

Urologische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Hartung)

**Dosis-Wirkungs-Beziehung des Tyrosinkinase-Inhibitors  
Imatinib auf drei verschiedene Prostatakarzinom-Zelllinien**

Sebastian Wutzler

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Paul  
2. Univ.-Prof. Dr. J.G. Duyster

Die Dissertation wurde am 26.09.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Klinische Aspekte des Prostatakarzinoms .....	7
1.1.1 Inzidenz und Ätiologie .....	7
1.1.2 Diagnostik und Verlaufsformen des Prostatakarzinoms .....	8
1.2 Grundlagen der Therapie maligner Erkrankungen .....	11
1.3 Grundlagen der experimentellen Tumorforschung .....	12
1.3.1 Zellkulturen .....	12
1.3.2 Interaktion biologisch wirksamer Substanzen .....	13
1.4 Ergebnisziel des experimentellen Teils .....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Verwendete Zelllinien .....	15
2.1.1 PC-3 .....	15
2.1.2 DU 145 .....	16
2.1.3 LNCaP .....	17
2.2 Materialien .....	20
2.2.1 Kulturmedien und Reagenzien .....	20
2.2.2 Arbeitsmittel .....	22
2.2.3 Verwendete Zytostatika .....	22
2.3 Handhabung und Subkultivierung der Zellen .....	24
2.3.1 Passagieren und Anzucht .....	25
2.3.2 Medienwechsel .....	25
2.3.3 Lagerung und Konservierung .....	25
2.3.4 Mykoplasmenkontrolle .....	26
2.3.5 Rezeptorbestimmung der Zelllinien .....	26

2.4	Testverfahren .....	27
2.4.1	Versuchsvorbereitung und Durchführung .....	27
2.4.2	Inkubation mit Zytostatika .....	27
2.4.3	Titerplattenphotometer-Messung .....	28
2.4.4	Statistische Auswertung und Darstellung .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Rezeptoreigenschaften der Zelllinien .....	35
3.2	Wachstumsverhalten bei Monotherapie .....	35
3.2.1	Imatinib .....	36
3.2.2	Etoposid.....	39
3.2.3	Estramustinphosphat .....	42
3.2.4	Docetaxel.....	45
3.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse bei Monotherapie .....	48
3.3	Wachstumsverhalten bei Kombinationstherapie .....	49
3.3.1	Imatinib und Etoposid .....	50
3.3.2	Imatinib und Estramustinphosphat.....	56
3.3.3	Imatinib und Docetaxel .....	62
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse bei Kombinationstherapie.....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
4.1	Beurteilung der Methoden.....	69
4.2	Wirkungsvergleich Monotherapie versus Kombinations-therapie.....	71
4.3	Ergebnisinterpretation .....	72
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>77</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersabhängige Entwicklung von Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms (BRD 2000, Fälle pro 100.000, Quelle RKI) .....	7
Abbildung 2: PC-3 Zellen bei 200facher Vergrößerung .....	15
Abbildung 3: DU 145 Zellen bei 200facher Vergrößerung .....	17
Abbildung 4: LNCaP Zellen bei 200facher Vergrößerung .....	18
Abbildung 5: Beispiel einer Dose-Response, grafische Darstellung .....	30
Abbildung 6: Beispiel eines klassischen $IC_{50}$ -Isobogramms für die Interaktion zweier Substanzen A und B bei sigmoidem Verlauf der Monosubstanz Dose-Response.....	32
Abbildung 7: PC-3 Wachstum abhängig von Imatinib .....	36
Abbildung 8: DU 145 Wachstum abhängig von Imatinib.....	37
Abbildung 9: LNCaP Wachstum abhängig von Imatinib .....	38
Abbildung 10: PC-3 Wachstum abhängig von Etoposid .....	39
Abbildung 11: DU 145 Wachstum abhängig von Etoposid.....	40
Abbildung 12: LNCaP Wachstum abhängig von Etoposid.....	41
Abbildung 13: PC-3 Wachstum abhängig von Estramustinphosphat .....	42
Abbildung 14: DU 145 Wachstum abhängig von Estramustinphosphat.....	43
Abbildung 15: LNCaP Wachstum abhängig von Estramustinphosphat .....	44
Abbildung 16: PC-3 Wachstum abhängig von Docetaxel .....	45
Abbildung 17: DU 145 Wachstum abhängig von Docetaxel.....	46
Abbildung 18: LNCaP Wachstum abhängig von Docetaxel.....	47
Abbildung 19: Isobogramm für Imatinib/Etoposid und PC-3.....	51
Abbildung 20: Isobogramm für Imatinib/Etoposid und DU 145 .....	53
Abbildung 21: Isobogramm für Imatinib/Etoposid und LNCaP.....	55
Abbildung 22: Isobogramm für Imatinib/EMP und PC-3.....	57
Abbildung 23: Isobogramm für Imatinib/EMP und DU 145 .....	59
Abbildung 24: Isobogramm für Imatinib/EMP und LNCaP.....	61
Abbildung 25: Isobogramm für Imatinib/Docetaxel und PC-3.....	63
Abbildung 26: Isobogramm für Imatinib/Docetaxel und DU 145 .....	65
Abbildung 27: Isobogramm für Imatinib/Docetaxel und LNCaP.....	67

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemische Eigenschaften von Imatinib.....	22
Tabelle 2: Chemische Eigenschaften von Etoposid .....	23
Tabelle 3: Chemische Eigenschaften von Estramustinphosphat.....	23
Tabelle 4: Chemische Eigenschaften von Docetaxel .....	24
Tabelle 5: Beispiel einer Dose-Response, tabellarische Darstellung.....	29
Tabelle 6: Beispiel der tabellarischen Darstellung einer Dose-Response der Substanz A in Abhängigkeit von B und umgekehrt .....	33
Tabelle 7: Beispiel einer tabellarischen Darstellung der Ergebnisse eines Kombinationsversuchs.....	34
Tabelle 8: Rezeptoreigenschaften der Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP.....	35
Tabelle 9: PC-3 Wachstum abhängig von Imatinib .....	36
Tabelle 10: DU 145 Wachstum abhängig von Imatinib.....	37
Tabelle 11: LNCaP Wachstum abhängig von Imatinib .....	38
Tabelle 12: PC-3 Wachstum abhängig von Etoposid.....	39
Tabelle 13: DU 145 Wachstum abhängig von Etoposid .....	40
Tabelle 14: LNCaP Wachstum abhängig von Etoposid.....	41
Tabelle 15: PC-3 Wachstum abhängig von Estramustinphosphat .....	42
Tabelle 16: DU 145 Wachstum abhängig von Estramustinphosphat.....	43
Tabelle 17: LNCaP Wachstum abhängig von Estramustinphosphat .....	44
Tabelle 18: PC-3 Wachstum abhängig von Docetaxel.....	45
Tabelle 19: DU 145 Wachstum abhängig von Docetaxel .....	46
Tabelle 20: LNCaP Wachstum abhängig von Docetaxel.....	47
Tabelle 21: Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> - und IC <sub>80</sub> -Werte .....	48
Tabelle 22: Kombinierte Dose-Response für PC-3 und Imatinib/Etoposid.....	50
Tabelle 23: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Imatinib/PC-3 .....	50
Tabelle 24: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Etoposid/PC-3 .....	51
Tabelle 25: Kombinierte Dose-Response für DU 145 und Imatinib/Etoposid .....	52
Tabelle 26: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Imatinib/DU 145 .....	52
Tabelle 27: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Etoposid/DU 145 .....	53
Tabelle 28: Kombinierte Dose-Response für LNCaP und Imatinib/Etoposid.....	54
Tabelle 29: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Imatinib/LNCaP .....	54

