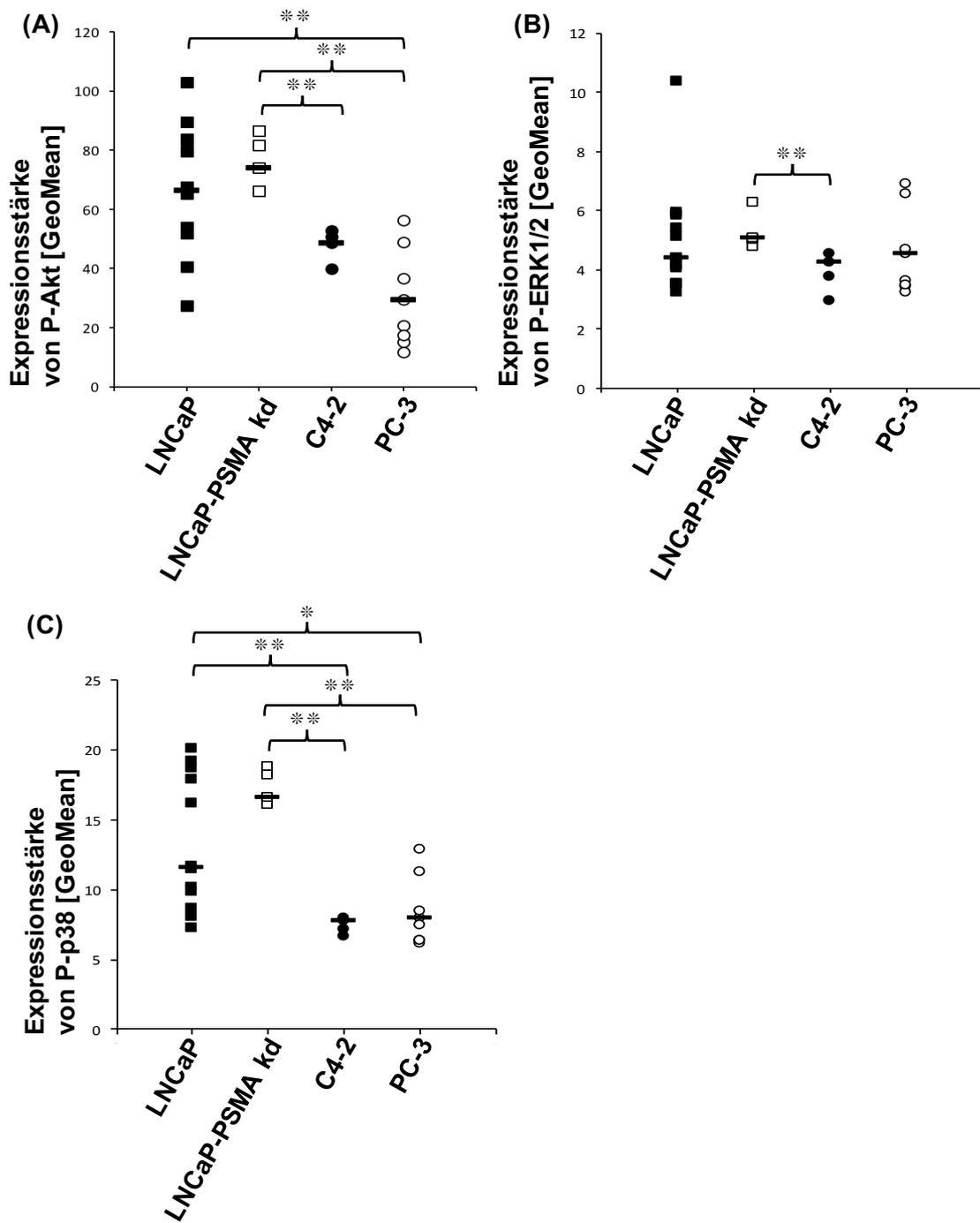


Abb. 5 Expression von P-Akt, P-ERK1/2 und P-p38. Die Expression wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median. (A) Expressionsniveau von P-Akt (LNCaP [n = 12], LNCaP-PSMA kd [n = 5], C4-2 [n = 5], PC-3 [n = 9]; **p < 0,02). (B) Expressionsniveau von P-ERK1/2 (LNCaP [n = 12], LNCaP-PSMA kd [n = 5], C4-2 [n = 5], PC-3 [n = 9]; **p < 0,02). (C) Expressionsniveau von P-p38 (LNCaP [n = 12], LNCaP-PSMA kd [n = 5], C4-2 [n = 5], PC-3 [n = 9]; *p < 0,05, **p < 0,02). kd = knockdown; P-Akt = Phospho-Proteinkinase B; P-ERK1/2 = Phospho-Extracellulär signal-regulierte Kinase 1 und 2; P-p38 = Phospho-p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; PSMA = Prostata-spezifisches Membranantigen.

3.2.4 Einfluss der Expression von PSMA auf die Expression von AR und CXCR4

Um den Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA, der Sensitivität gegenüber Docetaxel und der Expression von AR und CXCR4 zu untersuchen, wurde die AR- und CXCR4-Expression in den verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien durchflusszytometrisch quantifiziert. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression.

Das mediane Expressionsniveau des AR lag bei 29,44 (Wertebereich 13,65 – 34,89) in LNCaP, bei 32,33 (Wertebereich 28,45 – 37,12) in LNCaP-PSMA kd und bei 22,7 (Wertebereich 19,24 – 40,47) in C4-2 Zellen. PC-3 Zellen exprimierten in Übereinstimmung mit der Literatur kein AR (Median 1,32 [Wertebereich -0,01 – 3,42]; **Abb. 6A**) [58].

Das mediane Expressionsniveau von CXCR4 lag bei 459,97 (Wertebereich 374,38 – 509,63) in LNCaP, bei 415,76 (Wertebereich 390,22 – 529,95) in LNCaP-PSMA kd, bei 460,53 (Wertebereich 285,08 – 620,89) in C4-2 und bei 364,81 (Wertebereich 189,67 – 455,93) in PC-3 Zellen (**Abb. 6B**).

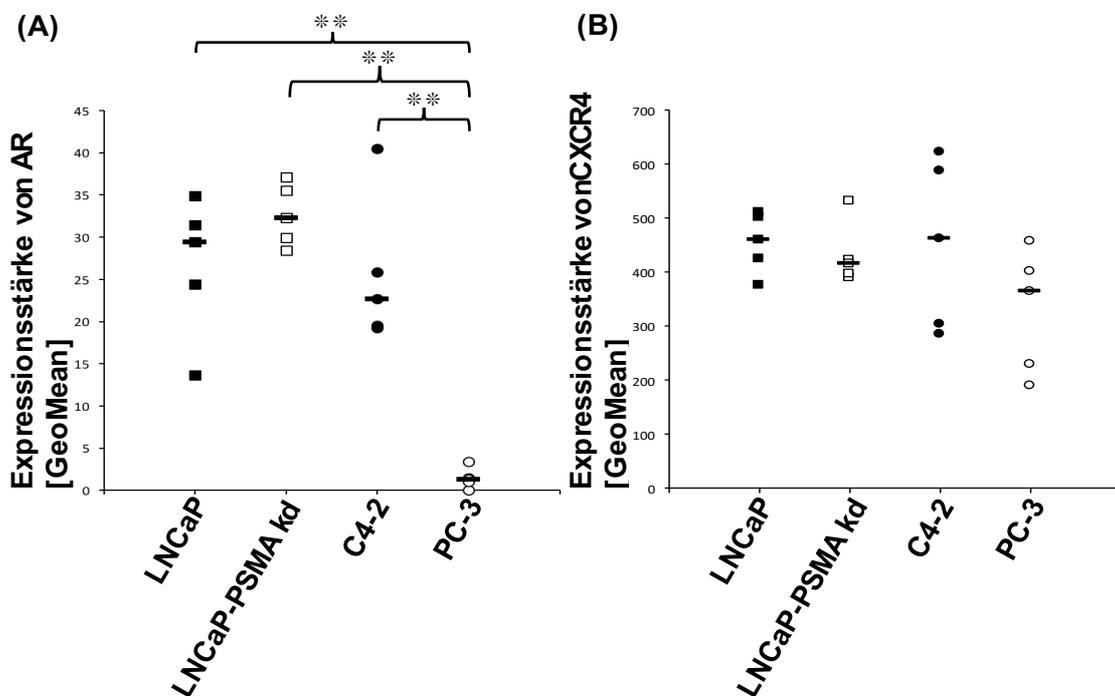


Abb. 6 Intrazelluläre Expression von AR und CXCR4. Die Expression des AR (A) und von CXCR4 (B) wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (n = 5; **p < 0,02). AR = Androgenrezeptor; CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.

3.2.5 Einfluss des PSMA kd auf das Proliferationsverhalten von LNCaP Zellen

Um den Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA, der Sensitivität gegenüber Docetaxel und dem Proliferationsverhalten zu untersuchen, wurden Zellzyklusprofile analysiert. Dabei ergaben sich jeweils vergleichbare Anteile von LNCaP- und LNCaP-PSMA kd Zellen in der G1, S und G2/M-Phase (**Abb. 7**).

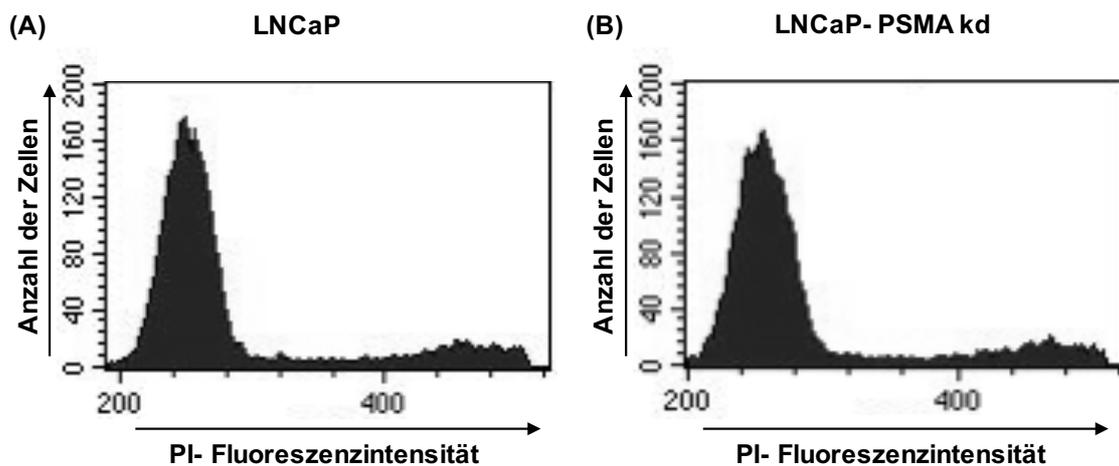


Abb. 7 Vergleich der Zellzyklusprofile von LNCaP und LNCaP-PSMA kd. Der Zellzyklusstatus wurde durchflusszytometrisch mittels Nicoletti Assay quantifiziert, bei welchem die PI-Fluoreszenzintensität proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. (A) Dargestellt ist das Zellzyklusprofil von LNCaP Zellen. (B) Dargestellt ist das Zellzyklusprofil von LNCaP-PSMA kd Zellen (dargestellt ist 1 von n = 5 Versuchspaaren). kd = knockdown; PI = Propidiumiodid; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.

3.3 Einfluss systemischer Medikamente auf die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2

Bei PSMA, CXCR4 und SSTR2 handelt es sich um innovative Angriffsziele nuklearmedizinischer theranostischer Verfahren. Das Ausmaß ihrer Expression auf der Oberfläche der Prostatakarzinomzellen beeinflusst möglicherweise die Ergebnisse der Diagnostik und den Erfolg der Therapie. Gleichzeitig erhalten viele Prostatakarzinompatienten als Bestandteil ihrer systemischen medikamentösen Therapie u.a. Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid. Es ist somit interessant zu wissen, welchen Einfluss die Medikamentenbehandlung auf die Expression der nuklearmedizinischen Angriffspunkte hat.

Die Medikamentenbehandlung führte generell bei allen Zelllinien zu einer Expressionsmodulation von PSMA, CXCR4 und SSTR2. Die SSTR2-Expression in den unbehandelten und die SSTR2-Expressionsmodulation in den mit Docetaxel und Dexamethason behandelten Zellen war jedoch so gering, dass auf weitere Untersuchungen mit den Medikamenten Metformin, Abirateron und Enzalutamid verzichtet wurde (**Abb. 10**). Zudem wurde hier auf die Untersuchung der PSMA-Expression von PC-3 Zellen verzichtet, da sie kein PSMA exprimieren (**Abb. 4**). Die unpublizierten Daten bezüglich der Expressionsmodulation von PSMA und CXCR4 bei LNCaP-PSMA kd Zellen nach Metformin-, Abirateron- und Enzalutamid-Behandlung wurden freundlicherweise von Stolzenburg et al. zur Verfügung gestellt und sind nicht im Rahmen dieser Arbeit entstanden (**Abb. 11**). Durch den engen thematischen Zusammenhang werden sie jedoch in der vorliegenden Arbeit mitdiskutiert.

