

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Urologische Klinik und Poliklinik Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend)

**Einfluß von Imatinib, Etoposid und Docetaxel in der Monotherapie und in  
Kombination mit Strahlentherapie auf die Proliferation von  
Prostatakarzinomzellen**

Nadine Jutta Stadler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend 2. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel

Die Dissertation wurde am 22.08.2012 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 17.09.2014 angenommen.

*Meinen Eltern gewidmet*

1. Einleitung.....	1
1.1. Klinische Aspekte des hormonrefraktären Prostatakarzinoms .....	1
1.1.1. Inzidenz und Ätiologie .....	1
1.1.2. Hormontherapie des Prostatakarzinoms .....	4
1.1.3. Entstehung der Hormonresistenz .....	9
1.2. Grundlagen der Therapie maligner Erkrankungen .....	11
1.2.1. Chemotherapie .....	11
1.4. Zielsetzung der Arbeit .....	16
2. Material und Methoden .....	18
2.1. Die Zelllinien .....	18
2.1.1. LNCaP .....	18
2.1.2. DU145 .....	19
2.1.3. PC3 .....	20
2.2. Zytostatika.....	21
2.2.1. Etoposid (VP-16) .....	21
2.2.2. Docetaxel .....	23
2.2.3. Imatinib.....	25
2.3. Geräte und Arbeitsmittel .....	27
2.3.1. Geräte .....	27
2.3.2. Arbeitsmittel.....	28
2.4. Medien, Puffer, Lösungen .....	28
2.5. Zellkultivierung .....	30
2.5.1. Kulturbedingungen und sterile Arbeitsbedingungen .....	30
2.5.2. Mykoplasmentest.....	31
2.5.3. Subkultivierung/Splitten .....	31
2.5.4. Medienwechsel.....	33
2.5.5. Zellbevorratung, Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
2.6. Versuchsdurchführung .....	34
2.6.1. Versuchsplanung und -vorbereitung.....	34
2.6.2. Bestrahlung .....	35
2.6.3. Zytostatikabehandlung .....	36
2.6.4. Kombinierte Zytostatika- und Strahlenapplikation.....	37
2.6.5. XTT- Test (Zytotoxizitätstest).....	38
2.6.6. Statistische Methoden und Darstellung .....	39
3. Ergebnisse.....	42
3.1. Dosiseffektkurven und IC50 nach Zytostatikamonotherapie .....	42
3.1.1. Imatinib.....	43
3.1.2. Docetaxel .....	46
3.1.3. Etoposid .....	50
3.2. Modulation der Zellproliferation durch die Kombination von Chemotherapie und Radiatio.....	54
3.2.1. Docetaxel + Bestrahlung, jeweils am Tag 1.....	54

3.2.2. Imatinib + Bestrahlung, jeweils am Tag 1 .....	56
3.2.3. Etoposid (Tag 2) + Bestrahlung (Tag 1) .....	58
3.2.4. Imatinib (Tag 1) + Bestrahlung (Tag 3).....	60
3.2.5. Docetaxel (Tag 1) + Bestrahlung (Tag 3) .....	62
3.2.6. Etoposid (Tag 1) + Bestrahlung (Tag 3) .....	65
3.2.7. Bestrahlung (Tag 1) + Imatinib (Tag 3).....	67
3.2.8. Bestrahlung (Tag 1) + Docetaxel (Tag3) .....	69
3.2.9. Bestrahlung (Tag 1) + Etoposid (Tag3) .....	71
3.3. Vergleich der unterschiedlichen Kombinationen .....	73
3.3.1. Imatinib.....	73
3.3.1.1. LNCaP .....	73
3.3.1.2. DU 145.....	75
3.3.1.3. PC3.....	77
3.3.2. Etoposid .....	79
3.3.2.1. PC3.....	79
3.3.2.2. LNCaP .....	81
3.3.2.3. DU145.....	83
3.3.3. Docetaxel .....	85
3.3.3.1. DU145.....	85
3.3.3.2. LNCaP .....	87
3.3.3.3. PC3.....	89
4. Diskussion .....	91
4.1. Methodik .....	91
4.2. Strahlentherapie.....	92
4.3. Zytostatika.....	94
4.4. Kombinationstherapie - Strahlentherapie und Chemotherapie.....	96
5. Zusammenfassung .....	100
6. Abbildungsvezeichnis .....	103
7. Tabellenverzeichnis .....	106
8. Abkürzungsverzeichnis.....	109
9. Literaturverzeichnis .....	110
10. Danksagung .....	125
11. Lebenslauf .....	126

## **1. Einleitung**

### **1.1. Klinische Aspekte des hormonrefraktären Prostatakarzinoms**

#### **1.1.1. Inzidenz und Ätiologie**

In den westlichen Industrieländern ist das Prostatakarzinom inzwischen der am häufigsten auftretende Tumor beim Mann, die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache und macht etwa 19% aller bösartigen Neubildungen bei Männern aus. So erkranken in Deutschland mittlerweile jährlich mehr als 32.000 Männer neu an einem Prostatakarzinom. Es ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters mit einem mittleren Erkrankungsalter von 69 Jahren.

Vor allem in den letzten Jahren sind in der Frühdiagnostik des Prostatakarzinoms, vor allem durch die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA), große Fortschritte erzielt worden (Wolff, 2009).

Trotz dieser immer besser werdenden Früherkennung befinden sich jedoch rund 40% der Prostatakarzinome zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium (Noldus, 2000). Da die Therapieergebnisse hier meist sehr schlecht sind und mit einer hohen Progressionsrate zu rechnen ist, stellt dieses Stadium nach wie vor eine große Herausforderung dar.

Bereits seit den Berichten von Huggins und Hodges (1941) ist bekannt, dass ein Prostatakarzinom durch die Suppression des Serum-Testosteron-Spiegels, also durch einen Androgenentzug, vorübergehend in seinem Fortschreiten eingedämmt werden kann. In der Regel verbessert sich dadurch auch die Symptomatik der behandelten Patienten und die Patienten können so über einen gewissen Zeitraum gut und effektiv behandelt werden.

Früher oder später versagt jedoch diese primäre Androgendeprivation, d.h. das Prostatakarzinom wird hormonrefraktär (Abrahamsson, 2003). Über einen mittleren Zeitraum von etwa 18-24 Monaten entwickelt sich das diagnostizierte und bereits fortgeschrittene Prostatakarzinom von einem hormonabhängigen und hormonempfindlichen zu einem hormonunabhängigen und hormonunempfindlichen Tumor. Dieser Übergang ist trotz adäquater Androgensuppression an einem stetig

ansteigenden PSA - Wert zu erkennen. Zur Veranschaulichung soll folgende Tabelle dienen:

1.) Initialstadium

Der Tumor ist *androgen- und hormonsensitiv*

Klinische Bedeutung: Der Tumor spricht also auf eine Androgendeprivation an (Scherr, 1996).

2.) Zwischenstadium

Der Tumor ist *androgeninsensitiv und hormonsensitiv*

Klinische Bedeutung: Der Tumor wächst unter Androgenblockade, ist jedoch durch Wechsel der Hormonbehandlung zu beeinflussen (Antiandrogenentzugssyndrom).

Das Tumorwachstum kann außerdem durch Androgene stimuliert werden (Scherr, 1996).

3.) Endstadium

Der Tumor ist *androgen- und hormoninsensitiv*

Klinische Bedeutung: Der Tumor spricht auf eine Hormonbehandlung nicht mehr an (Scherr, 1995). Der Testosteronspiegel sollte trotzdem im Kastrationsbereich liegen.

Obiges Schema kategorisiert also den Tumor entsprechend seines hormonellen Ansprechens. Diese Klassifikation mag vorteilhaft sein, sie unterschätzt jedoch die klinische Heterogenität des hormonrefraktären Prostatakarzinoms.

Die Literatur verwendet den Begriff des hormonrefraktären Prostatakarzinoms (HRPC) sowohl für androgeninsensitive aber noch hormonsensitive sowie hormoninsensitive Tumoren.

Allgemein kann man sagen, dass Hormonunempfindlichkeit immer dann vorliegt, wenn das Prostatakarzinom durch eine Hormonbehandlung nicht mehr zu beeinflussen ist. Die mittlere Überlebenszeit der Patienten in diesem Krankheitsstadium liegt dann meist nur noch bei 12-16 Monaten, bei vorliegenden Metastasen sogar nur noch bei 6-9 Monaten (Iversen 2003).

Um auch Patienten mit einem fortgeschrittenen Stadium ihrem Krankheitsstatus entsprechend einzustufen, entstand nach Crawford und Blumenstein (1997) folgendes Klassifizierungsschema:

### **Stadium**

- D1: pelviner Lymphknotenbefall
- D1.5 : PSA- Anstieg nach lokaler Therapie
- D2: Metastasen (ossäre, viszeral)
- D2.5: PSA- Anstieg nach PSA-Nadir
- D3: androgeninsensitives Prostatakarzinom
- D3.5: hormonsensitiv
- D4: hormoninsensitiv

Die Ergebnisse zeigen, dass gerade für Patienten im hormonrefraktären Stadium neue Therapieansätze entwickelt werden müssen. Zur Zeit existiert noch kein Therapieansatz, mit dem eine Heilung erzielt werden kann, auch konnte bisher mit keiner Therapie eine Lebensverlängerung erzielt werden.

### 1.1.2. Hormontherapie des Prostatakarzinom

Der Androgenentzug stellt die derzeitige Standardtherapie des primär metastasierenden oder lokal weit fortgeschrittenen, inoperablen und nicht mehr kurativ therapierbaren Prostatakarzinoms dar. Die mediane progressionsfreie Zeit bei Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom unter Hormontherapie beträgt 2 Jahre (Eisenberger 1998, Abrahamson 2003), bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom 3-5 Jahre (Small 1999, Abrahamson 2003).

Um den Einsatz von hormonellen Therapieverfahren zu verstehen, muß man wissen, dass die körpereigenen Hormone Testosteron, Dehydroepiandrosteron und Androstendion einen wachstumsfördernden Einfluß auf die Prostatazelle ausüben. Ihre Wirkungen vermitteln diese Hormone über den Androgenrezeptor. Ziel jeder Hormontherapie ist somit eine Senkung der körpereigenen Androgenproduktion oder die Blockade der Androgenrezeptoren im Tumor, um so die Proliferation der Tumorzellen zu inhibieren.

Diese körpereigene Produktion der „prostatarelevanten“ Androgene, speziell des Testosterons, findet beim Mann zu etwa 90% in den Hoden und zu ca. 10% in der Nebenniere statt.

Sie wird in den sogenannten Leydig-Zwischenzellen des Hoden des Mannes durch das luteotrope Hormon (LH) stimuliert und erfolgt durch eine Umwandlung von Hydroxyprogesteron zu Androstendion und schließlich Testosteron. Um wiederum diese LH- Ausschüttung zu koordinieren dient das im übergeordneten Hypothalamus pulsatil freigesetzte Luteinisierende Hormon Releasing Hormon (LNRH).

Das wichtige Androgen der Nebenniere ist das Dihydroepiandrosteron (DHEA), das auch zu Testosteron umgewandelt werden kann. Seine Bildung in der Nebennierenrinde wird durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), ein gonadotropes Proetehormon, stimuliert. Als übergeordneter Stimulus für dessen Ausschüttung dient hierzu das in der Hypophyse gebildete Corticotropin-Releasing-Hormon(CRH).

Das zu den Steroidhormonen zählende Testosteron bildet mit dem Androgenrezeptor auf der Prostatazellmembran einen Komplex, der nun von der Zelle aufgenommen werden kann. Damit dieses Testosteron schließlich intrazellulär wirken kann, wird es



durch die 5-alpha- Reductase zu dem stark wirksamen Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung androgenabhängiger Gene, die schließlich zur eigentlichen Gewebsproliferation beitragen und das Tumorwachstum stark anregen.

Hieraus leiten sich die unterschiedlichen Ansatzpunkte für eine Hormontherapie beim Prostatakarzinom ab (Wolff, 2009).

### **Hormonelle Therapieformen**

Die Beeinflussung bzw. eine Ausschaltung dieser körpereigenen Hormonproduktion kann auf unterschiedliche Weise erreicht werden:

- durch eine **operative Entfernung** der hormonbildenden Organe, wie dem Hodengewebe (plastisch, bilaterale Orchiectomie) oder der Hoden (radikale Orchiectomie ). Dies stellt eine relativ einfache und sichere Methode einer Androgendeprivation dar, und galt vor Einführung der LHRH-Analoga als Standardverfahren des Androgenentzugs.
- durch die Gabe von Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon (**LHRH-Analoga (Agonisten)**) kann auch das Kastrationsniveau erreicht werden, und damit ist der Therapieerfolg dem der Orchiectomie oder Östrogentherapie gleichzusetzen, solange die Medikation kontinuierlich fortgeführt wird. Diese Analoga, wie zum Beispiel Buserelin, Goserelin oder Leuprorelin, weisen im Vergleich zum natürlichen LHRH eine höhere Affinität zu den LHRH-Rezeptoren auf und haben gleichzeitig eine bessere Beständigkeit gegenüber abbauenden Enzymen. Wie bereits beschrieben, stimuliert LHRH die Gonadotropinausschüttung (LH, FSH) aus dem Hypophysenvorderlappen. Verabreicht man dem Patienten nun LHRH-Analoga kommt es anfangs zu einer Freisetzung von großen Mengen LH und FSH und damit zu erhöhten Testosteronsynthese. Daher sollte auch zu Beginn dieser Therapieform mit einem Antiandrogen vorbehandelt werden. Nach längerer Anwendung kommt es dann aber über eine Desensitivierung, Rezeptorverlust und

Wirkungsblockade zum Versiegen der LH- und FSH-Sekretion. So kann nach ca. dreiwöchiger Anwendung der Analoga ein Sistieren der Testosteronproduktion in den Leydigzellen des Hodens erreicht werden. Durch ihre hochspezifische Wirkung auf die hypophysäre Freisetzung von LH und FSH kommt es zu keinerlei Beeinflussung der übrigen hypophysären Hormone. Dieses System ist zudem jederzeit reversibel.

Bei der medikamentösen Kastration ist mit den gleichen Nebeneffekten wie bei der Orchiektomie zu rechnen, wie zum Beispiel mit Hitzewallungen in etwa 70% der Fälle, Libido- und Potenzverlust, Osteoporose und selten Spannungsschmerz in der Brust. Langfristig kann sich eine Hodenatrophie ausbilden.

Verglichen mit der Orchiektomie ist die medikamentöse Kastration kostenintensiver und bedarf einer guten Compliance des Patienten, um einen Therapieerfolg zu sichern (Wolff, 2009).

- durch eine **Gabe von Antiandrogenen (Androgenrezeptorantagonisten)** wird die Wirkung von Androgenen an der Prostatazelle neutralisiert. Die kompetitive Blockade von Hormonrezeptoren führt dazu, dass körpereigene Hormone nicht mehr an die Rezeptoren binden können und somit keine Signalkaskade mehr ausgelöst werden kann. Man unterscheidet steroidale (Cyproteronacetat) und nicht-steroidale Antiandrogene (Flutamid, Nilutamid, Bicalutamid). Cyproteronacetat hat aufgrund seines steroidalen Charakters auch eine gestagene und somit auch antigonadotrope Wirkung auf den Hypothalamus. Es führt zu einer Reduktion der LH - Ausschüttung und damit zu einem Absinken des Testosteronspiegels im Serum. Im Gegensatz dazu supprimieren die nicht-steroidalen Antiandrogene die Testosteronsynthese nicht, da sie reine Androgenrezeptorblocker sind. Libido und erektile Potenz bleiben initial vorhanden.
- durch eine **maximale Androgenblockade**, die eine medikamentöse oder chirurgische Kastration kombiniert mit der zusätzlichen Gabe eines Antiandrogens. Durch diese noch zusätzliche Einnahme des Antiandrogens wird auch das in der Nebenniere produzierte Testosteron an der Prostatazelle blockiert.

- durch **Östrogentherapie**: Der wesentliche Angriffspunkt der endokrinen Therapie mit gegengeschlechtlichen Hormonen wie Östrogenen beim Prostatakarzinom besteht in einer Hemmung der LH-Freisetzung aus der Hypophyse. Es kommt zu einem Konzentrationsabfall der körpereigenen Geschlechtshormone bis auf Kastrationsniveau. Aufgrund der vielen Nebenwirkungen, wie kardiovaskuläre und hepatische Toxizität, stellen sie nicht mehr die primäre hormonelle Therapieform dar (Hedlund, 2000; Waymond, 1992).

Das Tumorwachstum kann durch eine Hormontherapie nur über einen begrenzten Zeitraum kontrolliert werden, eine Tumorprogression (entsprechend einem androgeninsensitivem Prostatakarzinom), die z.B. durch einen steigenden PSA - Wert oder auch durch das Auftreten von Metastasen gekennzeichnet ist, ist letztendlich unvermeidbar.

### **Sekundäre Hormonmanipulation beim hormonrefraktären Prostatakarzinom**

Man unterscheidet hier:

- die zusätzliche Gabe oder auch Wechsel eines Antiandrogens
- den Antiandrogenentzug
- Behandlung mit Steroiden
- Inhibition der adrenalen Steroidsynthese

### **Gabe eines Antiandrogens (MAB: Maximale Androgenblockade) und Antiandrogenentzug**

Nach Kucuk (2001) und Fowler (1995) profitieren 80% der Patienten mit einem lokalisierten Karzinom und 54% der Patienten mit einem metastasierten Karzinom, die vorher mit einer primären Hormontherapie behandelt wurden und einen Progress ihrer Erkrankung erfahren,, von einer Änderung der Monotherapie in eine maximale Androgenblockade durch die zusätzliche Gabe eines Antiandrogens.

Nach Datenlage einiger Studien (Scher, 1995; Huan, 1997; Schellhammer, 1997) profitieren wiederum ca. 30% der Patienten, die auch unter MAB ein PSA - Rezidiv erfahren, von einem Entzug des Antiandrogens („Antiandrogenentzugssyndrom“) und zeigen vorübergehend einen erneuten PSA- Abfall.

### **Wechsel des Antiandrogens**

Nach Studien von Scher (1997) zeigen Patienten die sekundär mit einem anderen Antiandrogen (z.B. Bicalutamid im Austausch für Flutamid) behandelt wurden in 40% einen signifikanten PSA- Abfall und profitieren somit von einem Wechsel des Antiandrogens. Dies mag daran liegen, dass die einzelnen Antiandrogene unterschiedlich mit dem Androgenrezeptor reagieren.

### **Steroide**

Bereits seit Jahren kommt Kortison beim hormonrefraktären Prostatakarzinom im Sinne einer Palliation zu Einsatz. Nach Studienergebnissen von Tannock 1996 zeigen jedoch 20% der Patienten, die mit Prednisolon behandelt wurden, einen signifikanten PSA- Abfall. Ähnliche Erkenntnisse ergaben sich auch nach einem vorausgegangenen Antiandrogenentzugssyndrom (Kelly, 1995; Dawson, 1995).

### **Inhibition der adrenalen Steroidsynthese**

Zirka 3-5% des peripheren Testosterons wird durch die Nebennieren produziert. Diese Androgene sollen zu einer zusätzlichen Stimulation der Tumorzellen führen (Labrie, 1993). Durch den Einsatz von adrenalen Androgeninhibitoren (z.B. Ketokonazol, Liarozol, usw.), die zu einer funktionellen Adrenalektomie führen, sollen teilweise Ansprechraten von 30 bis 60% erzielt worden sein (Sartor, 1994; Small, 1997)

### **1.1.3. Entstehung der Hormonresistenz**

Nach unserem heutigen Verständnis führen folgende, nur cursorisch in diversen Studien erforschte (Koivisto, 1997; Visakorpi, 1995; Hobisch, 1995) Mechanismen zu einer Hormonunabhängigkeit des Prostatakarzinoms:

#### **Theorie der klonalen Selektion**

Beim Prostatakarzinom handelt es sich um einen heterogenen Tumor, das heißt er besteht primär bereits aus hormonabhängigen als auch aus hormonunabhängigen Tumorzellen (Isaacs, 1991; Logothetis, 1994). Erfolgt nun der Androgenentzug, kommt es zur Apoptose (programmierter Zelltod) der hormonabhängigen Zellen und somit zu einer Reduktion des Tumorwachstums. In einem Modell an Ratten und in der LNCaP- Zelllinie konnte bereits gezeigt werden, dass das Prostatakarzinom wohl zusätzlich aus hormonunabhängigen Zellen besteht, die unter Androgenablation weiterwachsen. Vermutlich führt also die Androgenablation zu einem Selektionsvorteil der androgenunabhängigen Zellen (Tang, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine primäre Androgenablation zu einer Veränderung der Zusammensetzung der eigentlichen Stammzellen führt. Am Shionogi-Karzinommodell wurde gezeigt, dass sich nach einer Androgenablation der Anteil der hormonunabhängigen Stammzellen um den Faktor 500 erhöht war. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Hormontherapie selbst bereits einen Selektionsfaktor zur vermehrten Ausbildung hormonunabhängiger Zellen darstellen könnte (Bruchovsky, 1990).

#### **Adaptionstheorie**

Sie geht von homogenen hormonsensiblen Zellklonen im Prostatakarzinom aus, die in der Lage sind sich nach einer primären Androgenblockade an ein androgenarmes Milieu zu adaptieren. Somit kommt es dann vermutlich zu einem Tumorprogress. Nach Labrie (1982) kann eine vollständige Therapie deshalb nur durch eine komplette Androgenblockade erreicht werden, die nicht nur das Blockieren der testikulären, sondern auch der adrenalen Androgene beinhaltet. Die Heterogenität des Prostatakarzinoms und die genetische Instabilität werden bei diesem Modell

allerdings vernachlässigt. Es resultieren daraus unterschiedliche Phänotypen der Tumorzellen (Isaacs, 1982; Stamey, 1988).

### **Mutation und Amplifikation des Androgenrezeptors**

Auch Veränderungen auf dem sogenannten Androgenrezeptor-Gen, welches auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, können zur Hormonunabhängigkeit führen. Mutationen eines Allels führen hierbei zu funktionellen Veränderungen des Rezeptors (Taplin, 1995). So konnten bereits Elo (1995) Punktmutationen bei einem Grossteil der Tumorzellen nach einer initialen Androgenablation nachweisen. Eine funktionelle Analyse dieser mutierten Rezeptoren wies schließlich eine Beeinflussung durch Östrogene und Progesteron auf, aber nicht mehr durch Androgene.

Auch andere Arbeitsgruppen beschreiben mittlerweile ebenfalls weitere Mutationen dieses Androgenrezeptors, wobei hier die Häufigkeit von Mutationen, je nachdem ob es sich um einen Primärtumor oder um Metastasen handelt, unterschiedlich gesehen wird. So ist die Häufigkeit der Mutationen beim Primärtumor eher gering, bei Metastasen liegt sie allerdings bei nahezu 50%. Dies zeigt die Bedeutung der Alteration des Androgenrezeptors für eine Progression des Prostatakarzinoms (Taplin, 1995). Erst 2003 konnten Hara et al. in vitro zeigen, dass unter einer Behandlung von Krebszellen mit dem Antiandrogen Bicalutamid Mutationen stattfanden, die dazu führten, dass Bicalutamid als Androgenrezeptoragonist wirkt. Flutamid dagegen, ein nicht-steroidales Antiandrogen, war weiterhin effektiv und das Zellwachstum konnte gehemmt werden.

Die Amplifikation des Androgenrezeptor - Gens in einem androgenarmen Milieu führt zu einer konsekutiven Ausbildung einer höheren Androgen-Rezeptor-Dichte. Dies zeigt, dass selbst geringste Androgenspiegel zu einer Wachstumsstimulation des Prostatakarzinoms führen können (Visakorpi, 1995). Ebenso wird die Sensitivität erhöht, so dass schon geringere Serumspiegel an Testosteron zur Rezeptorantwort führen können.

## **Weitere mögliche Mechanismen**

Es wurden Veränderungen und eine Überexpression des bcl-2-Proonkogens als Möglichkeit für die Hormonunabhängigkeit eines Prostatakarzinoms nachgewiesen. Dadurch kann es über eine Regulation der Mikrotubuliintegrität zu einer Verhinderung der Apoptose kommen (Navone, 1993; Tu, 1995; McDonell, 1992).

Für die Progression der Erkrankung scheint beim Prostatakarzinom auch eine Mutation im Tumorsuppressorgen p53 sowie eine Inaktivierung des Retinoblastom-Tumorsuppresorgans wesentlich zu sein (MacGrogan, 1997; Effert, 1992; Heidenberg, 1995).

Auch eine Wirkung der Wachstumsfaktoren epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) und insulin like growth factor (IGF), die über autokrine oder parakrine Stimulation die Tumorstammzelle am Leben halten, scheint unumstritten zu sein. Diese Wachstumsfaktoren werden u.a. als Folge der Androgenblockade, die zu einer Deprimierung androgensupprimierter Gene führt, gebildet (Kim, 1996; Koivisto, 1997; Feldmann, 2001).

## **1.2. Grundlagen der Therapie maligner Erkrankungen**

### **1.2.1. Chemotherapie**

Um den Einsatz von Chemotherapeutika allgemein besser zu verstehen, sind einige grundlegenden Sachverhalte wichtig:

Die allermeisten antineoplastischen Substanzen agieren phasenspezifisch.

Tumorzellen befinden sich in verschiedenen Phasen des Proliferationszykluses, wobei sich jeweils nur ein bestimmter Anteil von ihnen in der Proliferationsphase befindet. Die Zellen der Wachstumsfraktion teilen sich jedoch nicht immer synchron, es befindet sich folglich immer nur ein Teil der Tumorzellen in der sogenannten „sensiblen Phase“.

Das Applikationsintervall der jeweiligen Chemotherapeutika ist deshalb von großer Wichtigkeit, und man unterscheidet intermittierende Therapieformen mit weniger hohen Einzeldosen sowie Stoßtherapien mit einmaligen, hochdosierten Applikationen von hoher Toxizität.

Nach Skipper und Schabel (1973) folgen Zytostatika einer Kinetik erster Ordnung, das heißt eine Einzeldosis reduziert die Zellzahl um einen konstanten Prozentsatz der absoluten Zellzahl.

Somit erscheint es nur logisch, dass die Wirksamkeit einer zytostatischen Therapie umso größer ist, je kleiner die absolute Zellzahl zu Therapiebeginn ist. Eine klinische Vollremission ist nicht automatisch gleichzusetzen mit der kompletten Entfernung des malignen Gewebes, sondern einem Absinken der Zellzahl unter die Nachweisgrenze von etwa  $10^8$ - $10^9$  Zellen. Es ist also neben einer initialen Induktionstherapie auch immer eine Stabilisationstherapie nötig.

Dieses Prinzip macht sich zum Beispiel die adjuvante Chemotherapie zu nutzen, bei der im Anschluß an die chirurgische und/oder strahlenbedingte Reduktion der Tumormasse eine Vollremission bzw. eine Heilung durch zusätzliche Chemotherapie erzielt werden kann.

Es besteht weiter auch eine direkte Abhängigkeit zwischen der verabreichten Zytostatika-Dosis und der Anzahl der abgetöteten Zellen. Im klinischen Alltag ist die zum Einsatz kommende Zytostatikadosis jedoch durch das Auftreten von Nebenwirkungen limitiert.

Zusammenfassend bedingt dies in der Realität oft eine Kombination aus mehreren verschiedenen Therapieverfahren, wobei Substanzen und Verfahren oft auf sehr unterschiedliche Weise kombiniert werden können. So ist es möglich, verschiedene Angriffsorte im Zellzyklus bzw. verschiedenen Phasen des Zellzykluses zu agieren.

Durch eine kombinierte Anwendung bietet sich die Möglichkeit, die Nebenwirkungen der Einzelverfahren zu reduzieren und gleichzeitig eine Effektsteigerung zu erzielen.

Seit den frühen 70iger Jahren werden bezüglich des hormonrefraktären Prostatakarzinoms Studien mit Chemotherapie sowohl in Form von Einzelsubstanzen als auch Kombinationsregimen durchgeführt. Zusammenfassend kann man diese eher als frustriert bezeichnen (Yagoda, 1993), erst mit dem Einsatz neuerer Substanzen, insbesondere den Taxanen, hat sich dies entscheidend geändert.

Erstmals wurde in der TAX 327-Studie ein klarer Überlebensvorteil im Sinne einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit, eines signifikanten PSA- Abfalls und einer Verbesserung der Schmerzsymptomatik einer taxanbasierenden Chemotherapie



beim hormonrefraktärem Prostatakarzinom nachgewiesen (Tannock, 2004; Petrylak, 2004).

In einem Update dieser Studie von 2008 (Berthold, 2008) wurde der Überlebensvorteil für eine Docetaxeltherapie noch deutlicher.

Das hormonrefraktäre Prostatakarzinom ist und bleibt weiter eine therapeutische Herausforderung. Weitere Kombinationsregime mit unterschiedlichen Zytostatika und auch mit zusätzlicher Bestrahlung werden somit in naher Zukunft weiter getestet werden und sind von großem Interesse.

### **1.2.2. Strahlentherapie**

Bei der Strahlentherapie findet vorwiegend eine Schädigung der DNA statt. Durch eine Spaltung von Phosphatestern und Zerstörung der Desoxyribose kommt es zu Einzel – und Doppelstrangbrüchen der Doppelhelix. Dies führt schließlich zu einer Hemmung der Proteinbiosynthese mit der Folge der Proliferationshemmung, als auch zu Störungen der Transkription und Replikation, was wiederum ein Absterben der Zellen der nächsten Generation nach sich zieht. Durch DNA – Reparatursysteme kommt es jedoch meist zu Reparaturvorgängen, durch die Einzelbruchstellen enzymatisch entfernt werden und der betroffene Strangabschnitt neu gebildet wird. Man spricht hier auch von einer „subletalen Schädigung“ einer Zelle.

Proliferierende Tumorzellen zeigen im Vergleich zu Normalgewebe einen Unterschied im Ansprechen auf eine Bestrahlung. Sowohl die zeitliche Dosisverteilung, als auch die Größe der Wachstumsfraktion, die Zahl der zu inaktivierenden Zellzahl und der Anteil an hypoxischen Zellen spielen hier eine Rolle. Durch eine Applikation einer Einzeldosis kann zum Beispiel eine partiell subletale Schädigung der Zellen erfolgen, wobei hier die Tumorzellen nach einer Reparationsphase wieder weiter proliferieren können (Streffer, 1987).

Bisher ist die Indikation einer Strahlentherapie beim hormonrefraktären Prostatakarzinom als palliativ anzusehen, so zum Beispiel bei pathologischen Frakturen oder schmerzhaften Knochenmetastasen. Beim lokal begrenzten Prostatakarzinom kann eine perkutane Strahlentherapie als Alternative zur radikalen

Prostatektomie gesehen werden, prospektive randomisierte Studien zum Vergleich beider Verfahren fehlen allerdings bislang.

Die in dieser Arbeit verwendeten Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3 wurden bisher in wenigen Untersuchungen auf ihre Strahlensensibilität getestet.

So untersuchten Leith et al. die Radiosensitivität der LNCaP – Zelle bei einer Strahlendosis von 2 Gy. Hier kam es zu einem Überleben von 51,2% der Zellen (Leith, 1994). Auch die PC3- und DU145-Zelllinie waren Teil ihrer Forschungen. Es zeigte sich auch hier eine gewisse Radiosensitivität bei einer Dosis von 2 Gy. Der Anteil an nicht- apoptotischen Zellen betrug 31% bzw. 59,8% (Leith, 1993).

1996 bestätigten Algan et al. diese Radiosensitivität, indem sie erneut DU145 und PC3 einer Bestrahlung von 2 Gy aussetzten. Aus ihren Untersuchungen folgerten sie ein eher bedingtes Eingehen der Apoptose beider Zelllinien nach der Bestrahlung und eine unterschiedliche Radiosensitivität (Algan, 1996).

Bereits 1991 untersuchten auch Kaver et al. den Effekt von Radiatio in Verbindung mit Wärmebehandlung bei den Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3. Es ergab sich ein überlebender Anteil von 79% DU145 Zellen bzw. von 70% PC3 Zellen bei der alleinigen Radiatio und ein entsprechender Anteil von 42% bzw. 23% bei der gleichen Behandlung mit zusätzlicher Hyperthermie (Kaver, 1991).

Die untersuchten Prostatakarzinomzelllinien zeigen eine Tendenz zur Strahlenresistenz verglichen mit anderen Tumorentitäten wie z.B. dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem Ovarialkarzinom oder auch dem Melanom (Morstyn 1983, Rofstad 1986, Weichselbaum 1989).