Tabelle 30: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Etoposid/LNCaP .....	55
Tabelle 31: Kombinierte Dose-Response für PC-3 und Imatinib/EMP .....	56
Tabelle 32: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für EMP in Abhängigkeit von Imatinib/PC-3 .....	56
Tabelle 33: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Anhängigkeit von EMP/PC-3 .....	57
Tabelle 34: Kombinierte Dose-Response für DU 145 und Imatinib/EMP .....	58
Tabelle 35: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für EMP in Abhängigkeit von Imatinib/DU 145 .....	58
Tabelle 36: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Abhängigkeit von EMP/DU 145 .....	59
Tabelle 37: Kombinierte Dose-Response für LNCaP und Imatinib/EMP .....	60
Tabelle 38: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für EMP in Abhängigkeit von Imatinib/LNCaP .....	60
Tabelle 39: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Abhängigkeit von EMP/LNCaP .....	61
Tabelle 40: Kombinierte Dose-Response für PC-3 und Imatinib/Docetaxel.....	62
Tabelle 41: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Docetaxel in Abhängigkeit von Imatinib/PC-3 .....	62
Tabelle 42: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Docetaxel/PC-3 .....	63
Tabelle 43: Kombinierte Dose-Response für DU 145 und Imatinib/Docetaxel .....	64
Tabelle 44: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Docetaxel in Abhängigkeit von Imatinib/DU 145 .....	64
Tabelle 45: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Docetaxel/DU 145 .....	65
Tabelle 46: Kombinierte Dose-Response für LNCaP und Imatinib/Docetaxel .....	66
Tabelle 47: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Docetaxel in Abhängigkeit von Imatinib/LNCaP .....	66
Tabelle 48: Relative IC <sub>50</sub> -Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Docetaxel/LNCaP .....	67
Tabelle 49: Zusammenfassung der Ergebnisse bei Kombinationstherapie.....	68

## Abkürzungsverzeichnis

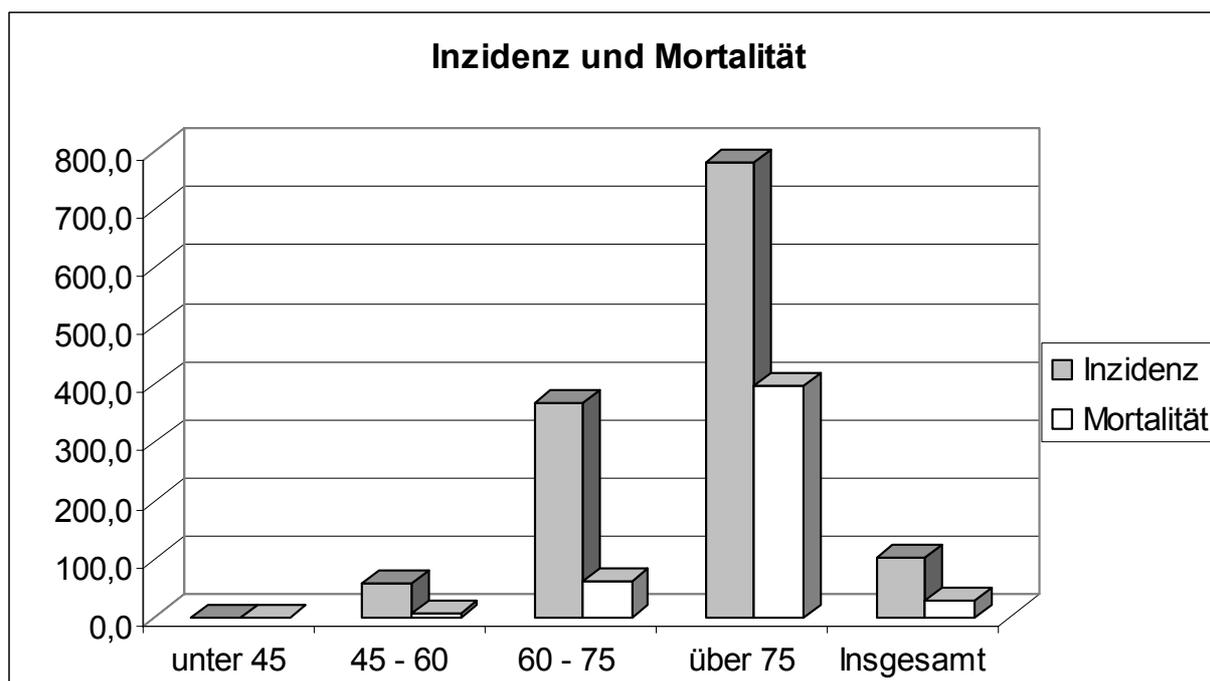
ABM:	Antibiotic Antimycotic Solution
AP:	Alkalische Phosphatase
ATCC:	American Type Culture Collection
CT:	Computertomographie
CLS:	Cell Line Service
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DRU:	Digitale rektale Untersuchung
EMP:	Estramustinphosphat
FGC:	Fast Growing Colony
FKS:	Fetales Kälberserum
GIST:	Gastrointestinaler Stromatumor
GnRH:	Gonadotropin Releasing Hormon
HRPC:	Hormonrefraktäres Prostatakarzinom
LDH:	Laktatdehydrogenase
NEAS:	Nichtessentielle Aminosäuren
PAP:	Prostata-spezifische Saure Phosphatase
PDGF:	Platelet derived Growth Factor
PMS:	Phenazine Methosulfate
PSA:	Prostata-spezifisches Antigen
RKI:	Robert-Koch-Institut
RPTK:	Receptor Protein Tyrosin Kinase

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Aspekte des Prostatakarzinoms

### 1.1.1 Inzidenz und Ätiologie

Das Prostatakarzinom ist mit Ausnahme der Hauttumoren der häufigste Tumor des Mannes und die zweithäufigste tumorassoziierte Todesursache (60). Das Robert-Koch-Institut gibt derzeit die Anzahl der neu diagnostizierten Prostatakarzinome in Deutschland mit circa 40.600/Jahr an (38). Erkrankungen treten typischerweise jenseits des 50. Lebensjahres auf (Abb. 1). Die Erkrankungsgefährdung steigt mit zunehmendem Alter und erreicht zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr ihren Gipfel bei einem mittleren Erkrankungsalter von etwa 71,4 Jahren (60). In der histologischen Betrachtung stellt sich die überwiegende Mehrheit der Prostatakarzinome als Adenokarzinom dar.