3.3.1 Docetaxel

Durch Docetaxel wurde die Expression der Oberflächenrezeptoren in allen Zelllinien heraufreguliert. In behandelten LNCaP Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen allenfalls gering (1,2-fach; $p = \text{n.s.}$) heraufreguliert (**Abb. 8**). Die Docetaxel-Behandlung von LNCaP Zellen führte dagegen zu einer deutlichen (1,67-fach; $p < 0,02$) Heraufregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten LNCaP-PSMA kd Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen 1,04-fach ($p = \text{n.s.}$) heraufreguliert und somit nahezu unverändert (**Abb. 8**). Die Docetaxel-Behandlung von LNCaP-PSMA kd Zellen führte zudem zu einer allenfalls geringen (1,3-fach; $p = \text{n.s.}$) Heraufregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten C4-2 Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen signifikant 2,05-fach ($p < 0,02$) heraufreguliert und somit ca. verdoppelt (**Abb. 8**). Die Docetaxel-Behandlung von C4-2 Zellen führte weiterhin zu einer 2,98-fachen ($p < 0,02$) Heraufregulation und somit ca. zur Verdreifachung der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten PC-3 Zellen war die CXCR4-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen gering (1,36-fach; $p = \text{n.s.}$) heraufreguliert (**Abb. 9**).

3.3.2 Dexamethason

Durch Dexamethason wurde die Expression der Oberflächenrezeptoren in allen Zellen herunterreguliert. In behandelten LNCaP Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen allenfalls gering (0,9-fach; $p = \text{n.s.}$) herunterreguliert (**Abb. 8**). Die Dexamethason-Behandlung von LNCaP Zellen führte zu einer geringen (0,76-fach; $p < 0,05$) Herunterregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten LNCaP-PSMA kd Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen allenfalls gering (0,91-fach; $p = \text{n.s.}$) herunterreguliert (**Abb. 8**). Die Dexamethason-Behandlung von LNCaP-PSMA kd Zellen führte außerdem zu einer Herunterregulation (0,55-fach; $p < 0,02$) auf ca. die Hälfte der ursprünglichen CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten C4-2 Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen allenfalls gering (0,93-fach; $p = \text{n.s.}$) herunterreguliert (**Abb. 8**). Die Dexamethason-Behandlung von C4-2 Zellen führte weiterhin zu einer geringen (0,91-fach; $p < 0,02$) Herunterregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten PC-3 Zellen war die CXCR4-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen gering (0,81-fach; $p = \text{n.s.}$) herunterreguliert (**Abb. 9**).

3.3.3 Metformin

In behandelten LNCaP Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen gering (0,84-fach; $p = \text{n.s.}$) herunterreguliert (**Abb. 8**). Zudem führte die Metformin-Behandlung von LNCaP Zellen zu einer mäßigen (1,41-fach; $p < 0,02$), Heraufregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten LNCaP-PSMA kd Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen deutlich (0,25-fach; $p < 0,02$) herunterreguliert (**Abb. 11**). Zudem führte die Metformin-Behandlung von LNCaP-PSMA kd Zellen zu einer deutlichen (2,03-fach; $p < 0,02$) Heraufregulation und somit ca. zur Verdopplung der CXCR4-Expression (**Abb. 11**).

In behandelten C4-2 Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen gering (0,68-fach; $p = \text{n.s.}$) herunterreguliert (**Abb. 8**).

Die Metformin-Behandlung von C4-2 Zellen führte außerdem zu einer geringen (1,33-fach; $p < 0,05$) Heraufregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten PC-3 Zellen war die CXCR4-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen auf ca. die Hälfte des ursprünglichen Niveaus (0,5-fach; $p < 0,02$) herunterreguliert (**Abb. 9**).

3.3.4 Abirateron

In behandelten LNCaP Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen gering (1,21-fach; $p < 0,02$) heraufreguliert (**Abb. 8**). Zudem führte die Abirateron-Behandlung von LNCaP Zellen zu einer mäßigen (1,42-fach; $p < 0,02$) Heraufregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten LNCaP-PSMA kd Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen gering (1,17-fach; $p = \text{n.s.}$) heraufreguliert (**Abb. 11**). Die Abirateron-Behandlung von LNCaP-PSMA kd Zellen führte außerdem zu einer deutlichen (2,22-fach; $p < 0,05$) Heraufregulation und somit zu mehr als einer Verdopplung der CXCR4-Expression (**Abb. 11**).

In behandelten C4-2 Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen gering (1,23-fach; $p < 0,02$) heraufreguliert (**Abb. 8**). Die Abirateron-Behandlung von C4-2 Zellen führte weiterhin zu einer deutlichen (1,74-fach; $p < 0,02$) Heraufregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten PC-3 Zellen war die CXCR4-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen deutlich (13,46-fach; $p < 0,02$) heraufreguliert (**Abb. 9**).

3.3.5 Enzalutamid

In behandelten LNCaP Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen tendenziell (0,54-fach; $p = \text{n.s.}$) herunterreguliert (**Abb. 8**). Zudem führte die Enzalutamid-Behandlung von LNCaP Zellen zu einer allenfalls geringen (0,96-fach; $p = \text{n.s.}$) Herunterregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten LNCaP-PSMA kd Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen allenfalls gering (1,11-fach; $p = \text{n.s.}$) heraufreguliert (**Abb. 11**). Die Enzalutamid-Behandlung von LNCaP-PSMA kd

Zellen führte ca. zur Verdopplung (1,98-fach; $p < 0,05$) der CXCR4-Expression (**Abb. 11**).

In behandelten C4-2 Zellen war die PSMA-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen deutlich (0,36-fach; $p = \text{n.s.}$) herunterreguliert (**Abb. 8**). Die Enzalutamid-Behandlung von C4-2 Zellen führte weiterhin zu einer mäßigen (0,6-fach; $p = \text{n.s.}$) Herunterregulation der CXCR4-Expression (**Abb. 9**).

In behandelten PC-3 Zellen war die CXCR4-Expression im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen mäßig (1,41-fach; $p = \text{n.s.}$) heraufreguliert (**Abb. 9**).

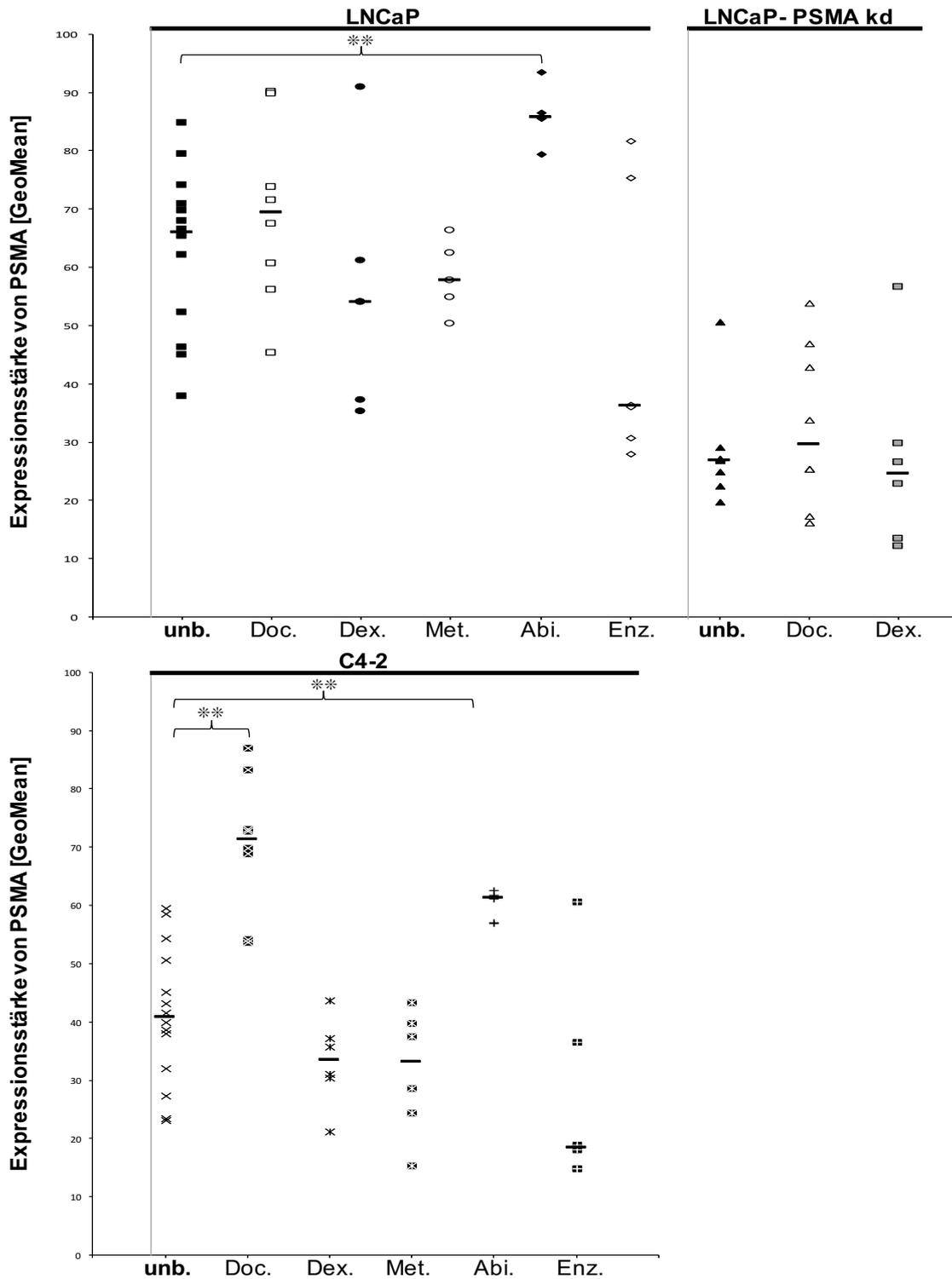


Abb. 8 Modulation der PSMA-Expression durch Medikamentenbehandlung. Die Zellen wurden mit Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid behandelt. Anschließend wurde die PSMA-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines FITC-gekoppelten anti-PSMA Antikörpers quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (oben: LNCaP [unbehandelt: n = 14, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 5, Abirateron: n = 5, Enzalutamid: n = 6], LNCaP-PSMA kd [unbehandelt: n = 8, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6]; unten: C4-2 [unbehandelt: n = 14, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 6, Abirateron: n = 6, Enzalutamid: n = 6]; **p < 0,02). Abi. = Abirateron; Dex. = Dexamethason; Doc. = Docetaxel; Enz. = Enzalutamid; kd = knockdown; Met. = Metformin; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; unb. = unbehandelt.

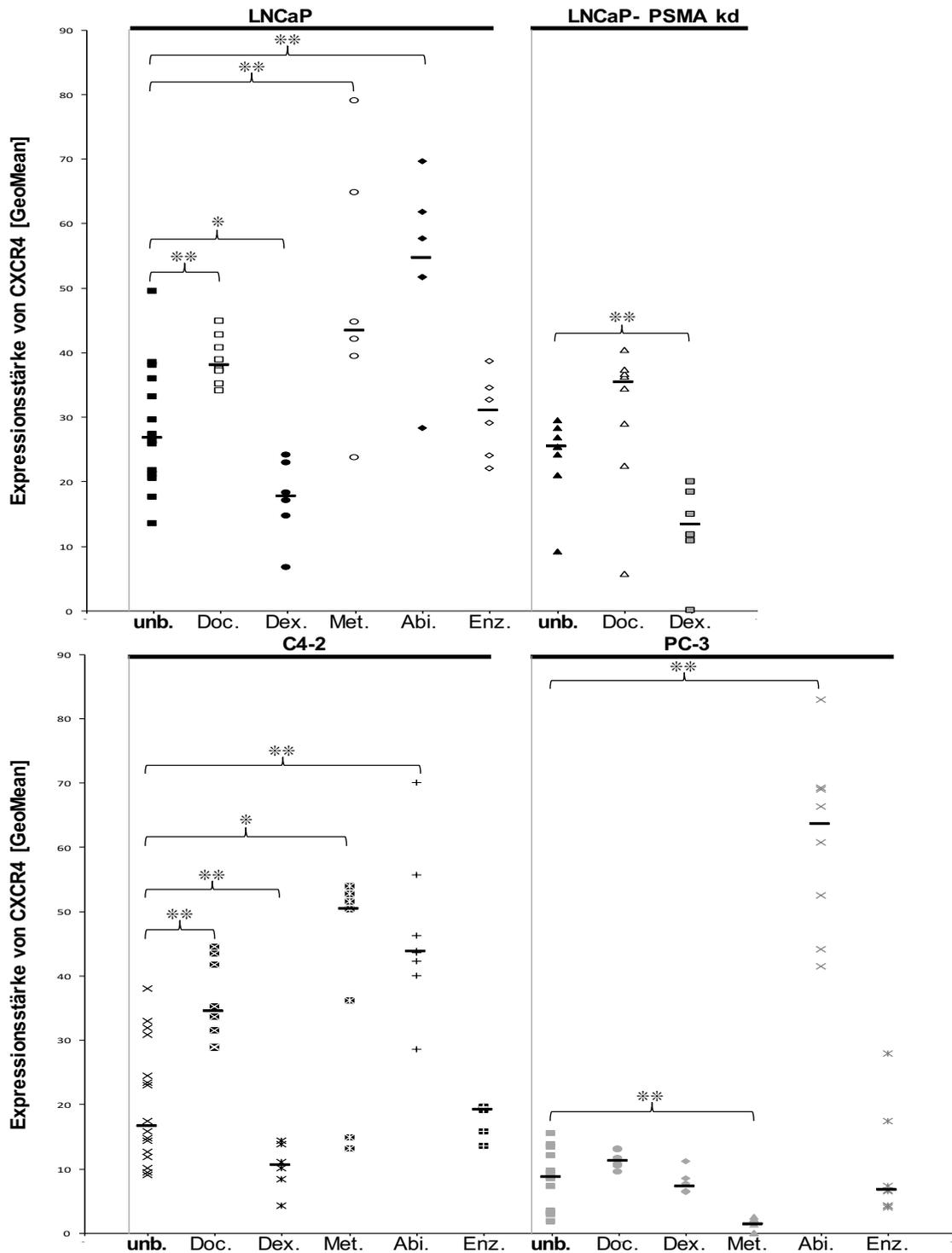


Abb. 9 Modulation der CXCR4-Expression durch Medikamentenbehandlung. Die Zellen wurden mit Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid behandelt. Anschließend wurde die CXCR4-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines PE-gekoppelten anti-CXCR4 Antikörpers quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (oben: LNCaP [unbehandelt: n = 14, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 6, Abirateron: n = 6, Enzalutamid: n = 6], LNCaP-PSMA kd [unbehandelt: n = 8, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6]; unten: C4-2 [unbehandelt: n = 16, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 7, Abirateron: n = 8, Enzalutamid: n = 5], PC-3 [unbehandelt: n = 13, Docetaxel: n = 6, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 7, Abirateron: n = 8, Enzalutamid: n = 8]; *p < 0,05, **p < 0,02). Abi. = Abirateron; CXCR4 = CXC-Motiv- Chemokinrezeptor 4; Dex. = Dexamethason; Doc. = Docetaxel; Enz. = Enzalutamid; kd = knockdown; Met. = Metformin; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; unb. = unbehandelt.

