

NEOADJUVANT KASTRATION

Att kombinationsbehandling med kastration och strålning vid prostatacancer ger resultat har länge varit känt. I en ny studie har man funnit orsaken till strålkänsligheten. Genom kastration minskar mängden protein som reparerar skador i DNA. **Firas Tarish**, Science for Life Laboratory, Avdelningen för Translational Medicine och kemisk biologi, Institutionen för medicinsk biokemi och biofysik, Karolinska Institutet. Department för urologi, Västmanlands Sjukhus, Centrum för klinisk forskning, Västerås förklarar här hur studien har utförts.

Prostatacancer är den vanligaste typen av cancer i många länder och förekomsten ökar över hela världen.

Kombination av kemisk kastration och strålning ökar behandlingsvinster, men mekanismerna har hittills varit okända.

I detta arbete ville vi undersöka om kastrationsbehandling medför en lägre nivå av reparationsenzymer i prostatacancerceller, vilket i så fall skulle leda till försämrad DNA-reparation och bättre strålbehandlingseffekt.

En djupare förståelse för vad som sker på cellnivå och molekylnivå i prostata-

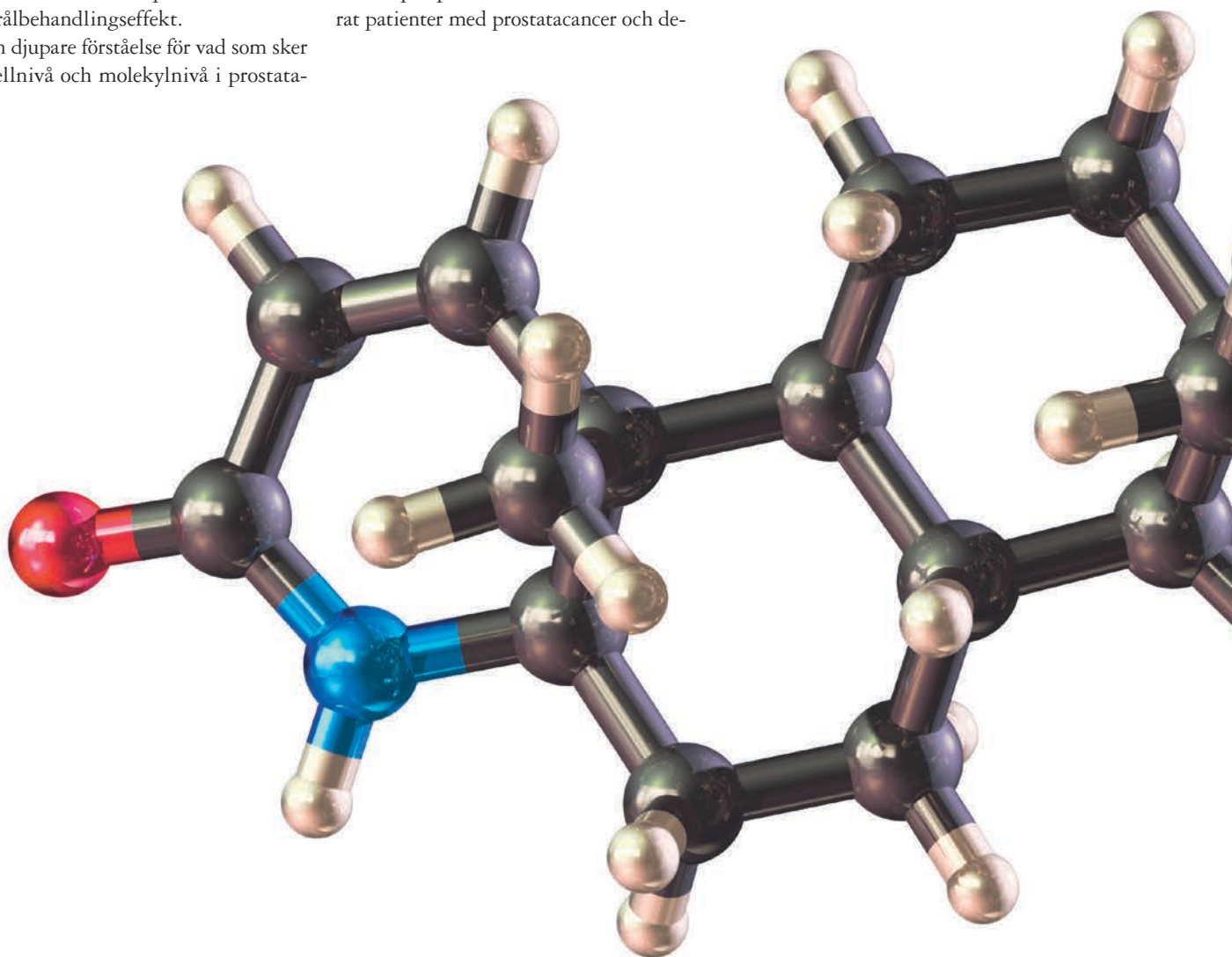
cancercellerna, när man först reducerar deras tillgång på manligt könshormon och därefter utsätter dem för joniserande strålning, gör att man bättre kan optimera behandlingen. Förmodligen kan det även ge uppslag till helt nya terapeutiska angreppspunkter.