**Abbildung 1: Altersabhängige Entwicklung von Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms (BRD 2000, Fälle pro 100.000, Quelle RKI)**

Der sprunghafte Anstieg der Inzidenz des Prostatakarzinoms in den neunziger Jahren ist nicht alleine auf die Zunahme an Prostatamalignomen, sondern auch auf die Einführung spezieller Methoden in der Frühdiagnostik und das steigende Durchschnittsalter der Bevölkerung zurückzuführen. Die Mortalität hat im gleichen Zeitraum nur geringfügig zugenommen. Im Autopsiematerial von über 80-jährigen lassen sich in mehr als zwei Drittel der Fälle latente

Karzinome der Prostata nachweisen, die klinisch nicht auffällig werden. In diesem Zusammenhang ist besonders die Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) von Bedeutung, durch die eine Vielzahl der latenten Prostatakarzinome entdeckt wird, die klinisch nicht manifest werden.

Das Prostatakarzinom wird im internationalen Vergleich als typische Erkrankung des westlichen Kulturkreises betrachtet. Wesentlichen Anteil daran trägt vermutlich die hier übliche Ernährung mit einem hohen Gesamtanteil an tierischen Fetten und pflanzlichen Eiweißen bei geringem Ballaststoffgehalt. Im Gegensatz dazu weisen Osteuropa und Asien, wo die Nahrung typischerweise ballaststoffreicher ist, vergleichsweise geringe Inzidenzen auf.

Das Überleben der Patienten ist im Wesentlichen von der Ausbreitung des Tumors bei Diagnosestellung abhängig. Während das lokal begrenzte Prostatakarzinom durch radikale Prostatektomie, Radio- und Brachytherapie initial kurativ behandelt werden kann und zum Teil (T1 bis T2N0M0/G1) ein tumorspezifisches 10-Jahres-Überleben von bis zu 92 % aufweist, existiert für das metastasierte Karzinom zur Zeit kein kurativer Therapieansatz (59). In Langzeitstudien kommt es jedoch auch bei bis zu 40% der initial kurativ behandelten Patienten zu einem biochemischen Tumorrezidiv (PSA-Anstieg) (1, 75).

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist nicht vollständig geklärt. Die androgene Stimulation des Prostataepithels wird ebenso wie virale oder infektiöse Einflüsse, genetische Disposition und verschiedene Umweltfaktoren wie Ernährung oder Vita sexualis als Cofaktor diskutiert. Die Kausalität dieser Faktoren konnte jedoch noch nicht einwandfrei belegt werden. Dem hereditären Mechanismus (definiert im Auftreten des Tumors bei mindestens zwei Verwandten) wird nach dem heutigen Stand die größte Bedeutung beigemessen, liegt jedoch nur in etwa 9% der Fälle zugrunde. Sind erstgradige Verwandte betroffen, erhöht sich das Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, um das bis zu 11fache gegenüber der Normalbevölkerung (59).

### **1.1.2 Diagnostik und Verlaufsformen des Prostatakarzinoms**

In frühen Stadien ist das Prostatakarzinom weitgehend symptomlos, da die überwiegende Mehrzahl bösartiger Läsionen in den peripheren Anteilen der Prostata lokalisiert ist. Die Erfassung im symptomlosen Initialstadium ist für Therapie und Prognose entscheidend. Diagnostisch stehen hier insbesondere die digitale rektale Untersuchung (DRU) und die Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens zur Verfügung. Das Prostataspezifische Antigen ist ein organ-, jedoch nicht tumorspezifisches, von den Epithelzellen der Prostata

produziertes Glykoprotein. PSA-Werte von über 4 ng/ml gelten als Warnsignal. Mit Einführung der PSA-Bestimmung sank die Anzahl der Patienten mit Fernmetastasen bei Diagnosestellung deutlich (73). Auch die transrektale Ultraschalluntersuchung der Prostata wird im Rahmen der Früherkennung genutzt. Diverse Laboruntersuchungen (Urinstatus, Nierenparameter, AP, LDH) und bildgebende Verfahren (CT Becken/Abdomen) runden die Diagnostik ab. Bei begründetem Verdacht erfolgt die Diagnosesicherung durch eine Prostatabiopsie und histopathologische Untersuchung.

Die Metastasierung kann früh über die periprostatischen Venen in die Lendenwirbelsäule oder die Beckenknochen erfolgen. Die metastasenbedingten Knochenschmerzen imponieren häufig als erstes Symptom. In manchen Fällen kommt es zur Makrohämaturie oder Anämie.

Beim disseminierten Tumor sind lokalisierte Maßnahmen wie radikale Prostatektomie oder Radiotherapie nicht erfolgversprechend, sondern systematische Therapiemaßnahmen notwendig. Für das fortgeschrittene oder metastasierte Prostatakarzinom gilt die antiandrogene Therapie als Mittel der Wahl (45). Da das männliche Sexualhormon die Teilung und Proliferation der prostatistischen Epithelzellen bewirkt, hat ein Testosteronentzug einen antiproliferativen Effekt. Die Therapie wird heute üblicherweise in Form einer hormonellen Behandlung (GnRH-Analoga, Antiandrogene) durchgeführt. Die Serum-Testosteronspiegel können hierbei auf Kastrationsniveau gesenkt werden, so dass die alternativ zur Verfügung stehende bilaterale plastische Orchiektomie nur noch selten durchgeführt wird. Über die androgensuppressive Therapie wird die Größe hormonsensibler Malignome und Metastasen deutlich verkleinert. Prostatamalignome bestehen jedoch aus hormonsensitiven und nicht-sensitiven Anteilen, von denen letztgenannte unabhängig weiter wachsen. Es kommt durchschnittlich zwei Jahre nach Therapiebeginn zur erneuten Tumorprogression, so dass jede Hormontherapie als palliativ angesehen werden muss (60). Trotz einer hohen initialen Ansprechrate auf Androgenentzug entwickeln fast alle dieser Patienten ein hormonrefraktäres Stadium des Prostatakarzinoms (HRPC) (22). Für dieses sind die Therapieoptionen limitiert (62, 72). Als lebensverlängernde Therapie konnten lediglich zytostatische Kombinationsbehandlungen mit Docetaxel beschrieben werden, die im Vergleich mit einer Behandlungsgruppe unter Mitoxantron und Prednison einen Überlebensvorteil von etwa zweieinhalb Monaten bewirkt (50, 67). Daraus ergibt sich die dringende Notwendigkeit der Erprobung neuer Therapieformen.

Als Behandlungsansatz gilt hier die Kombination verschiedener Therapiemöglichkeiten, um die Proliferation des Tumors auf mehreren zellulären Ebenen zu inhibieren. Vor allem die

Kombination verschiedener Chemotherapeutika, eventuell mit zusätzlicher Bestrahlung, ist von Interesse. Ein objektives Ansprechen, das allgemein akzeptiert in einem PSA-Abfall über 50% des Ausgangswertes definiert wird, ist in etwa 20% der bisher erprobten Chemotherapiestudien beschrieben (60). Interessant erscheinen hier vor allem estramustinphosphat-(27, 28, 29), etoposid-(7, 53) und docetaxelhaltige Protokolle (8, 51, 58).