### **1.3. Historischer Abriss der experimentellen Tumorforschung mit Zellkulturen**

Bereits Ende des 19.Jahrhunderts begannen die ersten Experimente bezüglich der Entwicklung der Gewebekulturtechnik durch Roux. Er hielt damals eine embryonale Hühnerzelle in einer Salzlösung in-vitro am Leben. Carrel führte schließlich 1913 das erste Langzeitexperiment mit Zellkulturen durch. Obwohl Anzucht und Erhalt von Gewebezellen in-vitro damals nicht das primäre Ziel der Forschungen waren, wurden so die Grundlagen für die heutige Zell-Kultur-Revolution gelegt. In diesen

ursprünglichen Versuchen basierte die Anzucht auf Kultur kleiner Gewebepartikel oder Explantate, wohingegen heute dissoziierte Zellkulturen gezüchtet werden.

Mit den ersten systematischen Versuchen, normales und tumoröses Gewebe von Primaten in- vitro zu züchten, begann man schließlich in den fünfziger Jahren (Kaighn, 1975). Gey et al. konnten so 1952 eine kontinuierliche Zelllinie, die später unter dem Namen HeLa-Zelllinie bekannt wurde, aus einem humanem Cervixkarzinom einführen.

Ein großes Problem dieser Zeit waren jedoch zum einen die Überwucherung dieser Kulturen mit Fibroblasten und zum anderen die Möglichkeit der Kultivierung der Zellen nur über einen kurzen Zeitraum. Insgesamt waren diese ersten Ergebnisse damals noch relativ enttäuschend (Verma, 2006).

Im Jahre 1959 berichtete Rohl erstmals über ein Wachstum von Prostatatumorgewebe in vitro, er konnte jedoch keine einheitliche Zelllinie vorweisen. Auch Schrodtt et al. berichteten in den Jahren 1961 bis 1971 über Kultivierungszeiträume von bis zu mehreren Monaten. Die 1970 von Fraley isolierte Zelllinie MA 160 bzw. die von Okada et al. isolierte Zelllinie EB33, die beide aus Prostatagewebe stammen, waren in ihrer Morphologie jedoch sehr heterogen und letztendlich zur Verwendung als Tumormodell noch nicht geeignet.

Erst durch Ausreifung der Techniken im Verlauf und durch die Entwicklung spezifischerer Kulturmedien gelang in den nachfolgenden Jahren die Isolierung, Charakterisierung und Konservierung von normalen und entarteten Zelllinien.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien DU145, PC3 und LNCaP wurden zwischen 1978 und 1980 isoliert und etabliert (Horoszewicz, 1980).

Heute ist die Zellkultivierung unter möglichst definierten Bedingungen aus der biologischen und medizinischen Forschung nicht mehr wegzudenken.

In diesem Zusammenhang sind die Gewebekultur und Organkultur, bei denen kleine Gewebeteilchen in einem Kulturmedium zum Wachstum gebracht werden, als auch die Zellkultur zu nennen. Bei letzterer werden die enzymatisch aus einem Zellverband gelösten Zellen mittels einer Suspension auf Kulturplatten eingesät. Man bezeichnet dies als sogenannte Primärkultur. Durch das schnelle Teilen der Zelllinien wird ein wiederholtes Passagieren möglich, nach einer gewissen Anzahl von Passagen sinkt jedoch die Proliferationsrate und die Zellen sterben ab.

Durch Transformation entstandene etablierte Zellen zeigen im Gegensatz dazu die Eigenschaft in- vitro unbegrenzt und unabhängig ihrer Herkunft weiterzuwachsen. Sie eignen sich damit hervorragend zur Anzucht unter definierten Bedingungen und stimmen genetisch, neben einer kurzen Verdopplungszeit, nicht mehr mit der Ausgangszelle überein. Der Nahrungsbedarf im Wachstumsverhalten ähnelt wiederum der Primär-Zelllinie, es zeigt sich hierbei gewöhnlich keine räumliche Orientierung.

Zusammenfassend lassen sich die bei der heutigen Zellkultivierung gewonnenen Ergebnisse, wenn auch nur bedingt, auf die natürliche Situation des lebenden Organismus übertragen. Einen Vorteil der Verwendung von Zellkultivierungen dieser Art bietet hier sicherlich die Homogenität des Materials verbunden mit der leichten Handhabbarkeit und Manipulierbarkeit.

### **1.4. Zielsetzung der Arbeit**

Die bisher sehr limitierten Therapieoptionen des HRPC zeigen die Notwendigkeit der experimentellen Analyse neuer Therapiestrategien bei der Behandlung.

Die vorliegende Arbeit soll in vitro die Effekte einzelner Chemotherapeutika bei den drei etablierten Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3 auf die Hemmung der Zellproliferation untersuchen. Auch soll die Modulation der Proliferation durch den Einsatz dieser Zytostatika in unterschiedlichen Kombinationen mit einer Bestrahlung von 5 Gy untersucht werden.

Zum Einsatz kamen hierzu zum einen die bereits für das Prostatakarzinom etablierten Chemotherapeutika Etoposid und Docetaxel, und zum anderen die noch relativ „neue Substanz“ Imatinib, ein selektiver Tyrosinkinase- Inhibitor.

Da sich in der Immunhistochemie epithelialer und stromaler Prostatakarzinomzellen eine Expression von PDGF- Rezeptoren nachweisen lässt, bietet eine Inhibition dieser Rezeptoren einen neuen und vielversprechenden therapeutischen Ansatz (Mathew, 2004; George, 2002).

Die Versuche wurden unter definierten und stets reproduzierbaren Bedingungen an Monolayerkulturen durchgeführt. Durch einen Vergleich mit einer entsprechenden

unbehandelten Zellkultur konnte eine Auswertung erfolgen. Eine Proliferationsbestimmung wurde über einen XTT- Test durchgeführt. Durch eine Nutzung von Enzymen des Zellstoffwechsels, kann so das entsprechende Produkt über eine Absorptionsmessung im Titerplattenphotometer quantifiziert werden.

In einem ersten Schritt wurden unter definierter Inkubationsdauer die entsprechenden Dose- Response- Kurven der Monolayerkulturen bei ansteigenden Zytostatikakonzentration von Imatinib, Etoposid und Docetaxel bestimmt. So wurden IC 50- Werte, bei denen die Zellproliferation auf 50% der unbehandelten Vergleichsgruppe absinkt, ermittelt. Diese ideale Wirkungskonzentration wurde für die entsprechenden Kombinationsversuche mit zusätzlicher Bestrahlung weiterverwendet. Das Hauptziel bestand darin, die genannten Substanzen in Monotherapien und in Kombination mit Strahlentherapie hinsichtlich ihrer antiproliferativen Wirkung zu untersuchen, um eine mögliche Empfehlung für die klinische Anwendung geben zu können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Die Zelllinien**

Für die Versuche wurde die Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP, die käuflich vom Cell Line Service (CLS, Heidelberg) erworben wurden, verwendet.

#### **2.1.1. LNCaP**

Die Zelllinie LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) wurde erstmal im August 1977 von Horoszewicz J.S. u.a. entdeckt. Sie isolierten die Zellen aus einer supraklavikulär gelegenen Lymphknotenmetastase eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms der Prostata eines 51jährigen Patienten mit bereits ausgeprägten Lymphknoten- und Knochenmetastasen. (Horoszewicz, 1980)

Der heute etablierte Zelltyp LNCaP wurde ausführlichst charakterisiert und auf Eignung als in vitro Modell für Studien über das Prostatakarzinom weitgehend untersucht (Horoszewicz, 1980 und 1983). Es existieren unterschiedliche Subtypen der LNCaP - Zelllinie, wobei sich die ursprünglichen Eigenschaften der Zelllinie vorwiegend in der FGC (fast growing colony) Zellkultur von LNCaP finden. (van Steenbrugge, 1989)

So zeigen die Zellen Epithelcharakter (Desmosomen im Elektronenmikroskop) mit guten, jedoch langsamen, Wachstumseigenschaften auf Kunststoff und weniger auf Glas. Allerdings haftet der Zellrasen kaum auf dem Boden der Kulturflasche, so dass ein behutsames Umgehen bei der Anzucht bzw. beim Mediumwechsel nötig ist. Nur ca. 70% der ursprünglich eingebrachten Zellen haften innerhalb von 40h am Boden. Bei einem Mediumwechsel muß mit einem Zellverlust von 10 – 20% gerechnet werden.

Bei einer durchschnittlichen Verdopplungszeit der Zellpopulation (im RPMI – Medium1640 bei einem Zusatz von 10% FKS) von ca. 72h können die Zellen sehr dicht wachsen ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>). Auffallend ist auch die Unregelmäßigkeit des Wachstums in der Monolayerkultur (Horoszewicz, 1980 und 1983). Das Optimum der Konzentration an fetalem Kälberserum liegt zwischen 2,5 und 15%. Bei höheren Konzentrationen innerhalb dieses Bereichs steigt die Wachstumsrate.

LNCaP Zellen besitzen außerdem ein niedriges koloniebildendes Potential und zeigen eine relative Bestrahlungsresistenz im Vergleich zu anderen menschlichen Neoplasmen. (Leith, 1994)

Sie produzieren sowohl in vitro als auch in vivo in der Nacktmaus kontinuierlich prostataspezifische saure Phosphatasen mit einer Aktivität von bis zu 300ng/ml/10<sup>6</sup>) sowie das prostataspezifische Antigen (PSA) (Horoszewicz, 1980).

In Abhängigkeit von Selektionsbedingungen, Kulturdauer und Androgenkonzentration treten verschiedene Subkulturen der LNCaP auf. So entstanden zwei große Hauptgruppen, eine androgenabhängige und eine unabhängige Subkultur. Die Differenzierung zwischen hormonabhängiger und hormonunabhängiger Subgruppe ist mit Hilfe sekundärer Markerchromosomen möglich. Die Fast Growing Colony (FGC) trägt vorwiegend die Eigenschaften der ursprünglichen Zellkultur.

Für die eigenen Versuche wurden LNCaP Zellen (ATCC CRL - 1740, FGC- Clone) aus dem käuflich erworbenen Bestand des Forschungslabors der Urologischen Klinik mit der Passagenzahl 51 bis 75 verwendet.

### **2.1.2. DU145**

Die heute etablierte Zelllinie DU145 wurde 1978 erstmals von Stone aus ZNS-Gewebematerial einer Hirnmetastase gewonnen. Bei diesem 69-jährigen Patienten lag ein fortgeschrittenes, multipel metastasierendes, undifferenziertes Adenokarzinom der Prostata vor (Mickey, 1980; Stone, 1978).

Die Zelllinie DU145 wurde über 2 Jahre in vitro mit 20% fetalem Kälberserum (vgl. hierzu eigene Versuche) bei optimalen Wachstumsbedingungen kultiviert und dabei ausführlich charakterisiert, so dass ihre Eignung als in vitro Modell für Studien über das Prostatakarzinom hinreichend belegt ist.

Hierbei wiesen die Zellen in über 90 Passagen vergleichbare und regelrechte Wachstumsverhältnisse auf mit keinen wesentlichen morphologischen Veränderungen. Für die Populationverdopplungszeit während der 39. Passage wurden ca. 34 Stunden ermittelt. (Kaighn, 1980)

Eine Analyse des Karyotyps bei Passage 14, 57 und 90 ergab einen beinahe triploiden Chromosomensatz mit durchschnittlich 64 Chromosomen (in der Passage 57) mit einer Abweichung von 46 bis 143 Chromosomen. Außerdem konnten mehrere Markerchromosome und ein Y-Chromosom mit einer Translokation am längeren Arm (Yq+) identifiziert werden. (Stone, 1978)

DU145 wachsen sowohl sehr gut auf Nähragar als auch in Flüssigmedium. Auch auf der Nacktmaus ließ sich ein Tumorwachstum induzieren, wobei hier die in vivo in die Versuchstiere passagierten Zellen im wesentlichen die Eigenschaften der ursprünglich injizierten Zelllinie beibehielten (Kaighn 1980; Mickey, 1980).

Es handelt sich bei den Zellen um kleine, polygonale Zellen, die elektronenmikroskopisch auf ihrer Zelloberfläche viele Mikrovilli, zahlreiche Desmosomen, Tonofilamente und aufgetriebene Mitochondrien aufweisen. Auffällig ist außerdem ein gut entwickelter Golgiapparat. In der Monolayerkultur zeigt sich in der Regel ein dicht wachsender Zellrasen. (Stone, 1978)

Eine schwach positive Reaktion für saure Phosphatasen ist für die Zelllinie ebenso typisch wie keinerlei Androgensensitivität oder Hormonsensitivität. (Stonington, 1975 und 1978)

Der Zelltyp DU145 (ATCC HTB-81) für die Experimente dieser Arbeit wurde aus dem käuflich erworbenen Bestand des Forschungslabors der Urologischen Klinik entnommen. Es wurden Zellen mit der Passagenummer 55 bis 80 verwendet.

### **2.1.3. PC3**

Die erstmals 1975 von Kaighn aus Tumorgewebe einer Wirbelsäulenmetastase eines nichtdifferenzierten Adenokarzinoms der Prostata isolierten Zellen stellen heute eine etablierte Zelllinie für Studien über das Prostatakarzinom dar. Es handelte sich beim Gewebespender um einen 64-jährigen Patienten, der bereits Skelett – und Nebennierenmetastasen hatte. Die Zelllinie PC3 wurde über zwei Jahre in vitro kultiviert und so ausführlich charakterisiert und untersucht und über 53 mal als Monolayer subkultiviert (Kaighn, 1978; Ohnuki, 1980).



So zeigen PC3 Zellen eine epithelähnliche Morphologie mit epithelalem Wachstum. Bei sehr gutem Anhaften der Zellen an den Kulturgefäßen, können traubenförmige, locker verbundene, gelegentlich sogar mehrschichtige Zellanhäufungen beobachtet werden (Kaighn, 1979).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen zahlreiche Mikrovilli an der Zelloberfläche der PC3 Zellen, sowie einige Desmosomen, gelappte Zellkerne und auch hypertrophierte Nucleoli. Auch findet man im Zellkörper abnorme Mitochondrien, sowie zahlreiche Lysosomen und Fettgranula.

Die Zelllinie wächst sowohl in einer Nährlösung, als auch in einem Flüssigmedium und zeigt selbst auf der Nacktmaus positive Wachstumseigenschaften, wobei die Zellen nach dem Passagieren in vivo die wesentlichen Eigenschaften der ursprünglich injizierten Zellen beibehielten (Kaighn, 1980). Bei Verwendung von PFMR-1 Wachstumsmedium mit 7% fetalem Kälberserum hatten die Zellen eine durchschnittliche Populationsverdopplungszeit von ca. 33 Stunden

Eine Androgensensitivität oder eine andere hormonelle Abhängigkeit der Zelllinie konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich bei den Zellen eine geringe Enzymaktivität der prostataspezifischen sauren Phosphatase (Kaighn, 1980).

Durch eine Analyse des Chromosomensatzes bei Passage 5, 8, 17, 30 und 50 ergab sich ein vollständig aneuploider Karyotyp mit einer Chromosomenzahl von 55 bis 62, wobei das Y – Chromosom sowie die Chromosomen 5 und 25 fehlen. Zusätzlich konnten bei den PC-3 Zellen zwischen 10 und 20 Markerchromosomen identifiziert werden. (Kaighn, 1978; Ohnuki, 1980)

Für die Versuche dieser Arbeit wurde der Zelltyp PC3 (ATCC CRL-1435) aus dem käuflich erworbenen Bestand des Forschungslabors der Urologischen Klinik mit der Passagennummer 52 bis 77 verwendet.

## **2.2. Zytostatika**

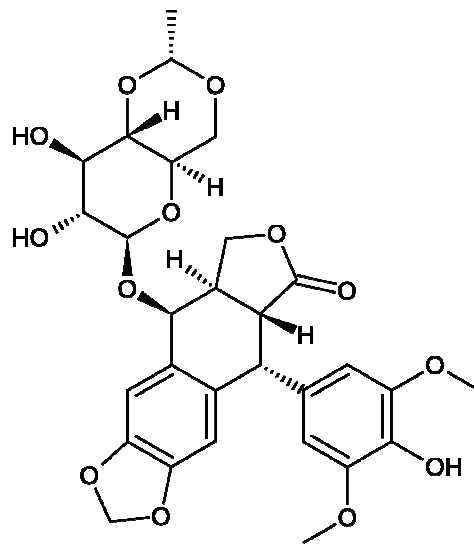
### **2.2.1. Etoposid (VP-16)**

Etoposid (4`-Demethylepipodophyllotoxin-ethylidenglucosid) ist ein halbsynthetisches Derivat des Podophyllotoxins aus *Podophyllum peltatum* (Maiapfel) (Zanetta, 1996).

Es wirkt zellzyklusphasenspezifisch und arretiert den Zellzyklus in der späten S- und frühen G2-Phase.

Etoposid wirkt dabei über eine Hemmung der Topoisomerase II, was zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA führt. (Ross, 1984; Wolff, 2009) Dies verursacht wiederum DNA- Protein-Quervernetzungen. Die Zelle geht so in die Apoptose über.

Mit einer Halbwertszeit von 4 bis 11 Stunden liegt seine orale Bioverfügbarkeit bei 30 bis 100%. Die Metabolisierung über die Leber, mit den entsprechenden hepatischen Nebenwirkungen, mündet in einer renalen (10 - 30%) und biliären (70-90%) Ausscheidung.



**Abb. 1: Strukturformel von Etoposid**

Derzeit kommt Etoposid bereits bei der Behandlung von Lymphomen der akuten myeloischen Leukämie, des Chorionkarzinoms, von Bronchialtumoren und des Hodenkarzinoms zum Einsatz.

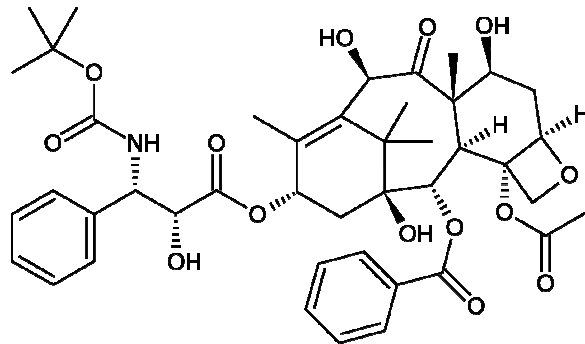
Etoposid wird zur Zeit beim Prostatakarzinom im Rahmen einer Phase II-Studie in Kombination mit Estramustinphosphat untersucht.

Etoposid wurde für die Versuche von der Firma Sigma bezogen (Kat. Nr. E 1383). Es wurde eine Stammlösung von 50mM in DMSO hergestellt und bei minus 20°C aufbewahrt.

Die einzelnen Versuchskonzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnungsreihen mit RPMI 1640 Medium vor den jeweiligen Versuchen hergestellt und auf Zimmertemperatur erwärmt.

### 2.2.2. Docetaxel

Docetaxel gehört, wie bereits der Name schon vermuten lässt, zu der Gruppe der Taxane. Bei Taxanen handelt es sich um eine bereits in den 1990er Jahren klinisch eingeführte Gruppe chemotherapeutisch sehr wirksamer Substanzen.



**Abb.2: Strukturformel von Docetaxel**

Ein Zytostatika dieser Gruppe ist Docetaxel. Es wird semisynthetisch aus den Nadeln der europäischen Eibe (*Taxus baccata*) hergestellt. Die Substanz wirkt antineoplastisch durch eine Inhibition der mikrotubulären Funktion. Die Interaktion mit B – Tubulin führt in diesem Zusammenhang einerseits zur Steigerung der Polymerisation zu stabilen Mikrotubuli, andererseits wird deren Depolymerisation gehemmt (Vaishampayan, 1999). Die Folge ist somit eine Unterbrechung des Mitosevorgangs und damit auch der Zellteilung.

Auch bewirken Taxane, die einen äußerst langsamen Efflux aus der Zelle und somit eine hohe Aktivität aufweisen, über eine Phosphorylierung eine sehr effektive Hemmung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Dies führt folglich zu einer vermehrten Apoptose (Vaishampayan, 1999; Halder, 1997).

Taxane weisen außerdem noch eine Vielzahl immunologischer Wirkungen auf, deren Effekte noch nicht hinlänglich erforscht sind.

Mit einer Halbwertszeit von 10 bis 19 Stunden wird Docetaxel in der Leber abgebaut und bevorzugt biliär (größer 80 – 90%) sowie gering auch renal (kleiner 10 -20%) ausgeschieden.

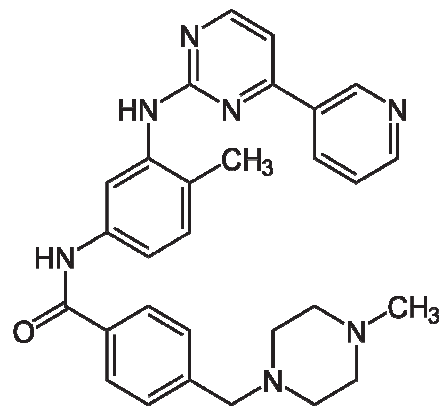
Das Nebenwirkungsspektrum reicht von allergischen Reaktionen bis hin zu Alopezie, Neutropenien, Dermatitis und Arrhythmien.

Mit Docetaxel, das seit 20. Oktober 2004 auch in Deutschland für das Prostatakarzinom zugelassen ist, steht heute zum ersten Mal beim hormonrefraktärem Prostatakarzinom eine erfolgsversprechende, antineoplastische wirkende Substanz zur Verfügung. Seit der Publikation der Phase - III - Studien (TAX-327 und SWOG 9916) im Jahr 2004 gilt Docetaxel als firstline Chemotherapie beim hormonrefraktärem Prostatakarzinom. Bis zu diesem Zeitpunkt war Mitoxantron als einziges Zytostatikum dafür zugelassen, im Vergleich hierzu ergab sich mit Docetaxel eine effektive Lebensverlängerung von 3 Monaten (Tannock, 2004; Petrylak, 2004).

Docetaxel wurde für die Versuche freundlicherweise von der Firma Aventis in Form der unter dem Handelsnamen Taxotere bekannten Substanz zur Verfügung gestellt. Es wurde eine Stammlösung von 5mg/ml (entspricht 6,2 mM) in RPMI 1640 hergestellt und bei minus 20°C aufbewahrt.

Die einzelnen Versuchskonzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnungsreihen mit RPMI 1640 Medium vor den jeweiligen Versuchen hergestellt und auf Zimmertemperatur erwärmt.

### 2.2.3. Imatinib

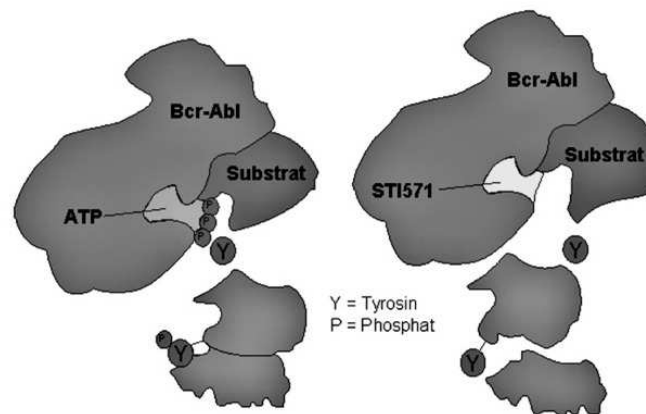


**Abb. 3: Strukturformel von Imatinib (Manley, 2002)**

Die Proteinkinasen sind eine große Familie homologer Proteine, die aus 2 Subfamilien, den Serin-Threonin-Kinasen und den Tyrosinkinasen, besteht. Sie sind Teil der Signaltransduktionswege und spielen eine zentrale Rolle in den verschiedensten biologischen Prozessen wie Zellwachstum, Stoffwechsel, Differenzierung und Apoptose.

Tyrosinkinasen binden ATP und übertragen Phosphatgruppen von ATP auf Tyrosinreste verschiedener Substrate. Imatinib (Glivec, früher STI571) ist ein selektiver Inhibitor der strukturell ähnlichen Tyrosinkinasen ABL, PDGF-R und c-kit.

Imatinib unterdrückt selektiv das Wachstum von BCR-ABL-positiven Zelllinien und-kolonien und hemmt selektiv die Tyrosinkinasen ABL, BCR-ABL, TEL-ABL, PDGF-R, TEL-PDGF-R, TEL-ARG und c-kit durch kompetitive Verdrängung von ATP aus der Enzymbindung.



**Abb. 4: Molekularer Wirkmechanismus von Imatinib (Manley, 2002)**

Die selektive Hemmung der Rezeptoren dieser Wachstumsfaktoren spielt in den Therapieoptionen der Onkologie eine große Rolle.

Die Rezeptor Tyrosin Kinase – Familie (RPTK) ist eine der größten Gruppen dieser Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Über eine Ligandenbindung am Rezeptor wird eine zyttoplasmatische Tyrosinkinase - Domäne autophosphoryliert, was zu einer Kaskade von Signaltransduktionen führt. Dies hat den Effekt der Zellproliferation und wirkt sich auf das Zellüberleben aus.

In Knochenmetastasen von Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom ist der Platelet-derived-Growth-Factor-Rezeptor (PDGF-r- $\alpha$ ) der meist exprimierte RPTK.

In intraepithelialen Neoplasien und Adenokarzinomen der Prostata werden sowohl PDGF-r- $\alpha$  und PDGF-r- $\beta$  exprimiert, jedoch nicht im normalen Prostataepithel und bei der benignen Prostatahyperplasie. Ko et. al. bestätigen, dass 80 % der Metastasen und 88 % der Primärtumoren eine PDGF-Rezeptor-Expression aufweisen.

Imatinibmesylat (=STI571, Glivec) ist ein Inhibitor dieses PDGF – r Rezeptors, aber auch die Tyrosinkinaseaktivität von c-kit und Bcr-Abl fallen unter sein Wirkungsspektrum.

Man kann deshalb vermuten, dass Imatinib in naher Zukunft eine große Rolle in der Behandlung von proliferativen Erkrankungen wie z. B. dem hormonrefraktären Prostatakarzinom, das eine hohe PDGF-r Aktivität zeigt, spielen wird.

Bereits bei Philadelphia-Chromosom-positiven chronisch myeloischen Leukämien zeigt Imatinib in klinischen Studien bei Dosen von ca. 400mg/d ein gutes Ansprechen bei tolerierbaren Nebenwirkungen wie Übelkeit, Müdigkeit, Diarrhoen, Ödemen, Muskelkrämpfen und Hautreizungen. Auch bei gastrointestinalen Stromatumoren mit einer Produktion einer aktivierten c-kit-Mutation zeigte der Tyrosinkinaseinhibitor eine deutliche Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion.

Dieses gute Ansprechen chronisch myeloischer Leukämien auf den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib sowohl in vivo wie auch bereits in präklinischen Studien stellt einen vielversprechenden Ansatz für eine in-vitro Erprobung von Imatinib bei der Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten des hormonrefraktären Prostatakarzinoms dar.

Imatinib wurde freundlicherweise von der Firm Novartis in Form der unter dem Handelsnamen Glivec bekannten Substanz als Mesylatsalz zur Verfügung gestellt. Es wurde eine Stammlösung von 10mM in DMSO hergestellt und bei minus 20°C aufbewahrt.

Die einzelnen Versuchskonzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnungsreihen mit RPMI 1640 Medium vor den jeweiligen Versuchen hergestellt und auf Zimmertemperatur erwärmt.

## **2.3. Geräte und Arbeitsmittel**

### **2.3.1. Geräte**

- Auflichtmikroskop: Zeiss Axiovert 135 (Best. Nr. 4913069804)
- Autoklav
- Brutschrank: CO<sub>2</sub>- Auto- Zero B6030 (Heraeus), Klima: 37°C, 100% relative Luftfeuchte, 95% Luft, 5% CO<sub>2</sub>
- Elektronenmikroskop
- Mikroplattenphotometer: Thermomax Microplate Reader (Molecular Devices) mit Auswertprogramm SOFTmax PRO Version 1.1
- Reinluftwerkbank: Lamin Air HB 2448 (Heraeus) mit vertikaler Strömung

- Zentrifuge: Rotina 48 Typ 4360, Baujahr 1997 , Firma Hettich, Tuttlingen

### **2.3.2. Arbeitsmittel**

- Einfrierbox (Nalgene)
- Einfrierröhrchen: 1,8ml (Nunc, Nr. 340711)
- Combitips plus Eppendorf Biopur (von Eppendorf): 5ml (Best. Nr. 0030069.455); 2,5ml (Best. Nr. 0030069.447); 0,5ml (Best. Nr. 0030069.420)
- Gewebekulturflaschen: steril mit Filter, Volumen 250ml (75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche) und 50ml ( 25cm<sup>2</sup> Bodenfläche) (Greiner, Nr.658175 bzw.690175)
- Gewebekulturplatten: steril mit Abdeckplatte: 6well Platten (Greiner, Nr. 657160), 96well Platten(Greiner, Nr. 655180)
- Pipetten: steril, einzeln verpackt: 25ml (Nr.9166778), 10ml (Nr.9166777), 5ml (Nr.9166776), 2ml (Nr.9166775), 1ml (Nr.9166774)
- Röhrchen: steril (Greiner): PP- Röhrchen 50ml (Nr.227261), PS- Röhrchen 12ml (Nr.164161), PS- Röhrchen 4,5ml (Nr.120161)

### **2.4. Medien, Puffer, Lösungen**

Zur Gewährleistung optimaler Wachstumsbedingungen wurden für die bei den Versuchen verwendeten Zelllinien folgende Reagenzien verwendet:

#### Wachstumsmedium zur Anzucht, hergestellt aus:

- 500ml RPMI 1640 Medium( mit 2,0g/l NaHCO<sub>3</sub>; 0,532g/l Glutamin;0,5ml 0,5%ige Phenolrotlösung), Kat. Nr. FG 1215( Biochrom AG, Berlin)
- 25ml (5%) bzw.50ml(10%) fetales Kälberserum (FKS, hitzeinaktiviert bei 56°C für 20min. ), Kat. Nr. 50115 ( Biochrom AG, Berlin)
- 5ml nichtessentielle Aminosäuren (NEAS), Kat. Nr. K0293 ( Biochrom AG, Berlin)



- 5ml ABM ( Antibiotic Antimykotic Solution) bei 10%, Kat. Nr. A5955  
( Sigma Steinheim, Deutschland)
- 5ml einer 100mM Natriumpyruvat- Lösung ( Kat. Nr. L0473, Biochrom AG Berlin) je 500ml RPMI 1640, **nur bei Zelllinie PC-3**

Um die Einzelergebnisse nicht durch eine Interaktion zwischen Tumorzellen und Antibiotika zu verfälschen wurde bei den Versuchen auf den Zusatz von ABM verzichtet.

Nur bei der Zelllinie PC-3 wurde bei Anzucht und Experiment zusätzlich jeweils 5 ml je 500ml RPMI 1640 hinzugefügt.

#### Weitere Medien und Reagenzien

- Dimethylsulfoxid (DMSO, Kat. Nr. 1.02931.1000, Firma Merck, Darmstadt); zur Verdünnung und Herstellung der Zytostatika- Stammlösungen
- Mycoplasma Detection Kit (Best. Nr. 129674425 Tests; Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)
- PBS (Phosphatpufferte Salzlösung, pH 7,2 – 7,4) hergestellt aus:  
8g NaCl  
0,2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1,15g  $\text{NaHPO}_4$   
0,2g KCl  
mit Aqua dest. auf 1Liter aufgefüllt; dann autoklaviert
- PMS (Phenazine Methosulfate) (Best. Nr. P - 5812-1g; Sigma Chemicals Co St. Louis, USA), 0,383mg/ml; für XTT - Test
- Trypsin/EDTA- Solution (0,05%/0,02% in PBS gelöst, Kat. Nr. L2143, Biochrom AG, Berlin); zum Ablösen der Zellen von den Kulturböden und zur Gewinnung von Einzelsuspensionen

- Trypanblaulösung: 0,5% (w/v) in physiolog. Saline, für die Zellzählung (Biochrom AG Berlin , Kat. Nr. L6323 )
- XTT (Methoxy - 4- nitro- 5- sulfophenyl- 2H - tetrazolium - 5 - carboxanilide innersalt); aufgelöst in RPMI 1640 Medium; Endkonzentration 1mg/ml

Das XTT – Reagenz für die Messungen besteht aus 5ml XTT und 100µl PMS.

Die hergestellten Medien und Reagenzien wurden stets im Kühlschrank aufbewahrt und vor den jeweiligen Versuchen auf Zimmertemperatur erwärmt.