Vi antog att den ökade strålkänsligheten orsakas av kastrations-förmedlad nedreglering av icke-homolog sammanfogning (NHEJ), vid reparation av DNA-dubbelsträngbrott (DSB).

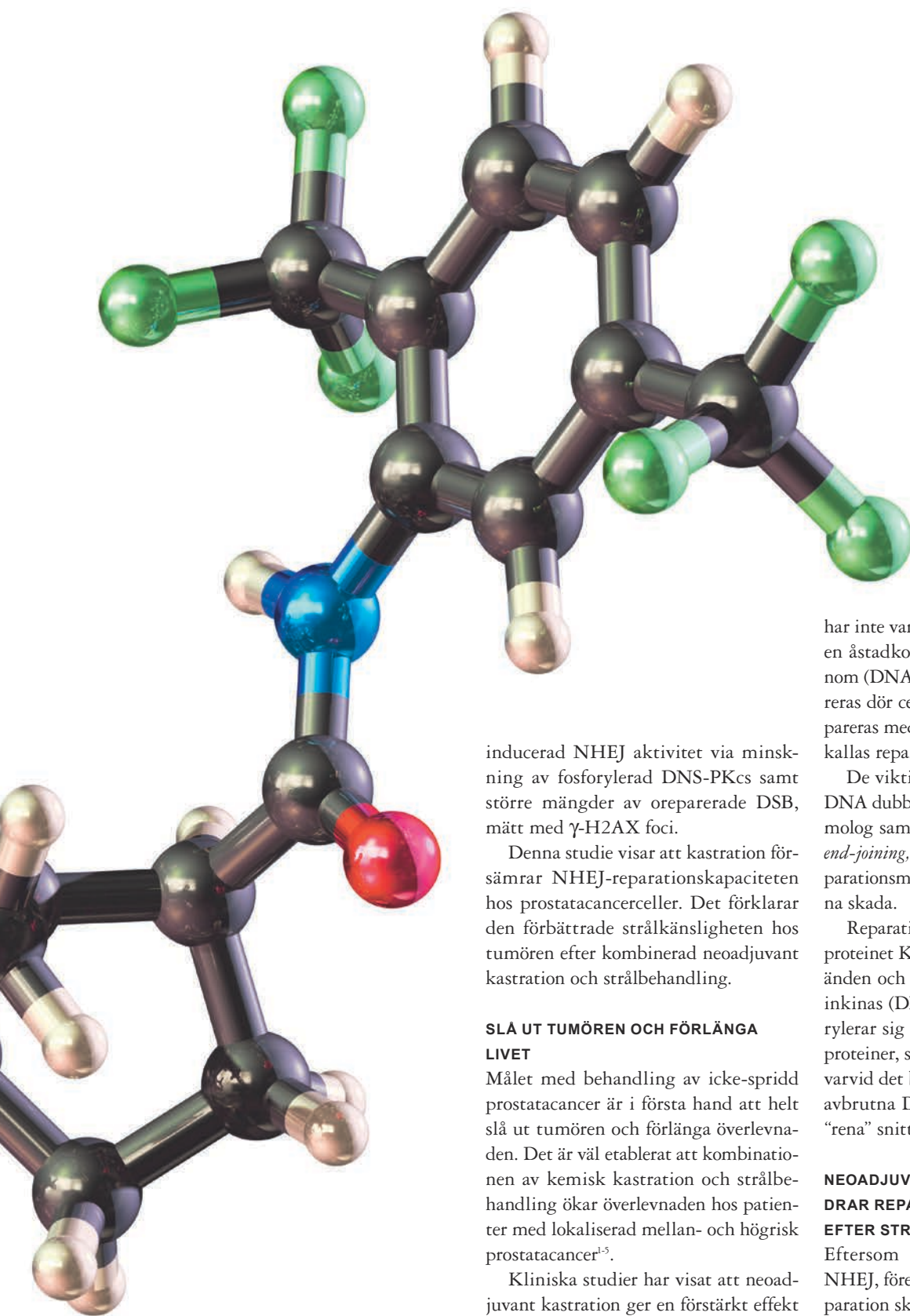
I en perspektivstudie har vi inkluderat patienter med prostatacancer och de-

lat in dem i två armar. Ena gruppen fick en dos strålbehandling före, den andra efter neoadjuvant kastrationsbehandling. Mellannålsbiopsier togs vid diagnos, före och efter kastration och strålbehandlingar.