Die selektive Hemmung der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren gilt als vielversprechendes neues Prinzip in der Onkologie (24). Die Receptor Protein Tyrosin Kinase-Familie (RPTK) stellt die größte Gruppe der Rezeptoren von Wachstumsfaktoren dar. Durch Ligandenbindung am Rezeptor wird eine zytoplasmatische Tyrosinkinase-Domäne autophosphoryliert, was in einer Signaltransduktionskaskade mit Effekt auf Zellproliferation und Zellüberleben resultiert (71). In Knochenmetastasen von Patienten mit HRPC ist der Platelet derived Growth Factor Rezeptor (PDGF-R- $\alpha$ ) der meistexprimierte PTK-R (6). In intraepithelialen Neoplasien und Adenokarzinomen der Prostata werden sowohl PDGF-R- $\alpha$  wie 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 einen PDGF-Rezeptor-Expression aufweisen (37). Bei verschiedenen weiteren soliden Tumoren wurde die PDGF-Rezeptor-Expression nachgewiesen und zum Gegenstand der Erforschung antineoplastischer Therapien gemacht (19).

Der selektive Inhibitor Imatinib (frühere Bezeichnung STI571) entfaltet seine Wirkung über einen kompetitiven Mechanismus unter anderem beim PDGF-R. Aber auch die Tyrosinkinaseaktivität von c-Kit und Bcr-Abl Rezeptoren fallen unter das Wirkungsspektrum (4, 13). Bei Philadelphia-Chromosom positiven chronisch myeloischen Leukämien zeigt dieser Wirkstoff in klinischen Studien bei Dosen von 400 mg/d ein gutes Ansprechen mit tolerierbaren Nebenwirkungen wie Übelkeit, Müdigkeit, Durchfall, Ödemen, Muskelkrämpfen oder Hautreizungen (11).

Das gute Ansprechen von chronisch myeloischen Leukämiezellen auf Tyrosinkinase-Inhibitoren sowohl in vitro, als auch in klinischen Studien lässt diese Therapieform für solide Tumorformen als interessant erscheinen (18). Auch bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) mit Produktion einer aktivierten c-Kit-Mutation zeigt Imatinib in vitro eine Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion (43). In klinischen GIST-Studien wird von einem Ansprechen in etwa 60% der Fälle und einem Progressionsarrest von über 80% berichtet. Die schnelle Linderung der Symptome unterstreicht die hohe Wirksamkeit dieser neuen Therapieform (55).

Die in vitro Erprobung der Kombinationstherapie von Imatinib mit anderen etablierten Zytostatika stellt einen vielversprechenden Schritt bei der Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten des HRPC dar.

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

Das Ziel der Behandlung maligner Erkrankungen ist die Beseitigung einer größtmöglichen Zahl von Tumorzellen. Im Idealfall wird der Tumor komplett entfernt. Grundsätzlich kommen bei der Therapie neben operativen Verfahren vor allem Chemo- und Radiotherapie zum Einsatz. Bei hormonsensitiven Tumoren können auch hormonelle Behandlungen indiziert sein. Dabei kommt je nach Art und Lokalisation des Tumors auch eine kombinierte Behandlung in Frage, zum Beispiel im Falle der adjuvanten Chemotherapie nach operativer Entfernung eines Tumors.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Einsatz antineoplastischer Agenzien. Bei der Behandlung sind einige Grundsätze zu beachten:

- Die allermeisten Zytostatika agieren phasenspezifisch. Die schnell proliferierenden Tumorzellen befinden sich aber in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Nur ein bestimmter Anteil der Zellen bildet die Wachstumsfraktion. Da sich die Zellen nicht synchron teilen, ist zum Zeitpunkt der Applikation immer nur ein Teil des Tumors sensibel. Daher ist das Applikationsintervall von zentraler Bedeutung. Alternativ kann eine zytostatische Therapie als Stoßtherapie mit einmaliger, hochdosierter Applikation hoher Toxizität oder als intermittierende Chemotherapie durchgeführt werden. Bei der intermittierenden Therapie mit weniger hohen Einzeldosen werden zwischen den Applikationen therapiefreie Intervalle zur Erholung der mitgeschädigten Organsysteme eingelegt. Bei beiden Therapieformen sind die Nebenwirkungen auf das gesunde Gewebe der limitierende Faktor.
- Der Effekt von Zytostatika folgt einer Kinetik erster Ordnung. Eine Einzeldosis reduziert die Zellzahl um einen konstanten Prozentsatz der absoluten Zellzahl. Die Wirksamkeit einer Chemotherapie wird somit auch durch die Zellzahl zu Therapiebeginn bestimmt. Eine klinische Vollremission ist nicht gleichbedeutend mit der kompletten Entfernung des malignen Gewebes, sondern einem Absinken der Zellzahl unter die Nachweisgrenze von etwa  $10^8$ – $10^9$  Zellen. Neben einer initialen Induktionstherapie ist daher eine Stabilisationstherapie nötig.

Die Kombination von chirurgischer oder strahlungsinduzierter mit zytostatikainduzierter Reduktion der Tumormasse ist das Prinzip der *adjuvanten* und *neoadjuvanten* Chemotherapie. Bei der adjuvanten und neoadjuvanten Therapie wird nach beziehungsweise vor einer potentiell kurativen Maßnahme zusätzlich auf Zytostatika zurückgegriffen, um den Tumor präoperativ oder vor einer Bestrahlung zu verkleinern oder eventuell vorhandene Mikrometastasen nach der Primärtherapie zu vernichten.

Der Prozentsatz getöteter Zellen ist direkt abhängig von der Dosis des verabreichten Zytostatikums. Da die Dosis im klinischen Gebrauch durch die Nebenwirkungen limitiert wird, empfiehlt sich die Kombination verschiedener Substanzen mit verschiedenen Angriffsorten im Zellzyklus, um eine größtmögliche Zahl an Tumorzellen zu eliminieren.

## **1.3 Grundlagen der experimentellen Tumorforschung**

### **1.3.1 Zellkulturen**

Schon Ende des 19. Jahrhunderts begannen die ersten Experimente auf dem Gebiet der Gewebekulturtechnik. Roux versuchte 1885, embryonale Hühnerzellen in einer Salzlösung *in vitro* lebend zu erhalten. 1913 führte Carrel die ersten Langzeitexperimente mit Zellkulturen durch. Diese ursprünglichen Versuche beruhten auf der Kultur kleiner Gewebepartikel oder Explanate und legten die ersten Grundlagen der Forschung an Zellkulturen.

In den fünfziger Jahren wurde erstmals versucht, systematisch normales und tumoröses Gewebe von Primaten als dissoziierte Zellkulturen zu züchten (31). Gey et al. führten 1952 die später unter dem Namen HeLa bekannte kontinuierliche Zelllinie aus humanen Cervixkarzinomen ein.