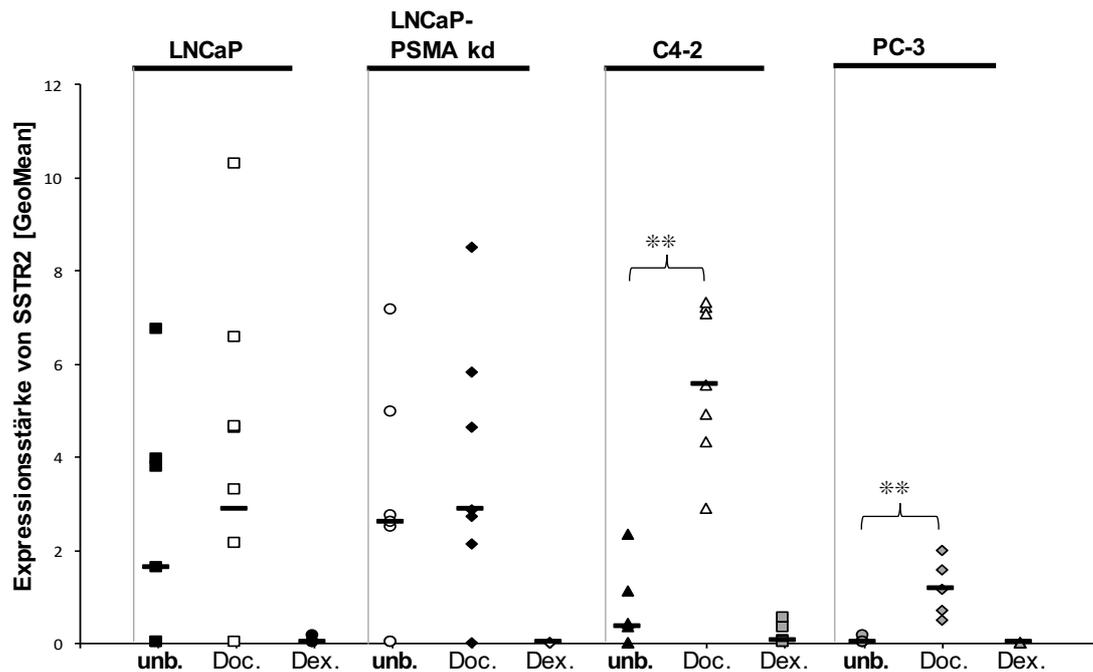


Abb. 10 Modulation der SSTR2-Expression durch Medikamentenbehandlung. Die Zellen wurden mit Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid behandelt. Anschließend wurde die SSTR2-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines PE-gekoppelten anti-SSTR2 Antikörpers quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (LNCaP [unbehandelt: n = 7, Docetaxel: n = 7, Dexamethason: n = 5], LNCaP-PSMA kd [unbehandelt: n = 7, Docetaxel: n = 7, Dexamethason: n = 5], C4-2 [unbehandelt: n = 7, Docetaxel: n = 7, Dexamethason: n = 5], PC-3 [unbehandelt: n = 5, Docetaxel: n = 5, Dexamethason: n = 5]; **p < 0,02). Dex. = Dexamethason; Doc. = Docetaxel; kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; SSTR2 = Somatostatinrezeptor Typ 2; unb. = unbehandelt.

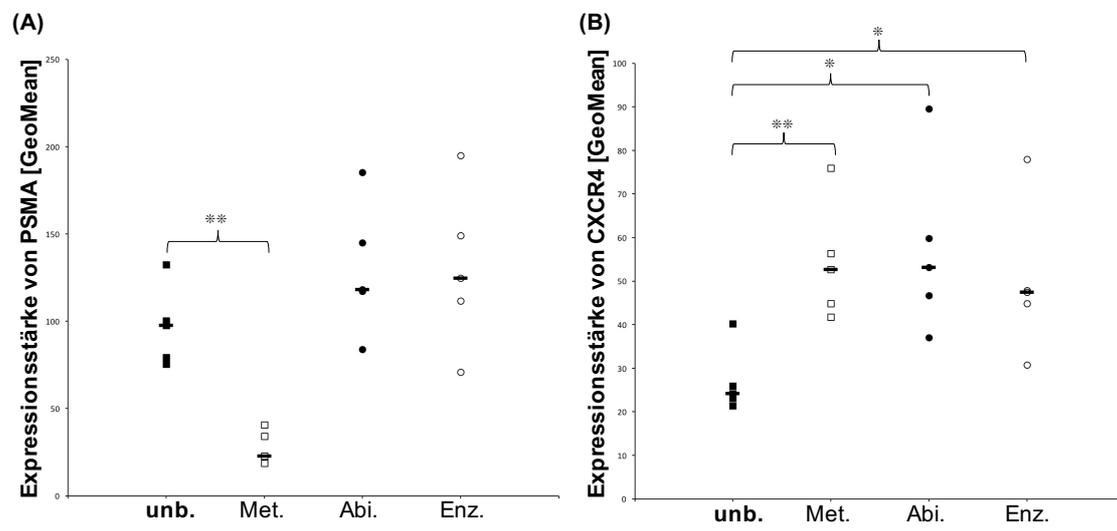


Abb. 11 Modulation der Expression von PSMA und CXCR4 bei LNCaP-PSMA kd Zellen durch Medikamentenbehandlung. Die Zellen wurden mit Metformin, Abirateron und Enzalutamid behandelt. Anschließend wurden die PSMA-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines FITC-gekoppelten anti-PSMA Antikörpers (A) und die CXCR4-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines PE-gekoppelten anti-CXCR4 Antikörpers (B) quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (n = 5; *p < 0,05, **p < 0,02). Abi. = Abirateron; CXCR4 = CXC-Motiv- Chemokinrezeptor 4; Enz. = Enzalutamid; kd = knockdown; Met. = Metformin; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; unb. = unbehandelt.

4 Diskussion

4.1 Einfluss der PSMA-Expression auf die Docetaxel-Sensitivität

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel untersucht. Vorhergehende Untersuchungen von Hartrampf et al. hatten eine tendenziell höhere PSMA-Expression und Sensitivität gegenüber Docetaxel bei LNCaP Zellen als bei C4-2 Zellen gezeigt [100]. Bei PSMA-negativen PC-3 Zellen wurde eine ähnliche Sensitivität wie bei parentalen LNCaP Zellen beschrieben, wobei beide Zelllinien deutlich besser auf Docetaxel ansprachen als LNCaP-PSMA kd Zellen. Auf der Suche nach zu Grunde liegenden Mechanismen wurden die PSMA-abhängige Aktivierung der Kinasen Akt, ERK 1/2 und p38, das Proliferationsverhalten sowie die AR- und CXCR4-Expression untersucht.

4.1.1 PSMA-Expression in LNCaP, LNCaP-PSMA kd, C4-2 und PC-3 Zellen

Die untersuchten Zelllinien unterschieden sich alle signifikant bezüglich ihrer PSMA-Expression. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigten LNCaP Zellen die höchste PSMA-Expression, gefolgt von C4-2 Zellen. LNCaP-PSMA kd Zellen exprimierten signifikant weniger PSMA als LNCaP und C4-2 Zellen. PC-3 Zellen konnten als Negativkontrolle betrachtet werden, da sie PSMA, in Übereinstimmung mit der Literatur, nicht exprimierten [58]. Als Ursache für die unterschiedliche PSMA-Expression von LNCaP und C4-2 Zellen kann unter anderem der Einfluss von Androgenen in Betracht gezogen werden. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass der AR und seine Signalwege die Expression des PSMA-Gens (FOLH1, folate hydrolase 1) herunterregulierten [58, 115]. LNCaP Zellen zeigten eine erhöhte PSMA-Expression beim Wachstum in androgenreduziertem/androgenfreiem Medium, welche durch Androgen-Behandlung jedoch zurückging [58, 104, 115].

4.1.2 Akt

Akt und seine Signalwege spielen eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen, aber auch in der Tumorgenese. Beim Prostatakarzinom wurden in ca. 40 % der Primärtumore und in bis zu 100 % der metastasierten Erkrankungsstadien Alterationen der Akt-Signalkaskade beschrieben [101, 116].

In-vitro- und in-vivo-Studien beschrieben eine PSMA-abhängige Aktivierung von Akt, was zu vermehrter Proliferation und zum gesteigerten Überleben der Zellen führte [117, 118]. Auch Caromile et al. beobachteten in Mäusen mit PSMA-positiven Prostatakarzinomen eine stärkere Aktivierung des Akt-Signalwegs als bei solchen mit PSMA-negativen Karzinomen [119]. In Arbeiten von Zhou et al. zeigte sich dazu passend, dass die Inhibition von PSMA zur verminderten Phosphorylierung von Akt führte [120]. Kaittanis et al. beschrieben ebenfalls eine Korrelation zwischen der PSMA-Expression und der Phosphorylierung von Akt, welche sie auf die enzymatische Aktivität von PSMA im Glutamatstoffwechsel zurückführten. Die Autoren zeigten außerdem, dass die PSMA-Expression und die Aufnahme von PSMA-Radiotracer stärker mit der Phosphorylierung von Akt korreliert, als mit klinischen Markern, wie dem PSA-Wert oder dem Gleason-Score [118]. Damit könnte die in der PET/CT-Bildgebung ermittelte PSMA-Expression eventuell als Surrogatmarker für die Aktivität des Akt-Signalweges dienen. Teile der Ergebnisse der hier präsentierten Untersuchung deuten ebenfalls auf eine mögliche Aktivierung von Akt durch PSMA hin. So zeigten sich jeweils eine höhere PSMA-Expression und ein höheres Niveau an phosphoryliertem Akt in LNCaP- als in C4-2 Zellen. In PC-3 Zellen, welche kein PSMA exprimierten, wurde die niedrigste Akt-Aktivierung beobachtet. Für eine Aktivierung von Akt durch zusätzliche andere Faktoren spricht, dass LNCaP-PSMA kd Zellen das höchste Niveau an P-Akt zeigten, obwohl sie signifikant weniger PSMA exprimierten als LNCaP- und C4-2 Zellen.

PTEN scheint ein weiterer Einflussfaktor auf die Aktivität des Akt-Signalwegs zu sein. Das multifunktionale Enzym unterbricht durch Dephosphorylierung den Akt-Signalweg und wirkt so durch seine antiproliferative Wirkung als Tumorsuppressor [121]. Bei 40 % der primären Prostatakarzinome lag eine gestörte Funktion von PTEN vor, welche beispielsweise durch Deletion, Mutation oder verminderte Expression des PTEN-Gens bedingt war [116]. LNCaP Zellen weisen ein deletiertes und ein mutiertes Allel von PTEN auf, während bei PC-3 Zellen beide Allele deletiert sind. In keiner der beiden Zelllinien konnte eine Expression von PTEN nachgewiesen werden [122]. Der vollständige Verlust von PTEN führte zur dauerhaften Aktivierung des Akt-Signalwegs, was zur Tumorgenese beitrug und

in 30 % der primären und 60 % der kastrationsresistenten Prostatakarzinome beobachtet werden konnte [123]. Versuche von Carver et al. legten außerdem eine Aktivierung von Akt-Signalwegen durch den Verlust von PTEN zum Überleben von Prostatakarzinomzellen, auch in Abwesenheit aktivierter AR-Signalwege, nahe [124]. Bei Inhibition entweder des Akt- oder des AR-Signalwegs scheint der jeweils andere Signalweg heraufreguliert zu werden und für weiteres Wachstum der Tumorzellen zu sorgen. Passend dazu führte die kombinierte Inhibition von Akt und AR zum fast vollständigen Rückgang von Prostatakarzinomen in PTEN defizienten Mäusen [124]. Für den Einfluss des Verlusts von PTEN auf die Aktivierung von Akt sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche eine starke Aktivierung von Akt in LNCaP- bzw. LNCaP-PSMA kd Zellen und der Subzelllinie C4-2 zeigten. In PC-3 Zellen zeigte sich dagegen trotz PTEN-Verlust ein signifikant niedrigeres P-Akt-Niveau.