Uttrycket androgenreceptorn, NHEJ och DSB reparation mättes i cancervävnad. Vi visade att neoadjuvant kastration före strålbehandling hade minskat uttrycket av NHEJ proteinet Ku70, vilket ledde till en försämrad strålnings-



VID PROSTATACANCER



inducerad NHEJ aktivitet via minskning av fosforylerad DNS-PKcs samt större mängder av oreparerade DSB, mätt med γ -H2AX foci.

Denna studie visar att kastration försämrar NHEJ-reparationskapaciteten hos prostatacancer celler. Det förklarar den förbättrade strålkänsligheten hos tumören efter kombinerad neoadjuvant kastration och strålbehandling.

SLÅ UT TUMÖREN OCH FÖRLÄNGA LIVET

Målet med behandling av icke-spridd prostatacancer är i första hand att helt slå ut tumören och förlänga överlevnaden. Det är väl etablerat att kombinationen av kemisk kastration och strålbehandling ökar överlevnaden hos patienter med lokaliserad mellan- och högrisk prostatacancer¹⁻⁵.

Kliniska studier har visat att neoadjuvant kastration ger en förstärkt effekt vid strålbehandling av prostatacancer. Mekanismen bakom denna synergism

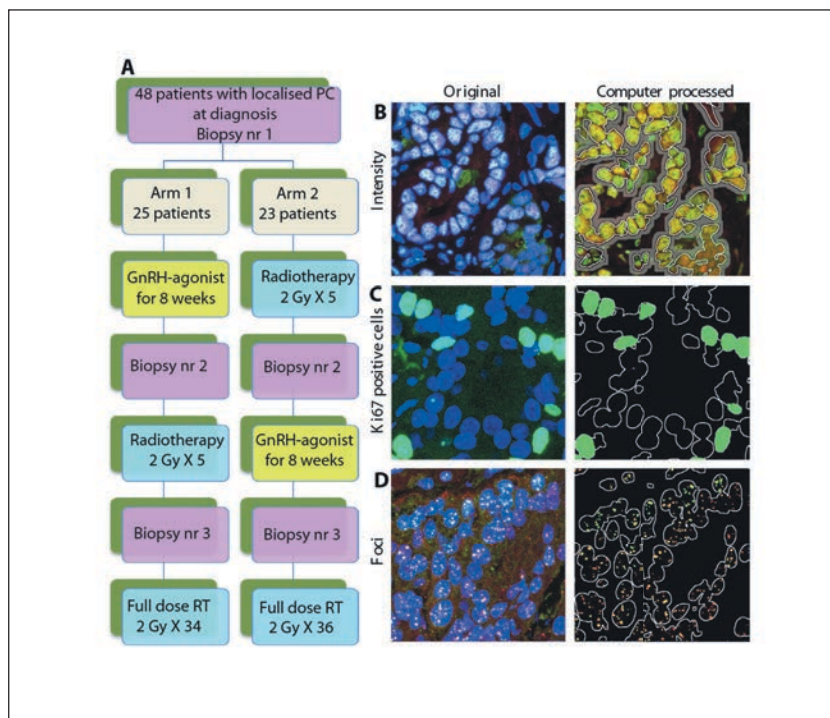
har inte varit klarlagd. Strålbehandlingen åstadkommer skador i cellernas genom (DNA). Om dessa skador inte repareras dör cellen. DNA-skadorna kan repareras med hjälp av vissa proteiner, som kallas reparationsenzymmer.

De viktigaste skadorna i genomen är DNA dubbelsträngbrott (DSB). Icke-homolog sammanfogning (*Non-homologous end-joining*, NHEJ) är den vanligaste reparationsmekanismen för DNA vid denna skada.