Die ersten Zelllinien waren jedoch nur über kurze Zeit kultivierbar und oftmals durch Fibroblasten überwuchert. 1959 beschrieb Rohl das Wachstum von Prostatagewebe *in vitro*, konnte aber keine einheitliche Zelllinie isolieren (57). Schrodt et al. berichteten in den Jahren von 1961 bis 1971 über Kultivierungszeiträume von bis zu mehreren Monaten (61). Die von Fraley 1970 isolierte Zelllinie MA 160 war ebenso wie die von Okada et al. isolierte Zelllinie EB 33 in ihrer Morphologie sehr heterogen und eignete sich nicht als Tumormodell (15, 46).

Mit der Verbesserung der Techniken und Kulturmedien folgte die Isolierung, Charakterisierung und Konservierung von normalem und entartetem Gewebe. Die für die vorliegenden Versuche verwendeten Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP wurden zwischen 1978 und 1980 isoliert und in der Forschung etabliert (25, 32, 64).

Die Verwendung von definierten Zellkulturen ist heute in der medizinischen und biologischen Forschung Routine. Im Gegensatz zur Gewebekultur und Organkultur, die durch das Einbringen von kleinen Gewebeteilchen in ein Kulturmedium charakterisiert sind, werden bei Zellkulturen durch enzymatische Reaktionen Zellen aus einem Verband gelöst und in einer Suspension auf Kulturplatten eingesät. Diese Kulturen werden als Primärkulturen bezeichnet und können lange Zeit wiederholt passagiert werden. Nach einer bestimmten Anzahl von Passagen sinkt die Proliferationsrate, und die Zellen sterben ab.

Durch Transformation entstandene, etablierte Zelllinien wachsen dagegen *in vitro* unbegrenzt und eignen sich zur Anzucht unter definierten Bedingungen. Der Nahrungsbedarf ähnelt dem der primären Kulturen, im Wachstumsverhalten fehlt aber gewöhnlich die räumliche Orientierung. Die durch Zellkulturen gewonnenen Ergebnisse lassen sich, wenn auch zum Teil bedingt, auf die Situation im lebenden Organismus übertragen. Der große Vorteil bei der Verwendung von Zellkulturen liegt in der Homogenität des Materials, das leicht gehandhabt und manipuliert werden kann.

### **1.3.2 Interaktion biologisch wirksamer Substanzen**

Die Interaktion biologisch wirksamer Substanzen und die daraus resultierenden möglichen therapeutischen Vorteile sind besonders bei der Bekämpfung von Infektionen und malignen Erkrankungen von Bedeutung. So weist zum Beispiel die akute lymphatische Leukämie im Kindesalter bei der Behandlung mit Einzelsubstanzen eine Remissionsrate von 40-50% auf, wohingegen die Kombinationstherapie mit drei Substanzen Werte von 94-95% erzielt (3). Durch die Verwendung von Kombinationen können die Einzeldosen der Substanzen gesenkt werden, wodurch auch die Toxizität sinkt. Außerdem stellt sich die Frage nach der Existenz zusätzlicher Effekte zwischen den Substanzen.

Generell ist es möglich, bei Interaktionen biologischer Substanzen zwischen Synergismus und Antagonismus zu unterscheiden. Bei hinreichend untersuchten Substanzen, deren Einzelwirkung in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis bekannt ist, kann eine Gleichung zur erwarteten Kombinationslösung aufgestellt werden. Entsprechen die Ergebnisse eines Kombinationsversuches der Gleichung, existiert keine biologisch relevante Interaktion zwischen den Substanzen (3). Weicht das Ergebnis vom Erwartungsergebnis ab, so ist es möglich, über ein empirisches Modell eine Aussage über Synergismus bzw. Antagonismus der betreffenden Substanzen zu postulieren. In der experimentellen Tumorforschung hat sich das Modell der empirischen Auswertung über Isobologramme etabliert (21).

## 1.4 Ergebnisziel des experimentellen Teils

Die limitierten Therapieoptionen des HRPC unterstreichen die Bedeutung der experimentellen Analyse neuer chemotherapeutischer Ansätze bei der Behandlung. Immunohistochemische Analysen epithelialer und stromaler Prostatakarzinomzellen weisen auf eine Expression von PDGF-Rezeptoren dieser Zellen hin. Die Inhibition der Rezeptoren scheint ein attraktives neues therapeutisches Konzept bei der Behandlung zu sein. Verschiedene Inhibitoren befinden sich bereits im Rahmen von Phase-II Studien in klinischer Erprobung. Die Resultate bei der Verwendung von Monosubstanzen demonstrieren eine eingeschränkte Wirksamkeit bei Patienten mit PSA-Progression nach lokaler Therapie (20, 54). Die Suche nach geeigneten Kombinationspartnern zur Wirkungsverstärkung ist Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Der Effekt des selektiven Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib auf die Zellproliferation verschiedener, in der Tumorforschung etablierter Zelllinien von Prostatagewebe soll geprüft werden. Hier sind nicht nur die Wirkungen der Einzelsubstanzen, sondern vor allem die Effekte in Kombination mit anderen Zytostatika von Bedeutung. Die Versuche sollen an Monolayerkulturen der drei Zelllinien LNCaP, PC-3 und DU 145 unter definierten, stets reproduzierbaren Bedingungen durchgeführt werden. Die Auswertung erfolgt jeweils durch den Vergleich mit einer unbehandelten Zellkultur. Dabei wird die Proliferationsbestimmung über den XTT-Test durchgeführt, der Enzyme des Zellstoffwechsels nutzt, und dessen Produkt über eine Absorptionsmessung im Titerplattenphotometer quantifiziert werden kann.

In einem ersten Schritt sollen die Dose-Response Kurven der Monolayerkulturen bei ansteigender Zytostatikakonzentration von Imatinib, Etoposid, Estramustinphosphat (EMP) und Docetaxel und definierter Inkubationsdauer bestimmt werden. Alle letztgenannten Substanzen bewirken in klinischen Studien alleine oder in Kombination einen signifikanten Abfall des PSA-Wertes (60). Die so ermittelten  $IC_{50}$ - und  $IC_{80}$ -Werte, bei denen die Zellproliferation auf 50 % beziehungsweise 20 % der unbehandelten Vergleichsgruppe absinkt, dienen zur Bestimmung der idealen Wirkungskonzentration und werden für die Isobologramm-Kurven der Kombinationsversuche weiterverwendet. Das Hauptziel der Experimente besteht darin, bei der Kombination von Imatinib mit Etoposid, Estramustinphosphat und Docetaxel über die Isobologramm-Methode Rückschlüsse auf synergistische oder antagonistische Effekte der einzelnen Kombinationen zu schließen. Bei entsprechenden Ergebnissen können so Empfehlungen für zukünftige klinische Studien gegeben werden.