Die Aktivierung des Akt-Signalwegs scheint mit dem Fortschreiten des Prostatakarzinoms, der Ausbildung von Therapieresistenzen und einem schlechteren Gesamtergebnis für den Patienten in Verbindung zu stehen [125]. So zeigten Liu et al. in ihren Arbeiten eine vermehrte Akt-Aktivierung in medikamentenresistenten Prostatakarzinomzellen, welche u.a. durch die verminderte Expression von PTEN bedingt zu sein scheint [101]. Weiterhin führte die Inhibierung des Akt-Signalwegs zur Resensitivierung u.a. auch gegenüber Docetaxel [101]. Passend dazu zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen die stärkste Akt-Aktivierung in LNCaP-PSMA kd Zellen, welche gleichzeitig auch durch die geringste Docetaxel-Sensitivität auffielen. Gegen einen Zusammenhang zwischen der Sensitivität gegenüber Docetaxel und dem P-Akt-Niveau spricht, dass C4-2 Zellen resistenter gegenüber Docetaxel waren, jedoch ein tendenziell niedrigeres Niveau der Akt-Aktivierung zeigten als LNCaP Zellen. PC-3 Zellen demonstrierten trotz ähnlicher Sensitivität gegenüber Docetaxel wie LNCaP Zellen sogar das niedrigste P-Akt Niveau. Ein klarer kausaler Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel, welcher durch eine Aktivierung des Akt-Signalwegs vermittelt wird, lässt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit somit nicht darstellen.

4.1.3 ERK1/2

ERK1/2 und Akt stehen in enger Verbindung bei der Regulation des Zellwachstums und bei Prozessen der Tumorgenese. Gioeli et al. brachten die vermehrte Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs beim Prostatakarzinom mit fortgeschrittenen Erkrankungsstufen, hormoneller Unabhängigkeit und mit einer schlechteren Prognose für den Patienten in Zusammenhang [126]. Die genaue Funktion von ERK1/2 bei der Regulation von Krebsprozessen ist jedoch nicht abschließend geklärt und ist Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

Zelivianski et al. beobachteten in ihren Zellversuchen an Prostatakarzinomzellen, dass Schäden an Mikrotubuli ERK1/2-abhängige Überlebenssignalwege aktivierten, was den chemotherapeutischen Effekt von Docetaxel schwächte. Wenn Docetaxel mit ERK1/2-Inhibitoren kombiniert wurde, konnte die Wirkung des Chemotherapeutikums jedoch wieder verstärkt und ein stärkerer wachstumshemmender Effekt als durch die jeweilige Einzelsubstanz erzielt werden [103]. Auch die Arbeiten von Boldt et al. legten einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs und der Sensitivität gegenüber Docetaxel nahe [127]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch in allen Zellen ein ähnlich niedriges P-ERK1/2-Niveau. Ein klarer Zusammenhang zwischen der Sensitivität für Docetaxel und dem P-ERK1/2-Niveau lässt sich mit den Untersuchungsergebnissen somit nicht darstellen. Auch Lee et al. konnten passend dazu in ihren Untersuchungen an Prostatakarzinomzellen keinen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs und der Chemoresistenz zeigen [128].

Die ERK1/2- und Akt-Signalwege scheinen in enger Interaktion zu stehen und sich gegenseitig zu beeinflussen. Versuche von Caromile et al. zeigten, dass Akt-Signalwege durch PSMA aktiviert werden und der Verlust der PSMA-Expression bei Prostatakarzinomen zu einer vermehrten ERK1/2-Aktivierung, dafür aber zu einer verringerten Akt-Aktivierung führte [119]. Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls ein hohes P-Akt-Niveau in LNCaP- und PC-3 Zellen mit eher niedrigem P-ERK1/2-Niveau, was u.a. durch den Verlust von PTEN bedingt zu sein scheint [129]. In der vorliegenden Arbeit zeigten die untersuchten Zellen jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Expression von PSMA und dem Niveau von

P-ERK1/2. Somit konnte mit den Untersuchungsergebnissen auch keine Verbindung zwischen dem Ausmaß der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel, welche durch den ERK1/2-Signalweg vermittelt wird, dargestellt werden.

4.1.4 Mitogenaktivierte Proteinkinase (p38, p38 MAPK)

Der p38-Signalweg scheint durch seinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten und auf die Auslösung der Apoptose eine wichtige Rolle für das zelluläre Überleben zu spielen. Es wird vermutet, dass er durch zellulären Stress wie beispielsweise durch UV-Strahlung oder Chemotherapeutika aktiviert wird [117, 130]. Zhang et al. und Perico et al. beschrieben in ihren Arbeiten zudem die PSMA-abhängige Aktivierung von p38 [67, 117]. Versuche von Gan et al. an Prostatakarzinomzellen legten außerdem einen Zusammenhang zwischen der p38-Aktivität und der Sensitivität gegenüber Docetaxel nahe [102]. Sie zeigten ein besseres Ansprechen von LNCaP Zellen auf eine Therapie mit Docetaxel bei gezielter Inhibition oder nach einem siRNA-vermittelten kd von p38. Im Einklang damit zeigten die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit bei den LNCaP-PSMA kd Zellen, welche die geringste Sensitivität gegenüber Docetaxel aufwiesen, das höchste Niveau an P-p38. Dagegen war die Aktivierung des p38-Signalwegs jedoch auch in LNCaP Zellen signifikant höher als in C4-2 und PC-3 Zellen, was gegen den beschriebenen Zusammenhang zwischen dem P-p38-Niveau und der Sensitivität gegenüber Docetaxel spricht. Eine Verbindung zwischen der Expression von PSMA und der Aktivität von p38 ging aus den Zellversuchen ebenfalls nicht hervor. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel, welcher durch die Aktivierung von p38 vermittelt wird, kann somit durch die Ergebnisse unserer Versuche nicht demonstriert werden.

Das jeweils höchste P-Akt-, P-ERK 1/2- und P-p38-Niveau zeigte sich auffälligerweise in LNCaP-PSMA kd Zellen, was gegen eine PSMA-abhängige Aktivierung spricht. Eventuell müssen hierfür andere Einflussfaktoren in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise der zusätzliche zelluläre Stress durch den PSMA kd mittels siRNA, welcher zur Aktivierung von verschiedenen Überlebenssignalwegen geführt haben könnte.

4.1.5 Proliferationsverhalten

Rajasekaran et al. beschrieben in ihren Versuchen einen Zusammenhang zwischen einer hohen PSMA-Expression und einer Verkürzung der Zellzykluszeit in der G2/M-Phase, welcher zu mehr Aneuploidien und zu vermehrter Karzinogenese führte [65]. Die Analyse der Zellzyklusprofile des isogenen Systems aus LNCaP und LNCaP-PSMA kd Zellen innerhalb der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zeigte jedoch jeweils vergleichbare Anteile von Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen. Die Proliferationsrate der LNCaP Zellen scheint somit nicht durch den PSMA kd beeinflusst und somit auch nicht entscheidend für den Unterschied in der Sensitivität gegenüber Docetaxel zu sein.

4.1.6 AR

Durch die Bindung der Liganden 5 α -Dihydrotestosteron und Testosteron an den AR werden physiologisch u.a. wichtige Mechanismen für die männliche Sexualentwicklung, den Aufbau von Muskeln und die Erythropoese in Gang gesetzt [131]. Aberrante AR-Aktivierung und -Signalvermittlung spielen jedoch auch in der Krebsentstehung des Prostatakarzinoms eine Schlüsselrolle [132]. Häufig kommt es zur Entwicklung einer Kastrationsresistenz mit Tumorprogression trotz Hormonablation [31]. AR-assoziierte Signalwege spielen im kastrationsresistenten Stadium weiterhin eine entscheidende Rolle und nehmen vor allem über folgende drei Wege Einfluss auf die Progression des Prostatakarzinoms: erstens über die AR-unabhängige Aktivierung von AR-abhängigen Signalwegen durch Umgehungswege wie die Hochregulation von Glukokortikoidrezeptoren oder die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen [133], zweitens über Dedifferenzierungsprozesse wie beispielsweise hin zum neuroendokrinen Prostatakarzinom [133] sowie drittens und am häufigsten über die Aktivierung des AR trotz niedriger Androgenkonzentrationen. Letzteres geschieht einerseits weiterhin in Abhängigkeit von Liganden über intratumorale Androgensynthese, über strukturelle AR-Alterationen wie Mutationen der AR-Liganden-Bindungsdomäne (dadurch höhere Sensitivität für Androgene oder Bindungsfähigkeit für Nicht-Androgen-Liganden), über Überexpression von Koaktivatoren der AR-Transkription, über Genamplifikation des AR-Gens, über

vermehrte Expression des AR-Proteins und der AR-Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) und über eine erhöhte Sensitivität für Androgene durch mutationsbedingte dauerhafte Aktivierung beispielsweise der Ras/MAPK-Signalwege. Andererseits findet dies unabhängig von Liganden über konstitutiv aktive Splicevarianten des AR, über AR-Aktivierung durch alternative Proliferationssignalwege (u.a. über Akt und MAPK) und über Selektion von Prostatakarzinomzellen innerhalb der Heterogenität des Tumors, welche von vornherein ein Androgen-unabhängiges Wachstum aufwiesen, statt [51, 133, 134].

Weiterhin scheinen die AR-Signalwege eine Funktion bei der Ausbildung von Resistenzen der hormonunabhängigen Prostatakarzinomzellen gegenüber Chemotherapeutika zu haben. So wird beispielsweise die Liganden-unabhängige Aktivierung des AR für eine verminderte Sensitivität gegenüber Taxanen verantwortlich gemacht und könnte so zur häufig im Therapieverlauf auftretenden Resistenz gegenüber Docetaxel beitragen [135]. Untersuchungen von Thadani-Mulero et al. ließen dagegen einen Zusammenhang zwischen der Expression verschiedener AR-Varianten und der in-vitro- und in-vivo-Sensitivität gegenüber Taxanen vermuten [136]. Die Zellkulturversuche von Komura et al. zeigten außerdem eine unterschiedliche Sensitivität von Prostatakarzinomzellen gegenüber Docetaxel in Abhängigkeit von der Aktivität von AR-Signalwegen. Sie beobachteten eine Abnahme der Sensitivität gegenüber Docetaxel, wenn die Zellen zusätzlich mit Dihydrotestosteron behandelt wurden. Dieser Effekt war jedoch regredient, wenn die AR-Signalwege gleichzeitig durch Enzalutamid gehemmt wurden [137]. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigten im Einklang damit die höchste AR-Expression in LNCaP-PSMA kd Zellen, welche gleichzeitig die geringste Sensitivität für Docetaxel demonstriert hatten. Jedoch unterschied sich die AR-Expression nicht signifikant zwischen parentalen LNCaP, LNCaP-PSMA kd und C4-2 Zellen, welche gleichzeitig aber unterschiedlich sensitiv auf die Docetaxel-Behandlung ansprachen. In Übereinstimmung mit der Literatur zeigten C4-2 Zellen im Vergleich zu parentalen LNCaP Zellen eine etwas niedrigere und PC-3 Zellen überhaupt keine AR-Expression [111, 112, 114]. Aus diesen Ergebnissen lässt sich jedoch kein

direkter Zusammenhang zwischen der AR-Expression und dem Ansprechen auf Docetaxel ableiten. Eine Verbindung zwischen der PSMA-Expression und der Expression von AR wird durch unsere Zellversuche ebenfalls nicht nahe gelegt. Es lässt sich somit aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht darauf schließen, dass das Ausmaß der PSMA-Expression einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Docetaxel hat, welcher durch die Expression von AR und der Aktivität AR assoziierter Signalwege vermittelt wird.

4.1.7 CXCR4

Die CXCR4/CXCL12-Signalwege sind bei vielen Tumorentitäten heraufreguliert und spielen eine wichtige Rolle für das Wachstum, die Angiogenese, die Metastasierung und die Therapieresistenz u.a. beim Prostatakarzinom [79]. Bhardwaj et al. beobachteten in ihren Versuchen, dass die Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit CXCL12 die Wirkung von Docetaxel minderte. Sowohl der Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase als auch der stabilisierende Effekt auf die Mikrotubuli wurden durch CXCL12 aufgehoben. Dieser Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden, wenn CXCR4 vorher inhibiert oder seine Expression unterdrückt wurde [105]. Versuche von Domanska et al. legten ebenfalls nahe, dass CXCL12, welches auch von Stromazellen des Prostatakarzinoms (aus der Mikroumgebung) produziert wurde, Prostatakarzinomzellen über die Aktivierung von CXCR4 vor der Toxizität von Docetaxel schützt. Auch hier führte die Inhibition von CXCR4 zur Verminderung dieses Effekts und die Prostatakarzinomzellen wurden wieder sensitiver gegenüber Docetaxel [138]. In den Zellkulturversuchen der vorliegenden Arbeit zeigten LNCaP- und C4-2 Zellen tendenziell eine höhere CXCR4-Expression als LNCaP-PSMA kd- und PC-3 Zellen. Die Unterschiede der CXCR4-Expression zwischen den Zelllinien waren jedoch nicht signifikant und zeigten weder einen Zusammenhang zur Sensitivität der Zellen gegenüber Docetaxel, noch zum Ausmaß der PSMA-Expression.

Mit den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich weder durch die Aktivität von Akt, ERK 1/2 und p38 noch durch Unterschiede im Proliferationsverhalten oder der Expression von AR und CXCR4 der Zusammenhang zwischen PSMA-Expression und Sensitivität gegenüber

Docetaxel erklären, welcher in vorherigen Untersuchungen von Hartrampf et al. beschrieben wurde [100]. Möglicherweise sind andere, in dieser Arbeit nicht berücksichtigte, Einflussfaktoren für den Zusammenhang verantwortlich. Dassie et al. beschrieben beispielsweise bei ihren Versuchen mit PC-3 Zellen und PSMA-überexprimierenden PC-3 Zellen keinen Unterschied bzgl. der Sensitivität gegenüber Docetaxel [139]. Der Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel bei Prostatakarzinomzellen muss somit in Frage gestellt werden und sollte Gegenstand weiterer Forschungsstudien sein.

