

MOLEKULÁRNÍ MECHANIZMY ÚČINKU ANTIANDROGENU BICALUTAMIDU

Jan Bouchal¹, Karl R. N. Baumforth², Michaela Šváchová¹, Paul G. Murray²,
Erwin von Angerer³, Zdeněk Kolář¹

¹Laboratoř molekulární patologie a Ústav patologie, LF UP, Olomouc

²Institute for Cancer Studies, University of Birmingham, Velká Británie

³Institut für Pharmazie, Universität Regensburg, Německo

Léčba pokročilých stadií karcinomu prostaty představuje vážný medicínský problém. Vzhledem k vedlejším účinkům kastrace, jako jsou ztráta libida a impotence, se alternativou u některých pacientů s karcinomem prostaty stává monoterapie antiandrogeny. Dobrou snášenlivost, minimum vedlejších účinků a zachování sexuálních funkcí vykazuje především léčba bicalutamidem. Cílem této práce bylo shrnutí poznatků o molekulárních mechanismech účinku tohoto antiandrogeny a diskutovat naše výsledky se zaměřením na aktivitu telomerázy, dráhu nádorového supresoru p53 a apoptózu. Zejména nový poznatek o aktivaci dráhy p53 a apoptózy vyššími dávkami bicalutamidu může vést k diskusi o jejich zavedení do léčebné praxe u androgen senzitivních karcinomů. Vyšší dávky než 150 mg bicalutamidu denně se v současné klinické praxi nepoužívají, protože ve srovnání s kastrací nezpůsobují další pokles hladin prostatického specifického antigenu. Dávkování až 600 mg bicalutamidu denně je však pacienty dobře snášeno a vzhledem k diskutovaným účinkům bicalutamidu, by mohly vyšší dávky přinést zlepšení terapie androgen senzitivních karcinomů.

Klíčová slova: bicalutamid, telomeráza, p53, karcinom prostaty.

MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF ANTIANDROGEN BICALUTAMIDE

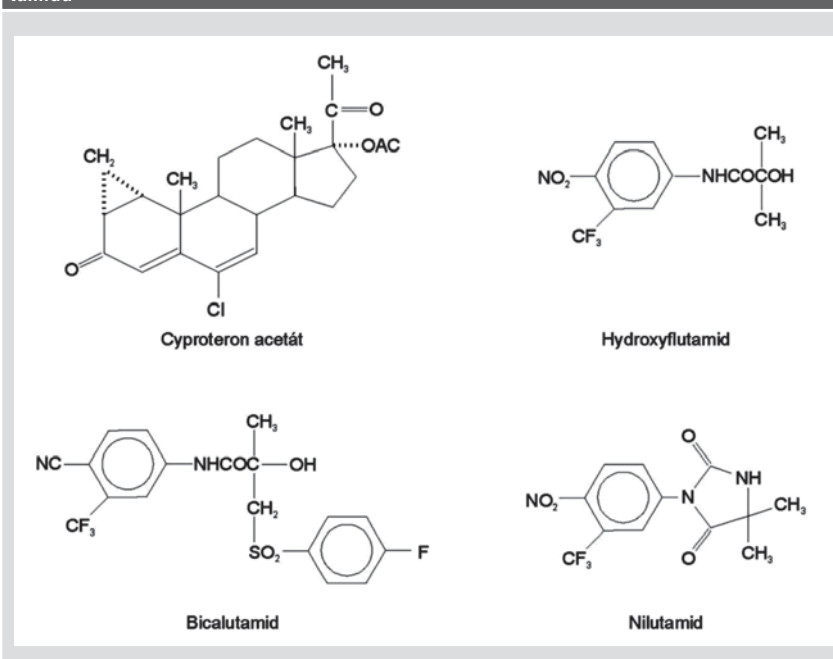
Androgen deprivation is currently the only effective systemic therapy available for metastatic prostate cancer. Monotherapy by antiandrogens represents for some patients an alternative to castration with respect to lower incidence of side effects. Advantages of antiandrogen bicalutamide include good tolerance, minimal side effects and retention of libido and sexual potency. We review the current knowledge on molecular mechanisms of bicalutamide action and discuss our results regarding telomerase activity, p53 pathway and apoptosis. In particular, the finding of activation of p53 pathway and apoptosis by higher doses of bicalutamide can lead to discussion on their usage in therapy of androgen sensitive carcinomas. Doses of bicalutamide higher than 150 mg daily are not clinically used now because they do not further decrease the levels of prostate specific antigen in comparison to castration. However, doses up to 600 mg daily are well tolerated and with respect to the discussed effects of bicalutamide, these higher doses of bicalutamide could be of bring benefit for patients with androgen sensitive carcinomas.