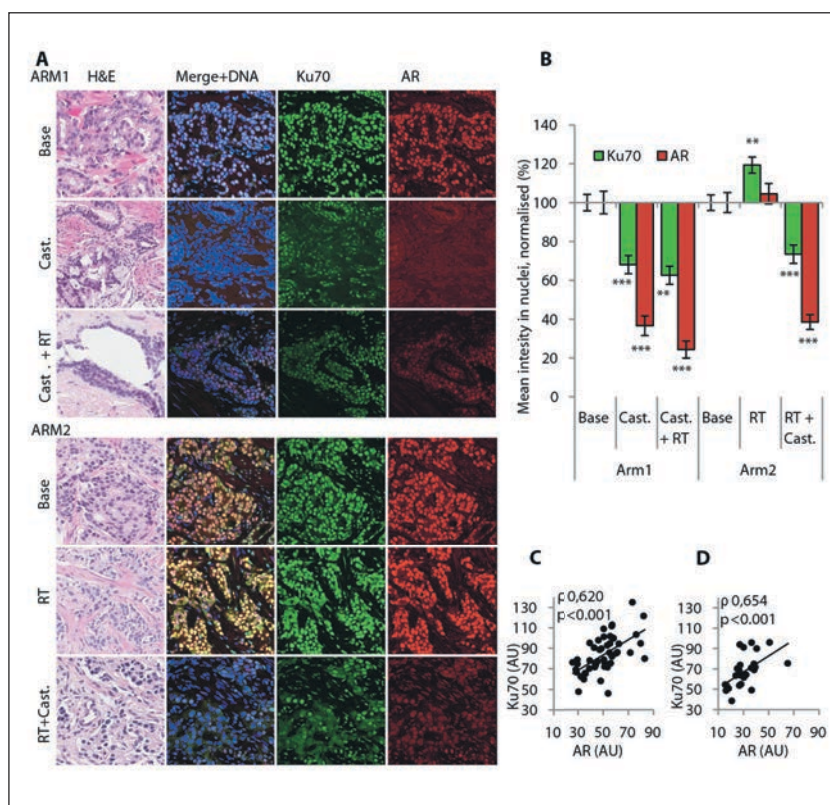
Reparationen av DNA sker genom att proteinet Ku70/80 fäster i vardera DNA-ändan och drar ihop dem. DNA-proteinkinase (DNA-PK) binder in och fosforylerar sig själv (på Ser2056) och andra proteiner, såsom ligase IV och XRCCR, varvid det börjar arbeta och trimmar de avbrutna DNA-ändarna så att man får "rena" snittytor som går att foga ihop.

NEOADJUVANT KASTRATION FÖRHINDRAR REPARATION AV SKADAD DNA EFTER STRÅLBEHANDLING

Eftersom Ku70 är en viktig del av NHEJ, föreslog vi att försämrad DSB-reparation skulle kunna vara en mekanistisk förklaring till den ökade strålkänsligheten efter kastration.



Figur 1.



Figur 2.

En prospektiv studie (se material och metoder samt Fig 1A) visar att i båda studiens armar ledde kastration, antingen före eller efter strålbehandling, till en

liknande minskning i serum prostata-specifikt antigen (PSA) ($P < 0,001$). Median testosteronnivåer i serum var 0,7 nmol/L i båda armarna.

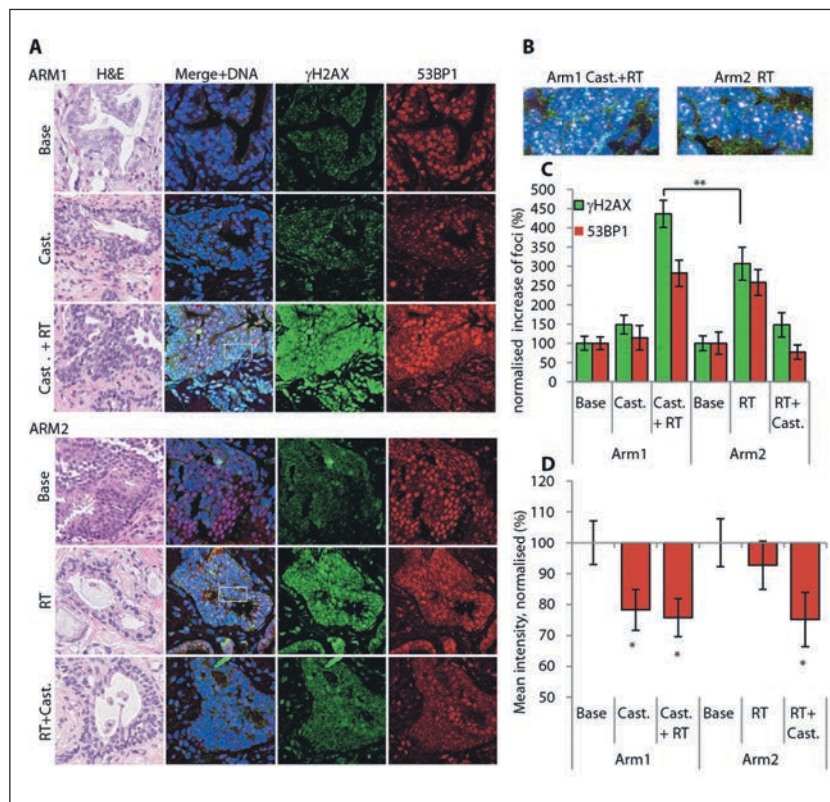
Serum testosteron $< 1,7$ nmol/L uppnåddes inte hos två patienter i arm 1, men hos fyra patienter i arm 2 efter åtta veckor av kemisk kastration. Serum-PSA minskade markant hos samma patienter. Dessa patienter ingår fortfarande i vår studie och i statistisk analys. Vi mätte även nivåerna av Ku70 protein i kärnor av prostatatumörceller. Vi observerade ingen skillnad i Ku70 nivåer mellan de två armarna vid diagnos. I båda armarna, minskade kastration Ku70 nivåer i samma utsträckning oavsett tidigare strålbehandling ($P < 0,01$) (fig. 2, A och B). Det fanns en statistiskt signifikant ökning av medelintensiteten av Ku70 efter 5×2 Gy strålbehandlingsfraktioner ($P = 0,014$). Vi tolkar detta som uppreglering av Ku70 och sannolikt andra NHEJ proteiner, efter fem dagars strålbehandlings-inducerad DSB reparation. Ingen sådan uppreglering av Ku70 hittades hos patienter som erhöll enbart kemisk kastration (fig. 2B). Vi mätte också nivåer av AR i kärnan av prostatatumörceller. Som väntat observerades ingen skillnad mellan armarna före kastration ($P = 0,3$) (fig. 2B). Det har tidigare rapporterats att AR-aktivitet ökas efter radioterapi. Figur 2A visar tydligare färgning för AR efter strålbehandling, men ingen statistiskt signifikant ökning (Fig. 2B). Som förväntat minskade medelvärdet av AR efter kastration (Fig. 2B). Vid användandet av Spearmans rho rangkorrelationstest (ρ), observerade vi i båda armarna en signifikant korrelation mellan Ku70 och AR före behandling ($\rho = 0,62$, $p < 0,001$), och i armen 1 efter kastration ($\rho = 0,65$, $P < 0,001$) (fig. 2, C och D).