## **2.5. Zellkultivierung**

### **2.5.1. Kulturbedingungen und sterile Arbeitsbedingungen**

In einem Brutschrank bei konstant vorherrschenden Bedingungen wie 37°C, 100% relativer Luftfeuchte, 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> fand in Gewebekulturflaschen, die mit Medium bedeckt wurden, die Zellanzucht statt. Um diese Kulturbedingungen auch in den Flaschen sicherzustellen, wurde der Schraubverschluss leicht geöffnet. Das Hydrogencarbonatpuffersystem im Medium und die CO<sub>2</sub>-Begasung sind in diesem Zusammenhang wichtig für die Konstanzhaltung des pH - Wertes in der vorhandenen Nährlösung. Außerdem verhindert die hohe Luftfeuchtigkeit ein Verdampfen des Mediums. Eine regelmäßige Reinigung dieses Wärmeschrankes ist obligat. Die Kultivierung der Mikro - und Makrotiterplatten für den Versuch selbst fand unter gleichen Bedingungen statt.

Sämtliche Arbeitsschritte der Zellanzucht und auch der Zellbehandlung für die eigentlichen Versuche wurden in einer Reinluftwerkbank mit vertikaler Strömung durchgeführt, um stets sterile Arbeitsbedingungen zu gewährleisten. Diese wurde zusätzlich vor und nach jedem Gebrauch durch Auswischen mit Ethanol (70%) gereinigt. Zur eigentlichen Zellkultivierung wurden nur sterile Medien und Lösungen verwendet, die stets im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, und nur vor Benutzung an Zimmertemperatur angepasst wurden. Um weiterhin die Sterilität zu wahren, wurden zusätzlich zum Flüssigkeitstransfer nur sterile Einmalkunststoffpipetten, sterile Combitips mit autoklavierten (bei 121°C und einem Druck von ca. 2 bar für 20 min.)

Pipettenspitzen mit deren zugehörigen Pipettierhilfen verwendet. Das Absaugen von Flüssigkeiten erfolgte mit hitzesterilisierten Pasteurpipetten in kurzer Form (145mm). Ein routinemäßiges Abflammen der Flaschenöffnungen und Pasteurpipetten über dem Bunsenbrenner war in diesem Zusammenhang weiterhin sehr nützlich, um eine Kontamination zu verhindern.

Vor jedem Arbeitstag wurde jede der Kulturen auf eine mögliche Kontamination mikroskopisch untersucht, so dass nur eindeutig sterile Zellen letztendlich auch zur Anwendung kamen.

### **2.5.2. Mykoplasmentest**

Um einen Mykoplasmenbefall auszuschließen, wurden die Zellkulturen ca. alle 3 – 4 Monate mithilfe eines ELISA – Tests (Mycoplasma Detection Kit; Enzyme Immunoassay, Best. NR. 1296744, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) auf Kontaminationen untersucht. Während des Zeitraums der Versuche waren alle durchgeführten Tests negativ.

### **2.5.3. Subkultivierung/Splitten**

Für die Versuche wurden eingefrorene und wiederaufgetaute oder in Kulturflaschen übernommene Subkulturen verwendet.

Die Zellpassagierung (entspricht der Subkultivierung) fand einmal wöchentlich statt, wobei sich die Passagennummern der Zellen folglich jede Woche um 1 erhöhte. In dieser Arbeit wurden bei den LNCaP die Passagennummern 51 bis 75, bei den PC-3 die Nummern 52 bis 77 und bei den DU-145 die Passagennummern 55 bis 80 verwendet.

Die Proliferationsrate sinkt bei Erreichen einer gewissen Zelldichte, dadurch können die Kulturen absterben. Aus diesem Grund wurden die Kulturen vor Erreichen der Maximaldichte durch Passagieren verdünnt.

Zu Beginn der Passagierung der Zellen wurde das Medium mittels steriler Pasteurpipette und einer Vakuumabsaugvorrichtung aus den Kulturflaschen entfernt. Diese wurde anschließend mit 5ml PBS gespült und das PBS in der Folge wieder

abgesaugt. Durch diese Spülung mit PBS wurde eine Inhibierung der anschließenden Trypsinwirkung durch Medienreste verhindert. Nach der Zugabe von 2ml Trypsin/EDTA- Lösung pro Gewebekulturflasche und Inkubation bei 37°C für ca. 5 - 10 Minuten im Wärmeschrank wurden die Zellen proteolytisch vom Flaschenboden abgelöst und die Zellen vereinzelt. Diese Aufteilung der Zellagglomerate in zählbare Einzelzellen und deren Ablösung vom Boden wurde zusätzlich durch vorsichtiges aber kräftiges Klopfen und Schütteln der Kulturflaschen erreicht und anschließend mittels Auflichtmikroskopierung bei 100facher Vergrößerung (Phasenkontrasteinstellung) optisch kontrolliert. Bei unzureichender Trypsinwirkung wurde die Inkubationszeit auf maximal 10 Minuten verlängert. Danach erfolgte durch Zugabe von 5ml Medium je Gewebekulturflasche die Abstopfung der proteolytischen Wirkung des Trypsins durch das darin enthaltene fetale Kälberserum und eine Überführung der nun vorliegenden 7ml Zellsuspension in sterile 12ml Zentrifugenröhrchen. Anschließende Zentrifugation dieser Röhrchen bei 400 x g über 5 Minuten. Der zellfreie Überstand wurde dann vorsichtig abgesaugt und das Zellsediment in 10ml resuspendiert. Von dieser, mit Hilfe einer sterilen Plastikpipette gut durchmischten Zellsuspension wurden schließlich 20 µl entnommen und mit 20µl Trypanblau gemischt (dies entspricht dann einer Verdünnung von 1:2) und damit eine Neubauer-Zählkammer befüllt. Avitale Zellen nehmen passiv diesen Farbstoff auf und stellen sich so im Mikroskop blau gefärbt dar. Die lebenden, d.h. ungefärbten Zellen der Mittelquadrate beider Kammern wurden anschließend bei 100facher Vergrößerung am Auflichtmikroskop mit Phasenkontrasteinstellung ausgezählt und so die Zellzahl der Zellsuspension wie folgt berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = (Z \times 10^4/\text{ml})$$

**Z:** gezählte Zellen in beiden Kammern zusammen, **10<sup>4</sup>/ml:** Kammerfaktor (um die Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension zu erhalten)

Durch die Addition der Zellzahlen beider Kammern fällt der zu berücksichtigende Verdünnungsfaktor 2 weg.

Für jede Neuaussaat der Zellen wurden für LNCaP  $3 \times 10^5$ , für DU-145  $0,7 \times 10^5$  und für PC-3  $0,9 \times 10^5$  Zellen pro Flasche eingesetzt. Daher wurde zunächst das entsprechende Volumen der benötigten Zellsuspension berechnet (siehe Beispiel)

Beispiel: bei 40 gezählten Zellen und 10 ml Zellsuspension ergibt sich eine Zellzahl von  $4 \times 10^6$  Zellen in 10ml Zellsuspension. Ausgehend von der Zellzahl der Probe, Berechnung des nun notwendigen Volumens zur Überführung von z.B.  $3 \times 10^5$  Zellen  
Anschließend wurden die neuen Kulturflaschen mit je 5ml Medium und dem entsprechenden berechnetem Volumen der Zellsuspension befüllt und in den Brutschrank gestellt.

#### **2.5.4. Medienwechsel**

Für ein gutes Wachstum und Vitalität der Zellen ist es nötig in gewissen regelmäßigen Zeitabständen einen Wechsel des Mediums durchzuführen.

Der Medienwechsel erfolgte jeweils nach 3 Tagen (72h) durch Absaugen des verbrauchten Mediums mittels steriler Pasteurpipetten, welche an eine Vakuumpumpe angeschlossen war. Es empfiehlt sich hierzu die Kulturflasche etwas schräg zu halten und die Pipettenspitze am tiefsten Punkt der Kulturflaschen anzusetzen, damit der wachsende Zellrasen nicht beschädigt oder gar abgesaugt wird und so das verbrauchte Medium vollständig entfernt werden kann. Anschließend wurden 5ml eines frischen,  $37^\circ\text{C}$  warmen Kulturmediums möglichst ohne Schaumbildung einpipettiert.

#### **2.5.5. Zellbevorratung, Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur Reduzierung der Passagenzahl und um Reserven der Zelllinien zu bilden wurden auch Zellen eingefroren. Das dazu verwendete Einfriermedium bestand aus 20% DMSO, 15% Medium und 65% fetalem Kälberserum und wurde auf Eis gelagert. Eine Zellsuspension mit  $10^7$  Zellen in 0,5ml Medium, die durch oben beschriebene Subkultivierung entstand, wurden in ein steriles Einfrierröhrchen (Nunc) gefüllt und anschließend auf Eis gestellt. Dazu wurde nun

nach und nach 0,5ml Einfriermedium zugegeben und die so entstandene Suspension für 24 Stunden bei -80°C in einer Einfrierbox (Nalgene) tiefgefroren. Eine langsame Temperaturadaption ist so möglich, bevor die Suspension am Anschluss in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff bei minus 196°C eingelagert wurde. Einer Variabilität der Zellen durch Subkultivierung wird so entgegenwirkt.

Das Wiederauftauen dieser Zellen erfolgte relativ schnell und unkompliziert mittels Handwärme innerhalb 2 Minuten. Die aufgetaut Zellsuspension wurde dann sofort mit 5ml Medium versetzt und bei 400 x g über 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte, wie bereits oben bei der Subkultivierung beschrieben, die Resuspension in 10ml Medium, die Vorbereitung zur Zellzahlbestimmung mit anschließender Auszählung und die Aussaat der entsprechenden Zellzahl in eine neue und sterile Kulturflasche.

Vor der Verwendung dieser „neuen“ Zellen für Versuchsansätze wurden die Zellen jeweils mindestens zwei weitere Male passagiert bzw. subkultiviert.

## **2.6. Versuchsdurchführung**

### **2.6.1. Versuchsplanung und -vorbereitung**

Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen praktischerweise so gesplittet (siehe Punkt „Splitten“) und an diesen Tagen auch die entsprechenden Versuche angesetzt, dass die Bestrahlungstage nicht aufs Wochenende fielen.

Zunächst wurden für jede unbehandelte Zelllinie Wachstumskurven erstellt, um die optimale Zellzahl pro Vertiefung und die optimale Versuchsdauer während des exponentiellen Wachstums zu ermitteln. Am geeignetsten erwiesen sich folgende Ansatzzellzahlen für eine Vertiefung in einer Platte:

#### Zelllinie - Zellzahl/well

LNCaP - 6000

DU-145 - 1000

PC-3 - 3000

Es wurde pro Zelllinie die definierte Zellzahl in 200 µl zellspezifischem Medium pro Well in 96-Loch-Mikrotiterplatten eingebracht. Diese Gewebekulturplatten wurden nach der Einsaat in Ruhe im Brutschrank bei 37°C belassen und nur zur Zytostatikapplikation oder Bestrahlung aus dem Wärmeschrank geholt.

Die Versuchsansätze dieser Arbeit erstreckten sich jeweils über einen Zeitraum von 6 Tagen (144h), wobei der „Tag 0 „ dem Tag der Aussaat der jeweiligen Zellen auf die Gewebekulturplatten entspricht. Alle weiteren Tage wurden in fortlaufender Nummerierung bezeichnet. Am Tag 6 wurde stets mittels XTT- Test gemessen und somit der Versuch abgeschlossen.

Bei jeder Kulturplatte wurde eine Anzahl Wells nur mit 200 µl Medium ohne Zellen befüllt. Nur so kann bei der Titerplattenphotometer- Messung( XTT) am Tag 6 der sogenannte Blank- Wert ermittelt werden.

Vor Versuchsbeginn wurden alle notwendigen Materialien bereitgestellt und gegebenenfalls erwärmt, um einen reibungslosen Ablauf des Versuches zu gewährleisten.

### **2.6.2. Bestrahlung**

Sämtliche Bestrahlungsversuche wurden im Institut für Strahlentherapie am Klinikum Rechts der Isar (Direktor Prof. Dr. Molls) durchgeführt. Dazu wurden die Versuchsgewebepplatten mit den jeweiligen Zellen in isolierten Styroporbehältern transportiert, um so die Kulturbedingungen des Brutschrankes möglichst wenig zu modifizieren und Temperaturschwankungen zu vermeiden.

Die Bestrahlung der Zellkulturplatte fand unter euoxischen Bedingungen bei ca. 22°C Raumtemperatur statt. Mittels eines Hochvoltlinearbeschleunigers der Firma Siemens erfolgte diese Bestrahlung mit 10MeV Photonenbremsstrahlung bei einer Dosisleistung von ca. 4,7 Gray /Minute (dies entspricht in etwa 335 Impulsen pro Minute). Der Abstand der Kulturplatten zur Strahlenquelle betrug dabei gleich bleibend ca. 80 cm und es wurde stets von unten bestrahlt. Hierzu wurden die Platten auf einer 1cm dicken Plexiglasplatte im Strahlengang positioniert und zusätzlich mit „Superflab“ mit der Dicke von 8mm abgedeckt. Die Grösse dieses Bestrahlungsfeldes betrug ungefähr 30cm x 30cm. Hierbei muss beachtet werden,

dass gerätespezifisch das Strahlenmaximum bei diesen Einstellungen erst beim Durchtritt durch das Gewebe in etwa 2,5 cm Tiefe erreicht wird. Um trotzdem die optimale Strahlenwirkung auf den Gefäßboden zu fokussieren, wurde „Superflab“, das einem H<sub>2</sub>O-Gel entspricht, als Gewebeäquivalent verwendet.

Je nach Versuchskombination wurden die Versuchsplatten bzw. die dazu gehörenden Kontrollplatten mit einer Einzeldosis von 5 Gray am Tag 1 und 3 nach Aussaat (entspricht Tag 0) jeweils morgens um 7.30Uhr bestrahlt. Erfolgte zusätzlich an einem dieser Tage noch eine Zytostatikaapplikation so wurde diese stets vor der Bestrahlung verabreicht (zwischen 5Uhr und 7.30Uhr).

### **2.6.3. Zytostatikabehandlung**

Erst kurz vor der eigentlichen Zugabe zu den Zellen wurden die Zytostatika aufgetaut und entsprechend den gewünschten Konzentrationen mit dem passenden Kulturmedium verdünnt.

Die Zugabe des jeweiligen Zytostatikums auf die eigentliche Versuchsgewebekulturplatte bzw. Kontrollplatte erfolgte je nach Kombination an den Tagen 1, 2, 3 (Tag 0 entspricht Aussaat der Zellen) und jeweils vor der Bestrahlung.

Mittels Verdünnungsreihen mit den entsprechenden Medien für die jeweilige Zelllinie wurden die Zytostatikalösungen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt.

Diese Auswahl der am geeignetsten verwendeten Konzentrationen erfolgte aufgrund Vorversuche in unserem Labor.



#### **2.6.4. Kombinierte Zytostatika- und Strahlenapplikation**

Das Procedere bei der Kombination von Bestrahlung und Zytostatikaapplikation ist jeweils mit der Methodik der Einzelbehandlungen vergleichbar.

Für diese Untersuchungen wurden folgende Versuchskombinationen gebildet:

##### Einmalige Exposition der drei Zelllinien (am Tag 1) mit Imatinib, Etoposid und Docetaxel

Die entsprechende Zellzahl der Linien DU 145, LNCaP und PC3 wurden einmalig am Tag 1 den entsprechenden Zytostatika Docetaxel, Etoposid und Imatinib exponiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte jeweils am Tag 6.

##### Kontrollgruppen (ohne Zytostatikaexposition)

Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die anstelle der antineoplastischen Substanzen nur das zellspezifische Medium erhielten. Auch hier wurde am Tag 6 die Zellzahl gemessen.

Diese „Kontrollzellen“ ohne Zugabe von Zytostatika dienen zur Beurteilung des Proliferationsverhalten der Zellen beim Versuch.

Zur Überprüfung der entsprechenden Wachstumsmodulation unter Zytostatikaapplikation und Radiatio wurden jeweils eigene entsprechende Kontrollversuche (Zellen, die ohne jede Substanzzugabe im Kulturmedium angezüchtet wurden, Zellen die am entsprechenden Tag mit den einzelnen neoplastischen Substanzen exponiert wurden und Zellen, die nur der Bestrahlung am entsprechenden Tag ausgesetzt wurden) durchgeführt.

##### Exposition der Zellen mit Imatinib, Docetaxel oder Etoposid und zusätzlich Radiatio

DU 145, PC3 und LNCaP wurden an unterschiedlichen Tagen mit den entsprechenden antineoplastischen Substanzen behandelt und zusätzlich an unterschiedlichen Tagen mit 5 Gy bestrahlt.

In dieser Arbeit wurden folgende Kombinationen diesbezüglich untersucht:

<u>Imatinib</u>	<u>Radiatio</u>	<u>Etoposid</u>	<u>Radiatio</u>	<u>Docetaxel</u>	<u>Radiatio</u>
Tag		Tag	Tag	Tag	Tag
1	+	1	2	+	1
1	+	3	1	+	3
3	+	1	3	+	1

Die Zellzahlbestimmung erfolgte jeweils am Tag 6.

Alle Versuche und Kombinationen wurden mindestens 2-mal zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt.

### 2.6.5. XTT- Test (Zytotoxizitätstest)

Mit Hilfe eines XTT- Test wurden die metabolisch aktiven, lebenden Zellen erfasst. Bei XTT handelt es sich um ein Terazolium- Salz, das von lebenden Zellen durch Dehydrogenaseenzyme bei Anwesenheit eines elektronenbindenden Agens (PMS) in ein wasserlösliches Formazan (farbig) umgesetzt wird (14,15).

Für den XTT- Test liefen jeweils zwei Kontrollen auf einer Gewebekulturplatte pro Test mit. Eine dieser Kontrollen bestand hierbei nur aus Medium ohne Zellen (blank), die andere aus unbehandelten Zellen und Medium. Der Blank- Control wird aus dem Mittelwert der Wells gebildet und von den Absorptionswerten subtrahiert.

Somit sind die in Normalmedium inkubierten Zellen als Kontrolle zur Beurteilung einer Zellproliferationsänderung nach Inkubation mit den jeweiligen Chemotherapeutika sowie nach Bestrahlung zu sehen.

Der Vergleich der Absorptionswerte von Wells mit unterschiedlich hoher Zytostatikakonzentration bzw. unterschiedlicher Kombinationen von Bestrahlung und Zytostatika ermöglicht die Bestimmung des Einflusses auf den Zellstoffwechsel. Je höher die Absorption, desto größer die Proliferationsrate.

Nach der entsprechenden Versuchsansatzzeit von 6 Tagen wurde in die Vertiefungen der Kulturplatten je 50µl/well XTT- Reagenz (= Mischung aus 5ml XTT und 100µl PMS) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von ca. 4h im Brutschrank

erfolgte schließlich bei einer Wellenlänge von 490nm und einer Referenzlänge von 650nm die Messung der optischen Dichte am Mikroplattenphotometer. (15, S. 258)

### 2.6.6. Statistische Methoden und Darstellung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden in sogenannten Dose-Response-Kurven dargestellt. Dabei wurden Zellproliferationen in Relation zu einer applizierten Dosis einer Einzelsubstanz aufgetragen. So wird auf der x- Achse die Konzentration der entsprechenden Substanz und auf der Y- Achse der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen (Cell survival rate, anteilig im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollpopulation) dargestellt. Hierzu war die Proliferationsmessung der Zellen nach Inkubation mit ansteigenden Zytostatikakonzentrationen notwendig.

Die Kurven verlaufen sigmoid mit einem steilen Abfall der Zellproliferation im optimalen Wirkungsbereich der Substanz.

Mittels dieser Diagramme ist es möglich, die IC 50 (Proliferationshemmung bei 50% der Zellen) zu ermitteln. Die IC 50 ist also die Konzentration des jeweiligen Zytostatikums, die zu einem Zelluntergang von 50% führt.

Dieser ermittelte Wert wird letztendlich für die Kombinationsversuche benötigt.

Um eine Zuordnung der Werte zu ermöglichen, werden die Ergebnisse jeweils in tabellarischer Form dargestellt (Tabelle ...).

<b>Substanz A</b> <b>/µM</b>	<b>%Überleben</b>	<b>SD - %FCS</b>	<b>95%</b>	<b>Ki-o</b>	<b>Ki-u</b>	<b>n</b>
<b>0</b>	100	5,4	1,9	101,9	98,1	30
<b>0,1</b>	92	7,3	2,6	94,9	89,7	30
<b>1</b>	93	7,1	2,6	95,4	90,3	30
<b>10</b>	52	9,5	3,5	55,5	48,5	29
<b>12,5</b>	42	11,6	4,2	45,7	37,4	30
<b>15</b>	36	6,6	2,4	37,9	33,1	29
<b>20</b>	26	4,3	1,6	27,8	24,7	29
<b>22,5</b>	18	3,1	1,1	18,7	16,5	30
<b>25</b>	12	3,6	1,3	13,3	10,8	30
<b>30</b>	8	2,7	1,0	8,5	6,6	30
<b>50</b>	2	0,9	0,3	2,6	1,9	30

Tabelle...: Tabellarisches Beispiel einer Dose- Response

**Legende:**

% Überleben (MV%): prozentuales Überleben im Vergleich zur unbehandelten Zellpopulation

SD- %FCS: Standardabweichung

95%: 95%- Konfidenzintervall

Ki-o/ Ki-u: Ober-/ Untergrenze Konfidenzintervall

n: Anzahl der ausgewerteten Wells

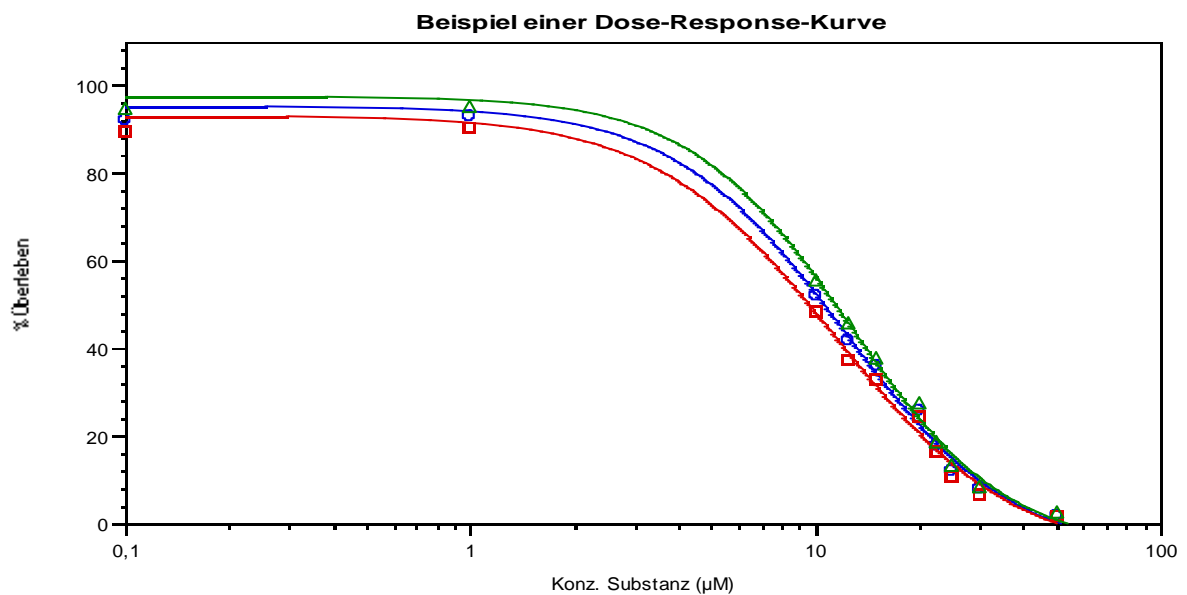


Abbildung x: Grafisches Beispiel einer Dose- Response-Kurve

**Legende:**

○: Dose- Response- Kurve der Substanz X

△: Obergrenze des 95%- Konfidenzintervall

□: Untergrenze des 95%- Konfidenzintervall

Um die Dose - Response - Kurven zu bearbeiten, wurde ein MATLAB-basiertes Computerprogramm entwickelt. Mit Hilfe dieses Programmes ist es möglich die X-Werte (entspricht den Konzentrationen) und deren 95% Konfidenzintervalle für definierte Y- Werte mittels einer logistischen 4-Parameter Regression zu bestimmen (Wagenpfeil 2003).

Im obigen Beispiel läge der IC50- Wert bei 10,616  $\mu\text{M}$  (95%- Konfidenzintervall:9,617-11,449  $\mu\text{M}$ )

Der Vergleich der IC50-Werte dieser Arbeit erfolgte zelllinien- und substratspezifisch (Chemotherapie) bzw. dosisspezifisch (Bestrahlung) mittels t-Test für unverbundene Stichproben.

Das Signifikanzniveau wurde in der Arbeit auf  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Dosiseffektkurven und IC50 nach Zytostatikamonotherapie

Vorversuche haben gezeigt, dass alle drei Zelllinien nur für eine gewisse Zeitspanne ein lineares Wachstum zeigen.

Um zunächst die Wirkung der verschiedenen Chemotherapeutika im einzelnen auf die Zellen bzw. das Zellüberleben zu untersuchen, wurden bei stets gleichen Versuchsbedingungen jeweils nach Aussaat der Zellen nach 24h (Tag 1) unterschiedliche Konzentrationen von Imatinib, Etoposid und Docetaxel appliziert.

Mittels XTT- Test wurde nach jeweils 5 Tagen (nach 120h) die Proliferationsmessung durchgeführt und eine entsprechende Dosis-Effekt- Kurve erstellt aus der sich die IC50 für die jeweilige Substanz bestimmt lässt.

Es wird dadurch eine Verfälschung der Ergebnisse durch das natürliche Absterben der Zellen bei Erreichen einer gewissen Populationsdichte verhindert, die zytotoxische Wirkung wird innerhalb des linearen Wachstumsbereichs entfaltet.

In den folgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse der Effekte der einzelnen Chemotherapeutika auf die Zellproliferation der drei Zelllinien LNCaP, DU145 und PC3 dargestellt (Dosis- Effekt- Kurven).

Für jeden Versuchsansatz wurden pro Konzentration 6 Wells gemessen. Die Ergebnisse stammen aus jeweils mindestens fünf unabhängigen Versuchsreihen..

Es sind hier tabellarisch jeweils die Mittelwerte des Zellüberlebens in Prozent angegeben und deren Standardabweichungen bezogen auf die unbehandelten Kontrollen. Auch sind jeweils die korrespondierenden 95% - Konfidenzintervalle aufgelistet. Die entsprechenden IC50- Werte ergeben sich aus den Dose- Response – Kurven.

Die Ergebnisse für die Berechnung der Konzentrationen bei 50%iger(IC-50) Hemmung sind zusätzlich in tabellarischer Form (Tabelle 10) zusammengefasst.

## 3.1.1. Imatinib

Tab. 1: Modulation der Zellproliferation bei LNCaP nach Applikation von 0,1-50µM Imatinib über 5 Tage.

Imatinib/µM	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	100	5,4	1,9	101,9	98,1	30
0,1	92	7,3	2,6	94,9	89,7	30
1	93	7,1	2,6	95,4	90,3	30
10	52	9,5	3,5	55,5	48,5	29
12,5	42	11,6	4,2	45,7	37,4	30
15	36	6,6	2,4	37,9	33,1	29
20	26	4,3	1,6	27,8	24,7	29
22,5	18	3,1	1,1	18,7	16,5	30
25	12	3,6	1,3	13,3	10,8	30
30	8	2,7	1,0	8,5	6,6	30
50	2	0,9	0,3	2,6	1,9	30

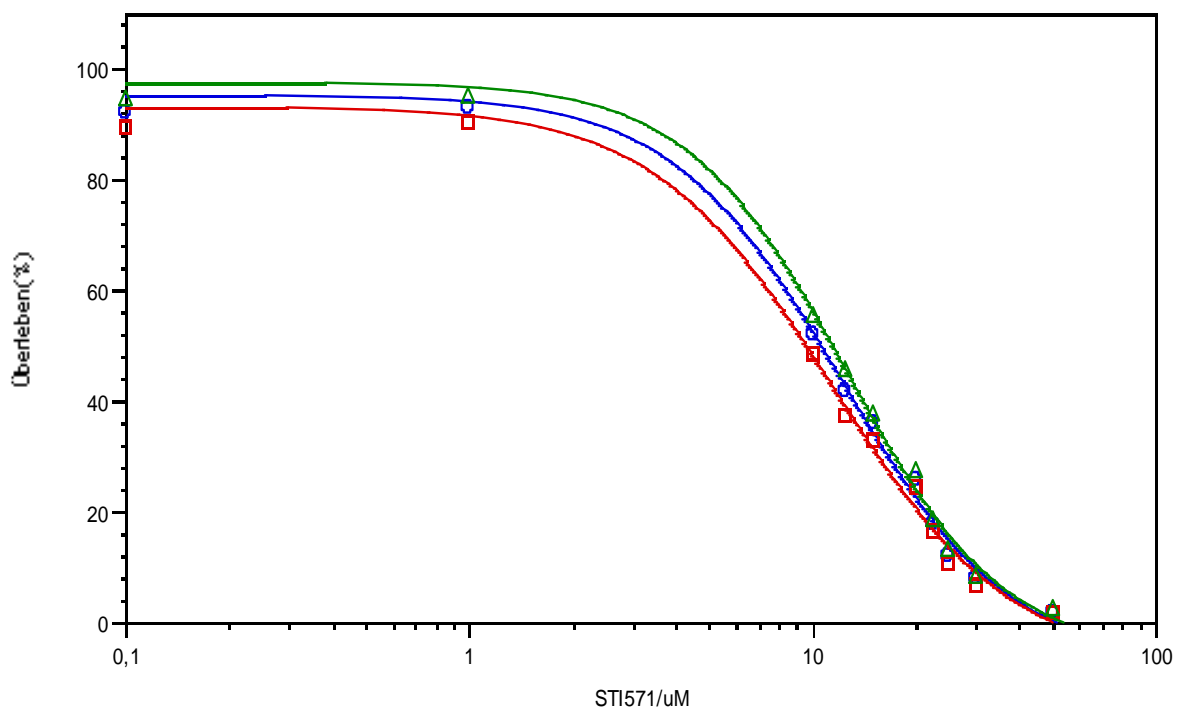
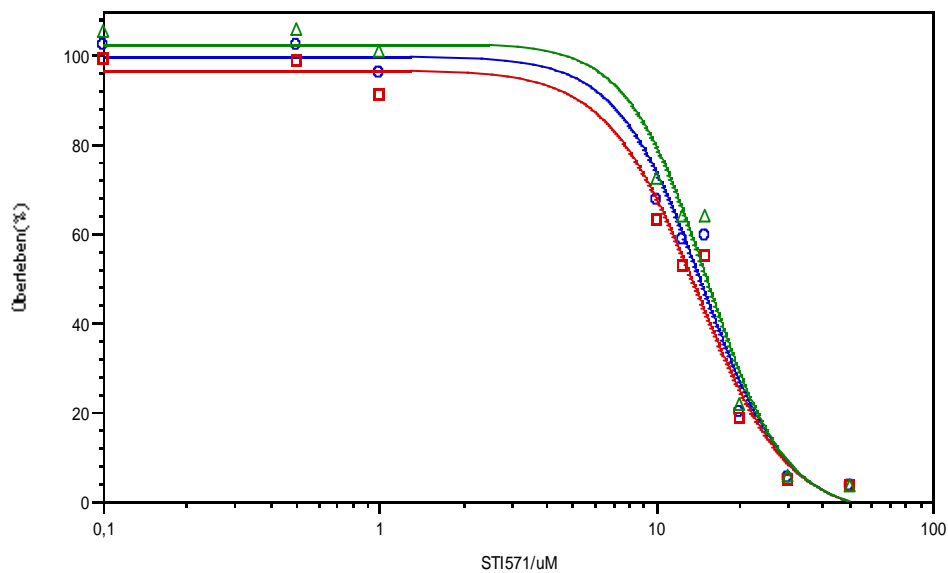


Abb.5: Dosiseffektkurve von LNCaP unter der Behandlung von Imatinib ( STI571) mit Konzentrationen von 0,1 bis 50µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen

**Tab. 2: Modulation der Zellproliferation bei PC3 nach Applikation von 0,1- 50 $\mu$ M über 5 Tage**

Imatinib/ $\mu$ M	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	100,0	3,6	1,3	101,3	98,7	30
0,1	102,4	8,4	3,0	105,4	99,4	30
0,5	102,3	9,6	3,5	105,8	98,8	29
1	96,3	13,0	4,8	101,1	91,4	28
10	67,9	13,2	4,8	72,7	63,1	29
12,5	58,6	14,7	5,5	64,1	53,0	27
15	59,6	11,9	4,5	64,0	55,1	27
20	20,2	4,4	1,7	21,9	18,5	26
30	5,5	1,3	0,5	6,0	5,0	30
50	3,5	0,3	0,1	3,6	3,4	30

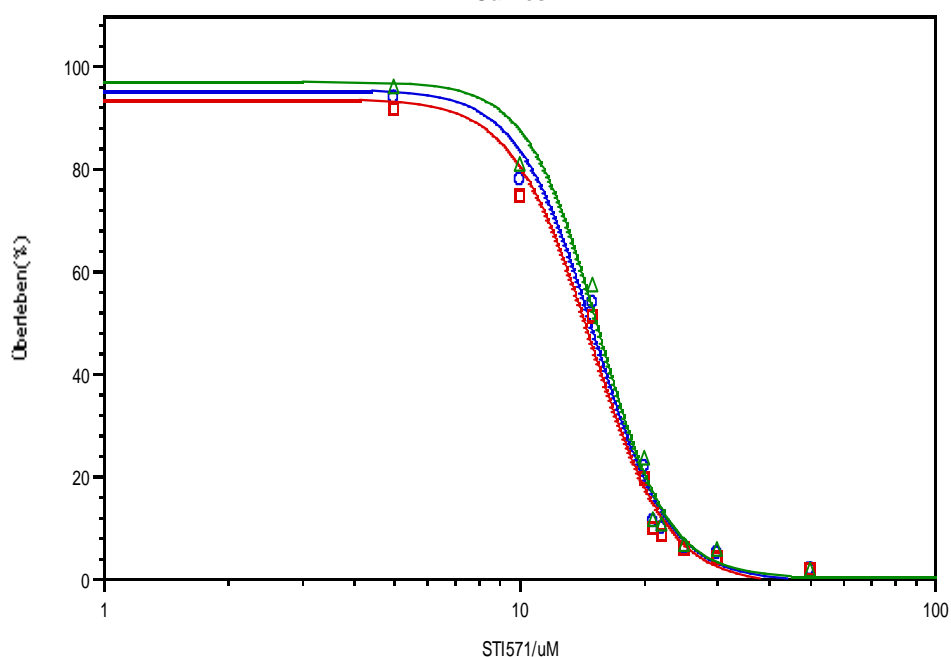


**Abb.6: Dosiseffektkurve von PC3 unter der Behandlung von Imatinib (STI571) mit Konzentrationen von 0,1 bis 50 $\mu$ M. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.**



**Tab. 3: %-Zell-Überleben bei DU 145 nach Applikation von 5-50 $\mu$ M Imatinib über 5 Tage.**

Imatinib/ $\mu$ M	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	100	4,98	1,78	101,77	98,21	30
5	94	6,28	2,25	96,27	91,77	30
10	78	8,69	3,11	81,19	74,97	30
15	54	7,73	3,03	57,49	51,43	25
20	22	5,47	2,06	23,65	19,52	27
21	11	2,46	0,88	11,52	9,76	30
22	10	2,41	0,91	10,50	8,67	27
25	6	1,58	0,58	6,84	5,69	29
30	5	2,05	0,77	5,62	4,07	27
50	2	0,39	0,14	1,95	1,67	29



**Abb. 7: Dosiseffektcurve von DU145 unter der Behandlung von Imatinib (STI571) mit Konzentrationen von 0,1 bis 50 $\mu$ M. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.**

Die entsprechenden IC50 Werte (Tabelle 10) liegen für Imatinib bei den LNCaP-Zellen bei 10,62 $\mu$ M (9,62-11,45), bei PC3 bei 14,37  $\mu$ M(13,44-15,20) und bei DU145 bei 14,82(14,38-15,32). Die maximale Hemmung aller drei Zelllinien befand sich im Konzentrationsbereich von 50 $\mu$ M.