4.2 Einfluss systemischer Medikamente auf die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Medikamente Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid auf die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2 untersucht. Die SSTR2-Expression erwies sich bei den unbehandelten und bei den mit Docetaxel und Dexamethason behandelten Zellen als so gering, dass auf die weiteren Untersuchungen mit den Medikamenten Metformin, Abirateron und Enzalutamid verzichtet wurde. Die Eignung von SSTR2 als potenzieller zukünftiger Biomarker des Prostatakarzinoms sollte daher in Frage gestellt werden. Im Folgenden wird daher nur auf den Einfluss der Medikamentenbehandlung auf die Expression von PSMA und CXCR4 eingegangen.

4.2.1 Docetaxel

Docetaxel wird von der Leitlinie als Erstlinientherapie empfohlen [6]. In unseren Zellversuchen wurde durch die Docetaxel-Behandlung die Expression der Biomarker in allen Zellen heraufreguliert. Kuroda et al. beobachteten bei ihren Versuchen mit LNCaP Zellen eine Herunterregulation der AR-Expression und des PSA-Spiegels, jedoch keine Beeinflussung der PSMA-Expression durch die Docetaxel-Behandlung [140]. Passend dazu zeigten die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit nur eine geringe und nicht signifikante Erhöhung der PSMA-Expression von LNCaP und LNCaP-PSMA kd Zellen. Die PSMA-Expression der C4-2 Zellen hatte sich durch die Docetaxel-

Behandlung jedoch ca. verdoppelt. Auch Hartrampf et al. kamen bei ihren Versuchen mit LNCaP und C4-2 Zellen zu vergleichbaren Ergebnissen [100]. Da die C4-2 Zellen ein Modell einer kastrationsresistenten Stufe des Prostatakarzinoms darstellen, könnten sich gerade hier Möglichkeiten ergeben, PSMA-basierte theranostische Verfahren durch Docetaxel-Behandlung zu verbessern.

Hatano et al. behandelten parentale DU145 und PC-3 Zellen mit Docetaxel und selektierten so docetaxelresistente Zellen. Bei weiteren Untersuchungen mit den resistenten Zellen zeigte sich, dass die Expression von CXCR4 durch die Docetaxel-Behandlung heraufreguliert worden war [141]. Die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit beschreiben damit im Einklang eine leichte Erhöhung der CXCR4-Expression bei LNCaP, LNCaP-PSMA kd und PC-3 Zellen. Die Expression bei C4-2 Zellen, als Modell des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms, hatte sich sogar nahezu verdreifacht. Damit könnte eine Docetaxel-Behandlung in Zukunft möglicherweise auch Vorteile für eine potenzielle CXCR4 gerichtete Bildgebung und Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom bringen.

4.2.2 Dexamethason

Bei Dexamethason handelt es sich um ein Medikament, welches regelhaft in der Therapie des Prostatakarzinoms verwendet wird [6]. Zur Beeinflussung der PSMA-Expression durch Dexamethason bei Prostatakarzinomzellen gibt es bisher kaum Untersuchungen. In unseren Zellkulturversuchen wurde die PSMA-Expression durch die Dexamethason-Behandlung von LNCaP, LNCaP-PSMA kd und C4-2 Zellen tendenziell herunterreguliert. Auch wenn die Unterschiede in der Expression gering waren, könnten sie möglicherweise negative Folgen für den Therapieerfolg von Patienten haben, welche sowohl Dexamethason als auch eine PSMA-gerichtete Endoradiotherapie erhalten.

Zur Auswirkung der Dexamethason-Behandlung auf die Expression von CXCR4 existieren bereits Studien. Es konnte beobachtet werden, dass Dexamethason zur Heraufregulation der CXCR4-Expression u.a. von Multiplen Myelomzellen und von T-Lymphozyten führte [142, 143]. Bei Lymphozyten, welche aus der Augenhaut von Patienten mit Uveitis isoliert wurden, konnte bereits durch

topische Dexamethason-Behandlung vermehrte CXCR4-Expression beobachtet werden [144]. Im Gegensatz dazu führte Dexamethason bei Versuchen an Gehirnen von neonatalen Ratten mit hypoxie- oder ischämie-bedingten Hirnschäden zur Herunterregulation der CXCR4-Expression [145]. Weiterhin beobachteten Lapa et al. in klinischen Studien eine Herunterregulation der CXCR4-Expression durch die Behandlung mit u.a. Dexamethason bei Patienten mit fortgeschrittenen Stadien hämatoonkologischer Erkrankungen, welche eine geplante Endoradiotherapie im Anschluss unmöglich machte [107]. Die Ergebnisse unserer Zellkulturversuche zeigen ebenfalls eine signifikante Verminderung der CXCR4-Expression bei LNCaP, LNCaP-PSMA kd und C4-2 Zellen durch die Dexamethason-Behandlung. Bei PC-3 Zellen fiel die CXCR4-Expression nach der Behandlung ebenfalls tendenziell niedriger aus. Dies sollte mit seinen möglichen negativen Folgen für theranostische, CXCR4- gerichtete Verfahren berücksichtigt und in weiteren Studien untersucht werden.

4.2.3 Metformin

Metformin ist ein Medikament zur Behandlung des Typ-2-Diabetes, dem auch ein möglicher positiver Einfluss in der Therapie des Prostatakarzinoms zugeschrieben wird [43, 44, 146]. Bei Versuchen an Prostatakarzinomzellen konnte bereits eine Herunterregulation der AR-Expression nach Metformin-Behandlung beobachtet werden [46]. Kranzbuhler et al. untersuchten u.a. den Einfluss von Metformin auf die Expression von PSMA bei Prostatakarzinomzellen und stellten keine signifikanten Unterschiede fest [147]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten bei LNCaP und C4-2 Zellen ebenfalls nur nicht-signifikante Herunterregulationen der PSMA-Expression durch Metformin. Bei LNCaP-PSMA kd Zellen zeigten die unpublizierten Daten von Stolzenburg et al. dagegen eine deutliche Verminderung der Expression auf ein Viertel des Ausgangswertes. Der Einfluss von Metformin auf die CXCR4-Expression bei Prostatakarzinomen wurde bisher kaum untersucht. In einer Arbeit von Wu et al. wurde jedoch eine Herunterregulation der CXCR4-Expression durch Metformin bei Magenkarzinomzellen von Mäusen beschrieben [148]. In unseren Zellkulturversuchen zeigte sich bei PC-3 Zellen ebenfalls eine signifikante Halbierung der CXCR4-Expression. Bei LNCaP und C4-2 Zellen zeigte sich

dagegen eine signifikante Erhöhung der Expression durch die Metformin-Behandlung. Weiterhin zeigten unpublizierte Daten von Stolzenburg et al. bei LNCaP-PSMA kd Zellen eine signifikante Veränderung der CXCR4-Expression auf etwa das Doppelte der Expression unbehandelter Zellen.

4.2.4 Antiandrogene der zweiten Generation

Die Expression von PSMA bei Prostatakarzinomzellen scheint abhängig von Androgenen zu sein [104, 115]. Es gibt Untersuchungen, welche nahelegen, dass die PSMA-Expression durch Androgene und AR-abhängige Signalwege supprimiert wird [115]. Damit im Einklang zeigen andere Studien eine Heraufregulation der PSMA-Expression und der Aufnahme von PSMA-Tracern durch Androgendeprivationstherapie oder Inhibition der AR-Signalwege wie z.B. durch Behandlung mit Abirateron oder Enzalutamid [104, 106, 149, 150]. So beobachteten Hope et al. eine Heraufregulation der PSMA-Expression bei Metastasen von Prostatakarzinomen und eine verbesserte Darstellung von Prostatakarzinom-Läsionen mittels [⁶⁸Ga]PSMA-PET/CT nach Unterdrückung der Androgenproduktion oder Inhibition von AR-Signalwegen [150]. Der Einfluss von Abirateron und Enzalutamid auf die Expression von CXCR4 wurde dagegen bisher noch nicht näher untersucht.

4.2.4.1 Abirateron

Murga et al. konnten in ihren Versuchen an LNCaP und C4-2 Zellen eine erhöhte PSMA-Expression nach Abirateron-Behandlung beobachten [106]. Auch Untersuchungen von Meller et al. zeigten eine erhöhte PSMA-Expression und eine erhöhte Aufnahme von PSMA-Tracern bei Prostatakarzinomzellen nach Abirateron-Behandlung [149]. Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit beschreiben damit in Einklang eine signifikant vermehrte PSMA-Expression durch Abirateron-Behandlung bei LNCaP und C4-2 Zellen. Unpublizierte Daten von Stolzenburg et al. zeigten auch bei LNCaP-PSMA kd Zellen einen tendenziell ähnlichen Effekt.

Auch die Expression von CXCR4 wurde durch Abirateron in allen Zelllinien signifikant heraufreguliert. Bei PC-3 Zellen war der Effekt am deutlichsten, hier

stieg die Expression auf das über 13-fache des Ausgangswertes der unbehandelten Zellen an.

4.2.4.2 Enzalutamid

In den Zellkulturversuchen von Murga et al. zeigte sich bei LNCaP und C4-2 Zellen eine Heraufregulation der PSMA-Expression durch die Enzalutamid-Behandlung. Die Menge an PSMA-Protein nahm während der Behandlung mit Enzalutamid über drei Wochen kontinuierlich zu und fiel nach Ende der Therapie innerhalb von einer Woche wieder auf den Ausgangswert zurück [106]. Auch Kranzbuhler et al. beschrieben in ihren Versuchen mit LNCaP Zellen eine erhöhte PSMA-Expression und vermehrte Aufnahme von PSMA-Tracern nach Behandlung der Zellen mit Enzalutamid [147]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten dagegen bei LNCaP und C4-2 Zellen eine tendenzielle, aktuell nicht-erklärbare Herunterregulation der PSMA-Expression durch Behandlung mit Enzalutamid. Unpublizierte Daten von Stolzenburg et al. zeigten wiederum eine leicht erhöhte PSMA-Expression bei LNCaP-PSMA kd Zellen nach Behandlung mit Enzalutamid.

In unseren Zellkulturversuchen wurde außerdem eine leichte Herunterregulation der CXCR4-Expression durch Enzalutamid bei LNCaP und C4-2 Zellen beobachtet. In PC-3 Zellen wurde die CXCR4-Expression dagegen leicht erhöht und unpublizierte Daten von Stolzenburg et al. zeigten sogar eine signifikant erhöhte CXCR4-Expression bei LNCaP-PSMA kd Zellen nach Behandlung mit Enzalutamid.

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass Docetaxel vor allem bei C4-2 Zellen, einem Modell für ein kastrationsresistentes Stadium des Prostatakarzinoms, einen positiven Einfluss auf die Rezeptorexpression zu haben scheint. Die PSMA-Expression wurde verdoppelt und die Expression von CXCR4 sogar verdreifacht. Damit könnte Docetaxel zukünftig evtl. bevorzugt in der Therapie von Patienten mit fortgeschrittenem, kastrationsresistenten Prostatakarzinom eingesetzt werden, bei denen eine PSMA- oder eine potenzielle zukünftige CXCR4-gerichtete Endoradiotherapie im Anschluss geplant ist.

Dexamethason zeigte dagegen keine deutliche Auswirkung auf die Expression von PSMA, regulierte jedoch CXCR4 bei LNCaP, LNCaP-PSMA kd und C4-2 Zellen herunter, was bei evtl. zukünftigen Einsatz CXCR4-basierter theranostischer Verfahren berücksichtigt werden sollte.

Die Behandlung von LNCaP-PSMA kd Zellen mit Metformin modulierte die PSMA-Expression auf ein Viertel des Ausgangswertes herunter. Dies sollte Berücksichtigung bei Patienten unter Metformintherapie bei gleichzeitig geplanter PSMA-gerichteter Endoradiotherapie finden. Die CXCR4-Expression wurde durch Metformin in PC-3 Zellen halbiert, in LNCaP, LNCaP-PSMA kd und C4-2 Zellen dagegen deutlich herauf moduliert. Somit wird die Einschätzung des Benefits einer Metformintherapie bei geplanten CXCR4-gerichteten theranostischen Verfahren vermutlich zusätzlich vom histologischen Status des Patienten abhängen.

Abirateron sorgte für eine deutliche Heraufregulation der PSMA-Expression bei LNCaP und C4-2 Zellen und für eine Zunahme der CXCR4-Expression bei allen Zellen. Bei PC-3 Zellen stieg die CXCR4-Expression durch Abirateron sogar auf das über 13-fache des Ausgangswertes an. Eine Abiraterontherapie könnte somit sowohl bei geplanten PSMA- als auch bei CXCR4- gerichteten theranostischen Verfahren Nutzen für den Patienten bringen.

Enzalutamid regulierte vor allem die CXCR4-Expression bei LNCaP-PSMA kd Zellen deutlich herauf. Somit wird die Einschätzung des Benefits einer Enzalutamidtherapie, ähnlich wie bei einer Metformintherapie, bei geplanten CXCR4-gerichteten theranostischen Verfahren evtl. zusätzlich vom histologischen Status des Patienten abhängen.

4.3 Ausblick

Die therapeutischen Optionen beim Prostatakarzinom sind vor allem bei metastasierter und fortgeschrittener Erkrankung bislang nicht zufriedenstellend. Durch häufige Resistenzentwicklung ist beispielsweise die Effektivität der Therapie mit dem Standardchemotherapeutikum Docetaxel eingeschränkt. In Kenntnis der ursächlichen Mechanismen könnte es zukünftig möglich sein, die Resistenzentwicklung beispielsweise durch Inhibierung intrazellulärer Signalwege zu verringern. In dieser Arbeit wurde u.a. nach dem kausalen

Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel gesucht. Dabei konnten weder die Aktivität von Akt, ERK 1/2 und p38, noch Unterschiede im Proliferationsverhalten oder in der Expression von AR und CXCR4 als Vermittler dieses Zusammenhanges bestätigt werden. Sollte sich jedoch in weiteren Arbeiten ein Zusammenhang zwischen der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel bestätigen, könnten zukünftig evtl. mittels nicht-invasiver PSMA-PET/CT-Bildgebung Rückschlüsse auf die Docetaxel-Sensitivität beim Patienten gezogen werden. So könnte möglicherweise auch die Effektivität einer Docetaxeltherapie überprüft und dem Patienten bei ungenügendem Ansprechen die nebenwirkungsreiche, ineffektive und kostenintensive weitere Therapie erspart werden.