DE ÅTERSTÅENDE STRÄLNINGSINDUCERADE DSB ÖKAR EFTER KASTRATION

För att bedöma om neoadjuvant kastration påverkade DSB reparation, mätte vi både p53-bindande protein 1(53BP1) och fosforylerades H2AX histon (γ -H2AX), båda används vanligen som markör för DSB⁶.

Strålbehandling i båda armarna ledde till en statistiskt signifikant ökning av både γ -H2AX och 53BP1 foci ($P < 0,001$).

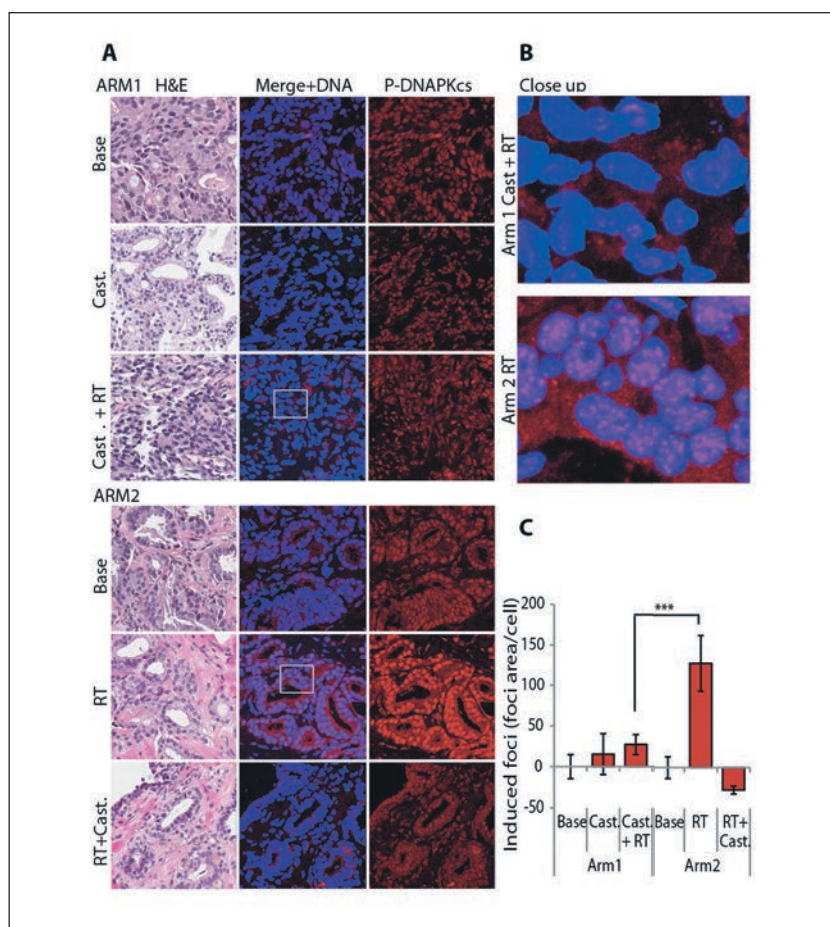
Vi observerade en tydlig ökning av strålbehandlings-inducerad γ -H2AX foci i arm 1 med neoadjuvant kastration be-



Figur 3.

handling ($P < 0,05$), vilket visar att antalet dödliga DSB ökade hos patienter som fått neoadjuvant kastration (Fig. 3C). Vi har inte observerat en statistiskt signifikant skillnad i färgning för 53BP1 foci mellan de två armarna. Detta beror sannolikt på det faktum att intensitet av 53BP1 verkar nedregleras genom kastration, vilket leder till en minskning av antalet 53BP1 foci (Fig. 3C).