## 3.1.2. Docetaxel

Tab. 4: %-Zell-Überleben bei LNCaP nach Applikation von 0,00001-50µM Docetaxel über 5 Tage

TXT/µM	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	100,0	7,7	2,6	102,6	97,4	34
0,00001	98,0	12,7	4,5	102,5	93,6	31
0,0001	97,6	11,7	4,1	101,7	93,4	31
0,0005	79,2	10,5	3,9	83,1	75,3	28
0,001	44,3	8,6	3,2	47,6	41,1	27
0,00125	38,4	8,5	3,1	41,5	35,2	28
0,0015	28,4	8,3	2,9	31,3	25,4	31
0,002	20,6	5,0	1,7	22,3	18,9	32
0,005	10,7	4,2	1,4	12,1	9,3	34
0,01	6,4	1,8	0,6	7,0	5,9	35
0,02	8,0	2,1	0,7	8,6	7,3	36
0,05	6,5	1,8	0,6	7,0	5,9	35
2	10,6	2,4	0,8	11,4	9,7	32
20	2,0	0,5	0,1	2,2	1,9	36
50	3,6	0,7	0,2	3,8	3,3	36

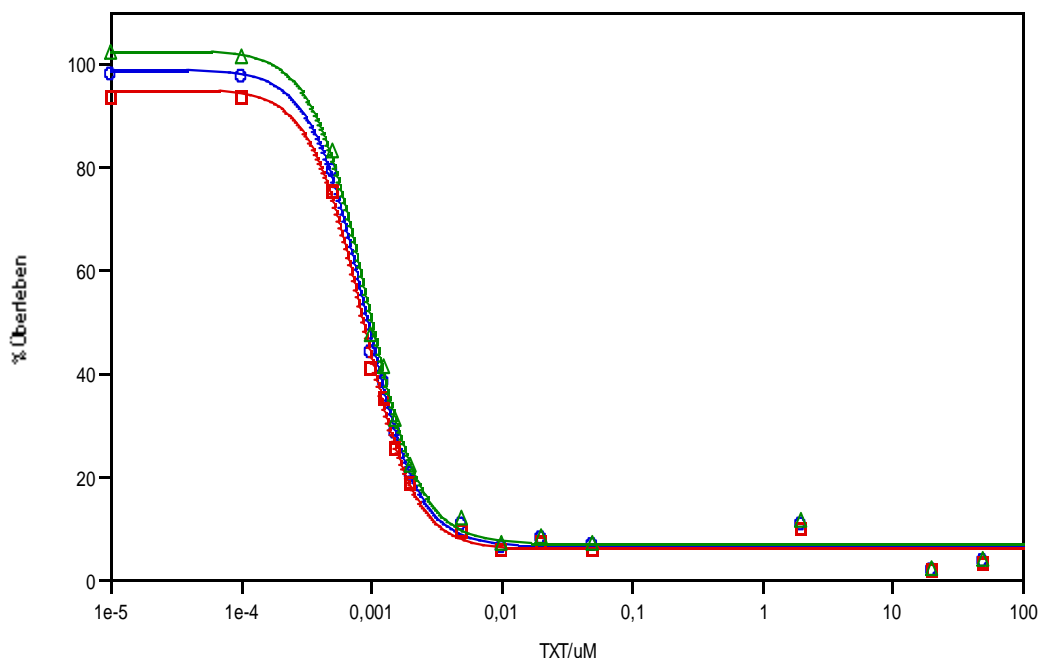
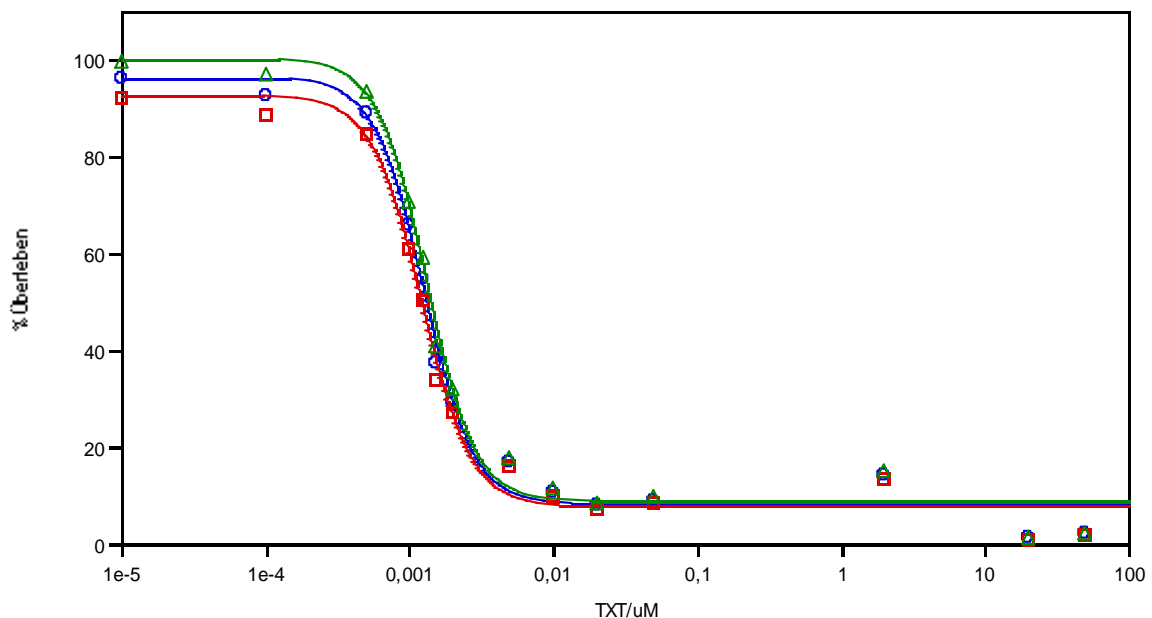


Abb. 8: Dosiswirkungskurve von LNCaP unter der Behandlung von Docetaxel (TXT) mit Konzentrationen von 0,00001 bis 50µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen

**Tab. 5: %-Zell-Überleben bei PC3 nach Applikation von 0,00001-50 $\mu$ M Docetaxel über 5 Tage**

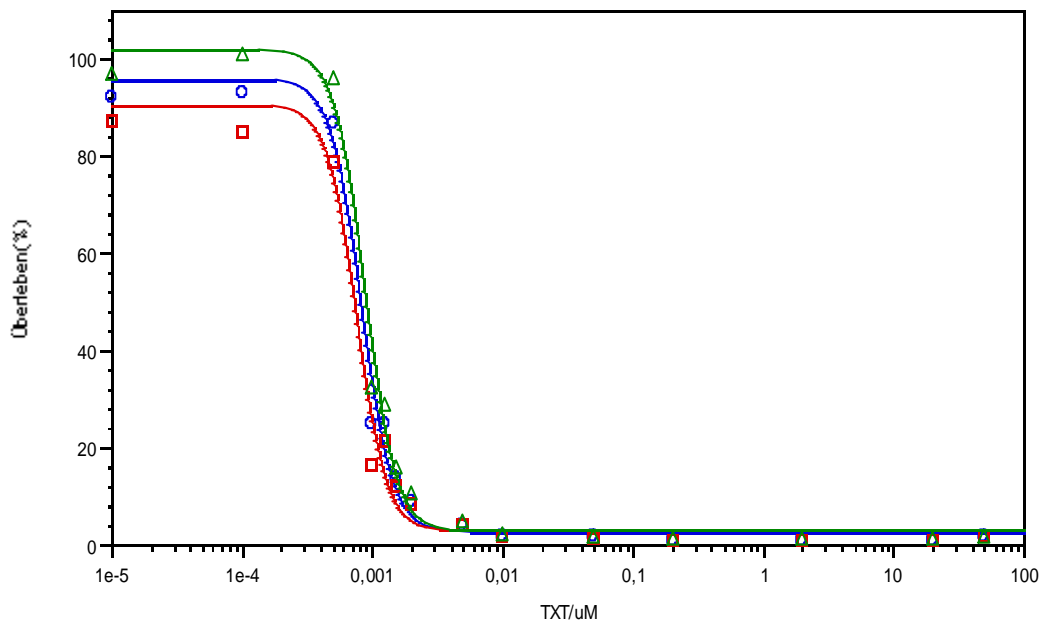
TXT/ $\mu$ M	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	100,0	10,9	3,6	103,6	96,4	36
0,00001	96,2	10,6	3,7	99,9	92,4	31
0,0001	92,8	11,5	4,1	96,9	88,7	30
0,0005	89,0	11,9	4,3	93,4	84,7	29
0,001	66,1	13,1	4,9	71,0	61,2	28
0,0013	54,9	11,8	4,5	59,3	50,4	27
0,0015	37,4	9,7	3,5	40,9	33,9	29
0,002	29,6	6,7	2,5	32,0	27,1	29
0,005	16,9	2,8	0,9	17,8	15,9	33
0,01	10,7	2,5	0,8	11,6	9,9	34
0,02	7,8	2,0	0,7	8,5	7,1	32
0,05	9,1	1,8	0,6	9,7	8,5	33
2	14,3	2,2	0,8	15,1	13,5	30
20	1,2	0,4	0,1	1,3	1,0	35
50	2,1	0,6	0,2	2,3	1,9	30



**Abb. 9: Dosiseffektkurve von PC3 unter der Behandlung von Docetaxel (TXT) mit Konzentrationen von 0,00001 bis 50 $\mu$ M. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen**

**Tab. 6: %-Zell-Überleben bei DU 145 nach Applikation von 0,00001-50µM Docetaxel über 5 Tage**

TXT/µM	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	101	7,6	3,0	104,2	98,1	24
0,00001	92	11,7	5,0	97,3	87,3	21
0,0001	93	17,2	8,2	101,3	84,9	17
0,0005	87	18,7	8,7	96,1	78,8	18
0,001	25	13,5	8,0	32,6	16,6	11
0,00125	25	9,4	3,8	29,1	21,5	24
0,0015	14	5,7	2,0	16,1	12,1	31
0,002	9	3,0	1,1	10,5	8,3	31
0,005	4	1,0	0,3	4,8	4,1	35
0,01	2	0,5	0,2	2,1	1,8	34
0,05	2	0,3	0,1	1,7	1,5	36
0,02	1	0,4	0,1	1,3	1,0	36
2	1	0,4	0,1	1,3	1,1	36
20	1	0,3	0,1	1,3	1,1	36
50	2	0,3	0,1	2,0	1,8	36



**Abb. 10: Dosiseffektcurve von DU 145 unter der Behandlung von Docetaxel (TXT) mit Konzentrationen von 0,00001 bis 50µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.**

Die IC50 Werte (Tabelle 10) liegen für Docetaxel bei den LNCaP- Zellen bei 0,94nM (0,87-1,0), bei PC-3 bei 1,31nM(1,21-1,4) und bei DU145 bei 0,81nM(0,72-0,89). Die maximale Hemmung aller drei Zelllinien befand sich im Konzentrationsbereich von 0,02µM bis 50µM (LNCaP: 20µM – 50µM, DU145: 0,02µM – 50µM, PC3: 20µM – 50µM).

## 3.1.2. Etoposid

Tab. 7: %-Zell-Überleben bei LNCaP nach Applikation von 0,001-100µM Etoposid über 5 Tage

Etoposid/µM	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	100	4,3	1,4	101,6	98,7	34
0,001	97	5,9	2,0	98,7	94,6	33
0,01	93	5,9	2,1	95,0	90,9	32
0,1	83	6,5	2,2	85,6	81,2	33
0,25	47	5,5	1,9	48,9	45,1	33
0,5	47	7,0	2,5	49,2	44,3	31
1	36	4,7	1,6	37,4	34,2	33
5	18	3,0	1,0	18,7	16,7	32
10	16	2,9	1,0	16,5	14,6	34
50	9	1,8	0,6	9,6	8,4	33
100	8	1,7	0,6	8,3	7,2	34

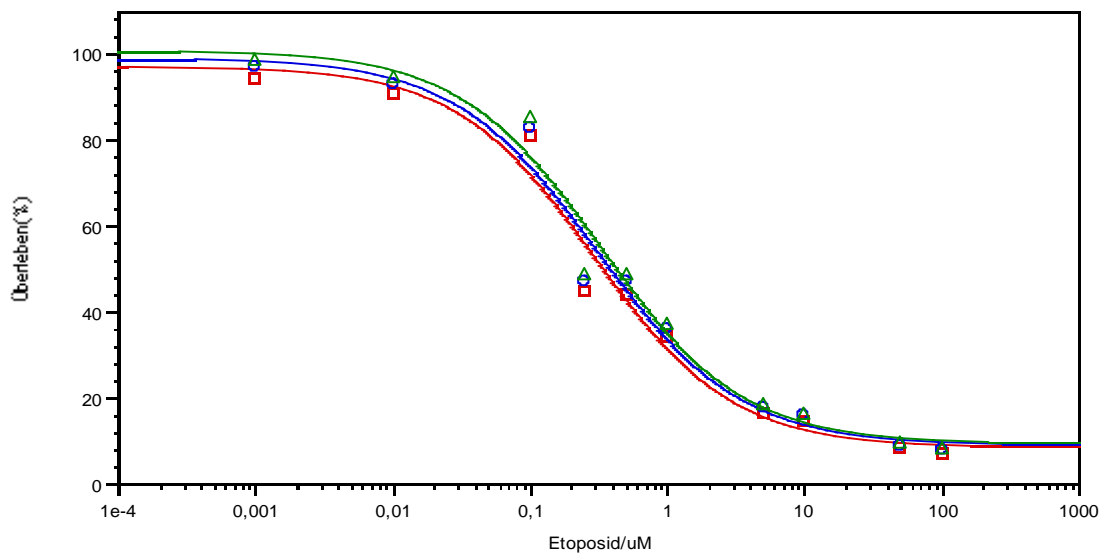
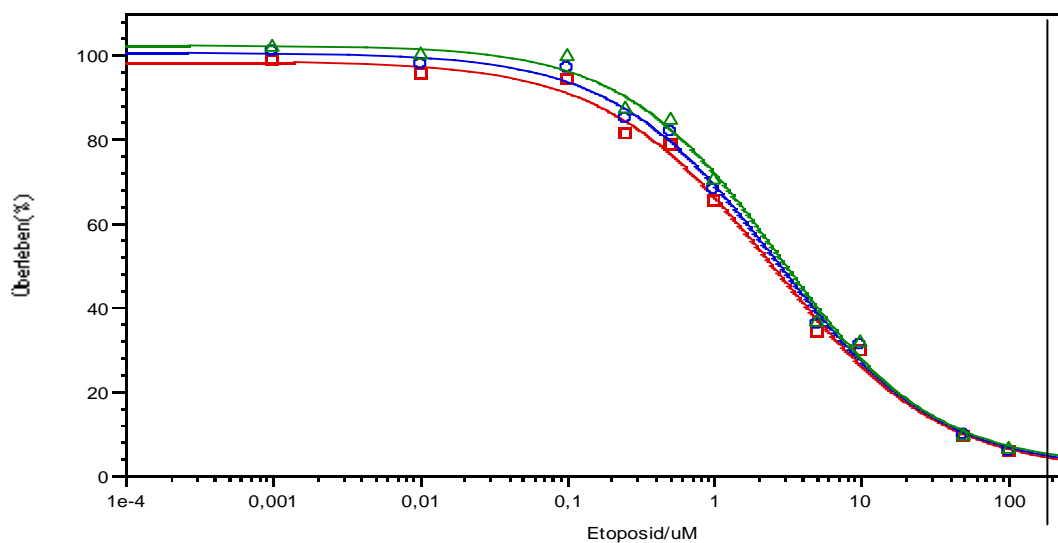


Abb. 11: Dosiseffektkurve von LNCaP unter der Behandlung von Etoposid mit Konzentrationen von 0,001 bis 100µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen

**Tab. 8: %-Zell-Überleben bei PC3 nach Applikation von 0,001-100µM Etoposid über 5 Tage**

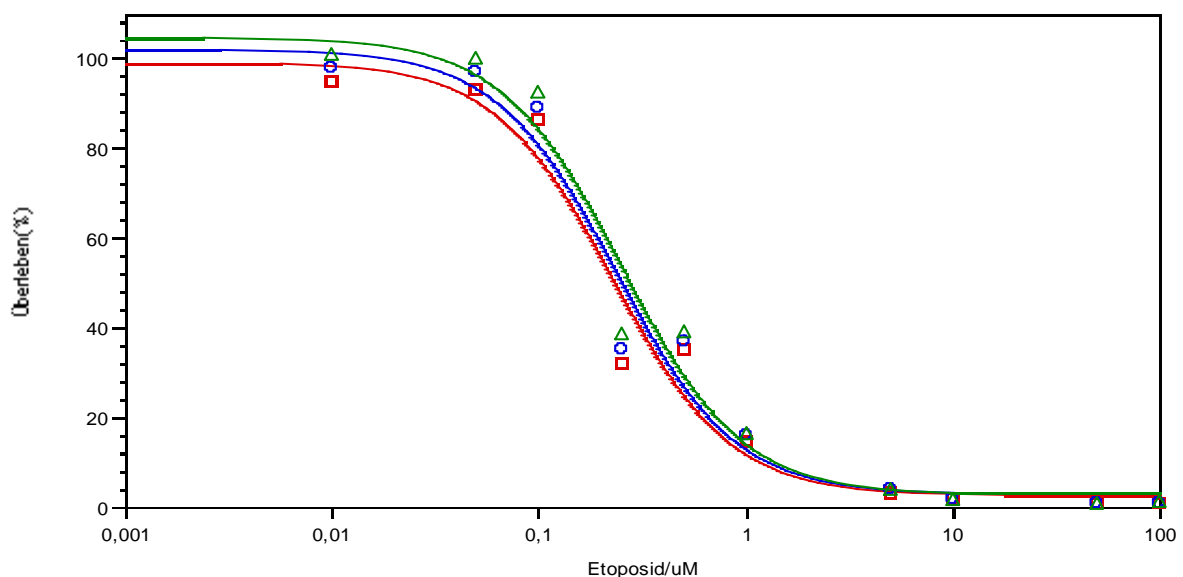
Etoposid/µM	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	100	4,1	1,4	101,1	98,3	32
0,001	101	5,2	1,8	102,4	98,8	31
0,01	98	7,2	2,5	100,8	95,9	33
0,1	97	8,2	2,9	100,1	94,4	31
0,25	85	8,7	3,0	87,8	81,7	31
0,5	82	8,5	3,1	84,9	78,8	30
1	68	8,0	2,7	70,8	65,5	34
5	36	3,9	1,4	37,0	34,3	32
10	31	3,5	1,2	32,2	30,0	34
50	10	1,2	0,4	10,0	9,2	35
100	6	0,9	0,3	6,5	5,9	34



**Abb. 12: Dosiseffektkurve von PC3 unter der Behandlung von Etoposid mit Konzentrationen von 0,001 bis 100µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen**

**Tab. 9: %-Zell-Überleben bei DU145 nach Applikation von 0,01-100µM Etoposid über 5 Tage**

Etoposid/µM	%Überleben	SD - %FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0	100	6,6	2,2	102,2	97,8	36
0,01	98	9,1	3,0	100,9	95,0	36
0,05	97	9,5	3,4	100,0	93,2	30
0,1	89	9,2	3,3	92,8	86,2	30
0,25	35	8,6	3,2	38,7	32,2	27
0,5	37	5,8	2,0	39,2	35,2	31
1	16	2,7	0,9	16,6	14,8	34
5	4	1,1	0,4	4,0	3,3	36
10	2	0,6	0,2	2,0	1,6	36
50	1	0,5	0,2	1,1	0,8	35
100	1	0,5	0,2	1,4	1,0	35



**Abb. 13: Dosis-effektkurve von DU145 unter der Behandlung von Etoposid mit Konzentrationen von 0,01 bis 100µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen**



Die IC<sub>50</sub> Werte (Tabelle 10) liegen für Etoposid bei den LNCaP- Zellen bei 0,386 $\mu$ M (0,346-0,426), bei PC3 bei 2,805 $\mu$ M(2,498-3,079) und bei DU145 bei 0,252 $\mu$ M(0,233-0,276). Die maximale Hemmung aller drei Zelllinien befand sich im Konzentrationsbereich von 10 $\mu$ M bis 100 $\mu$ M (LNCaP: 100 $\mu$ M, DU145: 10 $\mu$ M - 100 $\mu$ M, PC3: 100  $\mu$ M).

### Zusammenfassung der Ergebnisse der Monotherapien

In der folgenden Tabelle sind alle in den Versuchen bestimmten Konzentrationen mit entsprechenden 95%- Konfidenzintervallen für eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation zur besseren Übersicht zusammengestellt.

**Tab. 10: IC<sub>50</sub> - Werte der Prostatakarzinomzelllinien bei den verwendeten Chemotherapeutika (Werte repräsentieren den Mittelwert und das 95%-Konfidenz Intervall von mindestens 5 voneinander unabhängigen Versuchen)**

Chemotherapeutika	LNCaP	PC-3	DU 145
Imatinib ( $\mu$ M)	10,62(9,62-11,45)	14,37(13,44-15,2)	14,82(14,38-15,32)
Docetaxel (nM) <sup>o</sup>	0,94(0,87-1,0)	1,31(1,21-1,4)	0,81(0,72-0,89)
Etoposid ( $\mu$ M)	0,386(0,346-0,426)	2,805(2,498-3,079)	0,252(0,233-0,276)

<sup>o</sup> Der IC<sub>50</sub> Wert von Docetaxel ist im Gegensatz zu den anderen Chemotherapeutika in Nanomolar angegeben

### **3.2. Modulation der Zellproliferation durch die Kombination von Chemotherapie und Radiatio**

In den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse der Effekte der Kombinationsvarianten von Chemotherapeutika und Strahlentherapie bei den drei Zelllinien LNCaP, DU145 und PC3 dargestellt.

Es sind hier jeweils die Mittelwerte des Zellüberlebens in Prozent angegeben und deren Standardabweichungen bezogen auf die unbehandelten Kontrollen. Auch sind jeweils die korrespondierenden 95% - Konfidenzintervalle aufgelistet. Die Signifikanzen können aus den Abbildungen abgelesen werden.

#### **3.2.1. Docetaxel + Bestrahlung, jeweils am Tag 1**

Durch die Kombination der Bestrahlung mit 5Gy (Tag1) und der gleichzeitigen Gabe des Chemotherapeutikums Docetaxel am gleichen Tag (Tag1) kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Hemmung der Zellproliferation bei den Zelllinien PC3 und LNCaP bezogen sowohl auf die IC50 – Konzentration als auch auf die alleinige Bestrahlung.

Bei DU-145 ergab sich hier Signifikanz nur bezogen auf die alleinige Radiatio.

Bei der Zelllinie LNCaP konnte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung eine Zunahme der Hemmung des Zellwachstums durch die Kombinationstherapie erzielt werden. Es ergab sich hier ein statistisch signifikanter Unterschied des Zellüberlebens. Während nach der Bestrahlung 30 % der Zellen überlebten, war dies nach einer Bestrahlung mit Chemotherapie am gleichen Tag bei 22,9% der Fall. Auch konnte die Rate an überlebenden Zellen durch diese Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Docetaxel- Monotherapie signifikant von 50% auf 22,9% gesenkt werden.

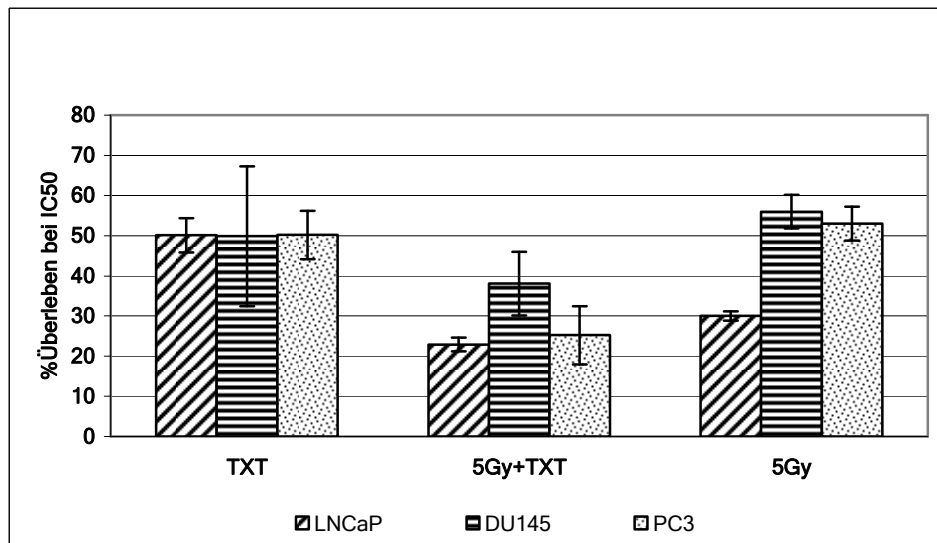
Wie auch bei den LNCaP-Zellen konnte auch bei der Zelllinie DU145 durch eine Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie ein Zunahme der Zellproliferationshemmung im Vergleich zur alleinigen Monotherapie mit Docetaxel erreicht werden. So überlebten hier 56% der Zellen nach Bestrahlung und 50% nach

Chemotherapie. Durch die Kombinationstherapie konnte hier die Rate der überlebenden Zellen auf 38,1% gesenkt werdend, der Unterschied war hier jedoch nur im Vergleich zur Strahlentherapie signifikant.

Bei der PC3- Zelllinie konnte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung der Zellen eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums durch eine Kombinationsbehandlung erreicht werden. Nach Der Bestrahlung überlebten 53% der Zellen und nach Bestrahlung und Chemotherapie 25,2%. Auch im Vergleich zu der alleinigen Inkubation mit Docetaxel, bei der 50% der Zellen überlebten, konnte durch die Kombinationstherapie eine verbesserte statistisch signifikante Hemmung der Zellproliferation festgestellt werden.

**Tab. 11: Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Radiatio und Docetaxel(TXT) (jeweils am Tag 1)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXX</b>
MV-%	100	30,0	50,0	22,9
SD-%	19,5	1,5	9,1	4,3
95%-KI	9,0	1,2	4,3	1,7
<b>DU145</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXX</b>
MV-%	100	56,0	50,0	38,1
SD-%	16,8	5,2	18,5	8,5
95%-KI	7,8	4,2	17,4	7,9
<b>PC3</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXX</b>
MV-%	100	53,0	50,0	25,2
SD-%	8,0	5,3	6,3	8,3
95%-KI	3,7	4,2	6,0	7,3



**Abb. 14: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie und Docetaxel (TXT) ( jeweils am Tag1).**

### 3.2.2. Imatinib + Bestrahlung, jeweils am Tag 1

Bei allen drei Zelllinien konnte eine Hemmung der Zellproliferation durch eine Bestrahlung mit 5 Gy oder eine Chemotherapie mit Imatinib in der IC-50-Konzentration erzielt werden.

Durch Kombination der Bestrahlung der Zellen mit gleichzeitiger Behandlung noch am selben Tag mit Imatinib kam es bei den Zelllinien PC3 und LNCaP zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Hemmung der Zellproliferation.

Bei den DU-145 ergab sich Signifikanz nur bezogen auf die alleinige Bestrahlung.

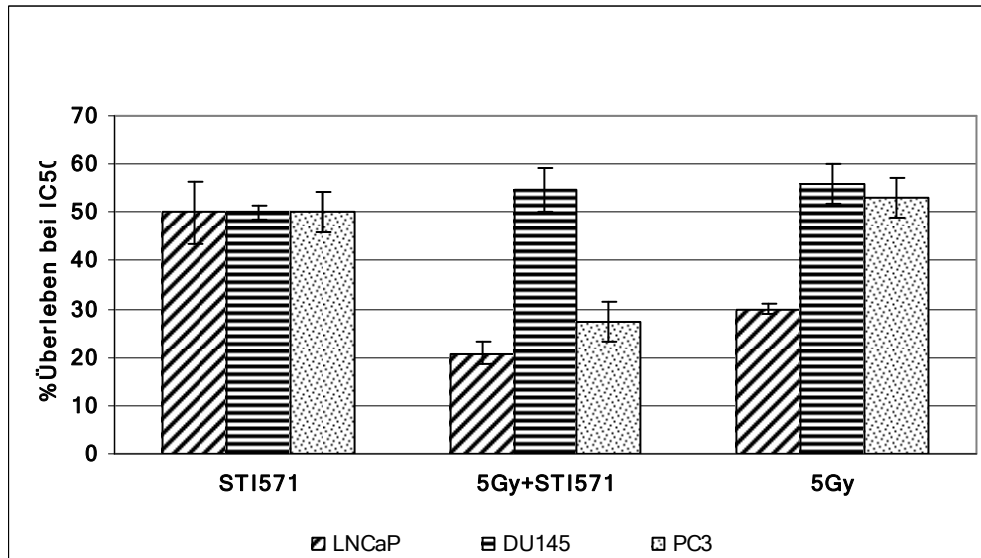
Bei der LNCaP- Zelllinie konnte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung oder Chemotherapie mit Imatinib eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums durch eine Kombination aus beiden erzielt werden. So kam es nach der Bestrahlung zu einem Zellüberleben von 30 %. Im Gegensatz dazu überlebten nach der alleinigen Inkubation mit Imatinib 50% der Zellen. Durch die Kombinationstherapie konnte jedoch die Überlebensrate auf signifikante 20,9% gesenkt werden.