Key words: bicalutamide, telomerase, p53, prostate cancer.

Význam hormonální léčby karcinomu prostaty

Pacienti s rozvinutou inoperabilní rakovinou prostaty jsou obvykle léčeni androgen deprivací terapií (1). Tato hormonální terapie má za úkol snížit hladiny cirkulujících androgenů nebo blokovat účinky mužských pohlavních hormonů na úrovni androgenových receptorů. Používaná hormonální terapie představuje kastraci – chirurgickou nebo chemickou (analogy LHRH, „luteinising hormone releasing hormone“), nebo podávání antiandrogenů (steroidní cyproteron acetát a nesteroidní sloučeniny flutamid, hydroxyflutamid, nilutamid a bicalutamid, viz obrázek 1). Analogy LHRH snižují sekreci testikulárních androgenů, antiandrogeny blokují androgenový receptor, a tak inhibují účinek testosteronu a dihydrotestosteronu. K blokování efektů androgenů produkovaných nadledvinami se používá kombinace obou přístupů, tj. kastrace společně s aplikací antiandrogenů. Vzhledem k vedlejším účinkům kastrace, jako jsou ztráta libida a impotence,

Obrázek 1. Chemické struktury cyproteron acetátu, hydroxyflutamidu, bicalutamidu a nilutamidu



se alternativou u některých pacientů stává monoterapie antiandrogeny. Dobrou snášenlivost a minimum vedlejších účinků vykazuje především léčba bicalutamidem (2, 3).

Antiandrogen bicalutamid

Bicalutamid (komerční název Casodex®) je nesteroidní antiandrogen podobný jak chemickou strukturou, tak účinkem flutamidu. Chemický název je propanamid N-[4-cyano-3-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[(4-fluorophenyl)sulphonyl]-2-hydroxy-2-methyl. Jedná se o chirální sloučeninu vyskytující se ve dvou enantiomerech, přičemž R-enantiomer má asi 60× vyšší antiandrogenní kapacitu než S-enantiomer (4). Bicalutamid se v krvi vyskytuje z 99 % ve formě R-enantiomeru. Zřetelnou výhodou je dlouhý biologický poločas eliminace, který umožňuje perorální aplikaci jednou denně. Bicalutamid vykazuje nízkou rozpustnost ve vodě (5 µg/ml ~ 11,6 µM), přičemž v krvi je ho asi 95,4 % vázáno na plazmatické proteiny (5). U lidí je metabolizován a vylučován močí a stolicí ve formě konjugátů s glukuronidem, jako hydroxy-bicalutamid a také v nezměněné podobě. McKillop se spolupracovníky (6) vysvětlují extenzivní eliminaci S-enantiomeru jeho výrazně vyšší afinitou ke glukuronyl transferáze, než je tomu u R-enantiomeru. McKillop se spolupracovníky (7) v pokusech na krysách ukázali, že nedochází ke stereochemické inverzi mezi enantiomery a popsali další metabolity bicalutamidu, které vznikají po hydrolýze jeho amidové vazby. Dlouhodobá léčba 50 mg bicalutamidu denně, což je standardní dávka při kombinované androgenové blokádě, vedla k průměrné plazmatické koncentraci 21,7 µM (5). Při monoterapii 150 mg bicalutamidu denně byla průměrná plazmatická koncentrace 50,2 µM, s rozmezím od 31 µM do 105 µM (8). Kolvenbag se spolupracovníky (9) nepozoroval zvýšený výskyt vedlejších účinků ani při dávkách 600 mg denně.