”Här visar vi i in vivo material, att minskningen av Ku70 efter kemisk kastration korrelerade med en ökning av strålbehandling-inducerad DSB.”



Figur 4.

NEOADJUVANT KASTRATION FÖRSÄM-LAR NHEJ AKTIVITET

För att undersöka NHEJ aktivitet i prostatacancervävnad, har vi använt en fosforilerad DNA-PKcs specifik antikropp som känner igen fosforilerad S2056 (pS2056) (7) på DNA-PK som metod. (Fig. 4A).

DNA-PK fosforylering var låg före behandling och efter kastration (Fig. 4C). Efter strålbehandling, observerade vi en stark ökning av den genomsnittliga färgningsintensiteten av fosforilerade DNA-PKcs ($P = 0,01$) (Fig. 4, B och C). Detta visar en stark aktivering av DNA-PK-medierad NHEJ reparation av DSB. Neoadjuvant kastration före strålbehandling ledde däremot till totalt avskaffande av strålnings-inducerad fosforilerade DNA-PKcs i armen 1.

HUR FÖRMEDLAR AR REPEARATIONS-ENZYMER?

Tidigare rapporterade vi en minskning av Ku70 proteinet i prostatacancervävnad efter kastration⁸, vilket tyder på att NHEJ kan påverkas av kastration. Prekliniska resultat som erhållits med hjälp av LNCaP prostatacancer cellinje visade att androgendeprivationsterapi (ADT)

minskade NHEJ⁹ och att AR främjade uttrycket och aktivitet av DNA-PKcs¹⁰.

Här visar vi i *in vivo* material, att minskningen av Ku70 efter kemisk kastration korrelerade med en ökning av strålbehandling-inducerad DSB, som i sin tur indikerar en minskning i NHEJ reparationsaktivitet. Nedsatt aktivering av NHEJ stöddes också av den låga färgningsintensiteten av DNA-PK (pS2056) i prostatatumörvävnad, efter kombinerad kastration och strålbehandling jämfört med enbart strålbehandling.

Eftersom specificiteten av DNA-PK (pS2056) antikropp inte har validerats i mänskliga formalinfixerade, paraffinbäddade prover, kan vi inte utesluta att kastration också kan påverka andra signalvägar än DNA-PK. Exempel på andra signalvägar är ATM (ataxi-telangiektasi muterade). Tidigare *in vitro* studier visade endast marginell minskning i NHEJ reparation⁹. Men i den aktuella studien var minskningen i Ku70 efter kastrationen mer robust, med 30 % i Ku70 jämfört med före kastration. Tillsammans antyder dessa data att AR reglering av NHEJ är strängare i prostata cancervävnad från patienter än vad som observerats i cellinjer *in vitro*.

Efter kastration minskar serumandrogen, som produceras av binjurarna, med 90 till 95 %, vilket lämnar 5 till 10 % kvar. Studier tyder på att kvarvarande androgen produktion av binjurarna och steroid syntes från kolesterol eller progesteron kan leda till fortsatt tillväxt prostatacancer. Kliniska prövningar har visat att användningen av andra generationens läkemedel såsom abirateron och enzalutamide förbättrar den totala överlevnaden hos patienter med hormonresistent prostatacancer¹¹⁻¹². Eftersom endast kastration inte undertrycker androgenreglerade gener tillräckligt, kan andra generationens läkemedel vara effektiva eftersom de undertrycker dessa gener. Detta kan leda till ytterligare försämring av NHEJ i en neoadjuvant inställning och förbättra strålkänslighet¹³. En återstående öppen fråga är om lokaliserad prostatacancer- återfall efter kombinerad kastration och strålbehandling beror på otillräcklig androgen utarmning efter kastration?

En begränsning av vår studie är att vi inte kan beskriva i detalj hur AR förmedlar NHEJ reparation. Om det till exem-

pel är enbart genom transkriptionsreglering av proteiner involverade i NHEJ eller om det finns en mer direkt roll för AR i NHEJ. Sådana frågor är svårare att lösa med patientmaterial och behandlas bättre *in vitro*. Vår aktuella studie är inriktad på NHEJ reparation, men det är möjligt att AR förmedlar även andra reparations- eller signalvägar som är viktiga för att öka känsligheten av prostatacancer celler till strålbehandling.

Vi har visat att den förbättrade överlevnaden av prostatacancerpatienter som uppnås genom kombinerad kastration och strålbehandling kan förklaras av försämrade NHEJ reparation av DSB. Detta resulterar i en ökning av radioterapi-framkallad DSB, vilket leder till apoptos av prostatacancer celler. Med tanke på att radiosensibilisering av prostatacancer- vävnad optimalt uppnås efter en kombination av kastration och strålbehandling, förutspår vi ännu bättre radiosensibilisering av prostatatumörvävnad som uttrycker mer androgenkänsliga AR.