Bei den DU145 konnte durch eine Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie am gleichen Tag keine signifikante Zunahme der Zellwachstumshemmung im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung erzielt werden. 56% der Zellen überlebten nach der Bestrahlung und 50% nach der Chemotherapie. Die Rate der überlebenden Zellen nach Kombinationstherapie betrug 54,8% und war auch der alleinigen Monotherapie mit Imatinib nicht signifikant überlegen.

Bei der Zelllinie PC3 konnte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung eine statistisch signifikante Zunahme der Proliferationshemmung durch die Kombination von Strahlentherapie und Imatinib beobachtet werden. Während nach der Radiatio 53% der Zellen überlebten, war dies nach Kombinationstherapie bei 27,4% der Zellen der Fall. Desweiteren ergab sich auch im Vergleich zur Monotherapie mit Imatinib, bei der 50% der Zellen letztendlich überlebten, durch eine Kombination aus beidem eine signifikante Zellproliferationshemmung.

**Tab. 12 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie und Imatinib (STI571) (jeweils am Tag 1)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	30,0	50,0	20,9
SD-%	8,2	1,5	6,7	4,1
95%-KI	3,3	1,2	6,5	2,2
<b>DU145</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	56,0	50,0	54,8
SD-%	4,8	5,2	4,7	5,1
95%-KI	2,2	4,2	1,5	4,7
<b>PC3</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	53,0	50,0	27,4
SD-%	5,2	5,3	6,4	5,1
95%-KI	2,1	4,2	4,2	4,0



**Abb. 15: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie und Imatinib (STI571) (jeweils am Tag1).**

### 3.2.3. Etoposid (Tag 2) + Bestrahlung (Tag 1)

Auch bei diesem Versuchsansatz konnte erneut eine Hemmung der Zellproliferation durch Bestrahlung mit 5Gy oder einer Chemotherapie mit Etoposid in der entsprechenden IC50-Konzentration erreicht werden.

Durch eine Kombination aus Bestrahlung der Zelllinien am Tag 1 mit einer zusätzlichen Chemotherapie mit Etoposid am Tag 2 kam es sowohl im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie als auch zur Strahlentherapie zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Zellproliferationshemmung bei allen drei Zellen.

Bei der Zelllinie LNCaP überlebten nach der Bestrahlung mit 5Gy 30% der Zellen, während durch eine Bestrahlung mit anschließender Chemotherapie 18,1% überlebten. Dieser Unterschied erreichte statistische Signifikanz. Die Proliferationsrate der Zellen konnte außerdem durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Chemo-Monotherapie signifikant von 50% auf 18,1% gesenkt werden.

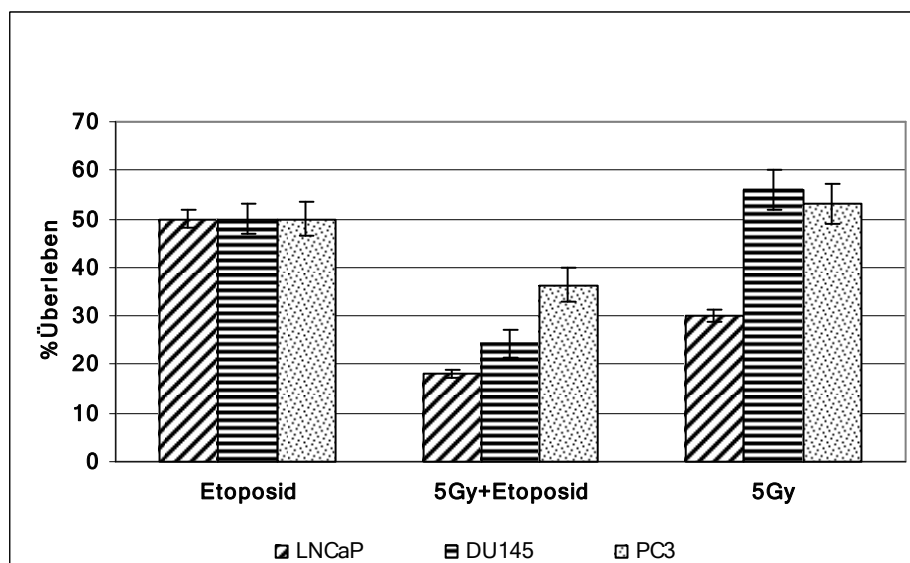
Bei der Zelllinie DU145 konnte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums durch die Kombination Strahlentherapie und Inkubation mit Etoposid erzielt werden. Während nach der Bestrahlung 56% der Zellen überlebten, war dies nach Bestrahlung und Chemotherapie bei 24,4% der Fall. Bei der Monotherapie mit Etoposid lag die Rate der überlebenden Zellen bei 50%. Die jeweiligen Unterschiede erreichten auch hier jeweils statistische Signifikanz.

Bei der Zelllinie PC3 konnte wie bei den DU 145 – Zellen durch eine Kombinationsbehandlung aus 5Gy und Etoposid eine signifikante Zunahme der Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur Monotherapie erzielt werden. So überlebten nach der Bestrahlung 53% und nach Chemotherapie 50%. Bereits dieser Unterschied war signifikant. Durch eine Kombination konnte die Rate der überlebenden Zellen letztendlich auf 36,4% gesenkt werden.

**Tab. 13: Überleben der Prostatakarzinomzellen bei Kombination von Strahlentherapie (Tag1) und Etoposid (Eto) (am Tag2)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>Etoposid</b>	<b>5Gy+Etoposid</b>
MV-%	100	30,0	50,0	18,1
SD-%	5,9	1,5	4,7	2,6
95%-KI	2,7	1,2	1,9	0,9

DU145	0	5Gy	Etoposid	5Gy+Etoposid
MV-%	100	56,0	50,0	24,4
SD-%	7,3	5,2	6,1	4,8
95%-KI	3,4	4,2	3,1	2,9
PC3	0	5Gy	Etoposid	5Gy+Etoposid
MV-%	100	53,0	50,0	36,4
SD-%	5,2	5,3	5,9	4,5
95%-KI	2,4	4,2	3,4	3,5



**Abb. 16: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag1) und Etoposid (Eto) (Tag 2)**

### 3.2.4. Imatinib (Tag 1) + Bestrahlung (Tag 3)

Die Kombination aus einer Bestrahlung mit 5Gy (Tag 3) und einer Chemotherapie mit Imatinib (Tag 1) führte bei allen Zelllinien zu einer signifikanten Zunahme der Hemmung der Zellüberlebens bezogen sowohl auf die IC50- Konzentration als auch auf die alleinige Bestrahlung.



Nach alleiniger Bestrahlung der LNCaP- Zellen überlebten 46% der Zellen, während nach 5Gy kombinierte mit Imatinib nur noch 28,2% überlebten. Dieser Unterschied erreichte erneut statistische Signifikanz. Auch konnte die Rate an überlebenden Zellen durch eine Kombinationstherapie im Vergleich zur Mono-Chemotherapie signifikant von 50% auf 28,2% gesenkt werden.

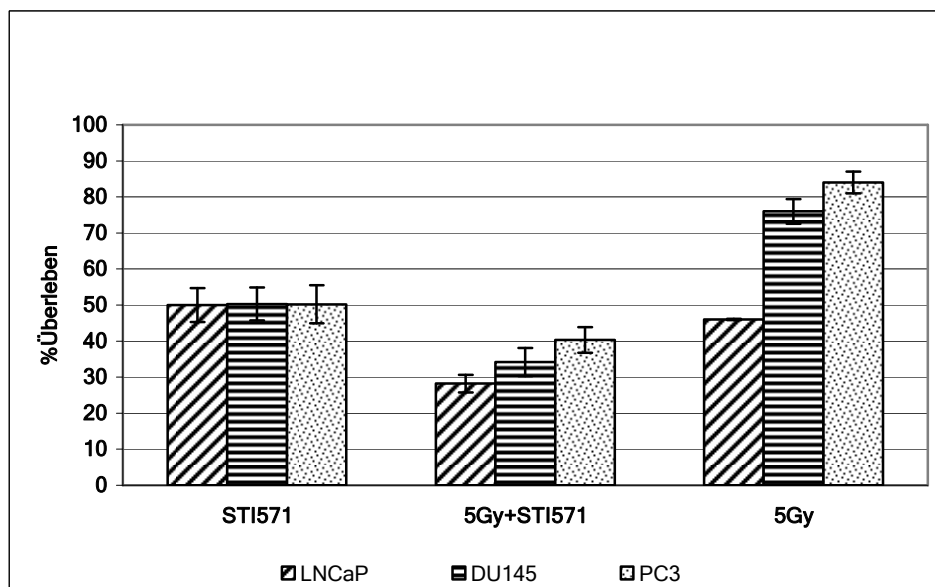
Bei der Zelllinie DU145 konnte ebenso durch die Kombination Strahlentherapie und Inkubation mit Imatinib eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellproliferation im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung oder alleinigen Chemotherapie festgestellt werden. 76% überlebten nach Bestrahlung und 50% nach Chemotherapie. Durch eine Kombination blieben letztendlich nur 34,2% der Zellen am Leben.

Im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie, bei der 50% der PC3 Zellen überlebten, konnte die Zellproliferation durch eine Kombinationstherapie weiter auf 40,3% gehemmt werden. Dieser Unterschied erreichte eine statistische Signifikanz. Nach alleinigen Bestrahlung der Zellen überlebten 84%. Auch dies beweist im Vergleich zur Kombination aus Strahlentherapie und gleichzeitiger Inkubation mit Imatinib eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums.

**Tab. 14 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Imatinib (STI571) (Tag 1)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	46,0	50,0	28,2
SD-%	3,7	0,2	3,1	2,8
95%-KI	2,2	0,4	4,7	2,5

<b>DU145</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	76,0	50,0	34,2
SD-%	4,1	3,0	5,5	4,1
95%-KI	2,4	3,4	4,6	3,9
<b>PC3</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	84,0	50,0	40,3
SD-%	4,0	2,6	4,6	2,9
95%-KI	1,8	3,0	5,3	3,6



**Abb. 17: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Imatinib (STI571) (Tag 1)**

### 3.2.5. Docetaxel (Tag 1) + Bestrahlung (Tag 3)

Durch eine Kombinationsbehandlung mit Docetaxel(Tag1) und nachfolgender Radiatio(Tag3) kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Hemmung der Zellproliferation bei der LNCaP-Zelle im Vergleich zur Mono-Chemotherapie oder alleinigen Bestrahlung und bei der PC3- und der DU145-Zelle im Vergleich zur Strahlentherapie.

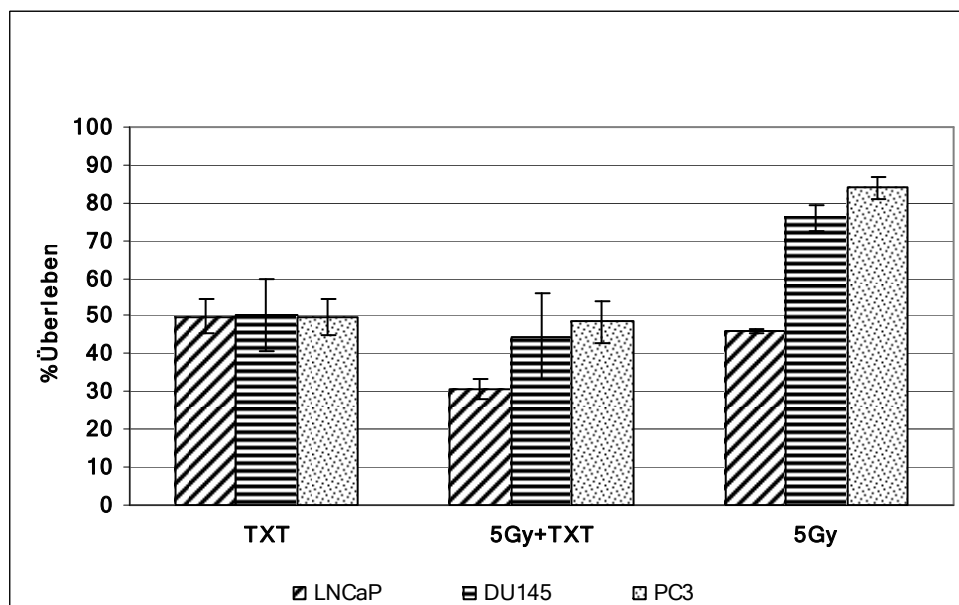
Während nach der Bestrahlung 46% der LNCaP-Zellen überlebten, war dies nach der Kombination aus Radiatio und Chemotherapie bei 30,8% der Fall. Dieser Unterschied erreichte auch statistische Signifikanz. Die Rate an überlebenden Zellen konnte hier außerdem durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Chemo-Monotherapie signifikant von 50% auf 30,8% gesenkt werden.

Wie bereits bei den LNCaP-Zellen konnte auch bei der DU145-Zelllinie durch eine Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie eine Zunahme der Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie erreicht werden. 76% der Zellen überlebten hier nach der Bestrahlung und 50% nach der Chemotherapieinkubation mit Docetaxel. Durch eine Kombinationsbehandlung konnte die Rate der überlebenden Zellen auf insgesamt 44,7% gesenkt werden. Dieser Unterschied war jedoch nur zur alleinigen Bestrahlung statistisch signifikant.

Auch bei den PC3 Zellen konnte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung eine signifikante Zunahme der Zellproliferationshemmung durch die Kombination Strahlentherapie und Docetaxelzugabe verzeichnet werden. Es überlebten dadurch 48,5% der Zellen, während dies nach alleiniger Radiatio bei 84% der Fall war. Verglichen jedoch mit der alleinigen Zugabe von Docetaxel, bei der letztendlich 50% der PC3-Zellen überlebten, erreichte hier der geringe Unterschied zur Kombinationsbehandlung keine statistischen Relevanz.

**Tab. 15 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Docetaxel (TXT) (Tag 1)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXT</b>
MV-%	100	46,0	50,0	30,8
SD-%	5,7	0,2	3,8	2,6
95%-KI	3,8	0,4	4,6	2,5
<b>DU145</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXT</b>
MV-%	100	76,0	50,0	44,7
SD-%	8,4	3,0	8,6	7,6
95%-KI	6,2	3,4	9,6	11,4
<b>PC3</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXT</b>
MV-%	100	84,0	50,0	48,5
SD-%	6,7	2,6	5,1	6,1
95%-KI	3,4	3,0	4,8	5,6



**Abb. 18: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Docetaxel(TXT) (Tag 1)**

### **3.2.6. Etoposid (Tag 1) + Bestrahlung (Tag 3)**

Durch eine Kombinationsbehandlung mit Etoposid(Tag1) und nachfolgender Radiatio(Tag3) kam es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Hemmung der Zellproliferation bei allen drei Zelllinien im Vergleich zur Mono-Chemotherapie oder alleinigen Bestrahlung.

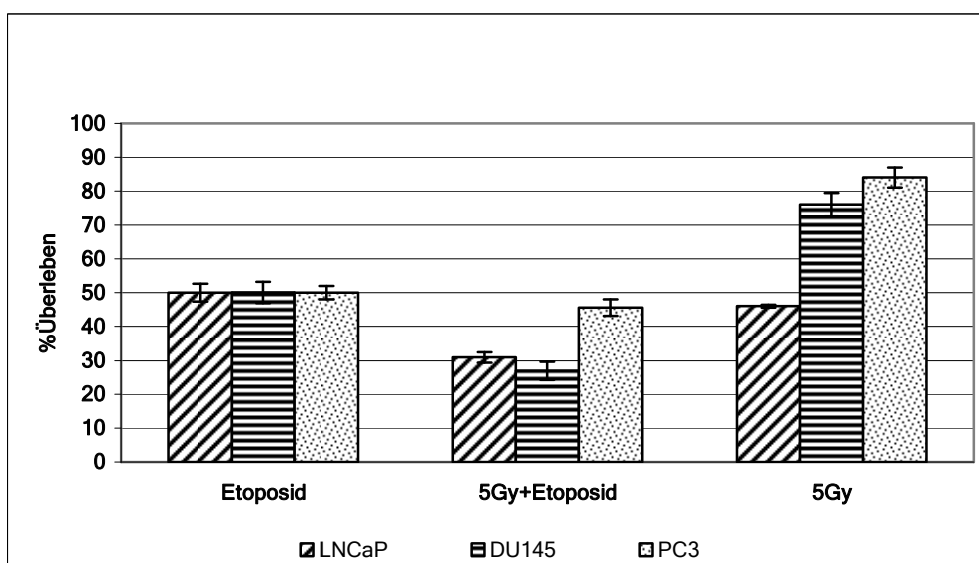
Bei der Zelllinie LNCaP überlebten nach der Bestrahlung mit 5Gy 46% der Zellen und nach der Inkubation mit Etoposid 50% der Zellen. Die Rate an überlebenden Zellen lag bei der Kombinationsbehandlung aus beidem jedoch bei 31%. Diese Zunahme der Hemmung des Zellwachstums ist jeweils im Vergleich zu den Einzelbehandlungen als statistisch signifikant zu werten.

Wie bereits bei den LNCaP-Zellen konnte auch bei der DU145-Zelllinie durch eine Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie eine Zunahme der Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie erreicht werden. 76% der Zellen überlebten hier nach der Bestrahlung und 50% nach der Chemotherapieinkubation mit Etoposid. Durch eine Kombinationsbehandlung konnte die Rate der überlebenden Zellen auf insgesamt 27% gesenkt werden. Auch dieser Unterschied ist jeweils statistisch signifikant.

Auch bei den PC3 Zellen konnte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung eine signifikante Zunahme der Zellproliferationshemmung durch die Kombination Strahlentherapie und Etoposidzugabe verzeichnet werden. Es überlebten dadurch 45,6% der Zellen, während dies nach alleiniger Radiatio bei 84% der Fall war. Auch verglichen mit der alleinigen Zugabe von Etoposid, bei der letztendlich 50% der PC3-Zellen überlebten, erreichte hier der Unterschied zur Kombinationsbehandlung statistische Relevanz.

**Tab. 16 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Etoposid (Eto) (Tag 1)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>Etoposid</b>	<b>5Gy+Etoposid</b>
MV-%	100	46,0	50,0	31,0
SD-%	3,4	0,2	4,5	3,9
95%-KI	1,6	0,4	2,7	1,6
<b>DU145</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>Etoposid</b>	<b>5Gy+Etoposid</b>
MV-%	100	76,0	50,0	27,0
SD-%	6,1	3,0	5,9	2,9
95%-KI	2,8	3,4	3,2	2,7
<b>PC3</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>Etoposid</b>	<b>5Gy+Etoposid</b>
MV-%	100	84,0	50,0	45,6
SD-%	4,0	2,6	4,4	2,7
95%-KI	1,9	3,0	2,0	2,5



**Abb. 19: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Etoposid(Eto)(Tag1)**

### 3.2.7. Bestrahlung (Tag 1) + Imatinib (Tag 3)

Durch die Kombinationstherapie Radiatio (Tag1) und nachfolgender Chemotherapiezugabe von Imatinib (Tag3) kam es bei allen drei Zellen zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Zellproliferationshemmung bezogen auf eine Chemomonotherapie bzw. die alleinige Bestrahlung.

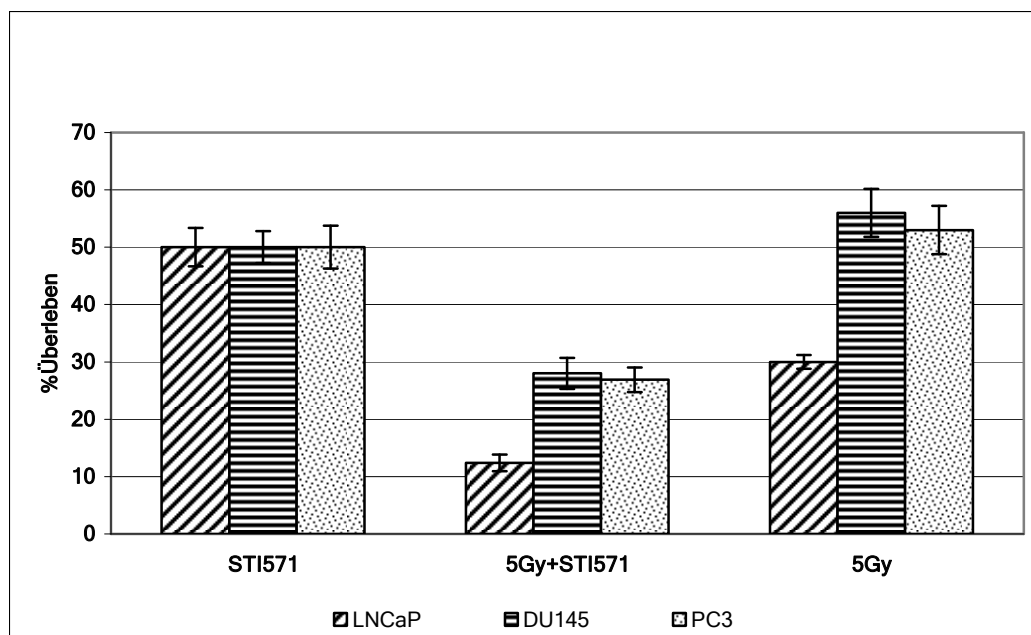
So konnte bei der Zelllinie LNCaP im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung oder Chemotherapie eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums durch die Kombinationsbehandlung erzielt werden. Während nach der alleinigen Radiatio 30% und nach Imatinibinkubation 50% der LNCaP-Zellen überlebten, war dies nach Bestrahlung und Chemotherapie bei 12,4% der Fall.

Bei der Zelllinie DU145 überlebten nach der Bestrahlung mit 5Gy 56% der Zellen und nach der Inkubation mit Imatinib 50% der Zellen. Die Rate an überlebenden Zellen lag bei der Kombinationsbehandlung aus beidem jedoch bei 28%. Diese Zunahme der Hemmung des Zellwachstums war jeweils im Vergleich zu den Einzelbehandlungen als statistisch signifikant zu werten.

Wie bereits bei den anderen zwei Zelllinien konnte auch erneut bei der PC3-Zelllinie durch diese entsprechende Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie eine Zunahme der Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie erreicht werden. 53% der Zellen überlebten hier nach der Bestrahlung und 50% nach der Chemotherapieinkubation mit Imatinib. Durch eine Kombinationsbehandlung konnte die Rate der überlebenden Zellen auf insgesamt 26,9% gesenkt werden. Auch dieser Unterschied war jeweils statistisch signifikant.

**Tab. 17 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Imatinib (STI571) (Tag 3)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	30,0	50,0	12,4
SD-%	5,1	1,5	5,4	2,9
95%-KI	2,4	1,2	3,4	1,5
<b>DU145</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	56,0	50,0	28,0
SD-%	4,5	5,2	6,2	5,9
95%-KI	2,1	4,2	2,8	2,7
<b>PC3</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>STI571</b>	<b>5Gy+STI571</b>
MV-%	100	53,0	50,0	26,9
SD-%	6,0	5,3	7,1	4,2
95%-KI	2,8	4,2	3,8	2,2



**Abb. 20: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Imatinib (STI571) (Tag 3)**



### 3.2.8. Bestrahlung (Tag 1) + Docetaxel (Tag3)

Durch eine Kombination aus Bestrahlung mit 5Gy (Tag 1) und einer Chemotherapie mit Docetaxel (Tag 3) konnte eine weitere signifikante Zunahme der Hemmung der Zellproliferation bei allen drei Zelllinien in der entsprechenden IC-50- Konzentration bezüglich Chemomonotherapie und alleiniger Bestrahlung erzielt werden.

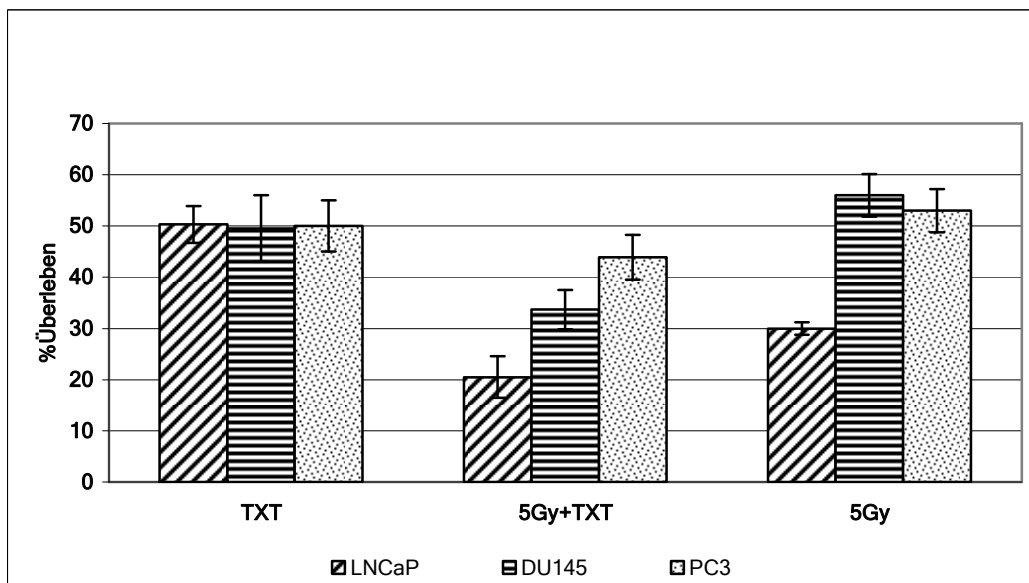
So kam es verglichen mit der alleinigen Bestrahlung zu einer Zunahme der Hemmung des Zellwachstums bei der Zelllinie LNCaP durch die Kombinationstherapie. Nach der Bestrahlung überlebten somit 30% der Zellen, während nach 5Gy und Imatinib nur 20,5% überlebten. Dieser Unterschied erreichte erneut statistische Signifikanz. Auch konnte die Rate an überlebenden Zellen durch eine Kombinationstherapie im Vergleich zur Mono-Chemotherapie signifikant von 50,3% auf 20,5% gesenkt werden.

Bei der Zelllinie DU145 konnte ebenso durch die Kombination Strahlentherapie und Inkubation mit Docetaxel eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellproliferation im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung oder alleinigen Chemotherapie festgestellt werden. 56,0% überlebten nach Bestrahlung und 49,5% nach Chemotherapie. Durch eine Kombination blieben letztendlich nur 33,7% der Zellen am Leben.

Im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie, bei der 50% der PC3 Zellen überlebten, konnte die Zellproliferation durch eine Kombinationstherapie weiter auf 43,9% gehemmt werden. Dieser Unterschied erreichte eine statistische Signifikanz. Nach alleiniger Bestrahlung der Zellen überlebten 53%. Auch dies beweist im Vergleich zur Kombination von Strahlentherapie und gleichzeitiger Inkubation mit Docetaxel eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums.

**Tab. 18 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Docetaxel (TXT) (Tag 3)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXT</b>
MV-%	100	30,0	50,0	20,5
SD-%	5,2	1,5	5,3	7,3
95%-KI	2,7	1,2	3,6	4,1
<b>DU145</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXT</b>
MV-%	100	56,0	50,0	33,7
SD-%	10,6	5,2	8,6	4,2
95%-KI	6,5	4,2	6,5	3,9
<b>PC3</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>TXT</b>	<b>5Gy+TXT</b>
MV-%	100	53,0	50,0	43,9
SD-%	5,8	5,3	6,9	5,1
95%-KI	2,7	4,2	5,0	4,4



**Abb. 21: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Docetaxel(TXT) (Tag 3)**

### 3.2.9. Bestrahlung (Tag 1) + Etoposid (Tag3)

Bei den drei Zelllinien LNCaP, DU145 und PC3 konnte hier eine Hemmung der Zellproliferation durch Bestrahlung oder Chemotherapie mit Etoposid in der entsprechenden IC-50- Konzentration erzielt werden.

Durch die Kombinationstherapie Radiatio (Tag1) und nachfolgender Chemotherapiezugabe von Etoposid (Tag3) kam es bei allen drei Zellen zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Zellproliferationshemmung im Vergleich zur Chemomonotheapie bzw. alleinigen Bestrahlung..

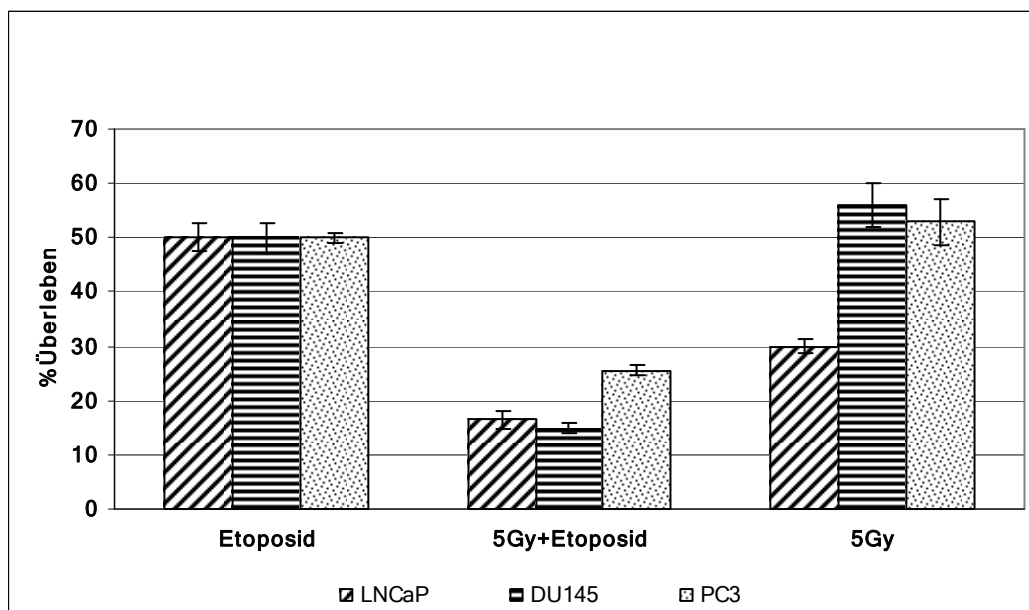
So konnte bei der Zelllinie LNCaP im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung oder Chemotherapie eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums durch die Kombinationsbehandlung erzielt werden. Während nach der alleinigen Radiatio 30% und nach Etoposidinkubation 50% der LNCaP-Zellen überlebten, war dies nach Bestrahlung und Chemotherapie bei 16,4% der Fall.

Bei der Zelllinie DU145 überlebten nach der Bestrahlung mit 5Gy 56% der Zellen und nach der Inkubation mit Etoposid 50% der Zellen. Die Rate an überlebenden Zellen lag bei der Kombinationsbehandlung aus beidem jedoch bei 14,9%. Diese Zunahme der Hemmung des Zellwachstums war jeweils im Vergleich zu den Einzelbehandlungen als statistisch signifikant zu werten.

Wie bereits bei den anderen zwei Zelllinien konnte auch erneut bei der PC3-Zelllinie durch diese entsprechende Kombination aus Bestrahlung und Chemotherapie eine Zunahme der Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur jeweiligen Monotheapie erreicht werden. 53,0% der Zellen überlebten hier nach der Bestrahlung und 50% nach der Chemotherapieinkubation mit Etoposid. Durch eine Kombinationsbehandlung konnte die Rate der überlebenden Zellen auf insgesamt 25,5% gesenkt werden. Auch dieser Unterschied war jeweils statistisch signifikant.