Původní představa o molekulárním působení bicalutamidu předpokládala, že účinkuje jako specifický antagonist, který zabraňuje vazbě androgenového receptoru na DNA (10). Massiello se spolupracovníky (11) naproti tomu ukázali, že bicalutamid po vazbě na androgenový receptor stimuluje jeho translokaci do jádra i vazbu na androgen responzivní elementy, přičemž však nedochází k aktivaci transkripce. Bicalutamid zabraňuje jednak konformační aktivaci androgenového receptoru a také interakci s transkripčními koaktivátory SRC 1 a 2. Autoři předpokládají, že zvýšená exprese androgenového receptoru a transkripčních koaktivátorů mohou být zodpovědné za sníženou účinnost bicalutamidu u androgen nezávislých karcinomů prostaty. V léčbě androgen senzitivních karcinomů pomocí bicalutamidu může být inaktivace androgenového receptoru spo-

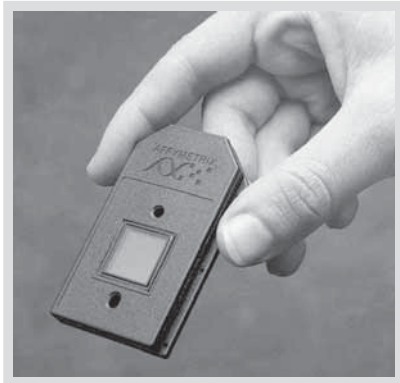
jena s aktivací apoptotického procesu (12). Aktivaci apoptózy po působení bicalutamidu jsme pozorovali i v naší práci (13). Dalším specifickým účinkem bicalutamidu byla inhibice telomerázy a aktivace proteinu p53. Tato pozorování, společně s účinkem bicalutamidu na androgen nesenzitivní buňky, jsou diskutovány dále. Mezi metody použité v naší práci patřila analýza genové exprese pomocí oligonukleotidových čipů HG-Focus Array firmy Affymetrix (obrázek 2). Ke sledování změn exprese vybraných proteinů byl použit Western blotting a viabilita buněk byla hodnocena MTT testem (MTT je zkratka pro 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) (14). Aktivita telomerázy byla měřena pomocí TRAP metody („telomere repeat amplification protocol“) (15) a exprese hTERT („human telomerase reverse transcriptase“) byla sledována kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí.

Inhibice telomerázy po působení bicalutamidu

Inhibice telomerázy po třídenním působení 80 µM bicalutamidu byla v androgen senzitivních buňkách LNCaP spojena s poklesem hladiny hTERT. Exprese této katalytické podjednotky většinou koreluje s aktivitou telomerázy (16). Inhibice telomerázy byla dále spojena s poklesem hladiny proteinu c-Myc, který byl popsán jako transkripční faktor pro hTERT (17). Bylo navíc zjištěno, že c-Myc může být v prostatických epiteliálních buňkách aktivován androgeny (18) a že proteiny rodiny Myc jsou zahrnuty do autoregulační dráhy androgenového receptoru (19). V našich experimentech jsme pozorovali mírné zvýšení telomerázové aktivity po třídenním působení 1 nM dihydrotestosteronu a 10 nM 17β-estradiolu. Podobně jako v případě bicalutamidu nedošlo k ovlivnění aktivity telomerázy po jednodenním působení hormonů, došlo však ke zvýšení hladin mRNA pro c-Myc i hTERT. To svědčí pro regulaci telomerázové aktivity přes androgenový receptor.