”En återstående öppen fråga är om lokaliserad prostatacancer- återfall efter kombinerad kastration och strålbehandling beror på otillräcklig androgen utarmning efter kastration?”

MATERIAL OCH METODER VI ANVÄNT

Patienter med lokaliserad mellan- och högriskprostatacancer som erbjöds kurativ strålbehandling inkluderades i studien. Den regionala etiska kommittén vid Uppsala universitet beviljade etiskt godkännande, EPN Dnr 2011: 066. I arm 1, erhöll patienterna neoadjuvant kemisk kastration med leuprorelin, en GnRH-analog, följt av extern strålbehandling i 2 Gy/dag fraktioner till en

total dos av 78 Gy. I arm 2, fick patienterna först strålbehandling i 2 Gy/dag fraktioner under fem dagar följt av neoadjuvant leuprorelin (en gonadotropin releasing hormone analoge) och sedan en motsvarande högre strålningsdos till totalt 82 Gy (se fig. 1A). Före behandlingen togs prostata mellannålsbiopsier från alla patienter. I arm 1 togs en andra biopsiomgång åtta veckor efter leuprorelininjektion, det vill säga före starten av strålbehandling. Den tredje biopsiomgången togs omkring tre timmar efter den femte strålningsfraktionen. I arm 2 gjordes en andra biopsiomgång cirka tre timmar efter den femte strålningsfraktionen, det vill säga innan hormonbehandling inleddes. En tredje biopsiomgång togs åtta veckor efter administrering av leuprorelin (Fig. 1A).

HISTOLOGI OCH IMMUNFLUORESCENS

Alla prostata mellannålsbiopsier inbäddades i paraffin, snittades och färgades med H & E. Cancerområden bedömdes av en uropatolog enligt Gleason systemet¹⁴. I studien användes två cancerrika biopsier från varje biopsiomgång och ytterligare snittades för immunofluorescensanalys.

Biopsisnitten avparaffinerades och rehydrerades före antigenåtervinning med R-buffert A (elektronmikroskopi Sciences) i en tryckkokare. Efter blockering med 2 % bovint serumalbumin, inkuberades biopsisnitten med olika primära antikroppar vid 4 ° C över natten. Omfattande sköljning utfördes en gång; biopsisnitten inkuberades med de sekundära antikropparna donkey-anti-mus-immunglobulin G (IgG) -Alexa Fluor 488 (1: 500; Molecular Probes) och donkey-anti-kanin-IgG-Alexa Fluor 555 (1: 500; Molecular Probes) under en timme vid rumstemperatur. DNA motfärgades med TO-PRO-3 jodid (Molecular Probes) och biopsisnitten på objektglaset var monterade med Prolong Guld (Molecular Probes). Objektglaset färgades med antikroppar mot (i) AR (1: 500, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology) och Ku70 (1: 500, E-5, SC-17789, Santa Cruz Biotechnology), (ii) 53BP1 (1: 1000, Bethyl Laboratories) och γ-H2AX (1: 1000, 3F2, Abcam), (iii) fosforylerade DNA-PKcs ensam (1: 750, S2056, Abcam). Bilder från tumörområdet med en bra immunofluorescens signal valdes ut

från varje biopsisnitt. Motsvarande områden i H & E-färgade avsnitt identifierades för histologisk kontroll av tumörområdet. I objektglas som färgats för Ku70, AR och fosforylerade DNA-PKcs har två områden från varje bild som innehåller 300 till 600 celler valts för analyser. TO-PRO-3 användes som en DNA-markör.

Alla bilder analyserades med avseende på medelfärgningsintensitet i kärnorna. Kärnområdet definierades av TO-PRO-3-signal (Fig. 2A). För de markörer som utgör foci, antal och området foci per DNA enhet mättes (Fig. 1D).

Icke-parametriska testmetoder tillämpades. Relaterade utfall efter olika behandlingar inom varje arm jämfördes med användning av Wilcoxon signed-rank test. Orelaterade utfall mellan studiens två armar jämfördes med hjälp av Mann-Whitney U test. Korrelationsanalys genomfördes med hjälp av Spearmans rho rangkorrelationstest (ρ). Alla statistiska test var tvåsidiga med signifikans fastställdes vid $P < 0,05$. Statistisk analys utfördes med hjälp av statistikpaketet för samhällsvetenskap (SPSS), version 21.0.

1. Science for Life Laboratory, Avdelningen för Translational Medicine och kemisk biologi, Institutionen för medicinsk biokemi och biofysik, Karolinska Institutet

2. Department för urologi, Västmanlands Sjukhus Västerås, Västerås

3. Department för klinisk patologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala

4. Department för patologi, Västmanlands Sjukhus Västerås

5. Department för onkologi, Västmanlands Sjukhus Västerås

6. Oxford Institute for Radiation Oncology, Institutionen för onkologi, University of Oxford, Storbritannien.

REFERENSER

1. P. Milecki, P. Martenka, A. Antczak, Z. Kwi- as, Radiotherapy combined with hormonal therapy in prostate cancer: the state of the art. *Cancer Manag Res* 2, 243 (2010).