Etablierten sich CXCR4 und SSTR2 als neue Biomarker des Prostatakarzinoms, könnte dies weitere theranostische Möglichkeiten eröffnen, wie es sich am Beispiel PSMA zunehmend zeigt. Evtl. könnten so zukünftig ohne eine Biopsie Informationen über beispielsweise die Aggressivität und Invasivität, die Tendenz zur Ausbildung von Metastasen und die Androgen-Sensitivität bei Prostatakarzinompatienten gewonnen werden. Günstigstenfalls könnte auf invasive und risikoreiche Diagnostik weitgehend verzichtet und die Risikostratifizierung sowie die Therapieempfehlung hauptsächlich auf Informationen aus der PET/CT-Bildgebung gestützt werden. In Zusammenhang damit würde das Wissen darüber, welchen Einfluss die medikamentöse Therapie auf die Expression der jeweiligen Biomarker hat, immer wichtiger. Wenn durch ein Medikament beispielsweise die PSMA-Expression deutlich heraufreguliert würde, könnte dies die Darstellung kleinerer Tumorareale oder Metastasen verbessern, aber andererseits auch die Informationen über z.B. die Aggressivität des Tumors verfälschen.

Durch den Erfolg der PSMA-gerichteten Endoradiotherapie in ersten klinischen Studien gewinnen Informationen über die Beeinflussung der Expression von Biomarkern wie PSMA durch Medikamente der Prostatakarzinomtherapie auch für therapeutische Fragestellungen an Bedeutung. Ließe sich beispielsweise durch die Vorab-Gabe von Docetaxel oder Abirateron die Effektivität einer PSMA-gerichteten Endoradiotherapie erhöhen? Wäre es sinnvoll, auf bestimmte

Medikamente in der Therapie vorerst zu verzichten und diese erst nach der Endoradiotherapie zu verabreichen? Sollte sich auch CXCR4 als Biomarker für die Diagnostik und als Ziel für die Endoradiotherapie des Prostatakarzinoms durchsetzen können, würde sich auch hier die Frage stellen, ob Docetaxel, Abirateron und Enzalutamid durch Hochregulation von CXCR4 positive Effekte für den Patienten haben könnten. Sollte dagegen in Zusammenhang mit CXCR4-basierter Diagnostik und Therapie eher auf eine Dexamethason-Behandlung verzichtet werden? Die hier formulierten Ansatzpunkte zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie von Patienten mit Prostatakarzinom demonstrieren den Bedarf weiterführender Forschung.

5 Zusammenfassung

Für das klinische Management des Prostatakarzinoms werden nuklearmedizinische Verfahren zunehmend relevant. Bildgebung und Therapie, welche gegen das Prostataspezifische Membranantigen (PSMA) gerichtet sind, werden bereits im klinischen Alltag angewendet. Weitere potenzielle Biomarker des Prostatakarzinoms, wie beispielsweise der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und der Somatostatinrezeptor Typ 2 (SSTR2), werden zudem als nuklearmedizinische Zielstrukturen diskutiert. Vorangegangene Arbeiten legten einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der PSMA-Expression und der Sensitivität gegenüber Docetaxel in Prostatakarzinomzellen nahe. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war, diesen Mechanismus genauer zu untersuchen. Dabei wurden die Aktivität onkogener Signalwege, die Proliferation und die CXCR4- sowie die Androgenrezeptor (AR)- Expression in Prostatakarzinomzelllinien mit unterschiedlicher PSMA-Expression durchflusszytometrisch quantifiziert. Im zweiten Projektteil sollte der Einfluss von Metformin und verschiedener, bereits in der Prostatakarzinomtherapie angewandter Medikamente (Docetaxel, Dexamethason, Abirateron und Enzalutamid), auf die Expression von PSMA, CXCR4 und SSTR2 untersucht werden. Die Quantifizierung der Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Ein kausaler Mechanismus für den Zusammenhang zwischen PSMA-Expression und Docetaxel-Sensitivität konnte in dieser Arbeit schließlich nicht hergestellt werden. Es zeigten sich jedoch vor allem Expressionsmodulationen von PSMA und CXCR4. Mittels Docetaxel konnte z.B. bei C4-2 Zellen eine Verdopplung der PSMA-Expression und eine Verdreifachung der CXCR4-Expression erreicht werden. Darüber hinaus zeigte die Behandlung mit Abirateron eine deutliche Heraufregulation der PSMA-Expression bei LNCaP und C4-2 Zellen, sowie eine Zunahme der CXCR4-Expression bei allen untersuchten Zelllinien. Sollte sich der Einfluss der medikamentösen Behandlung auf die Expression von PSMA und CXCR4 bestätigen, kann dies zukünftig zur verbesserten und individualisierten Diagnostik und Therapie von Prostatakarzinompatienten beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert-Koch Instituts (Hrsg): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile [Zugriff am 17.07.2018].
2. Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert-Koch Instituts (Hrsg): Krebs in Deutschland 2013/2014, https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile [Zugriff am 17.07.2018].
3. Ikeda, S., et al., *Next-generation sequencing of prostate cancer: genomic and pathway alterations, potential actionability patterns, and relative rate of use of clinical-grade testing*. *Cancer Biol Ther*, 2018: p. 1-8.
4. Zeegers, M.P., A. Jellema, and H. Ostrer, *Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis*. *Cancer*, 2003. **97**(8): p. 1894-903.
5. Matsuda, T. and K. Saika, *Comparison of time trends in prostate cancer incidence (1973-1997) in East Asia, Europe and USA, from Cancer Incidence in Five Continents Vols IV-VIII*. *Jpn J Clin Oncol*, 2007. **37**(7): p. 556-7.
6. Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF (Hrsg): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 5.0, https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostata_Kurzversion_5.0.pdf [Zugriff am 17.07.2018].
7. Hakenberg, O.W., *Prostatakarzinom*, in *Facharztwissen Urologie: Differenzierte Diagnostik und Therapie*, H.-U. Schmelz, C. Sparwasser, and W. Weidner, Editors. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 219-262.

8. Hertle, L., et al., *Tumoren*, in *Urologie*, R. Hautmann and J.E. Gschwend, Editors. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 169-247.
9. Barocas, D.A., et al., *Effect of the USPSTF Grade D Recommendation against Screening for Prostate Cancer on Incident Prostate Cancer Diagnoses in the United States*. *J Urol*, 2015. **194**(6): p. 1587-93.
10. Oesterling, J.E., *Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate*. *J Urol*, 1991. **145**(5): p. 907-23.
11. Wittekind, C., *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 2017: Wiley VCH Verlag GmbH.
12. Blum, U., *Nuklearmedizin*, in *Basiswissen Radiologie: Nuklearmedizin und Strahlentherapie*, M. Kahl-Scholz and C. Vockelmann, Editors. 2017, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 97-111.
13. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
14. Croteau, E., et al., *PET Metabolic Biomarkers for Cancer*. *Biomark Cancer*, 2016. **8**(Suppl 2): p. 61-9.
15. Kitajima, K., et al., *Update on positron emission tomography for imaging of prostate cancer*. *Int J Urol*, 2014. **21**(1): p. 12-23.
16. Jadvar, H., *Prostate cancer: PET with 18F-FDG, 18F- or 11C-acetate, and 18F- or 11C-choline*. *J Nucl Med*, 2011. **52**(1): p. 81-9.
17. Kao, P.F., Y.H. Chou, and C.W. Lai, *Diffuse FDG uptake in acute prostatitis*. *Clin Nucl Med*, 2008. **33**(4): p. 308-10.
18. Effert, P.J., et al., *Metabolic imaging of untreated prostate cancer by positron emission tomography with 18fluorine-labeled deoxyglucose*. *J Urol*, 1996. **155**(3): p. 994-8.
19. Ramirez de Molina, A., et al., *Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **296**(3): p. 580-3.

20. Umbehr, M.H., et al., *The role of 11C-choline and 18F-fluorocholine positron emission tomography (PET) and PET/CT in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis*. Eur Urol, 2013. **64**(1): p. 106-17.
21. Oprea-Lager, D.E., et al., *[18F]fluoromethylcholine as a chemotherapy response read-out in prostate cancer cells*. Mol Imaging Biol, 2015. **17**(3): p. 319-27.
22. Schwarzenbock, S.M., et al., *Prospective evaluation of [(11)C]Choline PET/CT in therapy response assessment of standardized docetaxel first-line chemotherapy in patients with advanced castration refractory prostate cancer*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2016. **43**(12): p. 2105-2113.
23. Kitajima, K., R.C. Murphy, and M.A. Nathan, *Choline PET/CT for imaging prostate cancer: an update*. Ann Nucl Med, 2013. **27**(7): p. 581-91.
24. Igerc, I., et al., *The value of 18F-choline PET/CT in patients with elevated PSA-level and negative prostate needle biopsy for localisation of prostate cancer*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. **35**(5): p. 976-83.
25. Weineisen, M., et al., *68Ga- and 177Lu-Labeled PSMA I&T: Optimization of a PSMA-Targeted Theranostic Concept and First Proof-of-Concept Human Studies*. J Nucl Med, 2015. **56**(8): p. 1169-76.
26. Mansi, R., et al., *Bombesin-Targeted PET of Prostate Cancer*. J Nucl Med, 2016. **57**(Suppl 3): p. 67S-72S.
27. Koerber, S.A., et al., *(68)Ga-PSMA-11 PET/CT in Primary and Recurrent Prostate Carcinoma: Implications for Radiotherapeutic Management in 121 Patients*. J Nucl Med, 2018.
28. Perera, M., et al., *Sensitivity, Specificity, and Predictors of Positive (68)Ga-Prostate-specific Membrane Antigen Positron Emission Tomography in Advanced Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis*. Eur Urol, 2016. **70**(6): p. 926-937.
29. Bluemel, C., et al., *68Ga-PSMA-PET/CT in Patients With Biochemical Prostate Cancer Recurrence and Negative 18F-Choline-PET/CT*. Clin Nucl Med, 2016. **41**(7): p. 515-21.
30. Maurer, T., et al., *Diagnostic Efficacy of Gallium-PSMA Positron Emission Tomography Compared to Conventional Imaging in Lymph Node Staging*

- of 130 Consecutive Patients with Intermediate to High Risk Prostate Cancer.* J Urol, 2015.
31. Harris, W.P., et al., *Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion.* Nat Clin Pract Urol, 2009. **6**(2): p. 76-85.
 32. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2020.* CA Cancer J Clin, 2020. **70**(1): p. 7-30.
 33. Bhalla, K.N., *Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis.* Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9075-86.
 34. Berthold, D.R., et al., *Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study.* J Clin Oncol, 2008. **26**(2): p. 242-5.
 35. Petrylak, D.P., et al., *Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer.* N Engl J Med, 2004. **351**(15): p. 1513-20.
 36. James, N.D., et al., *Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial.* Lancet, 2016. **387**(10024): p. 1163-77.
 37. Akakura, K., et al., *Possible mechanism of dexamethasone therapy for prostate cancer: suppression of circulating level of interleukin-6.* Prostate, 2003. **56**(2): p. 106-9.
 38. Nishimura, K., et al., *Potential mechanism for the effects of dexamethasone on growth of androgen-independent prostate cancer.* J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(22): p. 1739-46.
 39. Wilson, C., et al., *Dexamethasone potentiates the antiangiogenic activity of docetaxel in castration-resistant prostate cancer.* Br J Cancer, 2008. **99**(12): p. 2054-64.
 40. Miura, N., et al., *Low-Dose Docetaxel Combined with Dexamethasone Is Feasible for Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer.* Chemotherapy, 2016. **61**(1): p. 23-31.

41. Venkitaraman, R., et al., *Efficacy of low-dose dexamethasone in castration-refractory prostate cancer*. BJU Int, 2008. **101**(4): p. 440-3.
42. Seifert, R., *Antidiabetika*, in *Basiswissen Pharmakologie*. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 241-251.
43. Yu, H., et al., *Effect of metformin on cancer risk and treatment outcome of prostate cancer: a meta-analysis of epidemiological observational studies*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e116327.
44. Stopsack, K.H., et al., *Metformin and prostate cancer mortality: a meta-analysis*. Cancer Causes Control, 2016. **27**(1): p. 105-13.
45. Ben Sahra, I., et al., *The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level*. Oncogene, 2008. **27**(25): p. 3576-86.
46. Wang, Y., et al., *Metformin represses androgen-dependent and androgen-independent prostate cancers by targeting androgen receptor*. Prostate, 2015. **75**(11): p. 1187-96.
47. Demir, U., et al., *Metformin anti-tumor effect via disruption of the MID1 translational regulator complex and AR downregulation in prostate cancer cells*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 52.
48. Hammarsten, J. and B. Hogstedt, *Hyperinsulinaemia: a prospective risk factor for lethal clinical prostate cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(18): p. 2887-95.
49. Gapstur, S.M., et al., *Postload plasma glucose concentration and 27-year prostate cancer mortality (United States)*. Cancer Causes Control, 2001. **12**(8): p. 763-72.
50. Heinlein, C.A. and C. Chang, *Androgen receptor in prostate cancer*. Endocr Rev, 2004. **25**(2): p. 276-308.
51. Seruga, B., A. Ocana, and I.F. Tannock, *Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(1): p. 12-23.
52. Yang, L.P., *Abiraterone acetate: in metastatic castration-resistant prostate cancer*. Drugs, 2011. **71**(15): p. 2067-77.