Snížení exprese hTERT po léčbě bicalutamidem v kombinaci s goserelin-acetátem bylo popsáno i u pacientů s karcinomem prostaty (20). Autoři provedli imunohistochemickou analýzu exprese hTERT v biopsických vzorcích před léčbou a po třicetidenní aplikaci této kombinace. V souboru třiceti pacientů zjistili po léčbě signifikantní pokles nukleární pozitivita hTERT z 36,7 % na 13,2 %. Největší pokles byl pozorován v nádorech s nejvyšším Gleasonovým skóre. Autoři již dříve zjistili korelaci vyšší exprese hTERT s nižší diferenciací nádorů a zmíněný pokles dávají do souvislosti s tímto pozorováním (21). Autoři dále předpokládají, že androgenová blokáda může být považována za antitelomerázovou terapii. Ta obvykle vede k erozi telomer a následně akti-

Obrázek 2. Oligonukleotidový čip pro analýzu genové exprese od firmy Affymetrix



vaci replikativní senescence (22). Ke zkrácení telomer dochází po opakovaných cyklech replikace, zatímco androgenová deprivace vede k zástavě buněčného cyklu (23, 24). Přikládáme se proto k názoru Guo a spolupracovníků (25), že inhibice telomerázy po androgenové blokádě nepřispívá k nádorové regresi. Účinnější antitelomerázové terapie mohou být založeny na specifické inhibici tohoto enzymu, případně na technologiích využívajících vysokou expresi telomerázy v nádorových buňkách (26). Slibnými se jeví například imunizace peptidy hTERT (27, 28) nebo využití genových konstruktů, které obsahují pod promotorem pro hTERT virové nebo apoptotické proteiny, které způsobí selektivní smrt nádorových buněk (29–31). Řada prací popisuje zvyšující se telomerázovou aktivitu během vývoje karcinomů prostaty, což může mít význam také pro diagnostiku i prognózu onemocnění (32–37).

Aktivace proteinu p53 po působení bicalutamidu

Vedle snížení exprese androgeny regulovaných genů, jako jsou geny pro prostatický specifický antigen, kalikrein 2 a prostatickou kyselou fosfatázu, došlo v androgen senzitivních buňkách LNCaP po působení 80 µM bicalutamidu k indukci genů regulovaných p53. Aktivace p53 pravděpodobně nesouvisí s poškozením DNA, protože genotoxické testy prováděné in vitro i in vivo byly i při užití vyšších koncentrací bicalutamidu negativní (38). Působení 80 µM bicalutamidu bylo spojeno s částečným štěpením proapoptotické procaspázy 3 a proteinu PARP. Mírnější změny uvedených proteinů byly pozorovány i po působení 50 µM bicalutamidu, což odpovídá léčbě pacientů v dávce 150 mg denně (8). Vyšší dávky bicalutamidu se v klinické praxi nepoužívají, protože nezpůsobují další pokles hladin prostatického specifického antigenu (9). Vzhledem k dobré snášenlivosti bicalutamidu v dávkách až 600 mg denně a k diskutované výraznější odpovědi na 80 µM bicalutamidu předpokládáme, že léčba vyššími dávkami by mohla mít klinický význam. Naše pozorování

jsou v souladu s prací Lee a spolupracovníků (12), kteří u buněk LNCaP zjistili po dvoudenním působení 100 μ M bicalutamidu aktivaci nejen caspázy 3, ale i caspázy 8. Autoři pozorovali také uvolnění cytochromu c do cytoplazmy, což bylo v 80 % buněk spojeno se štěpením a translokací proteinu Bax z cytoplazmy do mitochondrií. Práce dále ukázala, že některé buňky jsou schopny přežít působení bicalutamidu a mohou tak poskytnout základ pro další vývoj nádoru. Intenzivnější androgenová blokáda je tak pravděpodobně schopna oddálit vznik rezistentních karcinomů, ale nedokáže tomu zcela zabránit.