2. A. R. Gottschalk, M. Roach, 3rd, The use of hormonal therapy with radiotherapy for prostate cancer: analysis of prospective randomised trials. *Br J Cancer* 90, 950 (Mar 8, 2004).

3. A. V. D'Amico, M. H. Chen, A. A. Renshaw, M. Loffredo, P. W. Kantoff, Androgen suppression and radiation vs radiation alone for prostate cancer: a randomized trial. *JAMA* 299, 289 (Jan 23, 2008).

4. M. Bolla et al., External irradiation with or without long-term androgen suppression for prostate cancer with high metastatic risk: 10-year results of an EORTC randomised study. *Lancet Oncol* 11, 1066 (Nov, 2010).

5. G. K. Zagars, A. Pollack, L. G. Smith, Conventional external-beam radiation therapy alone or with androgen ablation for clinical stage III (T3, NX/N0, M0) adenocarcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44, 809 (Jul 1, 1999).

6. A. Sak, M. Stuschke, Use of γ -H2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. *Semin. Radiat. Oncol.* 20, 223–231 (2010).

7. K. Meek, P. Douglas, X. Cui, Q. Ding, S. P. Lees-Miller, trans Autophosphorylation at DNAdependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3881–3890 (2007).

8. F. L. Al-Ubaidi, N. Schultz, O. Loseva, L. Egevad, T. Granfors, T. Hellday, Castration therapy results in decreased Ku70 levels in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 19, 1547–1556 (2013).

9. W. R. Polkinghorn, J. S. Parker, M. X. Lee, E. M. Kass, D. E. Spratt, P. J. Iaquina, V. K. Arora, W.-F. Yen, L. Cai, D. Zheng, B. S. Carver, Y. Chen, P. A. Watson, N. P. Shah, S. Fujisawa, A. G. Goglia, A. Gopalan, H. Hieronymus, J. Wongvipat, P. T. Scardino, M. J. Zelefsky, M. Jasin, J. Chaudhuri, S. N. Powell, C. L. Sawyers, Androgen receptor signaling regulates DNA repair in prostate cancers. *Cancer Discov.* 3, 1245–1253 (2013).

10. J. F. Goodwin, M. J. Schiewer, J. L. Dean, R. S. Schrecengost, R. de Leeuw, S. Han, T. Ma, R. B. Den, A. P. Dicker, F. Y. Feng, K. E. Knudsen, A hormone–DNA repair circuit governs the response to genotoxic insult. *Cancer Discov.* 3, 1254–1271 (2013).

11. K. Fizazi, H. I. Scher, A. Molina, C. J. Logothetis, K. N. Chi, R. J. Jones, J. N. Staffurth, S. North, N. J. Vogelzang, F. Saad, P. Mainwaring, S. Harland, O. B. Goodman Jr., C. N. Sternberg, J. Hui Li, T. Kheoh, C. M. Haqq, J. S. de Bono; COU-AA-301 Investigators, Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: Final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 13, 983–992 (2012).

12. H. I. Scher, K. Fizazi, F. Saad, M.-E. Taplin, C. N. Sternberg, K. Miller, R. de Wit, P. Mulders, K. N. Chi, N. D. Shore, A. J. Armstrong, T. W. Flaig, A. Fléchon, P. Mainwaring, M. Fleming, J. D. Hainsworth, M. Hirmand, B. Selby, L. Seely, and J. S. de Bono; AFFIRM Investigators, Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 367, 1187–1197 (2012).

13. E. A. Mostaghel, S. T. Page, D. W. Lin, L. Fazli, I. M. Coleman, L. D. True, B. Knudsen, D. L. Hess, C. C. Nelson, A. M. Matsumoto, W. J. Bremner, M. E. Gleave, P. S. Nelson, Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: Therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 67, 5033–5041 (2007).

14. D. G. Bostwick, Grading prostate cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 102, S38–S56 (1994).

FIRAS L. TARISH, SCIENCE FOR LIFE LABORATORY, AVDELNINGEN FÖR TRANSLATIONAL MEDICINE OCH KEMISK BIOLOGI, INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSK BIOKEMI OCH BIOFYSIK, KAROLINSKA INSTITUTET, DEPARTMENT FÖR UROLOGI, VÄSTMANLANDS SJUKHUS, CENTRUM FÖR KLINISK FORSKNING, VÄSTERÅS, FIRAS.TARISH@LTV.SE



I SAMARBETE MED: NIKLAS SCHULTZ¹, ANNA TANOGLIDI¹, HANS HAMBERG², HENRY LETOCHA⁵, KATALIN KARASZI⁶, FREDDIE C. HAMDY⁶, TORVALD GRANFORS³, THOMAS HELLEDAY¹