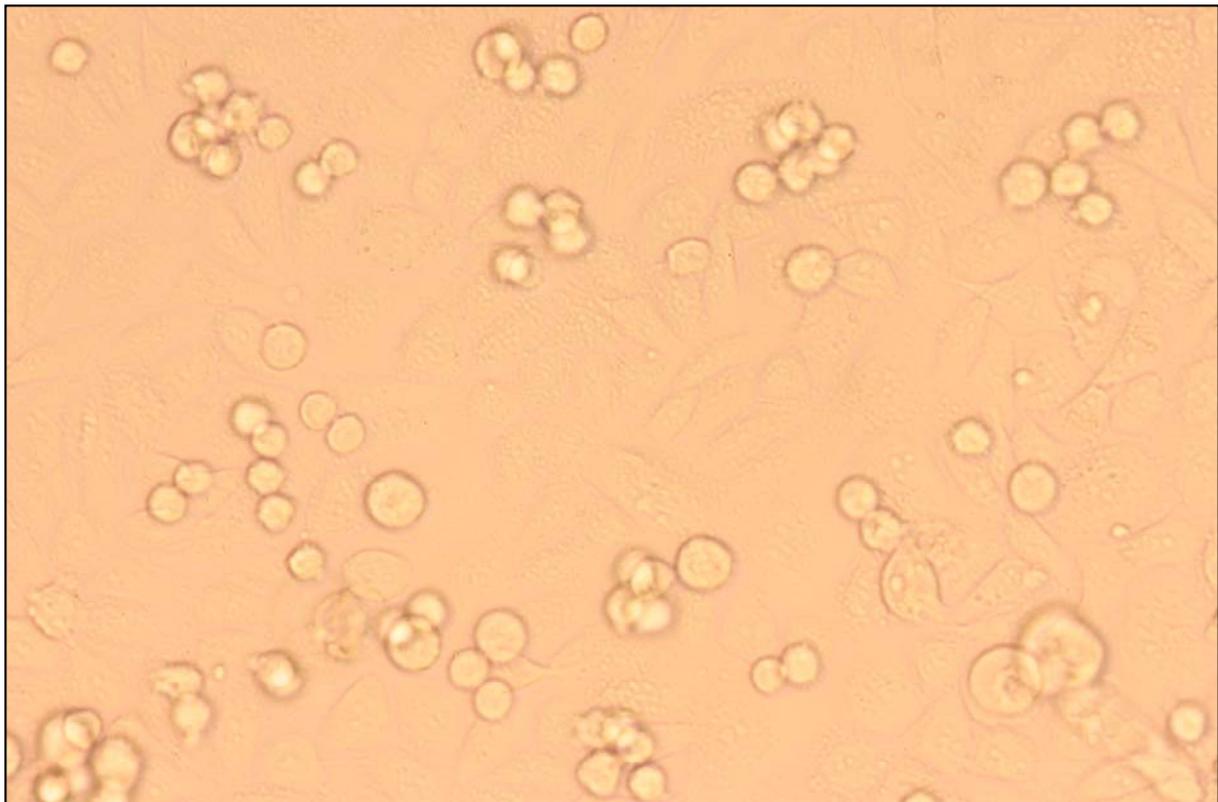
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Zelllinien

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

#### 2.1.1 PC-3

Das Ursprungsgewebe dieser Zelllinie stammt aus einer Knochenmetastase im Bereich der Lendenwirbelsäule eines 62-jährigen Patienten mit einem schlecht differenzierten Adenokarzinom der Prostata. Die Isolierung und Etablierung erfolgte 1979 durch Kaighn et al. Die Morphologie ist vergleichbar mit der epithelialen Gewebes. PC-3 Zellen bilden traubenförmige Cluster und zeigen in Nährlösung, flüssigem Medium und in der Nacktmaus positive Wachstumseigenschaften.



**Abbildung 2: PC-3 Zellen bei 200facher Vergrößerung**

Bei Passage 8 eines Zellklones betrug die durchschnittliche Verdopplungszeit unter Verwendung von PFMR-1-Wachstumsmedium mit 7% fetalem Kälberserum circa 33 h (32).

Diese vergleichbaren Wachstumsverhältnisse konnten bei über 300 Verdopplungszeiten nachgewiesen werden (30).

Eine hormonelle Abhängigkeit der Wachstumseigenschaften von PC-3 Zellen konnte nicht nachgewiesen werden. Die Zelllinie zeigt eine geringe Enzymaktivität der Prostataspezifischen Sauren Phosphatase (PAP).

Bei der Analyse des Chromosomensatzes zeigt sich ein vollständig aneuploider Karyotyp mit Chromosomenzahlen zwischen 55 und 62 (Analyse bei Passage 5, 8, 17, 30 und 50). Während zwischen 10 und 20 spezifische Markerchromosome identifiziert werden konnten, fehlen Y-Chromosom, Chromosom 5 und 15 (32).

In der elektronenmikroskopischen Betrachtung fallen neben oberflächlichen Mikrovilli gelappte Zellkerne, hypertrophierte Nucleoli und abnorme Mitochondrien auf.

Die PC-3 Zellen (ATCC CRL-1435) für die durchgeführten Experimente wurden aus dem käuflich erworbenen Bestand des Forschungslabors der Urologischen Klinik genommen.