Inhibice viability androgen senzitivních i nesenzitivních buněk

V rámci studia bicalutamidu jsme testovali jeho působení jak na androgen senzitivní (LNCaP), tak na androgen nesenzitivní (DU145) buněčné linie pomocí testu viability MTT. V rozporu s obecnou představou bicalutamidu jako specifického antiandrogenu, jsme pozorovali jeho výrazný inhibiční vliv i na buňky DU145. Inhibice viability bicalutamidem byla pozorována především při kultivaci buněk DU145 v nízké konfluenci. Buňky DU145 rostoucí ve vysoké hustotě vykazovaly nižší citlivost k bicalutamidu, což je v souladu s klinickými zkušenostmi, kdy léčba bicalutamidem nevede k prodloužení doby přežití pacientů s karcinomy nezávislými na androgenech (39, 40) a u nemocných se vzdálenými metastázami (41). Naše mikročipová analýza zjistila, že více jak polovina genů, jejichž exprese se mění u vysoce konfluentních buněk DU145 necitlivých na androgeny, byla změněna i u androgen senzitivních buněk LNCaP. Biologický význam změn expresních profilů zatím nelze automaticky analyzovat v celé šíři (42). Pomocí internetových databází jsme se alespoň pokusili zjistit biologickou funkci genů s nejvíce změněnou expresí v obou liniích, s cílem definovat biologické procesy ovlivněné bicalutamidem. Mezi tyto geny patřily geny kódující proteiny calmegin a DNAJB9, které mají chaperonovou aktivitu. Můžeme proto spekulovat, že jejich zvýšená exprese po působení bicalutamidu může souviset s buněčným stresem. Pokles hladin mRNA pro rabkinesin 6, který je zapojen do intracelulárního transportu pomocí kinesinového komplexu, může souviset s vlivem bicalutamidu na tento proces. V obou liniích došlo ke snížení exprese reduktázy ribonukleotidů M2, která je zahrnuta do DNA syntézy, což je v souladu se zástavou proliferace po ovlivnění bicalutamidem. Význam zvýšené exprese transportního proteinu pro aminokyseliny SLC7A11 je nejasný a funkce proteinu niban není zatím vůbec známa. Objasnění významu změn v expresi jednotlivých genů po

působení bicalutamidu bude vyžadovat další analýzy.

Závěr

V naší práci jsme popsali c-Myc protein jako chybějící článek v regulaci hTERT přes androgenový receptor. Inhibice telomerázové aktivity po působení bicalutamidu však pravděpodobně nemá klinický význam, protože dochází zároveň k zástavě proliferace a nemůže tak dojít ke zkracování telomer a indukcí procesu replikativní senescence. Klinický význam může naopak mít aktivace dráhy proteinu p53 po působení 80 μ M bicalutamidu. Aktivace proteinu p53 a indukce apoptózy byla pozorována v menší míře i po působení 50 μ M bicalutamidu což odpovídá léčbě 150 mg denně. I vyšší dávky bicalutamidu jsou pacienti dobře snášeny a jejich použití by mohlo zlepšit léčbu androgen senzitivních karcinomů.