**Tab. 19 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Etoposid (Tag 3)**

<b>LNCaP</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>Etoposid</b>	<b>5Gy+Etoposid</b>
MV-%	100	30,0	50,0	16,4
SD-%	8,7	1,5	4,5	3,6
95%-KI	4,4	1,2	2,6	1,6
<b>DU145</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>Etoposid</b>	<b>5Gy+Etoposid</b>
MV-%	100	56,0	50,0	14,9
SD-%	6,1	5,2	5,1	2,7
95%-KI	3,1	4,2	2,7	1,0
<b>PC3</b>	<b>0</b>	<b>5Gy</b>	<b>Etoposid</b>	<b>5Gy+Etoposid</b>
MV-%	100	53,0	50,0	25,5
SD-%	4,0	5,3	2,4	2,7
95%-KI	2,1	4,2	1,0	1,0



**Abb. 22 Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Etoposid(Eto)(Tag3)**

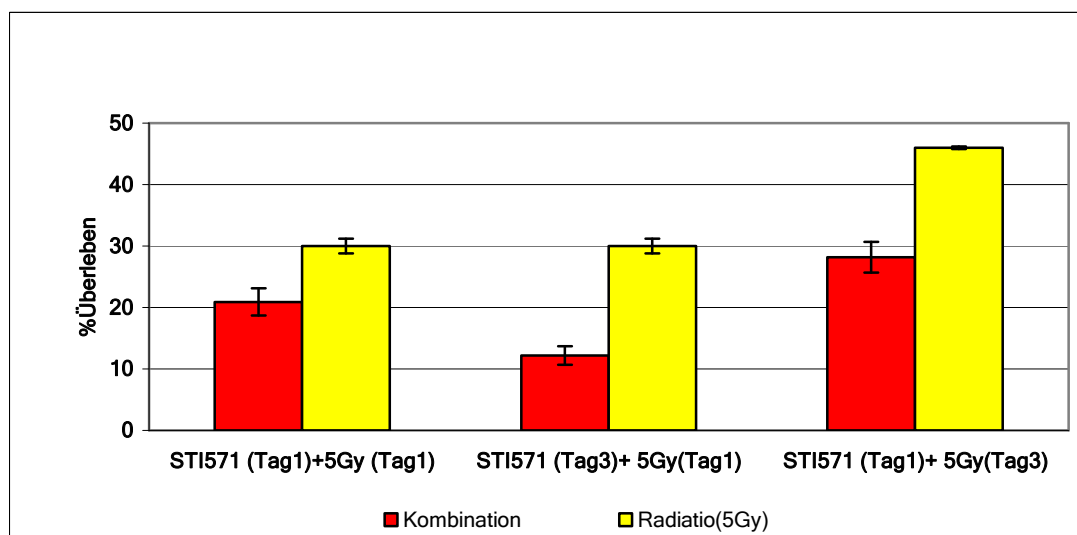
### 3.3. Vergleich der unterschiedlichen Kombinationen

#### 3.3.1. Imatinib

##### 3.3.1.1. LNCaP

**Tab. 20: %-Überleben der LNCaP-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Imatinib( STI571)) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Imatinib**

	STI571(Tag1)+5Gy(Tag1)	STI571(Tag3)+5Gy(Tag1)	STI571(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	20,9	12,2	28,2
95%	2,2	1,5	2,5
Ki-o	22,6	13,6	30,7
Ki-u	18,3	10,7	25,8
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	30,0		46,0
95%	1,2		0,2
Ki-o	30,8		46,0
Ki-u	28,4		45,7



**Abb. 23: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Imatinib( STI571) bei der LNCaP- Zelllinie**

Vergleicht man bei der Zelllinie LNCaP die einzelnen durchgeführten Kombinationen untereinander, so zeigt sich bei der Kombination Imatinib (Tag 3) und Radiatio (Tag 1) ein Zellüberleben von 12,2%. Im Vergleich zu den beiden anderen Kombinationen mit jeweils 20,9% Zellüberleben bzw. 28,2% Zellüberleben konnte die Rate an überlebenden Zellen mit dieser Kombination statistisch signifikant gesenkt werden.

Auch die Kombination Imatinib (Tag1) und Bestrahlung mit 5Gy(Tag1) zeigt mit 20,9% der überlebenden Zellen einen signifikanten Effekt im Vergleich zu der Kombination Imatinib (Tag1) und 5Gy (Tag3) mit 28,2%.

Durch alleinige Radiatio am Tag 1 mit einer Hemmung des Zellwachstums von 30% konnte außerdem eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 mit 46% erzielt werden.

## 3.3.1.2. DU 145

Tab. 21: %-Überleben der DU145-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Imatinib) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Imatinib

	STI571(Tag1)+5Gy(Tag1)	STI571(Tag3)+5Gy(Tag1)	STI571(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	54,8	28,0	34,2
95%	4,7	2,7	3,9
Ki-o	59,6	30,8	38,0
Ki-u	50,3	25,4	30,2
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	56,0		76,0
95%	4,15		3,4
Ki-o	60,01		79,1
Ki-u	51,7		72,3

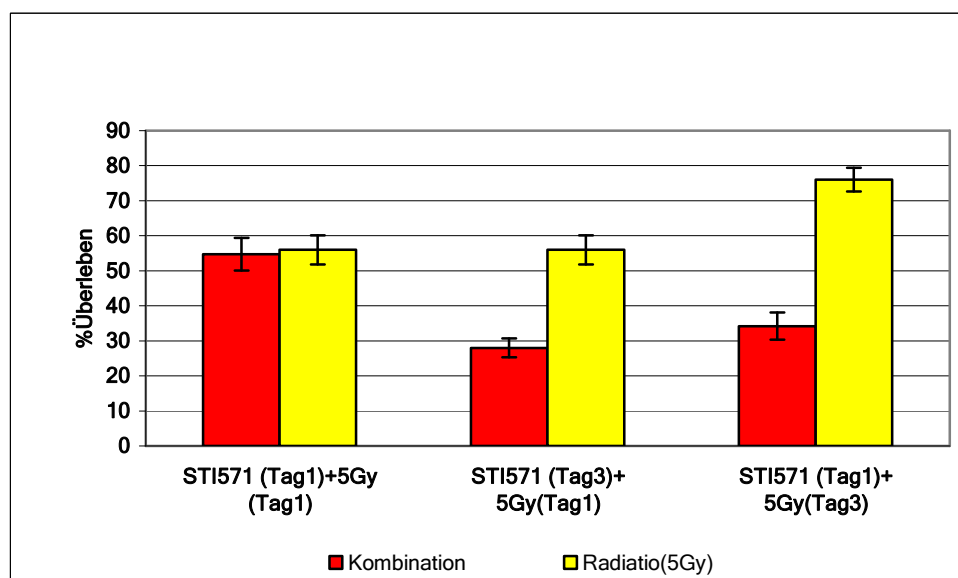


Abb. 24: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Imatinib bei der DU145 – Zelllinie

Eine erneute Zunahme der Hemmung der Zellproliferation gelang bei der DU145-Zelllinie durch die Zugabe von Imatinib am Tag 3 und der zusätzlichen Bestrahlung am Tag 1. Während nach dieser Kombination 28% der DU145-Zellen überlebten, war dies bei den anderen Kombinationen bei 54,8% bzw. 34,2% der Zellen der Fall. Dieser Unterschied erreichte jeweils statistische Signifikanz.

Auch konnte die Rate an überlebenden Zellen durch die Kombination Imatinib (Tag1) und Radiatio (Tag3) signifikant im Vergleich zur Kombination Imatinib und Radiatio (jeweils am Tag1) von 54,8% auf 34,2% gesenkt werden.

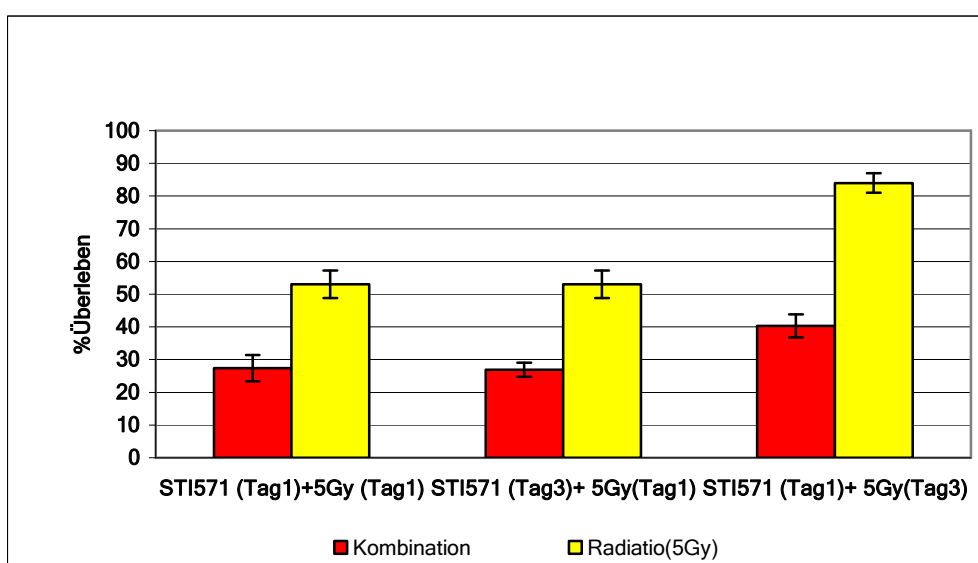
Durch alleinige Bestrahlung am Tag 1 mit einer Hemmung des Zellwachstums von 56% konnte außerdem eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 mit 76% erzielt werden.



## 3.3.1.3. PC3

**Tab. 22: %-Überleben der PC3-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Imatinib) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Imatinib**

	STI571(Tag1)+5Gy(Tag1)	STI571(Tag3)+5Gy(Tag1)	STI571(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	27,4	26,9	40,3
95%	4,0	2,2	3,6
Ki-o	31,4	29,0	43,8
Ki-u	23,3	24,7	36,7
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	53,0		84,0
95%	4,2		3,0
Ki-o	57,1		87,4
Ki-u	48,7		81,4



**Abb. 25: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Imatinib bei der PC3 – Zelllinie**

Bei der Zelllinie PC3 konnte durch die Kombination von Bestrahlung am Tag 1 und die zusätzliche Imatinibgabe am Tag 3 eine Zunahme der Hemmung des Zellwachstums erzielt werden. Während bei dieser Kombination 26,9% der Zellen überlebten, war dies bei der Kombination 5Gy am Tag 3 und Chemotherapie am Tag 1 bei 40,3 % der Zellen der Fall. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Verglichen mit der Kombination von Bestrahlung und Imatinibzugabe jeweils am Tag1 mit einem Zellüberleben von 27,4% zeigte sich jedoch keine Signifikanz.

Die Rate an überlebenden PC3-Zellen konnte durch die Kombination von 5Gy und Imatinibzugabe jeweils am Tag 1 mit 27,4% im Vergleich zu der Kombination Imatinib am Tag 1 und 5Gy am Tag 3 mit einem Zellüberleben von 40,3% wieder statistisch signifikant gesenkt werden.

Durch alleinige Bestrahlung am Tag 1 konnte ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 verzeichnet werden. Es überlebten von den PC3 Zellen durch Bestrahlung am Tag 1 nur noch 53% und nach der Bestrahlung am Tag 3 dagegen 84% der Zellen.

### 3.3.2. Etoposid

#### 3.3.2.1. PC3

Tab. 23: %-Überleben der PC3-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Etoposid) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Etoposid

	Etoposid(Tag2)+5Gy(Tag1)	Etoposid(Tag3)+5Gy(Tag1)	Etoposid(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	36,4	25,5	45,6
95%	3,5	1,0	2,5
Ki-o	39,9	26,5	47,8
Ki-u	33,0	24,6	42,8
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	53,0		84,0
95%	4,2		3,0
Ki-o	57,1		87,4
Ki-u	48,7		81,4

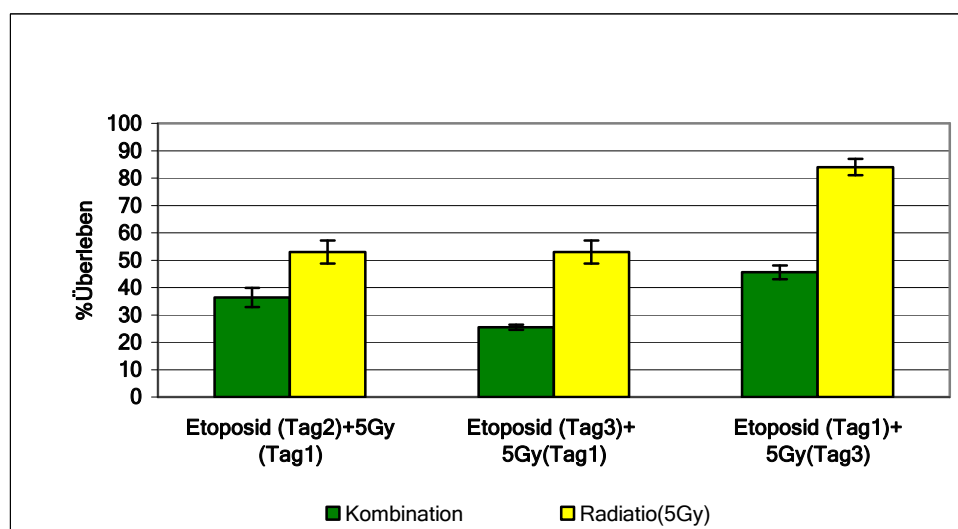


Abb. 26: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Etoposid bei der PC3 – Zelllinie

Vergleicht man bei der Zelllinie PC3 die einzelnen durchgeführten Kombinationen untereinander, so zeigt sich bei der Kombination Etoposid (Tag 3) und Radiatio (Tag 1) ein Zellüberleben von 25,5%. Im Vergleich zu den beiden anderen Kombinationen mit jeweils 36,4% Zellüberleben bzw. 45,6% Zellüberleben konnte die Rate an überlebenden Zellen mit dieser Kombination statistisch signifikant gesenkt werden.

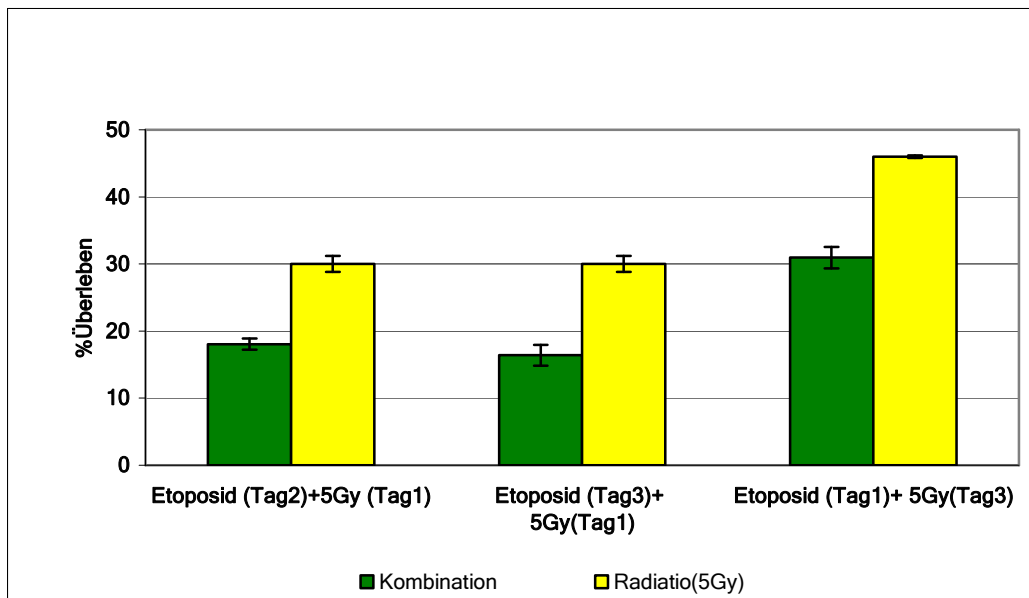
Auch die Kombination Etoposid (Tag 2) und Bestrahlung mit 5Gy(Tag1) zeigt mit 36,4% der überlebenden Zellen einen signifikanten Effekt im Vergleich zu der Kombination Etoposid (Tag1) und 5Gy (Tag3) mit 45,6%.

Durch alleinige Radiatio am Tag 1 mit einer Hemmung des Zellwachstums von 53% konnte außerdem eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 mit 84% erzielt werden.

## 3.3.2.2. LNCaP

**Tab. 24: %-Überleben der LNCaP-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Etoposid) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Etoposid**

	Etoposid(Tag2)+5Gy(Tag1)	Etoposid(Tag3)+5Gy(Tag1)	Etoposid(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	18,1	16,4	31,0
95%	0,9	1,6	1,6
Ki-o	18,9	18,0	32,6
Ki-u	17,2	14,9	29,4
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	30,0		46,0
95%	1,2		0,2
Ki-o	30,8		46,0
Ki-u	28,4		45,7



**Abb. 27: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Etoposid bei der LNCaP- Zelllinie**

Eine erneute Zunahme der Hemmung der Zellproliferation gelang bei der LNCaP-Zelllinie durch die Zugabe von Etoposid am Tag 3 und der zusätzlichen Bestrahlung am Tag 1. Während nach dieser Kombination 16,4% der LNCaP-Zellen überlebten, war dies bei den anderen Kombinationen bei 18,1% bzw. 31% der Zellen der Fall. Dieser Unterschied erreichte jeweils statistische Signifikanz.

Auch konnte die Rate an überlebenden Zellen durch die Kombination Etoposid (Tag1) und Radiatio (Tag3) signifikant im Vergleich zur Kombination Etoposid (Tag 2) und Radiatio (Tag1) von 31% auf 18,1% gesenkt werden.

Durch alleinige Bestrahlung am Tag 1 mit einer Hemmung des Zellwachstums 30% konnte außerdem eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 mit 46% erzielt werden.

## 3.3.2.3. DU145

Tab. 25: %-Überleben der DU145-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Etoposid) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Etoposid

	Etoposid(Tag2)+5Gy(Tag1)	Etoposid(Tag3)+5Gy(Tag1)	Etoposid(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	24,4	14,9	27,0
95%	2,9	1,0	2,7
Ki-o	27,2	15,9	29,9
Ki-u	21,5	13,9	24,5
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	56,0		76,0
95%	4,15		3,4
Ki-o	60,01		79,1
Ki-u	51,7		72,3

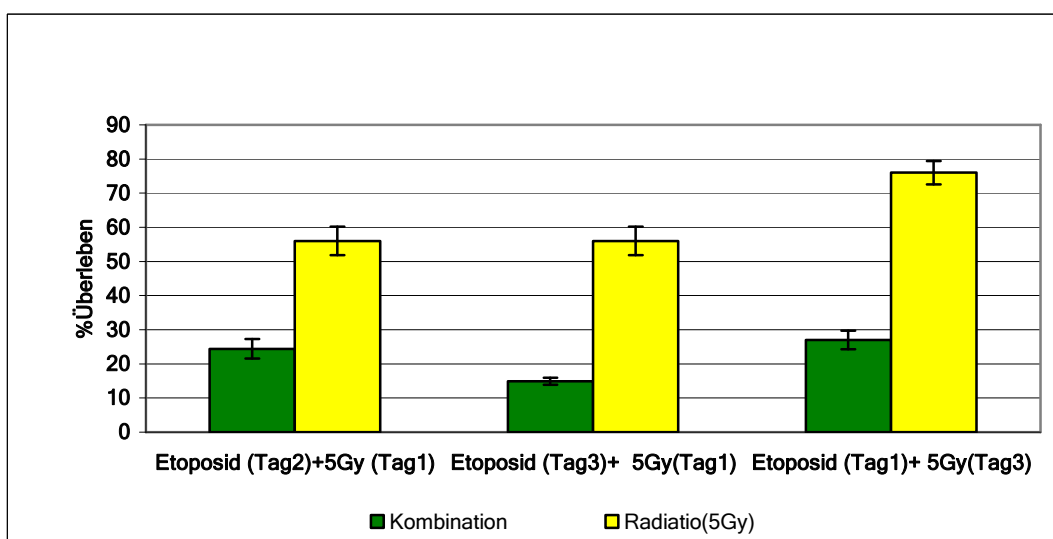


Abb. 28: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Etoposid bei der DU145-Zelllinie

Bei der Zelllinie DU145 konnte durch die Kombination von Bestrahlung am Tag 1 und die zusätzliche Etoposidbinkubation am Tag 3 eine Zunahme der Hemmung des Zellwachstums erzielt werden. Während bei dieser Kombination 14,9% der Zellen überlebten, war dies bei der Kombination 5Gy am Tag 3 und Chemotherapie am Tag 1 bei 27 % der Zellen der Fall. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Verglichen mit der Kombination von Bestrahlung und Etoposidzugabe jeweils am Tag 1 mit einem Zellüberleben von 24,4% zeigte sich auch hier Signifikanz.

Die Rate an überlebenden DU145-Zellen konnte durch die Kombination von 5Gy und Etoposidzugabe jeweils am Tag 1 mit 24,4% im Vergleich zu der Kombination Etoposid am Tag 1 und 5Gy am Tag 3 mit einem Zellüberleben von 27% erneut statistisch signifikant gesenkt werden.

Durch alleinige Bestrahlung am Tag 1 konnte ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 verzeichnet werden. Es überlebten von den DU145 - Zellen durch Bestrahlung am Tag 1 nur noch 56% und nach der Bestrahlung am Tag 3 dagegen 76% der Zellen.



### 3.3.3. Docetaxel

#### 3.3.3.1. DU145

Tab. 26: %-Überleben der DU145-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + TXT) und bei alleiniger TXT bei den entsprechenden IC-50-Werten für TXT

	TXT(Tag1)+5Gy(Tag1)	TXT(Tag3)+5Gy(Tag1)	TXT(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	38,1	33,7	44,7
95%	7,9	3,9	11,4
Ki-o	45,9	37,7	56,2
Ki-u	30,1	30	33,4
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	56,0		76,0
95%	4,15		3,4
Ki-o	60,01		79,1
Ki-u	51,7		72,3

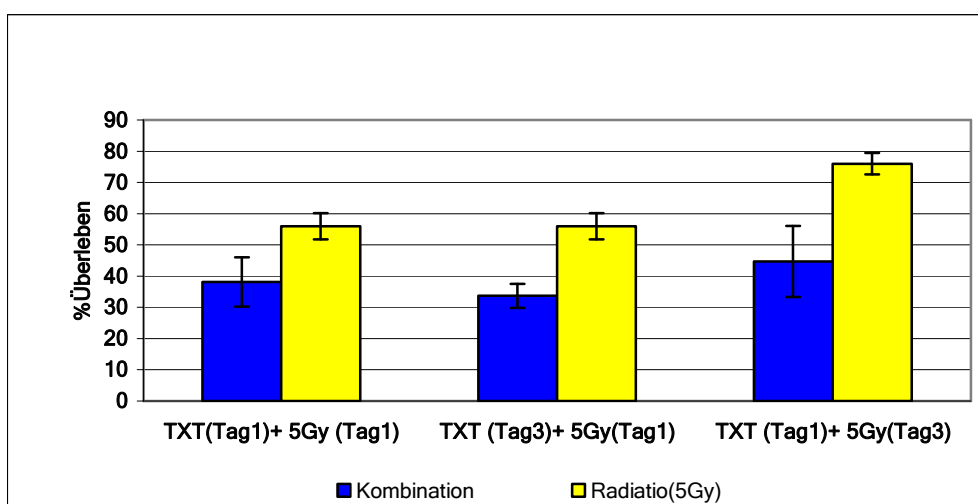


Abb. 29: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und TXT bei der DU145-Zelllinie

Bei der Zelllinie DU145 konnte durch eine Kombination von Bestrahlung am Tag 1 und einer zusätzlichen Docetaxelgabe am Tag 3 eine Zunahme der Hemmung des Zellwachstums erzielt werden. Während bei dieser Kombination 33,7% der Zellen überlebten, war dies bei der Kombination 5Gy am Tag 3 und Chemotherapie am Tag 1 bei 44,7 % der Zellen der Fall. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Verglichen mit der Kombination von Bestrahlung und TXT-Zugabe jeweils am Tag1 mit einem Zellüberleben von 38,1% zeigte sich auch hier keine Signifikanz.

Die Rate an überlebenden DU145-Zellen konnte durch eine Kombination von 5Gy und Docetaxelzugabe jeweils am Tag 1 mit 38,1% im Vergleich zu der Kombination TXT am Tag 1 und 5Gy am Tag 3 mit einem Zellüberleben von 44,7% auch nicht statistisch signifikant gesenkt werden.

Durch alleinige Bestrahlung am Tag 1 konnte ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 verzeichnet werden. Es überlebten von den DU145 - Zellen durch Bestrahlung am Tag 1 nur noch 56% und nach der Bestrahlung am Tag 3 dagegen 76% der Zellen.

## 3.3.3.2. LNCaP

Tab. 27: %-Überleben der LNCaP-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + TXT) und bei alleiniger TXT bei den entsprechenden IC-50-Werten für TXT

	TXT(Tag1)+5Gy(Tag1)	TXT(Tag3)+5Gy(Tag1)	TXT(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	22,9	20,5	30,8
95%	1,7	4,1	2,5
Ki-o	24,6	24,8	33,2
Ki-u	21,2	16,6	28,2
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	30,0		46,0
95%	1,2		0,2
Ki-o	30,8		46,0
Ki-u	28,4		45,7

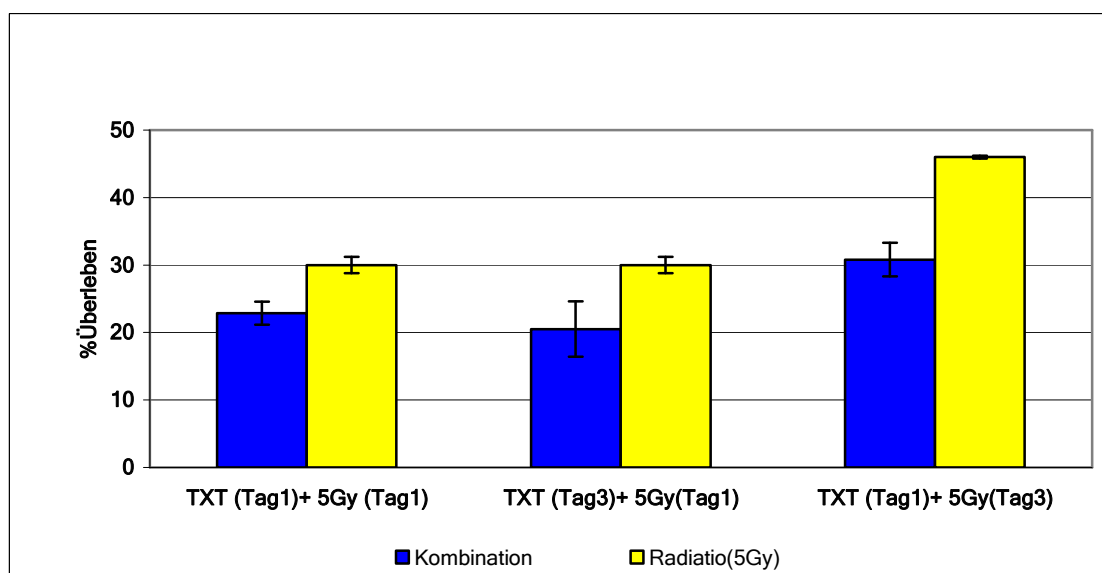


Abb. 30: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und TXT bei der LNCaP-Zelllinie

Eine Zunahme der Hemmung der Zellproliferation gelang bei der LNCaP-Zelllinie durch die Bestrahlung am Tag 1 und die Zugabe von TXT am Tag 3. Während nach dieser Kombination 20,5% der LNCaP-Zellen überlebten, war dies bei den anderen Kombinationen bei 22,9% bzw. 30,8% der Zellen der Fall. Dieser Unterschied erreichte jedoch nur verglichen mit der Kombination der Bestrahlung am Tag 3 und einer TXT- Zugabe am Tag 1 statistische Signifikanz.

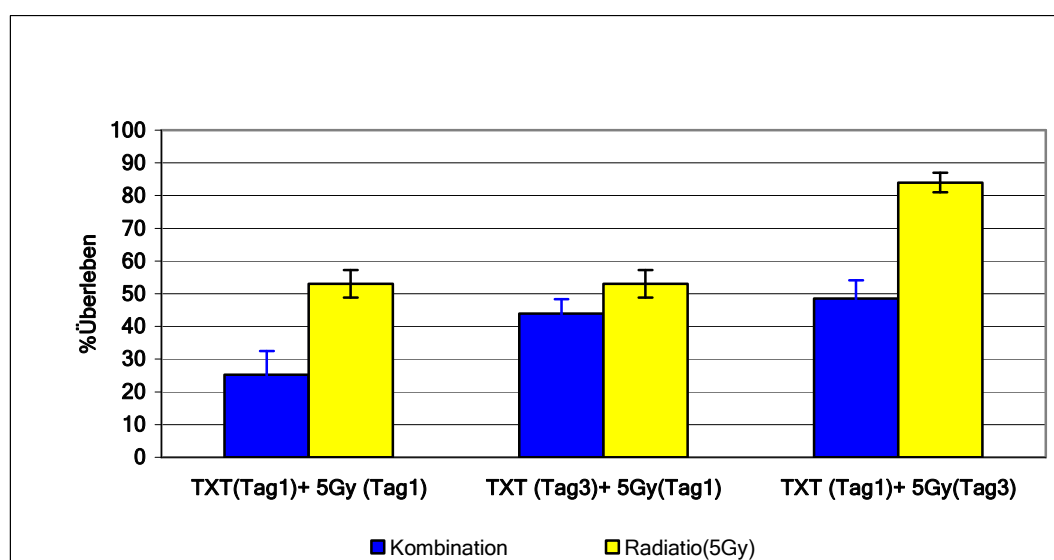
Auch konnte die Rate an überlebenden Zellen durch die Kombination Docetaxel und Radiatio (jeweils am Tag1) signifikant im Vergleich zur Kombination TXT (Tag1) und Radiatio (Tag 3) von 30,8% auf 22,9% gesenkt werden.

Durch alleinige Bestrahlung am Tag 1 mit einer Hemmung des Zellwachstums von 30% konnte außerdem eine signifikante Zunahme der Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 mit 46% erzielt werden.

## 3.3.3.3. PC3

**Tab. 28: %-Überleben der PC3-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + TXT) und bei alleiniger TXT bei den entsprechenden IC-50-Werten für TXT**

	TXT(Tag1)+5Gy(Tag1)	TXT(Tag3)+5Gy(Tag1)	TXT(Tag1)+5Gy(Tag3)
%Überleben	25,2	43,9	48,5
95%	7,3	4,4	5,6
Ki-o	32,5	48,3	54,0
Ki-u	17,9	39,5	42,8
	5Gy(Tag1)		5Gy(Tag3)
%Überleben	53,0		84,0
95%	4,2		3,0
Ki-o	57,1		87,4
Ki-u	48,7		81,4



**Abb. 31: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und TXT bei der PC3-Zelllinie**

Bei der Zelllinie PC3 konnte durch eine Kombination mit Bestrahlung am Tag 1 und eine zusätzliche TXT-Gabe am Tag 3 eine Zunahme der Hemmung des Zellwachstums erzielt werden. Während bei dieser Kombination 43,9% der Zellen überlebten, war dies bei der Kombination 5Gy am Tag 3 und Chemotherapie am Tag 1 bei 48,5 % der Zellen der Fall. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant.

Die Rate an überlebenden PC3-Zellen konnte durch die Kombination von 5Gy und Docetaxelzugabe jeweils am Tag 1 mit 25,2% im Vergleich zu der Kombination Docetaxel am Tag 1 und 5Gy am Tag 3 mit einem Zellüberleben von 48,5% jedoch statistisch signifikant gesenkt werden.

Durch die alleinige Bestrahlung am Tag 1 konnte ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Bestrahlung am Tag 3 verzeichnet werden. Es überlebten von den PC3 Zellen durch Bestrahlung am Tag 1 nur noch 53% und nach der Bestrahlung am Tag 3 dagegen 84% der Zellen.

## **4. Diskussion**

Nach wie vor stellt das hormonrefraktäre Prostatakarzinom eine therapeutische Herausforderung dar. Mit der Zulassung von Docetaxel als Standardtherapeutikum durch die Ergebnisse der TAX 327 und SWOG 9916- Studien gibt es erstmalig ein Zytostatikum, das das Leben Erkrankter signifikant verlängern kann. Diese doch entscheidenden Ergebnisse lassen wieder hoffen, waren doch bis dahin sämtliche Studien zum hormonrefraktären Prostatakarzinom eher enttäuschend zu werten. Es werden derzeit neue Kombinationstherapien getestet und auch neue Behandlungsstrategien entwickelt. So auch mit dieser Arbeit, in der sowohl Docetaxel als auch Etoposid, zwei Substanzen, die bereits Bestandteil vieler Studien um das metastasierte Prostatakarzinoms waren, zum Einsatz kommen. Neue therapeutische Optionen eröffnen sich auch durch die Substanz Imatinib, einem selektiven Tyrosinkinaseinhibitor, in Behandlungsstrategien um das Prostatakarzinoms. Durch eine Blockade von PDGF- Rezeptoren, die nach Fudge et. al. in der Pathogenese und Progression des Prostatakarzinoms in epithelialen und stromalen Zellen als auch intraepithelialen Neoplasien eine bedeutenden Rolle spielt, ergibt sich ein interessanter therapeutischer Ansatz. Bereits bei der Behandlung von Leukämien spielt Imatinib eine tragenden Rolle und ist aus Therapieregimes nicht mehr wegzudenken.