53. Tran, C., et al., *Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer*. Science, 2009. **324**(5928): p. 787-90.
54. Ryan, C.J., et al., *Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy*. N Engl J Med, 2013. **368**(2): p. 138-48.
55. Scher, H.I., et al., *Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy*. N Engl J Med, 2012. **367**(13): p. 1187-97.
56. Schultz, N.M., et al., *Treatment Duration, Healthcare Resource Utilization, and Costs Among Chemotherapy-Naive Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated with Enzalutamide or Abiraterone Acetate: A Retrospective Claims Analysis*. Adv Ther, 2018.
57. Hussain, M., et al., *Enzalutamide in Men with Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer*. N Engl J Med, 2018. **378**(26): p. 2465-2474.
58. Israeli, R.S., et al., *Expression of the prostate-specific membrane antigen*. Cancer Res, 1994. **54**(7): p. 1807-11.
59. Leek, J., et al., *Prostate-specific membrane antigen: evidence for the existence of a second related human gene*. Br J Cancer, 1995. **72**(3): p. 583-8.
60. Sokoloff, R.L., et al., *A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine*. Prostate, 2000. **43**(2): p. 150-7.
61. Silver, D.A., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(1): p. 81-5.
62. Ghosh, A. and W.D. Heston, *Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer*. J Cell Biochem, 2004. **91**(3): p. 528-39.
63. Pinto, J.T., et al., *Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(9): p. 1445-51.

64. Carter, R.E., A.R. Feldman, and J.T. Coyle, *Prostate-specific membrane antigen is a hydrolase with substrate and pharmacologic characteristics of a neuropeptidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 749-53.
65. Rajasekaran, S.A., et al., *Prostate-specific membrane antigen associates with anaphase-promoting complex and induces chromosomal instability*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 2142-51.
66. Ghosh, A., et al., *Novel role of prostate-specific membrane antigen in suppressing prostate cancer invasiveness*. Cancer Res, 2005. **65**(3): p. 727-31.
67. Zhang, Y., et al., *Prostate specific membrane antigen (PSMA): a novel modulator of p38 for proliferation, migration, and survival in prostate cancer cells*. Prostate, 2013. **73**(8): p. 835-41.
68. Fendler, W.P., et al., *(177)Lu-PSMA Radioligand Therapy for Prostate Cancer*. J Nucl Med, 2017. **58**(8): p. 1196-1200.
69. Kratochwil, C., et al., *Targeted alpha-Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with (225)Ac-PSMA-617: Swimmer-Plot Analysis Suggests Efficacy Regarding Duration of Tumor Control*. J Nucl Med, 2018. **59**(5): p. 795-802.
70. Kratochwil, C., et al., *Targeted alpha therapy of mCRPC: Dosimetry estimate of (213)Bismuth-PSMA-617*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2018. **45**(1): p. 31-37.
71. Rahbar, K., et al., *German Multicenter Study Investigating 177Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients*. J Nucl Med, 2017. **58**(1): p. 85-90.
72. Ahmadzadehfar, H., et al., *Therapeutic response and side effects of repeated radioligand therapy with 177Lu-PSMA-DKFZ-617 of castrate-resistant metastatic prostate cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(11): p. 12477-88.
73. Kratochwil, C., et al., *PSMA-Targeted Radionuclide Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with 177Lu-Labeled PSMA-617*. J Nucl Med, 2016. **57**(8): p. 1170-6.

74. Rahbar, K., et al., *PSMA targeted radioligandtherapy in metastatic castration resistant prostate cancer after chemotherapy, abiraterone and/or enzalutamide. A retrospective analysis of overall survival.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2018. **45**(1): p. 12-19.
75. Caruz, A., et al., *Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene.* FEBS Lett, 1998. **426**(2): p. 271-8.
76. Brandt, B. and P.E. Petrides, *Spezifische Tumore – Entstehung, Progression und Therapie,* in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P.C. Heinrich, M. Müller, and L. Graeve, Editors. 2014, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 649-659.
77. Lippitz, B.E., *Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review.* Lancet Oncol, 2013. **14**(6): p. e218-28.
78. Zhao, H., et al., *CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis.* Oncotarget, 2015. **6**(7): p. 5022-40.
79. Chen, Q. and T. Zhong, *The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: a meta-analysis and literature review.* Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 5115-22.
80. Lee, J.Y., et al., *Meta-Analysis of the Relationship between CXCR4 Expression and Metastasis in Prostate Cancer.* World J Mens Health, 2014. **32**(3): p. 167-75.
81. Jung, S.J., et al., *Correlation between Chemokine Receptor CXCR4 Expression and Prognostic Factors in Patients with Prostate Cancer.* Korean J Urol, 2011. **52**(9): p. 607-11.
82. Demmer, O., et al., *PET imaging of CXCR4 receptors in cancer by a new optimized ligand.* ChemMedChem, 2011. **6**(10): p. 1789-91.
83. Gourni, E., et al., *PET of CXCR4 expression by a (68)Ga-labeled highly specific targeted contrast agent.* J Nucl Med, 2011. **52**(11): p. 1803-10.
84. Wester, H.J., et al., *Disclosing the CXCR4 expression in lymphoproliferative diseases by targeted molecular imaging.* Theranostics, 2015. **5**(6): p. 618-30.

85. Philipp-Abbrederis, K., et al., *In vivo molecular imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in patients with advanced multiple myeloma*. EMBO Mol Med, 2015. **7**(4): p. 477-87.
86. Lapa, C., et al., *[(68)Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [(18)F]FDG and laboratory values*. Theranostics, 2017. **7**(1): p. 205-212.
87. Herrmann, K., et al., *First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with 177Lu- and 90Y-Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease*. J Nucl Med, 2016. **57**(2): p. 248-51.
88. Lapa, C., et al., *CXCR4-directed endoradiotherapy induces high response rates in extramedullary relapsed Multiple Myeloma*. Theranostics, 2017. **7**(6): p. 1589-1597.
89. Akashi, T., et al., *Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer*. Cancer Sci, 2008. **99**(3): p. 539-42.
90. Hoyer, D., et al., *Classification and nomenclature of somatostatin receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1995. **16**(3): p. 86-8.
91. Petersenn, S., et al., *Genomic structure and transcriptional regulation of the human somatostatin receptor type 2*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **157**(1-2): p. 75-85.
92. Hennigs, J.K., et al., *Loss of somatostatin receptor subtype 2 in prostate cancer is linked to an aggressive cancer phenotype, high tumor cell proliferation and predicts early metastatic and biochemical relapse*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100469.
93. Ruscica, M., et al., *Characterization and sub-cellular localization of SS1R, SS2R, and SS5R in human late-stage prostate cancer cells: effect of mono- and bi-specific somatostatin analogs on cell growth*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **382**(2): p. 860-70.
94. Karaca, B., et al., *Docetaxel in combination with octreotide shows synergistic apoptotic effect by increasing SSTR2 and SSTR5 expression*

- levels in prostate and breast cancer cell lines. Cancer Chemother Pharmacol, 2015. 75(6): p. 1273-80.*
95. Savelli, G., et al., *Somatostatin receptors over-expression in castration resistant prostate cancer detected by PET/CT: preliminary report of in six patients. Ann Transl Med, 2015. 3(10): p. 145.*
 96. Hope, T.A., et al., *Somatostatin imaging of neuroendocrine-differentiated prostate cancer. Clin Nucl Med, 2015. 40(6): p. 540-1.*
 97. Werner, R.A., et al., *68Gallium- and 90Yttrium-/ 177Lutetium: "theranostic twins" for diagnosis and treatment of NETs. Ann Nucl Med, 2015. 29(1): p. 1-7.*
 98. Bodei, L., et al., *The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRNT) in neuroendocrine tumours. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2013. 40(5): p. 800-16.*
 99. Brunner, P., et al., *The prognostic and predictive value of sstr2-immunohistochemistry and sstr2-targeted imaging in neuroendocrine tumors. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2017. 44(3): p. 468-475.*
 100. Hartrampf, P.E., et al., *Evaluation der PET-Tracer [18F]FDG, [18F]Cholin und [68Ga]PSMA I&T zur nicht-invasiven Charakterisierung von Prostatakarzinomzellen und des Ansprechens auf eine Docetaxeltherapie, unv. Diss., Universität Würzburg 2018, <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bvb:20-opus-176299> [Zugriff am 06.05.2020].*
 101. Liu, Z., et al., *The Upregulation of PI3K/Akt and MAP Kinase Pathways is Associated with Resistance of Microtubule-Targeting Drugs in Prostate Cancer. J Cell Biochem, 2015. 116(7): p. 1341-9.*
 102. Gan, L., et al., *Resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate cancer cells by p38/p53/p21 signaling. Prostate, 2011. 71(11): p. 1158-66.*
 103. Zelivianski, S., et al., *ERK inhibitor PD98059 enhances docetaxel-induced apoptosis of androgen-independent human prostate cancer cells. Int J Cancer, 2003. 107(3): p. 478-85.*
 104. Evans, M.J., et al., *Noninvasive measurement of androgen receptor signaling with a positron-emitting radiopharmaceutical that targets*

- prostate-specific membrane antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9578-82.
105. Bhardwaj, A., et al., *CXCL12/CXCR4 signaling counteracts docetaxel-induced microtubule stabilization via p21-activated kinase 4-dependent activation of LIM domain kinase 1*. Oncotarget, 2014. **5**(22): p. 11490-500.
106. Murga, J.D., et al., *Synergistic co-targeting of prostate-specific membrane antigen and androgen receptor in prostate cancer*. Prostate, 2015. **75**(3): p. 242-54.
107. Lapa, C., et al., *Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy*. Br J Haematol, 2018.
108. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
109. Tai, S., et al., *PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma*. Prostate, 2011. **71**(15): p. 1668-79.
110. Horoszewicz, J.S., et al., *The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma*. Prog Clin Biol Res, 1980. **37**: p. 115-32.
111. Wu, H.C., et al., *Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells*. Int J Cancer, 1994. **57**(3): p. 406-12.
112. Kaighn, M.E., et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): p. 16-23.
113. Wang, X., et al., *In vitro and in vivo responses of advanced prostate tumors to PSMA ADC, an auristatin-conjugated antibody to prostate-specific membrane antigen*. Mol Cancer Ther, 2011. **10**(9): p. 1728-39.
114. van Bokhoven, A., et al., *Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines*. Prostate, 2003. **57**(3): p. 205-25.
115. Wright, G.L., Jr., et al., *Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy*. Urology, 1996. **48**(2): p. 326-34.

116. Taylor, B.S., et al., *Integrative genomic profiling of human prostate cancer*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(1): p. 11-22.
117. Perico, M.E., et al., *Prostate-specific membrane antigen (PSMA) assembles a macromolecular complex regulating growth and survival of prostate cancer cells "in vitro" and correlating with progression "in vivo"*. *Oncotarget*, 2016. **7**(45): p. 74189-74202.
118. Kaittanis, C., et al., *Prostate-specific membrane antigen cleavage of vitamin B9 stimulates oncogenic signaling through metabotropic glutamate receptors*. *J Exp Med*, 2018. **215**(1): p. 159-175.
119. Caromile, L.A., et al., *PSMA redirects cell survival signaling from the MAPK to the PI3K-AKT pathways to promote the progression of prostate cancer*. *Sci Signal*, 2017. **10**(470).
120. Zhou, J., et al., *NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(12): p. 1015-26.
121. Leslie, N.R., et al., *The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation*. *Biochem Soc Trans*, 2016. **44**(1): p. 273-8.
122. Vlietstra, R.J., et al., *Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts*. *Cancer Res*, 1998. **58**(13): p. 2720-3.
123. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(7): p. 489-501.
124. Carver, B.S., et al., *Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(5): p. 575-86.
125. Bitting, R.L. and A.J. Armstrong, *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2013. **20**(3): p. R83-99.
126. Gioeli, D., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase associated with prostate cancer progression*. *Cancer Res*, 1999. **59**(2): p. 279-84.
127. Boldt, S., U.H. Weidle, and W. Kolch, *The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(11): p. 1831-8.

128. Lee, J.T., Jr., L.S. Steelman, and J.A. McCubrey, *Modulation of Raf/MEK/ERK kinase activity does not affect the chemoresistance profile of advanced prostate cancer cells*. *Int J Oncol*, 2005. **26**(6): p. 1637-44.
129. McCubrey, J.A., et al., *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(8): p. 1263-84.
130. Thornton, T.M. and M. Rincon, *Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival*. *Int J Biol Sci*, 2009. **5**(1): p. 44-51.
131. Gao, T., F. Furnari, and A.C. Newton, *PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth*. *Mol Cell*, 2005. **18**(1): p. 13-24.
132. Perner, S., et al., *Adaptive responses of androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(34): p. 35542-55.
133. Crumbaker, M., L. Khoja, and A.M. Joshua, *AR Signaling and the PI3K Pathway in Prostate Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2017. **9**(4).
134. Chandrasekar, T., et al., *Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC)*. *Transl Androl Urol*, 2015. **4**(3): p. 365-80.
135. Kahn, B., J. Collazo, and N. Kyprianou, *Androgen receptor as a driver of therapeutic resistance in advanced prostate cancer*. *Int J Biol Sci*, 2014. **10**(6): p. 588-95.
136. Thadani-Mulero, M., et al., *Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2014. **74**(8): p. 2270-2282.
137. Komura, K., et al., *Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(22): p. 6259-64.
138. Domanska, U.M., et al., *CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy*. *Neoplasia*, 2012. **14**(8): p. 709-18.