Literatura

1. Denis LJ, Griffiths K. Endocrine treatment in prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 2000; 18: 52–74.
2. Schellhammer PF. An evaluation of bicalutamide in the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2002; 3: 1313–1328.
3. Anderson J. The role of antiandrogen monotherapy in the treatment of prostate cancer. *BJU Int* 2003; 91: 455–461.
4. Tucker H, Chesterson GJ. Resolution of the nonsteroidal antiandrogen 4'-cyano-3-[(4-fluorophenyl)sulfonyl]-2-hydroxy-2-methyl-3'-(trifluoromethyl)-propionanilide and the determination of the absolute configuration of the active enantiomer. *J Med Chem* 1988; 31: 885–887.
5. Cockshott ID, Cooper KJ, Sweetmore DS, Blacklock NJ, Denis L. The pharmacokinetics of Casodex in prostate cancer patients after single and during multiple dosing. *Eur Urol* 1990; 18 (Suppl 3): 10–17.
6. McKillop D, Simons PJ, Cockshott ID, et al. Enantioselective metabolism and pharmacokinetics of Casodex in the male rat. *Xenobiotica* 1995; 25: 623–633.
7. McKillop D, Boyle GW, Cockshott ID, Jones DC, Phillips PJ, Yates RA. Metabolism and enantioselective pharmacokinetics of Casodex in man. *Xenobiotica* 1993; 23: 1241–1253.
8. Tyrrell CJ, Denis L, Newling D, Soloway M, Channer K, Cockshott ID. Casodex 10-200 mg daily, used as monotherapy for the treatment of patients with advanced prostate cancer. An overview of the efficacy, tolerability and pharmacokinetics from three phase II dose-ranging studies. *Casodex Study Group. Eur Urol* 1998; 33: 39–53.
9. Kolvenbag GJ, Blackledge GR, Gotting-Smith K. Bicalutamide (Casodex) in the treatment of prostate cancer: history of clinical development. *Prostate* 1998; 34: 61–72.
10. Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, et al. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69: 307–313.
11. Masiello D, Cheng S, Buley GJ, Lu ML, Balk SP. Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 26321–26326.
12. Lee EC, Zhan P, Schallhorn R, Packman K, Tenniswood M. Antiandrogen-induced cell death in LNCaP human prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 2003; 10: 761–771.
13. Bouchal J, Baumforth KRN, Svachova M, Murray PG, von Angerer E, Kolar Z. Microarray analysis of bicalutamide action on telomerase activity, p53 pathway and viability of prostate carcinoma cell lines. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57: 83–92.
14. Romijn JC, Verkoelen CF, Schroeder FH. Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-induced cytostatic and cytotoxic effects. *Prostate* 1988; 12: 99–110.
15. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011–2015.
16. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002; 21: 564–579.
17. Oh S, Song YH, Kim UJ, Yim J, Kim TK. In vivo and in vitro analyses of Myc for differential promoter activities of the human telomerase (hTERT) gene in normal and tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 361–365.
18. Silva IS, Morsch DM, Urnauer L, Spritzer PM. Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocr Res* 2001; 27: 153–169.
19. Grad JM, Dai JL, Wu S, Burnstein KL. Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1896–1911.
20. Iczkowski KA, Huang W, Mazzucchelli R, Pantazis CG, Stevens GR, Montironi R. Androgen ablation therapy for prostate carcinoma suppresses the immunoreactive telomerase subunit hTERT. *Cancer* 2004; 100: 294–299.
21. Iczkowski KA, Pantazis CG, McGregor DH, Wu Y, Tawfik OW. Telomerase reverse transcriptase subunit immunoreactivity: a marker for high-grade prostate carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 2487–2493.
22. Wynford-Thomas D. Cellular senescence and cancer. *J Pathol* 1999; 187: 100–111.
23. Tsuji M, Murakami Y, Kanayama H, Sano T, Kagawa S. Immunohistochemical analysis of Ki-67 antigen and Bcl-2 protein expression in prostate cancer: effect of neoadjuvant hormonal therapy. *Br J Urol* 1998; 81: 116–121.
24. Matsushima H, Goto T, Hosaka Y, Kitamura T, Kawabe K. Correlation between proliferation, apoptosis, and angiogenesis in prostate carcinoma and their relation to androgen ablation. *Cancer* 1999; 85: 1822–1827.
25. Guo C, Armbruster BN, Price DT, Counter CM. In vivo regulation of hTERT expression and telomerase activity by androgen. *J Urol* 2003; 170: 615–618.

nomů. V naší práci jsme také pozorovali na androgenovém receptoru nezávislý účinek bicalutamidu na buňky DU145 rostoucí v nízké konfluenci. Pokud byly androgen nesenzitivní buňky DU145 kultivovány ve vysoké konfluenci, tak vykazovaly vyšší odolnost k bicalutamidu, což je v souladu s neúčinností tohoto antiandrogenu v léčbě androgen nesenzitivních karcinomů prostaty. Mikročipová analýza odhalila, že část genů byla podobně změněna jak v LNCaP tak DU145 buňkách, což ukazuje na další účinky bicalutamidu, které jsou nezávislé na androgenovém receptoru. Mikročipová data jsme poskytli dalším pracovním a doufáme, že budou ověřena in vivo podobně jako v případě inhibice telomerázy bicalutamidem (43, 20).