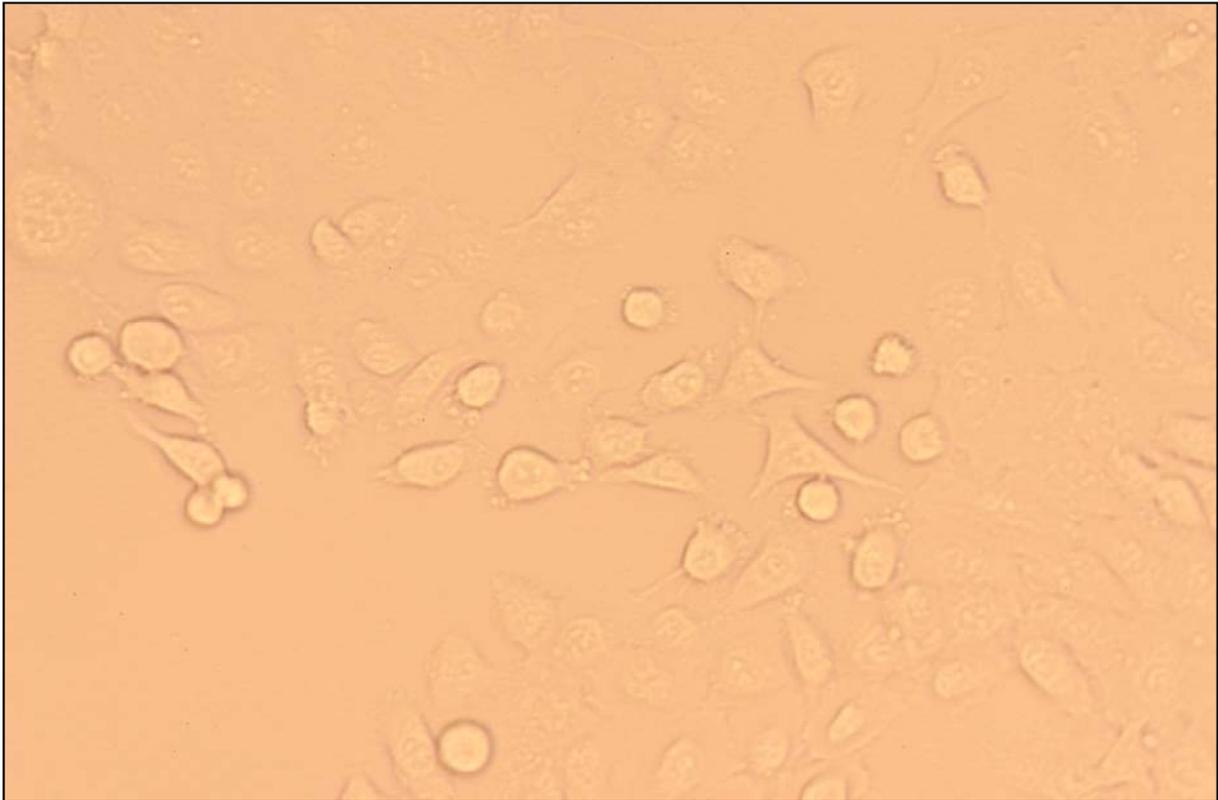
### **2.1.2 DU 145**

1978 isolierten Stone et al. die Zelllinie DU 145 aus einer Hirnmetastase eines 69-jährigen Prostatakarzinom-Patienten. Das histologische Bild zeigt ein undifferenziertes Adenokarzinom der Prostata mit epithelähnlicher Morphologie (64).

Ein optimales Wachstum zeigt sich bei DU 145 Zellen in Nähragar, Flüssigmedium und in der Nacktmaus. Unter Normalbedingungen sind regelgerechte, vergleichbare Wachstumsbedingungen bei bis über 90 Passagen vorhanden. Bei Passage 39 betrug die Verdopplungszeit etwa 34 Stunden bei optimalen Wachstumsbedingungen mit 20% fetalem Kälberserum (30).

Es konnte keinerlei Hormonsensitivität oder Hormonabhängigkeit für diese Zelllinie nachgewiesen werden. Die Reaktion von DU 145 Zellen für Saure Phosphatase ist schwach positiv (65).

Bei der Analyse des Chromosomensatzes zeigte sich ein hypotriploider Chromosomensatz mit einem Mittel von 64 Chromosomen (Passage 57) und einem Gesamtbereich von 46 bis 143 Chromosomen (Analyse bei Passage 14, 57 und 90). Für DU 145 Zellen existieren drei lange, akrozentrische Chromosomen sowie ein metazentrisches Chromosom, das auch als minute-marker bezeichnet wird. Das Y-Chromosom weist eine Translokation am langen Arm auf.



**Abbildung 3: DU 145 Zellen bei 200facher Vergrößerung**

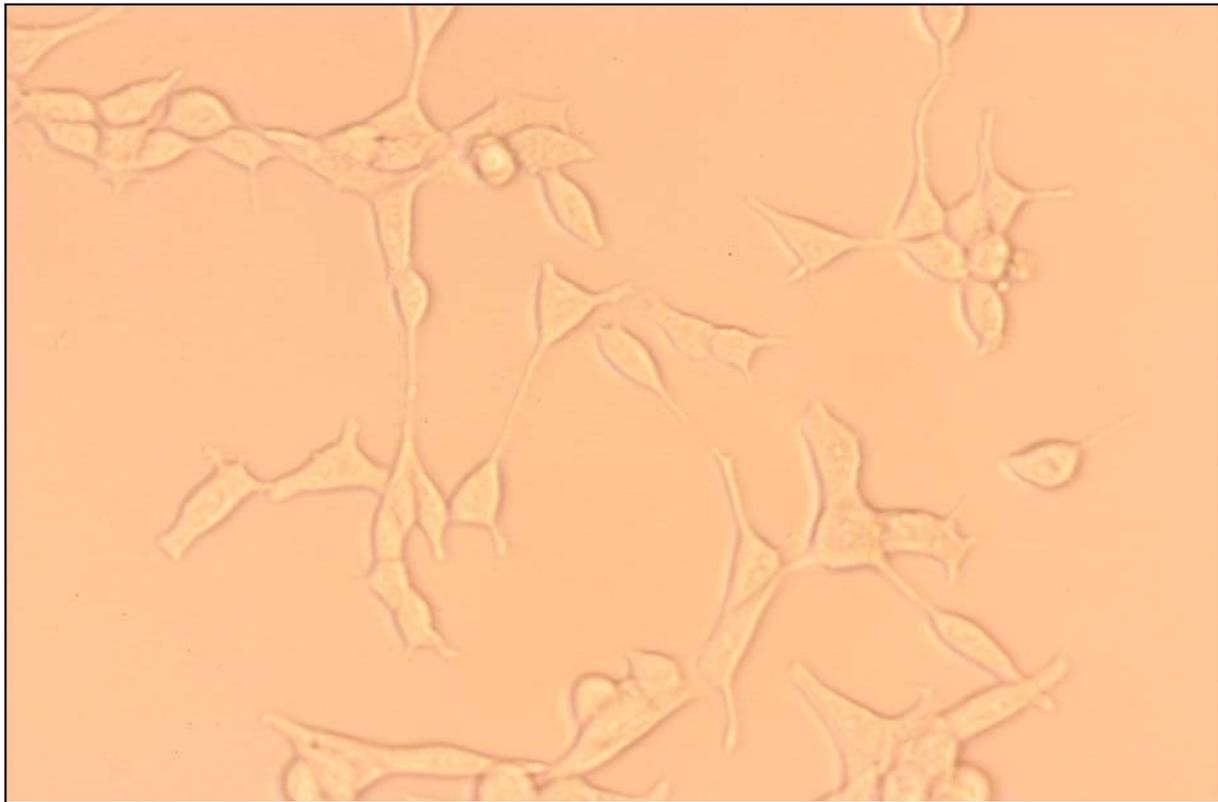
In der elektronenmikroskopischen Betrachtung zeigt sich die Ultrastruktur des Zelltyps sehr irregulär. Neben vielen Mikrovilli auf und zwischen den Zellen sind Desmosomen, Tonofilamente und leicht aufgetriebene Mitochondrien erkennbar. Die vorhandenen Ribosomen kommen vor allem frei im Zytoplasma vor und sind wenig strukturgebend. Es fällt ein gut entwickelter Golgiapparat auf, zusätzlich lassen sich neben Vakuolen und Fettkörperchen elektronendichte Einschlusskörperchen erkennen.

Die DU 145 Zellen (ATCC HTB-81) für die durchgeführten Experimente wurden aus dem käuflich erworbenen Bestand des Forschungslabors der Urologischen Klinik genommen.

### **2.1.3 LNCaP**

Die Zelllinie LNCaP stammt aus einer links supraclaviculär gelegenen Lymphknotenmetastase eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms der Prostata. Die Tumorzellen wurden 1977 mittels Nadelbiopsie eines 50-jährigen Patienten isoliert und 1980 erstmalig von Horoszewicz et al. beschrieben. Beim Spender war zuvor durch Feinnadelbiopsie der Prostata und retroperitonealer Lymphknotenexploration ein D<sub>1</sub>-Stadium eines Prostatakarzinoms nach Flocks diagnostiziert worden (25).