139. Dassie, J.P., et al., *Targeted inhibition of prostate cancer metastases with an RNA aptamer to prostate-specific membrane antigen*. Mol Ther, 2014. **22**(11): p. 1910-22.
140. Kuroda, K., et al., *Docetaxel down-regulates the expression of androgen receptor and prostate-specific antigen but not prostate-specific membrane antigen in prostate cancer cell lines: implications for PSA surrogacy*. Prostate, 2009. **69**(14): p. 1579-85.
141. Hatano, K., et al., *Residual prostate cancer cells after docetaxel therapy increase the tumorigenic potential via constitutive signaling of CXCR4, ERK1/2 and c-Myc*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(9): p. 1088-100.
142. Kim, S.W., et al., *Dexamethasone and hypoxia upregulate CXCR4 expression in myeloma cells*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(7): p. 1163-73.
143. Ghosh, M.C., et al., *Dexamethasone augments CXCR4-mediated signaling in resting human T cells via the activation of the Src kinase Lck*. Blood, 2009. **113**(3): p. 575-84.
144. Curnow, S.J., et al., *Topical glucocorticoid therapy directly induces up-regulation of functional CXCR4 on primed T lymphocytes in the aqueous humor of patients with uveitis*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 7154-61.
145. Felszeghy, K., et al., *Dexamethasone downregulates chemokine receptor CXCR4 and exerts neuroprotection against hypoxia/ischemia-induced brain injury in neonatal rats*. Neuroimmunomodulation, 2004. **11**(6): p. 404-13.
146. Deng, D., et al., *Association between metformin therapy and incidence, recurrence and mortality of prostate cancer: evidence from a meta-analysis*. Diabetes Metab Res Rev, 2015. **31**(6): p. 595-602.
147. Kranzbuhler, B., et al., *Pharmacological upregulation of prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate cancer cells*. Prostate, 2018. **78**(10): p. 758-765.
148. Wu, W., et al., *Metformin suppresses gastric tumorigenesis by regulating chemokine CXCR4*. Int J Clin Exp Med, 2016. **9**(11): p. 21878-21882.

149. Meller, B., et al., *Alterations in androgen deprivation enhanced prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in prostate cancer cells as a target for diagnostics and therapy*. EJNMMI Res, 2015. **5**(1): p. 66.
150. Hope, T.A., et al., *⁶⁸Ga-PSMA-11 PET Imaging of Response to Androgen Receptor Inhibition: First Human Experience*. J Nucl Med, 2017. **58**(1): p. 81-84.

I Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CFDA-SE	Carboxyfluorescein diazotate succinimidyl ester
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl- Ester
CT	Computertomographie
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, eng.: deoxyribonucleic acid
ECL-Lösung	Chemolumineszenz-Lösung (Western Lightning® Plus-ECL)
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
FACS	„fluorescence-activated cell scanning“, generischer Begriff für die Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FDG	2'-Fluor-2'-desoxy-D-glucose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GeoMean	Geometrischer Mittelwert
h	Stunde/n
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HRP	Pferd-anti-Maus Meerrettichperoxidase- Sekundärantikörper

kd	knockdown
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	Boten-RNA, engl.: messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NEAA	Nicht essentielle AS
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
n.s.	nicht signifikant
P-Akt	Phospho-Akt
P-ERK 1/2	Phospho-ERK 1/2
P-p38	Phospho-p38
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-chain-reaction
PE	Phycoerythrin
PET	Positronenemissionstomographie/- tomogramm
PI	Propidiumiodid
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RIPA-Puffer	eng.: Radioimmunoprecipitation assay buffer
RKI	Robert-Koch-Institut

RNA	Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute, eng.: rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde/n
siRNA	small interfering RNA
SSTR2	Somatostatinrezeptor Typ 2
TBS-T	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Polysorbat 20, engl.: tris-buffered saline with tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN®20	Polysorbat 20
V	Volt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Behandlungskonzentrationen von Metformin, Abirateron und Enzalutamid. Die Proliferation wurde mittels CFSE-Färbung untersucht. Dargestellt ist der Anteil proliferierender Zellen in Relation zu unbehandelten Zellen in Prozent nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Metformin (A), Abirateron (B) und Enzalutamid (C) \pm Standardabweichung (LNCaP [Metformin: n = 6, Abirateron: n = 7, Enzalutamid n = 6], C4-2 [n = 5], PC-3 [Metformin: n = 5, Abirateron: n = 4, Enzalutamid: n = 4]).31

Abb. 2 Überprüfung der Transfektionseffizienz. LNCaP Zellen wurden mit Alexa Fluor 488-gekoppelter Kontroll-siRNA transfiziert. **(A)** Die Abbildung zeigt die fast 50-fach höhere Fluoreszenzintensität der transfizierten Zellen gegenüber den nicht-transfizierten LNCaP-Kontrollzellen (n = 1). **(B)** Dargestellt sind Histogramme von nicht-transfizierten Zellen (1) und Zellen, welche mit FITC-gekoppelter siRNA transfiziert wurden (2). Die Transfektionseffizienz betrug über 90 % (n = 1). FITC = Fluoresceinisothiocyanat; siRNA = small interfering RNA.....41

Abb. 3 Kontrolle des transienten kd. **(A)** Dargestellt sind nebeneinander jeweils zugehörige Versuchspaare bestehend aus LNCaP-PSMA kd und LNCaP Zellen, welche mit funktionsunfähiger Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Es zeigte sich die deutlich geringere Menge des PSMA-Proteins in den transfizierten Zellen. Tubulin diente dem Proteinmengenabgleich (dargestellt sind 4 von 6 Versuchspaaren). **(B)** Gezeigt ist die durchflusszytometrisch quantifizierte Verringerung der PSMA-Expression in LNCaP-PSMA kd Zellen in Prozent der ursprünglichen Expression als Median mit dem Wertebereich der Versuchswerte ($p < 0,02$; n = 18). kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.42

Abb. 4 PSMA Oberflächenexpression von LNCaP, LNCaP-PSMA kd, C4-2 und PC-3 Zellen. Die PSMA-Expression auf der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch mittels eines FITC-gekoppelten anti-PSMA Antikörpers quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten

einzelnen Messwerte mit Median (LNCaP [n = 12], LNCaP- PSMA kd [n = 8], C4-2 [n = 12], PC-3 [n = 15]; *p < 0,05, **p < 0,02). kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.43

Abb. 5 Expression von P-Akt, P-ERK1/2 und P-p38. Die Expression wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median. (A) Expressionsniveau von P-Akt (LNCaP [n = 12], LNCaP-PSMA kd [n = 5], C4-2 [n = 5], PC-3 [n = 9]; **p < 0,02). (B) Expressionsniveau von P-ERK1/2 (LNCaP [n = 12], LNCaP-PSMA kd [n = 5], C4-2 [n = 5], PC-3 [n = 9]; **p < 0,02). (C) Expressionsniveau von P-p38 (LNCaP [n = 12], LNCaP-PSMA kd [n = 5], C4-2 [n = 5], PC-3 [n = 9]; *p < 0,05, **p < 0,02). kd = knockdown; P-Akt = Phospho-Proteinkinase B; P-ERK1/2 = Phospho-Extracellulär signal-regulated kinase 1 and 2; P-p38 = Phospho-p38-mitogenaktivierte Proteinkinase; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.45

Abb. 6 Intrazelluläre Expression von AR und CXCR4. Die Expression des AR (A) und von CXCR4 (B) wurde durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (n = 5; **p < 0,02). AR = Androgenrezeptor; CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.46

Abb. 7 Vergleich der Zellzyklusprofile von LNCaP und LNCaP-PSMA kd. Der Zellzyklusstatus wurde durchflusszytometrisch mittels Nicoletti Assay quantifiziert, bei welchem die PI-Fluoreszenzintensität proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. (A) Dargestellt ist das Zellzyklusprofil von LNCaP Zellen. (B) Dargestellt ist das Zellzyklusprofil von LNCaP-PSMA kd Zellen (dargestellt ist 1 von n = 5 Versuchspaaren). kd = knockdown; PI = Propidiumiodid; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.47

Abb. 8 Modulation der PSMA-Expression durch Medikamentenbehandlung. Die Zellen wurden mit Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid behandelt. Anschließend wurde die PSMA-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines FITC-gekoppelten anti-PSMA Antikörpers quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten

einzelnen Messwerte mit Median (oben: LNCaP [unbehandelt: n = 14, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 5, Abirateron: n = 5, Enzalutamid: n = 6], LNCaP-PSMA kd [unbehandelt: n = 8, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6]; unten: C4-2 [unbehandelt: n = 14, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 6, Abirateron: n = 6, Enzalutamid: n = 6]; **p < 0,02). Abi. = Abirateron; Dex. = Dexamethason; Doc. = Docetaxel;ENZ. = Enzalutamid; kd = knockdown; Met. = Metformin; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; unb. = unbehandelt.52

Abb. 9 Modulation der CXCR4-Expression durch Medikamentenbehandlung.

Die Zellen wurden mit Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid behandelt. Anschließend wurde die CXCR4-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines PE-gekoppelten anti-CXCR4 Antikörpers quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (oben: LNCaP [unbehandelt: n = 14, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 6, Abirateron: n = 6, Enzalutamid: n = 6], LNCaP-PSMA kd [unbehandelt: n = 8, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6]; unten: C4-2 [unbehandelt: n = 16, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 7, Abirateron: n = 8, Enzalutamid: n = 5], PC-3 [unbehandelt: n = 13, Docetaxel: n = 6, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 7, Abirateron: n = 8, Enzalutamid: n = 8]; *p < 0,05, **p < 0,02). Abi. = Abirateron; CXCR4 = CXC-Motiv- Chemokinrezeptor 4; Dex. = Dexamethason; Doc. = Docetaxel;ENZ. = Enzalutamid; kd = knockdown; Met. = Metformin; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; unb. = unbehandelt.....53

Abb. 10 Modulation der SSTR2-Expression durch Medikamentenbehandlung.

Die Zellen wurden mit Docetaxel, Dexamethason, Metformin, Abirateron und Enzalutamid behandelt. Anschließend wurde die SSTR2-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines PE-gekoppelten anti-SSTR2 Antikörpers quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (LNCaP [unbehandelt: n = 7, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 6, Abirateron: n = 6, Enzalutamid: n = 6]; unten: C4-2 [unbehandelt: n = 16, Docetaxel: n = 8, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 7, Abirateron: n = 8, Enzalutamid: n = 5], PC-3 [unbehandelt: n = 13, Docetaxel: n = 6, Dexamethason: n = 6, Metformin: n = 7, Abirateron: n = 8, Enzalutamid: n = 8]; *p < 0,05, **p < 0,02). Abi. = Abirateron; SSTR2 = Somatostatinrezeptor 2; Dex. = Dexamethason; Doc. = Docetaxel;ENZ. = Enzalutamid; kd = knockdown; Met. = Metformin; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; unb. = unbehandelt.....54

= 7, Dexamethason: n = 5], LNCaP-PSMA kd [unbehandelt: n = 7, Docetaxel: n = 7, Dexamethason: n = 5], C4-2 [unbehandelt: n = 7, Docetaxel: n = 7, Dexamethason: n = 5], PC-3 [unbehandelt: n = 5, Docetaxel: n = 5, Dexamethason: n = 5]; **p < 0,02). Dex. = Dexamethason; Doc. = Docetaxel; kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; SSTR2 = Somatostatinrezeptor Typ 2; unb. = unbehandelt.....54

Abb. 11 Modulation der Expression von PSMA und CXCR4 bei LNCaP-PSMA kd Zellen durch Medikamentenbehandlung. Die Zellen wurden mit Metformin, Abirateron und Enzalutamid behandelt. Anschließend wurden die PSMA-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines FITC-gekoppelten anti-PSMA Antikörpers (A) und die CXCR4-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch mittels eines PE-gekoppelten anti-CXCR4 Antikörpers (B) quantifiziert. Dargestellt sind die hintergrundkorrigierten einzelnen Messwerte mit Median (n = 5; *p < 0,05, **p < 0,02). Abi. = Abirateron; CXCR4 = CXC-Motiv- Chemokinrezeptor 4;ENZ. = Enzalutamid; kd = knockdown; Met. = Metformin; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; unb. = unbehandelt.54

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Vereinfachte Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms.	4
Tabelle 2 Behandlungskonzentrationen der eingesetzten Medikamente. kd = knockdown; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen.	32
Tabelle 3 Charakteristika der Zelllinien LNCaP, LNCaP-PSMA kd, C4-2 und PC-3. AR = Androgenrezeptor; kd = knockdown; PSA = Prostataspezifisches Antigen; PSMA = Prostataspezifisches Membranantigen; ? = bisher nicht untersucht; + = vorhanden/ Expression vorhanden; - = nicht vorhanden/ keine Expression; (-) = PSMA-Expression deutlich vermindert.	39

IV Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die mich beim Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Herzlichen Dank an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas K. Buck für die umfangreiche Unterstützung, die motivierenden Worte und das Bereitstellen der finanziellen Mittel.

Frau Dr. Katharina Lückerath hat mit ihrer fachlichen Expertise und ihrem umfassenden persönlichen Engagement besonders zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Sie war stets eine verlässliche und geduldige Ansprechpartnerin. Vielen Herzlichen Dank!

Vielen Dank an Herrn Dr. Philipp E. Hartrampf für die methodische Einarbeitung sowie für die anregenden fachlichen Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Gabriele Riehl für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Unterstützung.

Herzlichen Dank an Frau Dr. Antje Stolzenburg für die Bereitstellung Ihrer unpublizierten Daten für diese Dissertation.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Labors der urologischen Klinik Würzburg und an Herrn Prof. A. Beer, Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Ulm, für die Bereitstellung von Zelllinien.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die umfangreiche persönliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Dissertation bedanken.