Diese Arbeit soll zeigen, ob durch unterschiedliche Kombinationen dieser einzelnen Substanzen mit einer Strahlentherapie ein entscheidender Effekt auf die Proliferation der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3 erzielt werden kann.

### **4.1. Methodik**

Betrachtet man zusammenfassend alle Ergebnisse, so zeigt sich tendenziell eine gute Reproduzierbarkeit.

Unterschiedliche Chargennummern, externe Manipulation, Auftauvorgänge, unbewusst unterschiedliche Handhabung der Zellen oder allgemeinen Temperaturschwankungen spielen hier jedoch sicher eine erwähnenswerte Rolle.

Eine zufällige Fehlerquelle stellt auch das manuelle Zählen der Zellen in der Neubauer- Zählkammer dar.

Standardisierte Ablesezeitpunkte (Aussaat der Zellen am Tag 0, Proliferationsmessung am Tag 6) und Ausgangskonzentrationen pro Well verhinderten ein Verfälschen der Ergebnisse durch ein natürliches Absterben der Zellen bei Erreichen einer gewissen Zelldichte oder durch Zellkontakte:

Durch den prozentualen Vergleich mit dem Überleben unbehandelter Zellen war es möglich Wirkungskonzentrationen in verschiedenen Versuchsreihen und Ergebnisse unabhängiger Versuche miteinander zu vergleichen.

Nachteilig ist sicherlich zu werten, dass in dem vorliegenden Untersuchungsmodell keine Aussage über toxische Wirkungen auf gesunde Zellen gemacht werden kann, da schließlich nur maligne Prostata-Zellen untersucht worden sind.

Hinweise bezüglich des klinischen Gebrauchs lassen sich dennoch aus den ermittelten IC- 50- Werten ermitteln. Hierzu erscheint es auch nützlich, dass die verwendeten Zelllinien DU145, PC-3 und LNCaP in der Tumorforschung seit langer Zeit etabliert sind und aus verschiedenen Metastasierungslokalisationen des Prostatakarzinoms stammen.

Alles in allem erlauben es die standardisierten Bedingungen und die Gleichförmigkeit, mit der Monolayerkulturen durchgeführt werden, in vivo - Studien zu entwickeln.

### **4.2. Strahlentherapie**

Die verwendeten Prostatakarzinomzelllinien sind bekanntermaßen relativ strahlenresistent (Leith 1993, 1994).

In Anlehnung an die Ergebnisse von Hug (1974) zeigte sich auch in dieser Arbeit eine höhere Strahlenresistenz der DU145 - Zellen im Vergleich zu den PC3 - und vor allem der LNCaP - Zellen (DU145: 56%; PC3: 53%; LNCaP: 30%).

Auch nach neueren Studien von Leith et al. (1993) ergab sich nach einer Radiatio mit 2 Gy eine signifikant höhere Strahlenresistenz der DU145 und LNCaP Zellen im Vergleich zu den PC3 Zellen (Überlebensrate hier für LNCaP 51,2%, DU145 59,8%



und PC3 32%). Nach seinen Ergebnissen war die PC3 -Zelllinie am strahlensensibelsten, bei unseren Untersuchungen hingegen ist dies die LNCaP – Zelllinie. Er belegte auch, dass DU145 und PC3 zu einer Erholung von subletalen Strahlenschäden fähig sind.

Wie zu erwarten, war bei unseren Ergebnissen bei allen Zelllinien das prozentuale Zellüberleben nach einer Bestrahlung am Tag 3 im Gegensatz zu einer Bestrahlung am Tag1 deutlich erhöht. Dies ist sicherlich durch die größere Anzahl an Zellen, die bis zum Tag 3 herangewachsen sind, erklärt.

Auch Bromfield hat bereits im Jahr 2003 alle drei der auch bei uns verwendeten Zelllinien mit 2 Gy bestrahlt. Es erfolgte in seinen Versuchen eine Messung der Rate an überlebenden Zellen nach 120 bis 164 Stunden, was eine Überlebensrate von 30% für die LNCaP- Zellen, von 35% für die PC3- Zelle und von 55% für die DU145 Zelle lieferte.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass vermutlich sowohl die unterschiedlichen Messzeitpunkte (Leith: 96 Stunden; Bromfield:120 bis164 Stunden; eigene Daten:144 Stunden) als auch eventuell die verschiedenen Hersteller und Chargen der Zelllinien eine entscheidende Rolle zu den Unterschieden der Strahlenresistenz bzw. – sensibilität der Zelllinien beitragen.

Scott et al. hat das Zellüberleben der Prostatakarzinomzellen LNCaP nach 6 Tagen und PC3 nach 14 Tagen unter einer Radiatio von 2 Gy, 4 Gy und 6 Gy mit Hilfe eines klonogenen Assay gemessen. Unter 4 und 6 Gy, was in etwa mit der Radiatio von 5 Gy in unseren Versuchen verglichen werden kann, war die LNCaP- Zelllinie bei seinen Versuchen signifikant strahlensensibler (18% vs. 26% und 6% vs. 10%). Diese Ergebnisse decken sich auch mit unseren. Bei seinen Studien ist jedoch auffallend, dass insgesamt die Hemmung der Zellproliferation bei beiden Zelllinien im Vergleich zu unseren Ergebnissen deutlich höher ist. Als Ursache hierfür kann zum einen die Inkubationszeit nach der Bestrahlung diskutiert werden, zum anderen aber auch die unterschiedlichen Assays (Scott: Klonogener Assay: 144 bis 296 Stunden; eigenen Daten: XTT- Test, 144Stunden bzw. 72Stunden).

Zusammenfassend kann man hinsichtlich der Strahlensensibilität der einzelnen Zelllinien die folgende Reihenfolge von strahlensensibel bis strahlenresistent

feststellen, die auch mit unseren Ergebnissen für eine Bestrahlung der drei Zellen mit jeweils 5 Gy bei einem Messzeitpunkt von 144 bzw. 72 Stunden übereinstimmt:

LNCaP>PC3>DU145.

Zieht man sämtliche Literaturergebnisse bezüglich Radiatio der letzten Jahre heran, so zeigt sich, dass stets Strahlendosen zwischen 2 und 12 Gy bei der Bestrahlung zur Anwendung kamen (Scott 2004, Bromfield 2003, Pollack 2001, Algan 1996, Lamond 1996).

In unseren Vorversuchen ergab sich bei 5 Gy eine Hemmung der Zellproliferation, es überlebte jedoch hier auch ein ausreichender Prozentsatz an Zellen. Diese Dosis von 5 Gy stellt somit für unsere Versuchsansätze mit einer Kombination aus Strahlentherapie und Chemotherapie eine standardisierte und repräsentative Dosis dar.

#### **4.3. Zytostatika**

Vor Verwendung der einzelnen Zytostatika in einer Kombination sollte die Wirksamkeit der Einzelsubstanzen erwiesen sein. Die verwendeten Substanzen greifen über unterschiedliche Mechanismen in die Zellproliferation ein. Wirksamkeit und Dosisbereich der einzelnen Zytostatika wurden im Vorfeld der Kombinationsversuche über das Proliferationsassay getestet.

Bereits Heather et al. hatten im Jahr 2000 in Studien die Wirkung von Docetaxel in vitro auf die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 untersucht. Es ergab sich hier jeweils ein IC-50 Wert von 0,04µM, wobei hier die Proliferationsbestimmung bereits nach 24 Stunden nach Zellaussaat erfolgte. In dieser Arbeit liegen die entsprechenden IC-50-Werte, gemessen nach 6 Tagen (nach 144h), für Docetaxel bei 0,00094µM für LNCaP, bei 0,0013µM für PC3 und bei 0,00081µM/0,0013µM für die Zelllinie DU145. Durch die unterschiedlichen Messzeiten der IC-50 - Werte könnten diese Unterschiede der Ergebnisse erklärt sein.

Demarquay et al. untersuchten die Hemmung der Zellproliferation durch Etoposid bei den Zelllinien PC3 und DU145. Auch hier wurde die IC-50 bestimmt, die bei 1,3µM

---

für die DU145- Zellen und bei größer 10 $\mu$ M für die PC3 Zellen lagen. Verglichen mit unseren Konzentrationen, lagen die Werte über den in unseren Versuchen berechneten (DU145:0,25 $\mu$ M, LNCaP:0,39 $\mu$ M, PC3: 2,81 $\mu$ M).

In der Literatur sind auch hier zum Teil sehr unterschiedliche Ergebnisse für die IC-50 dieser Substanz angegeben, dies ist vermutlich durch unterschiedliche Messzeitpunkte und durch die verschiedenen Assays zur Messung der Zellproliferation bedingt.

Zur Wirkung von Imatinib auf Prostatakarzinomzelllinien existieren bislang kaum vergleichbaren Studien. Die Blockade von PDGF- Rezeptoren stellt einen potentiellen Therapieansatz beim Prostatakarzinom dar.

Eine multizentrische Phase II Studie mit dem PDGF- R- Inhibitor SU101 bei Patienten mit einem HRPC zeigte eher begrenzte Effekte. Bei 26% der Patienten stabilisierte sich hier der steigende PSA- Wert und bei 8% konnte ein PSA- Abfall um mehr als 50% des Ausgangswertes verzeichnet werden. In den ersten klinischen Studien mit Imatinib als Monotherapie zeigte sich eine minimale Wirksamkeit.

Die IC- 50 Werte in unserer Arbeit liegen bei 10,62 $\mu$ M für die LNCaP, bei 14,37 $\mu$ M für die PC3 und bei 14,82 $\mu$ M für die Zelllinie DU145. Zum Vergleich: Eine orale Einnahme von ca. 400mg Imatinib/d erzielt ungefähr eine Plasmakonzentration von 1,46 $\mu$ mol/l, ein Wert der weit unter unseren IC50- Werten liegt.

Zhang et. al. Untersuchte bereits die Hemmung der Zellproliferation durch Imatinib bei Zellen eines Bronchialkarzinoms (A549) in vitro. Nach 48 Stunden ergab sich hier, gemessen mittels eines MTT- Assays ein IC-50- Wert von 2 bis 3  $\mu$ M, der weit unter unseren Ergebnissen liegt. Die deutlich niedrigeren Werte für die IC-50 von Zhang könnten durch eine unterschiedliche Expression des PDGF- Rezeptors erklärt sein.

Insgesamt konnte bei allen verwendeten Zelllinien mit jeder der verwendeten Zytostatika eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation erzielt werden., damit ist erneut die proliferationshemmende Wirkung der Einzelsubstanzen in vitro bei den Prostatakarzinomzelllinien bewiesen. Es fällt die im Verhältnis hohe benötigte Konzentration an Imatinib (10,6-14,8 $\mu$ M) im Vergleich mit den anderen Substanzen

(Docetaxel 0,81nM- 1,3nM; Etoposid 0,25µM - 2,81µM) auf.

#### **4.4. Kombinationstherapie - Strahlentherapie und Chemotherapie**

Kombinationstherapien bieten den Vorteil, in unterschiedliche Phasen des Zellzykluses eingreifen und verschiedene zelluläre Proliferationsmechanismen inhibieren zu können. Einer raschen Entwicklung von Resistenzen in der Zellpopulation wird so eher entgegengewirkt und eventuell können durch eine Dosisreduktion der Einzeltherapien Schäden am gesunden Gewebe minimiert werden.

Es wurden bei den Kombinationsversuchen die etablierten IC- 50- Konzentrationen der jeweiligen Substanz (Konzentration der halbmaximalen Hemmung der Zellproliferation) aus den entsprechenden Proliferationsversuchen eingesetzt. So war es möglich, die Proliferationseffekte durch die entsprechenden Kombinationen aus Bestrahlung mit 5 Gy und Zytostatikainkubation mit den Ergebnissen der jeweiligen Monotherapien zu vergleichen.

Bisher beschreiben nur wenige Autoren eine Hemmung der Zellproliferation der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3 nach einer Strahlentherapie (Scott 2004, Bromfield 2003, Algan 1996).

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so zeigt sich, dass durch die Kombination aus Strahlentherapie und Chemotherapie in den unterschiedlichen Kombinationsformen überwiegend eine Zunahme der Hemmung der Zellproliferation nachgewiesen werden kann.

Durch die Kombination Bestrahlung am Tag 1 und Chemotherapie am Tag 3 konnte bei nahezu allen Chemotherapeutika und Zelllinien die stärkste Hemmung der Zellproliferation erreicht werden, lediglich bei der Zelllinie PC3 und der Substanz Docetaxel war dies nicht der Fall.

In der überwiegenden Anzahl war die Proliferationshemmung hier sowohl gegenüber den Monotherapien (alleinige Radiatio bzw. Chemotherapie) als auch gegenüber den weiteren Kombinationsforen signifikant überlegen.

### Kombination Bestrahlung am Tag 1 und Zugabe des Zytostatikums am Tag 1 bzw. 2

Es kam bei Docetaxel und Imatinib bei der Kombinationsform Bestrahlung und Chemozugabe jeweils am Tag 1 nur bei den LNCaP und PC3 zu einer signifikant stärkeren Hemmung der Proliferation der Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien, während dies bei den DU145 - Zellen nicht der Fall war.

Das Zytostatikum Etoposid zeigte durch eine Kombinationsbehandlung mit Bestrahlung am Tag 1 und Etoposidzugabe am Tag 2 bei den Linien LNCaP, Du145 und PC3 im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien eine signifikante Hemmung der Zellproliferation.

### Kombination Bestrahlung am Tag 3 und Zugabe des Zytostatikums am Tag 1

Beim Einsatz von Docetaxel in Form der Kombination Bestrahlung am Tag 3 und Substanz am Tag 1 war das Signifikanzverhalten der drei Zelllinien unterschiedlich. Während die Zellproliferation der Linie LNCaP und PC3 durch eine Kombinationstherapie im Vergleich zu beiden Monotherapien jeweils signifikant gesenkt werden konnte, war dies bei der DU145- Zellen hier wieder nur im Vergleich zur Strahlentherapie der Fall.

Bei Imatinib und Etoposid hingegen war die Kombination bei jeder der drei Prostatakarzinomzelllinien den einzelnen Monotherapien signifikant überlegen.

### Kombination Bestrahlung am Tag 1 und Zugabe des Zytostatikums am Tag 3

Bei dieser Kombinationsform konnte bei allen drei Zelllinien und bei jeder der drei verwendeten Zytostatika eindeutig eine signifikante Steigerung der Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur alleinigen Chemo- bzw. Strahlentherapie gefunden werden.

Betrachtet man zusammenfassend sämtliche obigen Kombinationsform der drei verwendeten Zytostatika in dieser Arbeit, kann eine Reihenfolge der Chemotherapeutika hinsichtlich der Hemmung der Zellproliferation durch eine entsprechende Kombinationstherapie von „effektiv“ bis am „wenigsten effektiv“ in vitro im Vergleich zur Chemomonotherapie erstellt werden. Hier ergibt sich demnach:

Etoposid > Imatinib > Docetaxel

und im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie:

Etoposid > Imatinib > Docetaxel

### Vergleich der einzelnen Kombinationen

Vergleicht man unsere Ergebnisse der unterschiedlichen Kombinationsvariationen mit Docetaxel, Etoposid und Imatinib und jeweils Bestrahlung mit 5 Gy untereinander, erwies sich sowohl bei den LNCaP als auch DU145- Zellen die Kombination Bestrahlung am Tag 1 und anschließend die entsprechende Chemozugabe am Tag 3 als am effektivsten.

Bei den PC3 - Zellen kam es zu ähnlichen Ergebnissen, nur bei der Anwendung von Docetaxel erwies sich diese Kombinationsform nicht als am geeignetsten. Hier war die maximale Hemmung der Zellproliferation durch die Zugabe des Chemotherapeutikums am Tag 1 und anschließender Bestrahlung am selben Tag zu erreichen. Diese war signifikant im Vergleich zu den anderen Kombinationsformen.

Es erscheint daher sinnvoll, die vorhandene Zellzahl vor einer entsprechenden Zytostatikabehandlung durch Radiatio zu minimieren.

Es ergab sich weiter, dass die Kombinationsvariante in Form einer Zytostatika- und Bestrahlungsbehandlung jeweils am Tag 1 bei Docetaxel und Imatinib auch sehr effektiv sein kann. Verglichen mit der Kombination Chemotherapiezugabe am Tag 1 und Radiatio am Tag 3 kam es hier zu einer deutlichen Zunahme der Hemmung der Zellproliferation. Lediglich bei den mit Imatinib behandelten DU145- Zellen trifft dies nicht zu. Eventuell ist dies mit der Strahlenresistenz der Zelllinie, die hier offensichtlich bei dieser Kombination relevanter zu sein scheint, zu erklären.

Bei den Ergebnissen der Kombination Etoposid am Tag 2 und Radiatio am Tag 1 ließ sich erneut eine Verbesserung der Zellproliferationshemmung im Vergleich zu der Variante Chemotherapeutikum am Tag1 und Bestrahlung erst am Tag 3 feststellen.

Zusammenfassend ergibt sich auch hier, dass es auf jeden Fall sinnvoller erscheint, eine Bestrahlung in einem Therapieregime mit Docetaxel, Imatinib und Etoposid prinzipiell vorweg durchzuführen, um so die Zellzahl bereits vor Substanzzugabe zu reduzieren und die Effektivität der oben genannten Zytostatika zu steigern. Auch scheint es zumindest anhand der Ergebnisse bei unseren Versuchen vorteilhaft zu sein, eine gewisse Zeit bis zur Chemozugabe abzuwarten, um so die Radiatio vorwirken zu lassen und die Zellen in Ihren unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus zu synchronisieren.

Inwieweit die hier dargestellten Ergebnisse klinische Relevanz haben werden, bleibt abzuwarten. Als Grundlage für die Planung weiterer Studien können die Ergebnisse jedoch sicher Anwendung finden und hilfreich sein.

Langfristig deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass eine kombinierte Radiochemotherapie beim hormonrefraktären Prostatakarzinom in der Zukunft ein erfolgsversprechendes Therapiekonzept darstellen kann

## 5. Zusammenfassung

Das hormonrefraktäre Prostatakarzinom stellt aufgrund begrenzter Therapieoptionen nach wie vor eine therapeutische Herausforderung dar. So ist das Prostatakarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern. Neue Therapieansätze und -strategien erscheinen somit notwendig.

In dieser Arbeit sollten die Effekte der bereits beim Prostatakarzinom etablierten Substanzen Etoposid und Docetaxel und des selektive Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib untersucht werden. Mit Imatinib sind bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) und der chronisch myeloischen Leukämie therapeutische Erfolge beschrieben. Es wurde die Hemmung der Zellproliferation bei den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3 untersucht, nachdem die Zellen mit den einzelnen Substanzen inkubiert ( Monotherapie), an unterschiedlichen Tagen bestrahlt und mit den entsprechenden Chemotherapeutika behandelt wurden (Kombinationstherapie).

Die Ergebnisse der Kombinationstherapie wurden untereinander und mit den Monotherapien (Chemotherapie bzw. Radiatio) verglichen.

Die Untersuchungen erfolgten in 96-well-Platten als Monolayerkulturen unter optimalen Wachstumsbedingungen. Dieses System ist gut reproduzierbar und vergleichbar.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einem Hochvolt-Linearbeschleuniger.

Die dosisabhängigen Veränderung der Proliferationskinetik wurde über das XTT-Assay sowohl bei Applikation der Monosubstanzen als auch bei den Kombinationstherapien gemessen und eine entsprechende Dosis- Wirkungskurve erstellt.

Für jede Versuchsreihe wurde die Konzentration der jeweiligen Substanz bei halbmaximaler Hemmung der Zellproliferation (IC-50) ermittelt und so die Substanzen bzw. Zelllinien mittels t- Test für unverbundene Stichproben miteinander verglichen.



Bei allen drei Zelllinien bewirkte die Bestrahlung mit 5Gy eine Hemmung der Zellproliferation. Hierbei zeigten die DU145- Zellen die höchste Strahlenresistenz.

Hinsichtlich der Strahlensensibilität ergibt sich bei einer Dosis von 5Gy und einem Messzeitpunkt der Zellproliferation nach 144 Stunden folgende Reihenfolge von strahlensensibel bis strahlenresistent:

LNCaP>PC3>DU145

Bei den drei verwendeten Zytostatika konnte bei allen Zelllinien ein 50%ige Hemmung der Zellproliferation erzielt werden. Es fällt die im Verhältnis hohe benötigte Konzentration an Imatinib (10,6-14,8µM) im Vergleich mit den anderen Substanzen (Docetaxel 0,81nM- 1,3nM; Etoposid 0,25µM - 2,81µM) auf.

Ausgehend von den IC-50-Werten wurden die Kombinationseffekte ermittelt.

Durch eine Kombination aus Strahlentherapie und Chemotherapie ergab sich überwiegend eine Zunahme der Hemmung der Zellproliferation.

Die Kombination einer Bestrahlung am Tag 1 mit anschließender Inkubation eines Chemotherapeutikums am Tag 3 ergab die stärkste Proliferationshemmung. Diese erwies sich auch überwiegend als signifikant gegenüber den Monotherapien und weiteren Kombinationsformen.

Lediglich bei der Zelllinie PC3 und der Substanz Docetaxel war dies nicht der Fall.

Eine maximale und auch signifikante Hemmung der Zellproliferation gegenüber den anderen Kombinationen ergab sich hier durch eine Chemotherapiezugabe am Tag 1 und anschließender Bestrahlung am selben Tag.

In der Ergebnisinterpretation erscheint ein Therapieregime mit einer Bestrahlung vorweg und anschließender Chemotherapiezugabe sinnvoll. So kann die Effektivität der Zytostatika durch ein Reduzieren der Zellzahl durch eine Radiatio gesteigert werden und Zellen in ihren unterschiedlichen Phasen des Zellzykluses synchronisiert werden.

Eine kombinierte Radiochemotherapie könnte somit in der Zukunft beim hormonrefraktären Prostatakarzinom ein erfolgsversprechendes Therapiekonzept darstellen und die erstellten Daten eignen sich als Richtlinien zur Erstellung neuer Protokolle.

## 5. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Etoposid .....	22
Abb. 2: Strukturformel von Docetaxel .....	23
Abb. 3: Strukturformel von Imatinib .....	25
Abb. 4: Molekularer Wirkmechanismus von Imatinib .....	26
Abb.5: Dosiseffektkurve von LNCaP unter der Behandlung von Imatinib ( STI571) mit Konzentrationen von 0,1 bis 50 $\mu$ M. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.....	43
Abb.6: Dosiseffektkurve von PC3 unter der Behandlung von Imatinib (STI571) mit Konzentrationen von 0,1 bis 50 $\mu$ M.Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.....	44
Abb. 7: Dosiseffektkurve von DU145 unter der Behandlung von Imatinib (STI571) mit Konzentrationen von 0,1 bis 50 $\mu$ M. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.....	45
Abb. 8: Dosiseffektkurve von LNCaP unter der Behandlung von Docetaxel (TXT) mit Konzentrationen von 0,00001 bis 50 $\mu$ M. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.....	46
Abb. 9: Dosiseffektkurve von PC3 unter der Behandlung von Docetaxel (TXT) mit Konzentrationen von 0,00001 bis 50 $\mu$ M. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.....	47
Abb. 10: Dosiseffektkurve von DU 145 unter der Behandlung von Docetaxel (TXT) mit Konzentrationen von 0,00001 bis 50 $\mu$ M. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen. ....	48

Abb. 11: Dosiseffektkurve von LNCaP unter der Behandlung von Etoposid mit Konzentrationen von 0,001 bis 100µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.....	50
Abb. 12: Dosiseffektkurve von PC3 unter der Behandlung von Etoposid mit Konzentrationen von 0,001 bis 100µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.....	51
Abb. 13: Dosiseffektkurve von DU145 unter der Behandlung von Etoposid mit Konzentrationen von 0,01 bis 100µM. Jeder Punkt repräsentiert bereits den Mittelwert und das 95%-Konfidenz- Intervall von mindestens fünf voneinander unabhängigen Versuchen.....	52
Abb. 14: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie und Docetaxel (TXT) ( jeweils am Tag1). .....	56
Abb. 15: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie und Imatinib (STI571) (jeweils am Tag1).....	58
Abb. 16: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag1) und Etoposid (Eto) (Tag 2).....	60
Abb. 17: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Imatinib (STI571) (Tag 1).....	62
Abb. 18: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Docetaxel(TXT) (Tag 1) .....	64
Abb. 19: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Etoposid(Eto)(Tag1).....	66
Abb. 20: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Imatinib (STI571) (Tag 3).....	68
Abb. 21: Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Docetaxel(TXT) (Tag 3) .....	70
Abb. 22 Überleben der Prostatakarzinomzellen durch die Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Etoposid(Eto)(Tag3).....	73

---

Abb. 23: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Imatinib( STI571) bei der LNCaP- Zelllinie .....	74
Abb. 24: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Imatinib bei der DU145 – Zelllinie .....	75
Abb. 25: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Imatinib bei der PC3 – Zelllinie .....	77
Abb. 26: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Etoposid bei der PC3 – Zelllinie .....	79
Abb. 27: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Etoposid bei der ..... LNCaP- Zelllinie.....	81
Abb. 28: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und Etoposid bei der DU145- Zelllinie .....	83
Abb. 29: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und TXT bei der DU145- Zelllinie .....	85
Abb. 30: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und TXT bei der LNCaP- Zelllinie .....	87
Abb. 31: Vergleich der einzelnen Kombinationen Radiatio und TXT bei der PC3- Zelllinie .....	89

## 7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Modulation der Zellproliferation bei LNCaP nach Applikation von 0,1-50µM Imatinib über 5 Tage.....	43
Tab. 2: Modulation der Zellproliferation bei PC3 nach Applikation von 0,1- 50µM über 5 Tage .....	44
Tab. 3: %-Zell-Überleben bei DU 145 nach Applikation von 5-50µM Imatinib über 5 Tage. ....	45
Tab. 4: %-Zell-Überleben bei LNCaP nach Applikation von 0,00001-50µM Docetaxel über 5 Tage .....	46
Tab. 5: %-Zell-Überleben bei PC3 nach Applikation von 0,00001-50µM Docetaxel über 5 Tage .....	47
Tab. 6: %-Zell-Überleben bei DU 145 nach Applikation von 0,00001-50µM Docetaxel über 5 Tage .....	48
Tab. 7: %-Zell-Überleben bei LNCaP nach Applikation von 0,001-100µM Etoposid über 5 Tage .....	50
Tab. 8: %-Zell-Überleben bei PC3 nach Applikation von 0,001-100µM Etoposid über 5 Tage .....	51
Tab. 9: %-Zell-Überleben bei DU145 nach Applikation von 0,01-100µM Etoposid über 5 Tage .....	52
Tab. 10: IC50 - Werte der Prostatakarzinomzelllinien bei den verwendeten Chemotherapeutika (Werte repräsentieren den Mittelwert und das 95%-Konfidenz Intervall von mindestens 5 voneinander unabhängigen Versuchen) 53	
Tab. 11: Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Radiatio und Docetaxel(TXT) (jeweils am Tag 1) .....	55
Tab. 12 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie und Imatinib (STI571) (jeweils am Tag 1).....	57
Tab. 13: Überleben der Prostatakarzinomzellen bei Kombination von Strahlentherapie (Tag1) und Etoposid (Eto) (am Tag2).....	59

---

Tab. 14 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Imatinib (STI571) (Tag 1).....	61
Tab. 15 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Docetaxel (TXT) (Tag 1) .....	64
Tab. 16 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 3) und Etoposid (Eto) (Tag 1).....	66
Tab. 17 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Imatinib (STI571) (Tag 3).....	68
Tab. 18 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Docetaxel (TXT) (Tag 3) .....	70
Tab. 19 : Überleben der Prostatakarzinomzellen bei der Kombination von Strahlentherapie (Tag 1) und Etoposid (Tag 3) .....	72
Tab. 20: %-Überleben der LNCaP-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Imatinib ( STI571)) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Imatinib.....	73
Tab. 21: %-Überleben der DU145-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Imatinib) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Imatinib.....	75
Tab. 22: %-Überleben der PC3-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Imatinib) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Imatinib.....	77
Tab. 23: %-Überleben der PC3-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Etoposid) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Etoposid .....	79
Tab. 24: %-Überleben der LNCaP-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Etoposid) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Etoposid .....	81
Tab. 25: %-Überleben der DU145-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + Etoposid) und bei alleiniger Radiatio bei den IC-50-Werten für Etoposid .....	83

Tab. 26: %-Überleben der DU145-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + TXT) und bei alleiniger TXT bei den entsprechenden IC-50-Werten für TXT ..... 85

Tab. 27: %-Überleben der LNCaP-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + TXT) und bei alleiniger TXT bei den entsprechenden IC-50-Werten für TXT ..... 87

Tab. 28: %-Überleben der PC3-Zelllinie bei den unterschiedlichen Kombinationen (Radiatio + TXT) und bei alleiniger TXT bei den entsprechenden IC-50-Werten für TXT ..... 89



**8. Abkürzungsverzeichnis**

ABM	Antibiotic Antimycotic Solution
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATCC	American Type Culture Collection
CLS	Cell Line Service
DMSO	Dimethylsulfoxid
FGC	Fast Growing Colony
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HRPC	Hormonrefraktäres Prostatakarzinom
IC - 50	Konzentration der halbmaximalen Hemmung der Zellproliferation
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
MAB	Maximale Androgenblockade
MV	Mittelwert
NEAS	Nichtessentielle Aminosäuren
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
SD	Standardabweichung
RPTK	Receptor Protein Tyrosin Kinase
RTX	Strahlentherapie
VP-16	Etoposid

## 9. Literaturverzeichnis

1. Abrahamsson,P.A. revolutions in The Management of the Hormone-refractory Prostate Cancer, Eur Urol Suppl 2) 2 (2003) 3-8
2. Algan,O., Stobbe,C.C., Helt,A.M., Hanks,G.E., Chapman,J.D. Radiation inactivation of human prostate cancer cells: the role of apoptosis, Radiat. Res. 146 (1996) 267-275.
3. Berthold,D.R., Pond,G.R., de,W.R., Eisenberger,M., Tannock,I.F. Survival and PSA response of patients in the TAX 327 study who crossed over to receive docetaxel after mitoxantrone or vice versa, Ann. Oncol. 19 (2008) 1749-1753.
4. Berthold,D.R., Pond,G.R., Roessner,M., de,W.R., Eisenberger,M., Tannock,A.I. Treatment of hormone-refractory prostate cancer with docetaxel or mitoxantrone: relationships between prostate-specific antigen, pain, and quality of life response and survival in the TAX-327 study, Clin. Cancer Res. 14 (2008) 2763-2767.
5. Berthold,D.R., Pond,G.R., Soban,F., de,W.R., Eisenberger,M., Tannock,I.F. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study, J. Clin. Oncol. 26 (2008) 242-245.
6. Bromfield,G.P., Meng,A., Warde,P., Bristow,R.G. Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill, Prostate Cancer Prostatic. Dis. 6 (2003) 73-85.
7. Bruchofsky,N., Rennie,P.S., Coldman,A.J., Goldenberg,S.L., To,M., Lawson,D. Effects of androgen withdrawal on the stem cell composition of the Shionogi carcinoma, Cancer Res. 50 (1990) 2275-2282.
8. Carroll,M., Ohno-Jones,S., Tamura,S., Buchdunger,E., Zimmermann,J., Lydon,N.B., Gilliland,D.G., Druker,B.J. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins, Blood 90 (1997) 4947-4952.
9. Chowdhury,S., Burbridge,S., Harper,P.G. Chemotherapy for the treatment of hormone-refractory prostate cancer, Int. J. Clin. Pract. 61 (2007) 2064-2070.