Poděkování: Tato práce byla částečně podpořena granty NC 7497-3; MSM 151100001 a MSM 6198959216.

26. Lavelle F, Riou JF, Laoui A, Mailliet P. Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34: 111–126.
27. Minev B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Langlade-Demoyen P, Zanetti M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4796–4801.
28. Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 828–839.
29. Lanson NA, Friedlander PL, Schwarzenberger P, Kolls JK, Wang G. Replication of an adenoviral vector controlled by the human telomerase reverse transcriptase promoter causes tumor-selective tumor lysis. *Cancer Res* 2003; 63: 7936–7941.
30. Koga S, Hirohata S, Kondo Y, Komata T, Takakura M, Inoue M, Kyo S, Kondo S. A novel telomerase-specific gene therapy: gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1397–1406.
31. Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Hirohata S, Koga S, Sumiyoshi H, Srinivasula SM, Barna BP, Germano IM, Takakura M, Inoue M, Alnemri ES, Shay JW, Kyo S, Kondo S. Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter. *Cancer Res* 2001; 61: 5796–5802.
32. Koenenman KS, Pan CX, Jin JK, Pyle JM, Flanigan RC, Shankey TV, Diaz MO. Telomerase activity, telomere length, and DNA ploidy in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). *J Urol* 1998; 160: 1533–1539.
33. Kamradt J, Drosse C, Kalkbrenner S, Rohde V, Lensch R, Lehmann J, Fixemer T, Bonkhoff H, Stoeckle M, Wullich B. Telomerase activity and telomerase subunit gene expression levels are not related in prostate cancer: a real-time quantification and in situ hybridization study. *Lab Invest* 2003; 83: 623–633.
34. Liu BC, LaRose I, Weinstein LJ, Ahn M, Weinstein MH, Richie JP. Expression of telomerase subunits in normal and neoplastic prostate epithelial cells isolated by laser capture microdissection. *Cancer* 2001; 92: 1943–1948.
35. Wang Z, Ramin SA, Tsai C, Lui P, Ruckle HC, Beltz RE, Sands JF. Telomerase activity in prostate sextant needle cores from radical prostatectomy specimens. *Urol Oncol* 2001; 6: 57–62.
36. Wymenga LF, Wisman GB, Veenstra R, Ruiters MH, Mensink HJ. Telomerase activity in needle biopsies from prostate cancer and benign prostates. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 330–335.
37. Ruijter E, Montironi R, van de Kaa C, Schalken J. Molecular changes associated with prostate cancer development. *Anal Quant Cytol Histol* 2001; 23: 67–88.
38. Iswaran TJ, Imai M, Betton GR, Siddall RA. An overview of animal toxicology studies with bicalutamide (ICI 176,334). *J Toxicol Sci* 1997; 22: 75–88.
39. Balk SP. Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer. *Urology* 2002; 60: 132–138.
40. Oh WK. Secondary hormonal therapies in the treatment of prostate cancer. *Urology* 2002; 60: 87–92.
41. Tyrrell CJ, Kaisary AV, Iversen P, Anderson JB, Baert L, Tammela T, Chamberlain M, Webster A, Blackledge G. A randomised comparison of 'Casodex' (bicalutamide) 150mg monotherapy versus castration in the treatment of metastatic and locally advanced prostate cancer. *Eur Urol* 1998; 33: 447–456.
42. Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 951–960.
43. Bouchal J, Kolar Z, Mad'arova J, Hlobilkova A, von Angerer E. The effects of natural ligands of hormone receptors and their antagonists on telomerase activity in the androgen sensitive prostatic cancer cell line LNCaP. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 1177–1181.