10. Crawford,E.D., Blumenstein,B.A. Proposed substages for metastatic prostate cancer, *Urology* 50 (1997) 1027-1028.
11. Crawford,E.D. Summary: the role of the urologist in chemotherapy of hormone refractory prostate cancer, *Urology* 54 (1999) 51-52.
12. Crawford,E.D., Rosenblum,M., Ziada,A.M., Lange,P.H. Hormone refractory prostate cancer, *Urology* 54 (1999) 1-7.
13. Dawson,N.A., Cooper,M.R., Figg,W.D., Headlee,D.J., Thibault,A., Bergan,R.C., Steinberg,S.M., Sausville,E.A., Myers,C.E., Sartor,O. Antitumor activity of suramin in hormone-refractory prostate cancer controlling for hydrocortisone treatment and flutamide withdrawal as potentially confounding variables, *Cancer* 76 (1995) 453-462.
14. de,W.R. Chemotherapy in hormone-refractory prostate cancer, *BJU. Int.* 101 Suppl 2 (2008) 11-15.
15. Demarquay,D., Huchet,M., Coulomb,H., Lesueur-Ginot,L., Lavergne,O., Camara,J., Kasprzyk,P.G., Prevost,G., Bigg,D.C. BN80927: a novel homocamptothecin that inhibits proliferation of human tumor cells in vitro and in vivo, *Cancer Res.* 64 (2004) 4942-4949.
16. Druker,B.J., Talpaz,M., Resta,D.J., Peng,B., Buchdunger,E., Ford,J.M., Lydon,N.B., Kantarjian,H., Capdeville,R., Ohno-Jones,S., Sawyers,C.L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1031-1037.
17. Druker,B.J., O'Brien,S.G., Cortes,J., Radich,J. Chronic myelogenous leukemia, *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*(2002) 111-135.
18. Effert,P., McCoy,R., bdel-Hamid,M., Flynn,K., Zhang,Q., Busson,P., Tursz,T., Liu,E., Raab-Traub,N. Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma, *J. Virol.* 66 (1992) 3768-3775.
19. Eisenberger,M.A., Blumenstein,B.A., Crawford,E.D., Miller,G., McLeod,D.G., Loehrer,P.J., Wilding,G., Sears,K., Culkin,D.J., Thompson,I.M., Jr., Bueschen,A.J., Lowe,B.A. Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1036-1042.

20. Elo,J.P., Kvist,L., Leinonen,K., Isomaa,V., Henttu,P., Lukkarinen,O., Vihko,P. Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 80 (1995) 3494-3500.
21. Feldman,B.J., Feldman,D. The development of androgen-independent prostate cancer, *Nat. Rev. Cancer* 1 (2001) 34-45.
22. Fowler,J.E., Jr., Pandey,P., Seaver,L.E., Feliz,T.P. Prostate specific antigen after gonadal androgen withdrawal and deferred flutamide treatment, *J. Urol.* 154 (1995) 448-453.
23. Fowler,J.E., Jr., Pandey,P., Seaver,L.E., Feliz,T.P., Braswell,N.T. Prostate specific antigen regression and progression after androgen deprivation for localized and metastatic prostate cancer, *J. Urol.* 153 (1995) 1860-1865.
24. Fraley,E.E., Ecker,S., Vincent,M.M. Spontaneous in vitro neoplastic transformation of adult human prostatic epithelium, *Science* 170 (1970) 540-542.
25. Fudge,K., Wang,C.Y., Stearns,M.E. Immunohistochemistry analysis of platelet-derived growth factor A and B chains and platelet-derived growth factor alpha and beta receptor expression in benign prostatic hyperplasias and Gleason-graded human prostate adenocarcinomas, *Mod. Pathol.* 7 (1994) 549-554.
26. Fudge,K., Bostwick,D.G., Stearns,M.E. Platelet-derived growth factor A and B chains and the alpha and beta receptors in prostatic intraepithelial neoplasia, *Prostate* 29 (1996) 282-286.
27. George,D. Platelet-derived growth factor receptors: a therapeutic target in solid tumors, *Semin. Oncol.* 28 (2001) 27-33.
28. George,D.J. Receptor tyrosine kinases as rational targets for prostate cancer treatment: platelet-derived growth factor receptor and imatinib mesylate, *Urology* 60 (2002) 115-121.
29. Haldar,S., Basu,A., Croce,C.M. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity, *Cancer Res.* 57 (1997) 229-233.

30. Hara,T., Miyazaki,J., Araki,H., Yamaoka,M., Kanzaki,N., Kusaka,M., Miyamoto,M. Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome, *Cancer Res.* 63 (2003) 149-153.
31. Hedlund,P.O. Side effects of endocrine treatment and their mechanisms: castration, antiandrogens, and estrogens, *Prostate Suppl* 10 (2000) 32-37.
32. Hedlund,P.O. [Treatment of advanced prostatic cancer], *Lakartidningen* 97 (2000) 3466-3469.
33. Heidenberg,H.B., Sesterhenn,I.A., Gaddipati,J.P., Weghorst,C.M., Buzard,G.S., Moul,J.W., Srivastava,S. Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer, *J. Urol.* 154 (1995) 414-421.
34. Heidenreich,A., von,K.R., Hofmann,R. Current status of cytotoxic chemotherapy in hormone refractory prostate cancer, *Eur. Urol.* 39 (2001) 121-130.
35. Hobisch,A., Culig,Z., Radmayr,C., Bartsch,G., Klocker,H., Hittmair,A. Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein, *Cancer Res.* 55 (1995) 3068-3072.
36. Horoszewicz,J.S., Leong,S.S., Chu,T.M., Wajzman,Z.L., Friedman,M., Papsidero,L., Kim,U., Chai,L.S., Kakati,S., Arya,S.K., Sandberg,A.A. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma, *Prog. Clin. Biol. Res.* 37 (1980) 115-132.
37. Horoszewicz,J.S., Leong,S.S., Kawinski,E., Karr,J.P., Rosenthal,H., Chu,T.M., Mirand,E.A., Murphy,G.P. LNCaP model of human prostatic carcinoma, *Cancer Res.* 43 (1983) 1809-1818.
38. Huan,S.D., Gerridzen,R.G., Yau,J.C., Stewart,D.J. Antiandrogen withdrawal syndrome with nilutamide, *Urology* 49 (1997) 632-634.
39. Hug,O. [Proceedings: Current radiobiological aspects in the therapy of tumors], *Arch. Klin. Exp. Ohren. Nasen. Kehlkopfheilkd.* 205 (1973) 50-54.
40. Huggins,C., Hodges,C.V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941, *J. Urol.* 167 (2002) 948-951.

41. Isaacs,J.T., Wake,N., Coffey,D.S., Sandberg,A.A. Genetic instability coupled to clonal selection as a mechanism for tumor progression in the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system, *Cancer Res.* 42 (1982) 2353-2371.
42. Isaacs,W.B., Carter,B.S. Genetic changes associated with prostate cancer in humans, *Cancer Surv.* 11 (1991) 15-24.
43. Iversen, J.T. Current topics in the treatment of hormone-refractory prostate cancer, *Eur Urol (Suppl 2)* 3 (2003) 3-8
44. Kaighn,M.E., Babcock,M.S. Monolayer cultures of human prostatic cells, *Cancer Chemother. Rep.* 59 (1975) 59-63.
45. Kaighn,M.E., Lechner,J.F., Narayan,K.S., Jones,L.W. Prostate carcinoma: tissue culture cell lines, *Natl. Cancer Inst. Monogr*(1978) 17-21.
46. Kaighn,M.E., Narayan,K.S., Ohnuki,Y., Lechner,J.F., Jones,L.W. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3), *Invest Urol.* 17 (1979) 16-23.
47. Kaighn,M.E. Human prostatic epithelial cell culture models, *Invest Urol.* 17 (1980) 382-385.
48. Kao,J., Ko,E.C., Eisenstein,S., Sikora,A.G., Fu,S., Chen,S.H. Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology, *Crit Rev. Oncol. Hematol.*(2010).
49. Kaver,I., Ware,J.L., Wilson,J.D., Koontz,W.W., Jr. Effect of radiation combined with hyperthermia on human prostatic carcinoma cell lines in culture, *Urology* 38 (1991) 88-92.
50. Kaver,I., Koontz,W.W., Jr., Wilson,J.D., Guice,J.M., Ware,J.L. The effect of radiation therapy and hyperthermia on a human prostatic carcinoma cell line grown in athymic nude mice, *J. Urol.* 145 (1991) 654-656.
51. Kelly,W.K., Scher,H.I., Mazumdar,M., Vlamis,V., Schwartz,M., Fossa,S.D. Prostate-specific antigen as a measure of disease outcome in metastatic hormone-refractory prostate cancer, *J. Clin. Oncol.* 11 (1993) 607-615.
52. Kelly,W.K., Scher,H.I. Prostate specific antigen decline after antiandrogen withdrawal: the flutamide withdrawal syndrome, *J. Urol.* 149 (1993) 607-609.

- 
53. Kelly,W.K., Scher,H.I., Mazumdar,M., Pfister,D., Curley,T., Leibertz,C., Cohen,L., Vlamis,V., Dnistrian,A., Schwartz,M. Suramin and hydrocortisone: determining drug efficacy in androgen-independent prostate cancer, *J. Clin. Oncol.* 13 (1995) 2214-2222.
  54. Kelly,W.K., Curley,T., Leibertz,C., Dnistrian,A., Schwartz,M., Scher,H.I. Prospective evaluation of hydrocortisone and suramin in patients with androgen-independent prostate cancer, *J. Clin. Oncol.* 13 (1995) 2208-2213.
  55. Kim,H.J., Jung,C.W., Kim,K., Ahn,J.S., Kim,W.S., Park,K., Ko,Y.H., Kang,W.K., Park,K. Isolated blast crisis in CNS in a patient with chronic myelogenous leukemia maintaining major cytogenetic response after imatinib, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 4028-4029.
  56. Kim,I.Y., Kim,J.H., Zelner,D.J., Ahn,H.J., Sensibar,J.A., Lee,C. Transforming growth factor-beta1 is a mediator of androgen-regulated growth arrest in an androgen-responsive prostatic cancer cell line, LNCaP, *Endocrinology* 137 (1996) 991-999.
  57. Ko,Y.J., Small,E.J., Kabbinavar,F., Chachoua,A., Taneja,S., Reese,D., DePaoli,A., Hannah,A., Balk,S.P., Bubley,G.J. A multi-institutional phase ii study of SU101, a platelet-derived growth factor receptor inhibitor, for patients with hormone-refractory prostate cancer, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 800-805.
  58. Koivisto,P., Kononen,J., Palmberg,C., Tammela,T., Hyytinen,E., Isola,J., Trapman,J., Cleutjens,K., Noordzij,A., Visakorpi,T., Kallioniemi,O.P. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer, *Cancer Res.* 57 (1997) 314-319.
  59. Kucuk,O., Fisher,E., Moinpour,C.M., Coleman,D., Hussain,M.H., Sartor,A.O., Chatta,G.S., Lowe,B.A., Eisenberger,M.A., Crawford,E.D. Phase II trial of bicalutamide in patients with advanced prostate cancer in whom conventional hormonal therapy failed: a Southwest Oncology Group study (SWOG 9235), *Urology* 58 (2001) 53-58.
  60. Labrie,F., Dupont,A., Belanger,A., Cusan,L., Lacourciere,Y., Monfette,G., Laberge,J.G., Emond,J.P., Fazekas,A.T., Raynaud,J.P., Husson,J.M. New hormonal therapy in prostatic carcinoma: combined treatment with an LHRH agonist and an antiandrogen, *Clin. Invest Med.* 5 (1982) 267-275.

61. Labrie,F., Dupont,A., Simard,J., Luu-The,V., Belanger,A. Intracrinology: the basis for the rational design of endocrine therapy at all stages of prostate cancer, *Eur. Urol.* 24 Suppl 2 (1993) 94-105.
62. Lamond,J.P., Wang,M., Kinsella,T.J., Boothman,D.A. Concentration and timing dependence of lethality enhancement between topotecan, a topoisomerase I inhibitor, and ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 36 (1996) 361-368.
63. Lechner,J.F., Babcock,M.S., Marnell,M., Narayan,K.S., Kaighn,M.E. Normal human prostate epithelial cell cultures, *Methods Cell Biol.* 21B (1980) 195-225.
64. Leith,J.T., Quaranto,L., Padfield,G., Michelson,S., Hercbergs,A. Radiobiological studies of PC-3 and DU-145 human prostate cancer cells: x-ray sensitivity in vitro and hypoxic fractions of xenografted tumors in vivo, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 25 (1993) 283-287.
65. Leith,J.T. In vitro radiation sensitivity of the LNCaP prostatic tumor cell line, *Prostate* 24 (1994) 119-124.
66. Logothetis,C.J., Hoosein,N.M., Hsieh,J.T. The clinical and biological study of androgen independent prostate cancer (AI PCa), *Semin. Oncol.* 21 (1994) 620-629.
67. MacGrogan,D., Bookstein,R. Tumour suppressor genes in prostate cancer, *Semin. Cancer Biol.* 8 (1997) 11-19.
68. Manley,P.W., Cowan-Jacob,S.W., Buchdunger,E., Fabbro,D., Fendrich,G., Furet,P., Meyer,T., Zimmermann,J. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor, *Eur. J. Cancer* 38 Suppl 5 (2002) S19-S27.
69. Mathew,P., Fidler,I.J., Logothetis,C.J. Combination docetaxel and platelet-derived growth factor receptor inhibition with imatinib mesylate in prostate cancer, *Semin. Oncol.* 31 (2004) 24-29.
70. Mathew,P., Thall,P.F., Jones,D., Perez,C., Bucana,C., Troncoso,P., Kim,S.J., Fidler,I.J., Logothetis,C. Platelet-derived growth factor receptor inhibitor imatinib mesylate and docetaxel: a modular phase I trial in androgen-independent prostate cancer, *J. Clin. Oncol.* 22 (2004) 3323-3329.



71. McDonnell,T.J., Troncoso,P., Brisbay,S.M., Logothetis,C., Chung,L.W., Hsieh,J.T., Tu,S.M., Campbell,M.L. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer, *Cancer Res.* 52 (1992) 6940-6944.
72. Mickey,D.D., Stone,K.R., Wunderli,H., Mickey,G.H., Paulson,D.F. Characterization of a human prostate adenocarcinoma cell line (DU 145) as a monolayer culture and as a solid tumor in athymic mice, *Prog. Clin. Biol. Res.* 37 (1980) 67-84.
73. Morstyn,G., Mitchell,J., Carney,D., Gazdar,A., Glatstein,E Radiation biology of human lung cancer (HLC) cell lines (CL) of different histologies, *Proc Am Assc Cancer Res* 23 (1983) 33
74. Navone,N.M., Troncoso,P., Pisters,L.L., Goodrow,T.L., Palmer,J.L., Nichols,W.W., von Eschenbach,A.C., Conti,C.J. p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (1993) 1657-1669.
75. Noldus,J., Chen,Z., Stamey,T.A. Isolation and characterization of free form prostate specific antigen (f-PSA) in sera of men with prostate cancer, *J. Urol.* 158 (1997) 1606-1609.
76. Noldus,J., Graefen,M., Haese,A., Henke,R.P., Hammerer,P., Huland,H. Stage migration in clinically localized prostate cancer, *Eur. Urol.* 38 (2000) 74-78.
77. Numata,K., Miura,N., Azuma,K., Karashima,T., Kasahara,K., Nakatsuzi,H., Hashine,K., Sumiyoshi,Y. Oral estramustine phosphate and oral etoposide for the treatment of hormone-refractory prostate cancer, *Hinyokika Kyo* 53 (2007) 99-104.
78. Ohnuki,Y., Marnell,M.M., Babcock,M.S., Lechner,J.F., Kaighn,M.E. Chromosomal analysis of human prostatic adenocarcinoma cell lines, *Cancer Res.* 40 (1980) 524-534.
79. Okada,K., Schroder,F.H. Human prostatic carcinoma in cell culture: preliminary report on the development and characterization of an epithelial cell line (EB 33), *Urol. Res.* 2 (1974) 111-121.

80. Petrylak,D.P., Macarthur,R., O'Connor,J., Shelton,G., Weitzman,A., Judge,T., England-Owen,C., Zuech,N., Pfaff,C., Newhouse,J., Bagiella,E., Hetjan,D., Sawczuk,I., Benson,M., Olsson,C. Phase I/II studies of docetaxel (Taxotere) combined with estramustine in men with hormone-refractory prostate cancer, *Semin. Oncol.* 26 (1999) 28-33.
81. Petrylak,D.P., Tangen,C.M., Hussain,M.H., Lara,P.N., Jr., Jones,J.A., Taplin,M.E., Burch,P.A., Berry,D., Moinpour,C., Kohli,M., Benson,M.C., Small,E.J., Raghavan,D., Crawford,E.D. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1513-1520.
82. Petrylak,D.P. The current role of chemotherapy in metastatic hormone-refractory prostate cancer, *Urology* 65 (2005) 3-7.
83. Petrylak,D.P. Chemotherapy for androgen-independent prostate cancer, *World J. Urol.* 23 (2005) 10-13.
84. Pienta,K.J., Fisher,E.I., Eisenberger,M.A., Mills,G.M., Goodwin,J.W., Jones,J.A., Dakhil,S.R., Crawford,E.D., Hussain,M.H. A phase II trial of estramustine and etoposide in hormone refractory prostate cancer: A Southwest Oncology Group trial (SWOG 9407), *Prostate* 46 (2001) 257-261.
85. Pollack,A., Salem,N., Ashoori,F., Hachem,P., Sangha,M., von Eschenbach,A.C., Meistrich,M.L. Lack of prostate cancer radiosensitization by androgen deprivation, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 51 (2001) 1002-1007.
86. Rao,K., Goodin,S., Levitt,M.J., Dave,N., Shih,W.J., Lin,Y., Capanna,T., Doyle-Lindrud,S., Juvidian,P., DiPaola,R.S. A phase II trial of imatinib mesylate in patients with prostate specific antigen progression after local therapy for prostate cancer, *Prostate* 62 (2005) 115-122.
87. Rauchenwald,M., De,S.M., Fink,E., Holtl,W., Kramer,G., Marei,I.C., Neumann,H.J., Reissigl,A., Schmeller,N., Stackl,W., Hobisch,A., Krainer,M. [Chemotherapy for prostate cancer], *Wien. Klin. Wochenschr.* 120 (2008) 440-449.
88. Rini,B.I., Small,E.J. Hormone-refractory Prostate Cancer, *Curr. Treat. Options. Oncol.* 3 (2002) 437-446.

- 
89. Rofstad,E.K. Radiation biology of malignant melanoma, *Acta Radiol. Oncol.* 25 (1986) 1-10.
  90. Rohl,L. Prostatic hyperplasia and carcinoma studied with tissue culture technique, *Acta Chir Scand. Suppl* 116 (1959) 1-88.
  91. Rosenberg,J., Small,E.J. Prostate cancer update, *Curr. Opin. Oncol.* 15 (2003) 217-221.
  92. Ross,W., Rowe,T., Glisson,B., Yalowich,J., Liu,L. Role of topoisomerase II in mediating epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage, *Cancer Res.* 44 (1984) 5857-5860.
  93. Salido,M., Larran,J., Lopez,A., Vilches,J., Aparicio,J. Etoposide sensitivity of human prostatic cancer cell lines PC-3, DU 145 and LNCaP, *Histol. Histopathol.* 14 (1999) 125-134.
  94. Sartor,O., Cooper,M., Weinberger,M., Headlee,D., Thibault,A., Tompkins,A., Steinberg,S., Figg,W.D., Linehan,W.M., Myers,C.E. Surprising activity of flutamide withdrawal, when combined with aminoglutethimide, in treatment of "hormone-refractory" prostate cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994) 222-227.
  95. Schellhammer,P.F., el-Mahdi,A.M., Kuban,D.A., Wright,G.L., Jr. Prostate-specific antigen after radiation therapy. Prognosis by pretreatment level and post-treatment nadir, *Urol. Clin. North Am.* 24 (1997) 407-414.
  96. Schellhammer,P.F., Venner,P., Haas,G.P., Small,E.J., Nieh,P.T., Seabaugh,D.R., Patterson,A.L., Klein,E., Wajsman,Z., Furr,B., Chen,Y., Kolvenbag,G.J. Prostate specific antigen decreases after withdrawal of antiandrogen therapy with bicalutamide or flutamide in patients receiving combined androgen blockade, *J. Urol.* 157 (1997) 1731-1735.
  97. Scher,H.I., Kelly,W.K. Flutamide withdrawal syndrome: its impact on clinical trials in hormone-refractory prostate cancer, *J. Clin. Oncol.* 11 (1993) 1566-1572.
  98. Scher,H.I., Steineck,G., Kelly,W.K. Hormone-refractory (D3) prostate cancer: refining the concept, *Urology* 46 (1995) 142-148.
  99. Scher,H.I., Fossa,S. Prostate cancer in the era of prostate-specific antigen, *Curr. Opin. Oncol.* 7 (1995) 281-291.

100. Scher, H.I., Liebertz, C., Kelly, W.K., Mazumdar, M., Brett, C., Schwartz, L., Kolvenbag, G., Shapiro, L., Schwartz, M. Bicalutamide for advanced prostate cancer: the natural versus treated history of disease, *J. Clin. Oncol.* 15 (1997) 2928-2938.
101. Schnadig, I.D., Beer, T.M. Optimal timing of chemotherapy in androgen independent prostate cancer, *Urol. Oncol.* 27 (2009) 97-100.
102. Schrodt, G.R., Foreman, C.D. In vitro maintenance of human hyperplastic prostate tissue, *Invest Urol.* 9 (1971) 85-94.
103. Schurko, B., Oh, W.K. Docetaxel chemotherapy remains the standard of care in castration-resistant prostate cancer, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 5 (2008) 506-507.
104. Scott, S.L., Gumerlock, P.H., Beckett, L., Li, Y., Goldberg, Z. Survival and cell cycle kinetics of human prostate cancer cell lines after single- and multifraction exposures to ionizing radiation, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59 (2004) 219-227.
105. Small, E.J. Prostate cancer: who to screen, and what the results mean, *Geriatrics* 48 (1993) 28.
106. Small, E.J. Hormonal therapy for metastatic prostate cancer, *West J. Med.* 160 (1994) 253-254.
107. Small, E.J., Srinivas, S. The antiandrogen withdrawal syndrome. Experience in a large cohort of unselected patients with advanced prostate cancer, *Cancer* 76 (1995) 1428-1434.
108. Small, E.J., Baron, A., Bok, R. Simultaneous antiandrogen withdrawal and treatment with ketoconazole and hydrocortisone in patients with advanced prostate carcinoma, *Cancer* 80 (1997) 1755-1759.
109. Small, E.J. Prostate cancer, Incidence, management and outcomes, *Drugs Aging* 13 (1998) 71-81.
110. Small, E.J. Update on the diagnosis and treatment of prostate cancer, *Curr. Opin. Oncol.* 10 (1998) 244-252.
111. Small, E.J., Reese, D.M., Vogelzang, N.J. Hormone-refractory prostate cancer: an evolving standard of care, *Semin. Oncol.* 26 (1999) 61-67.

- 
112. Small,E.J., Bok,R., Reese,D.M., Sudilovsky,D., Frohlich,M. Docetaxel, estramustine, plus trastuzumab in patients with metastatic androgen-independent prostate cancer, *Semin. Oncol.* 28 (2001) 71-76.
  113. Small,E.J. Docetaxel in prostate cancer, *Anticancer Drugs* 12 Suppl 1 (2001) S17-S20.
  114. Stamey,T.A. Clinical and morphometric observations on prostate cancer, *Med. Sect. Proc.*(1988) 29-42.
  115. Stone,K.R., Mickey,D.D., Wunderli,H., Mickey,G.H., Paulson,D.F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145), *Int. J. Cancer* 21 (1978) 274-281.
  116. Stonington,O.G., Szwec,N., Webber,M. Isolation and identification of the human malignant prostatic epithelial cell in pure monolayer culture, *J. Urol.* 114 (1975) 903-908.
  117. Stonington,O.G., Szwec,N., Webber,M. Identification of cultured, human, malignant, prostatic epithelial cells, *Natl. Cancer Inst. Monogr*(1978) 31-33.
  118. Streffer,C. Biological basis for the use of hyperthermia in tumour therapy, *Strahlenther. Onkol.* 163 (1987) 416-419.
  119. Streffer,C., van,B.D. The biological basis for tumour therapy by hyperthermia and radiation, *Recent Results Cancer Res.* 104 (1987) 24-70.
  120. Sumiyoshi,Y. [Estramustine phosphate and other chemotherapeutic agents in hormone refractory prostate cancer], *Nippon Rinsho* 58 Suppl (2000) 337-339.
  121. Sumiyoshi,Y., Hashine,K., Nakatsuzi,H., Yamashita,Y., Karashima,T. Oral estramustine phosphate and oral etoposide for the treatment of hormone-refractory prostate cancer, *Int. J. Urol.* 7 (2000) 243-247.
  122. Tang,D.G., Porter,A.T. Target to apoptosis: a hopeful weapon for prostate cancer, *Prostate* 32 (1997) 284-293.
  123. Tannock,I.F., Osoba,D., Stockler,M.R., Ernst,D.S., Neville,A.J., Moore,M.J., Armitage,G.R., Wilson,J.J., Venner,P.M., Coppin,C.M., Murphy,K.C. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points, *J. Clin. Oncol.* 14 (1996) 1756-1764.

124. Tannock, I.F., de, W.R., Berry, W.R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K.N., Oudard, S., Theodore, C., James, N.D., Turesson, I., Rosenthal, M.A., Eisenberger, M.A. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1502-1512.
125. Taplin, M.E., Bubley, G.J., Shuster, T.D., Frantz, M.E., Spooner, A.E., Ogata, G.K., Keer, H.N., Balk, S.P. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1393-1398.
126. Taplin, M.E., Rajeshkumar, B., Halabi, S., Werner, C.P., Woda, B.A., Picus, J., Stadler, W., Hayes, D.F., Kantoff, P.W., Vogelzang, N.J., Small, E.J. Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663, *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 2673-2678.
127. Tolis, G., Ackman, D., Stellos, A., Mehta, A., Labrie, F., Fazekas, A.T., Comaru-Schally, A.M., Schally, A.V. Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with luteinizing hormone-releasing hormone agonists, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79 (1982) 1658-1662.
128. Tu, S.M., McConnell, K., Marin, M.C., Campbell, M.L., Fernandez, A., von Eschenbach, A.C., McDonnell, T.J. Combination adriamycin and suramin induces apoptosis in bcl-2 expressing prostate carcinoma cells, *Cancer Lett.* 93 (1995) 147-155.
129. Vaishampayan, U., Parchment, R.E., Jasti, B.R., Hussain, M. Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics, *Urology* 54 (1999) 22-29.
130. van Steenbrugge, G.J., Groen, M., van Dongen, J.W., Bolt, J., van der, K.H., Trapman, J., Hasenson, M., Horoszewicz, J. The human prostatic carcinoma cell line LNCaP and its derivatives. An overview, *Urol. Res.* 17 (1989) 71-77.
131. Verma, R.P., Hansch, C. Chemical Toxicity on HeLa Cells, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 423-448.
132. Visakorpi, T., Kallioniemi, A.H., Syvanen, A.C., Hyytinen, E.R., Karhu, R., Tammela, T., Isola, J.J., Kallioniemi, O.P. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization, *Cancer Res.* 55 (1995) 342-347.

133. Visakorpi,T., Hyytinen,E., Koivisto,P., Tanner,M., Keinanen,R., Palmberg,C., Palotie,A., Tammela,T., Isola,J., Kallioniemi,O.P. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer, *Nat. Genet.* 9 (1995) 401-406.
134. Wagenpfeil,S., Treiber,U., Lehmer, A., Isobologram analysis in MATLAB for combined effects of two agents in dose-response experiments, *Medical Data Analysis Springer Verlag* (2003) 47-54.
135. Waymont,B., Lynch,T.H., Dunn,J.A., Emtage,L.A., Arkell,D.G., Wallace,D.M., Blackledge,G.R. Phase III randomised study of zoladex versus stilboestrol in the treatment of advanced prostate cancer, *Br. J. Urol.* 69 (1992) 614-620.
136. Waymont,B., Lynch,T.H., Dunn,J., Bathers,S., Wallace,D.M. Treatment preferences of urologists in Great Britain and Ireland in the management of prostate cancer, *Br. J. Urol.* 71 (1993) 577-582.
137. Weichselbaum,R.R., Rotmensch,J., hmed-Swan,S., Beckett,M.A. Radiobiological characterization of 53 human tumor cell lines, *Int. J. Radiat. Biol.* 56 (1989) 553-560.
138. Wolff,J.M. Das hormonrefraktäre Prostatakarzinom, UNI-MED Science Verlag AG (2009) 3.Auflage
139. Yagoda,A., Petrylak,D. Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer, *Cancer* 71 (1993) 1098-1109.
140. Zanetta,G., Monico,S.L., Gabriele,A., Miceli,D., Mangioni,C. Chemotherapy with doxorubicin, etoposide and cyclophosphamide (DEC) in ovarian cancer persistent after platinum-based treatment, *Eur. J. Cancer* 32A (1996) 178-179.
141. Zhang,H., D'Arpa,P., Liu,L.F. A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons, *Cancer Cells* 2 (1990) 23-27.
142. Zhang,M., Fu,W., Prabhu,S., Moore,J.C., Ko,J., Kim,J.W., Druker,B.J., Trapp,V., Fruehauf,J., Gram,H., Fan,H.Y., Ong,S.T. Inhibition of polysome assembly enhances imatinib activity against chronic myelogenous leukemia and overcomes imatinib resistance, *Mol. Cell Biol.* 28 (2008) 6496-6509.
143. Ziada,A.M., Crawford,E.D. Advanced prostate cancer, *Prostate Cancer Prostatic. Dis.* 2 (1999) 21-26.

144. Zincke,H., Oesterling,J.E., Blute,M.L., Bergstralh,E.J., Myers,R.P., Barrett,D.M.  
Long-term (15 years) results after radical prostatectomy for clinically localized  
(stage T2c or lower) prostate cancer, J. Urol. 152 (1994) 1850-1857.



## 10. Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. R. Hartung, möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für die Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe und für seine Unterstützung der Arbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. H. van Randenborgh für seine geduldige Betreuung dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Antonie Lehmer und Ihren Mitarbeiterinnen Frau Doris Langer und Frau Stefanie Rämisch, sowie allen übrigen Mitarbeitern des Urologischen Labors der Urologischen Klinik und Poliklinik der TU München, danke ich für die immer freundliche und teils recht humorvolle Zusammenarbeit. Sie waren mir stets eine kompetente Unterstützung im Labor und auch bei der Auswertung der Ergebnisse.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Institut für Strahlentherapie am Klinikum Rechts der Isar (Direktor Prof. Dr. Molls) und seinen Mitarbeitern, die eine Bestrahlung der Zellen freundlicherweise ermöglicht haben.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die meine Ausbildung und auch diese Arbeit stets unterstützt haben. Ganz besonders meinem Mann Lois möchte ich hier danken. Er war mir, wie stets in unseren gemeinsamen Jahre, eine große Hilfe und Unterstützung.

## 11. Lebenslauf:

Name: Nadine Jutta Stadler, geb. Stark  
Geburtsdatum: 30.11.1976  
Geburtsort: Dillingen a.d. Donau

### Schulbildung

1983 – 1985 Grundschole Wittislingen  
1985 – 1987 Grundschole St. Anton, Passau  
1987 – 1996 Adalbert-Stifter-Gymnasium Passau, Allg. Hochschulreife

### Studium

11/1996 – 11/2000 Studium an der Universität Regensburg:  
Humanmedizin (Vorklinik und 1. klinisches Semester)  
21.03.2000 Ärztliche Vorprüfung

11/2000 – 11/2004 Studium an der Technischen Universität München,  
Humanmedizin (Klinik)  
21.03.2002 1. Staatsexamen  
12.09.2003 2. Staatsexamen  
11.11.2004 3. Staatsexamen

04/2003 – 07/2004 Praktisches Jahr  
1. Tertial: Chirurgie,  
Prof. Dr. Heitland, München/Bogenhausen  
2. Tertial: Diag. Radiologie,  
Prof. Dr. Rummeny, TU München.  
3. Tertial: Innere Medizin (Gastroenterologie),  
Prof. Dr. Schmid, TU München.  
Innere Medizin (Hämatologie/Onkol.),  
Prof. Dr. Peschel, TU München.

### Ärztliche Tätigkeit

03/2005 – 10/2005 Assistenzärztin am Krankenhaus Landau, Abteilung für  
Innere Medizin,  
Dr. med P. Kolbinger

02/2006 – 12/2006 Assistenzärztin am Klinikum Passau, I. Medizinische  
Klinik: Innere Medizin, Gastroenterologie,  
Infektiologie, Nephrologie, Stofwechselekrankungen,  
Ernährungsmedizin,  
Prof. Dr. med M. Wettstein

01/2007 – 12/2011      Assistenzärztin am Klinikum Deggendorf,  
I.Medizinische Klinik: Innere Medizin, Kardiologie,  
Angiologie, Pneumologie, Nephrologie  
PD Dr. med M. Giesler

Seit 01/2012            Weiterbildungsassistentärztin  
Praxis Dres. Spechter/Stadler, Allgemeinmedizin;  
Passau