Obwohl die Zellen gute Wachstumseigenschaften sowohl *in vitro* als auch im Tierversuch zeigen, fällt das geringe Anhaftungspotential der Zellen am Boden der Plastikkulturflasche auf. Die Verdopplungszeit in RPMI 1640-Medium mit fetalem Kälberserum beträgt durchschnittlich etwa 72 Stunden. Das Optimum der Konzentration an fetalem Kälberserum liegt zwischen 2,5 und 15%. Bei höheren Konzentrationen innerhalb dieses Bereichs steigt die Wachstumsrate (25).



**Abbildung 4: LNCaP Zellen bei 200facher Vergrößerung**

Spezifische Rezeptoren lassen sich bei den Zellen sowohl für Androgene als auch für Östrogene nachweisen. Während die Androgenrezeptoren im Zellkern und Zytosol zu finden sind, sind die Östrogenrezeptoren nahezu ausschließlich im Zytosol lokalisiert. LNCaP Zellen produzieren kontinuierlich Prostataspezifische saure Phosphatase und das Prostataspezifische Antigen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Nacktmaus) (25).

Bei der Analyse des Chromosomensatzes zeigte sich ein plumper, aneuploider männlicher Karyotyp mit einer Chromosomenzahl zwischen 33 und 91 bei 46 ausgezählten Metaphasen (Analyse nach 12 beziehungsweise 32 Monaten, in etwa entsprechend Passage 100 bzw. 300). Für LNCaP Zellen existieren verschiedene persistente Markerchromosomen sowie weitere Chromosomenabnormalitäten mit geringerer Frequenz (26).

Verschiedene Subkulturen von LNCaP treten in Abhängigkeit von Selektionsbedingungen, Kulturdauer und Androgenkonzentration auf. Von den ursprünglichen Zellen haben sich so zwei große Hauptgruppen abgesondert. Man unterscheidet eine Androgen-abhängige und eine unabhängige Subkultur. Die Differenzierung zwischen hormonabhängiger und hormonunabhängiger Untergruppe ist mit Hilfe sekundärer Markerchromosomen möglich (36). Die Fast Growing Colony (FGC) trägt vorwiegend die Eigenschaften der ursprünglichen Zellkultur (69).

Die LNCaP Zellen (ATCC CRL-1740, FGC-Clone) für die durchgeführten Experimente wurden aus dem käuflich erworbenen Bestand des Forschungslabors der Urologischen Klinik genommen.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Kulturmedien und Reagenzien

Für Proliferation und Differenzierung im Allgemeinen und gleichermaßen für die spezifischen Zellfunktionen benötigen Zellen *in vitro* eine geeignete Umgebung. An das Fließgleichgewicht des Stoffwechsels angepasst müssen essentielle, nicht synthetisierbare Substanzen zugeführt und Stoffwechselabbauprodukte entfernt oder über einen gewissen Zeitraum abgepuffert werden. Zum Schutz vor Kontaminationen werden außerdem Antibiotika zugesetzt.

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

#### **Wachstumsmedium zur Anzucht:**

- 500 ml RPMI 1640 Medium (mit 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub>; 0,532 g/l stabiles Glutamin; 0,5 ml 0,5%ige Phenolrotlösung), Kat. Nr. FG1215 (Biochrom AG, Berlin)
- 50 ml FKS (Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert bei 56° C für 20 min), Kat. Nr. 50115 (Biochrom AG, Berlin)
- 5 ml NEAS (Nichtessentielle Aminosäuren), Kat. Nr. K0293 (Biochrom AG, Berlin)
- 5 ml ABM (Antibiotic Antimycotic Solution), Kat. Nr. A5955 (Sigma Steinheim, Deutschland)

Dem Medium für die Experimente wurden 25 ml FKS je 500 ml RPMI 1640 zugefügt. Auf den Zusatz von ABM wurde bei den Experimenten verzichtet, um die Ergebnisse nicht durch Interaktionen zwischen Tumorzellen und Antibiotika zu verfälschen.

Bei der Zelllinie PC-3 wurden bei Anzucht und Experimenten zusätzlich jeweils 5 ml einer 100 mM Natriumpyruvat-Lösung (Kat. Nr. L0473, Biochrom AG Berlin) je 500 ml RPMI 1640 hinzugefügt.

Zur Verdünnung und Herstellung der Zytostatika-Stammlösungen wurde Dimethylsulfoxid (DMSO, Kat. Nr. 1.02931.1000, Firma Merck Darmstadt) verwendet.

Beim Passagieren wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,2-7,4 (hergestellt aus: 8 g NaCl; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g KCL und 1 l Aqua dest.) verwendet. Zum Ablösung der Zellen wurde eine Trypsinlösung (Trypsin/EDTA-Lösung 0,05%/0,02% in PBS gelöst, Kat. Nr. L2142, Biochrom AG, Berlin) verwendet.

Bei der Titerplattenphotometer-Messung wurde eine Lösung aus Tetrazoliumsalz (XTT) und Phenazine Methosulfate (PMS) verwendet:

- XTT (Methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl-2H-tetrazolium-5-carboxanilide-innersalt) aufgelöst in RPMI 1640 Medium; Endkonzentration 1 mg/ml
- PMS (Phenazine Methosulfate, Best. Nr. P-5812, Sigma Chemicals Co St. Louis, USA), 0,383 mg/ml

Das XTT-Reagens für die Messungen bestand aus 100 µl PMS, gelöst in 5 ml XTT.

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

## 2.2.2 Arbeitsmittel

Das Zellwachstum ist unter anderem abhängig vom jeweilig verwendeten Gefäß. Die spezifischen Kultureigenschaften der Zellen sind deshalb wichtig für die Auswahl der Kulturtechnik. Um Kontaminationen aufgrund von Rückständen, Reinigungen oder Ähnlichem zu verhindern, wurden ausschließlich Einmalmaterialien aus Hartplastik oder Glas verwendet.

Zur Anzucht der Zellen wurden Kulturflaschen aus Plastik der Firma Greiner verwendet (50ml/25cm<sup>2</sup>, Best. Nr. 690175).

Die Kultivierung der Zellen in den Kulturflaschen und Gewebekulturplatten erfolgte in einem Begasungsbrutschrank der Firma Heraeus, Typ B5061 EC/CO<sub>2</sub>. Bei 37° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% wird hier 5% CO<sub>2</sub> zugemischt. Durch die hohe Luftfeuchtigkeit wird das Verdampfen des Mediums verhindert, während die CO<sub>2</sub>-Zumischung zusammen mit dem Hydrogencarbonat-Puffersystem des Mediums der Erhaltung des pH-Wertes dient.

## 2.2.3 Verwendete Zytostatika

### Imatinib

Imatinib gehört zur Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren und wirkt über die Blockade der Tyrosinkinaseaktivität von PDGF, Bcr-Abl und c-Kit Rezeptoren.

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

Die einzelnen Versuchskonzentrationen wurden durch Verdünnungsreihen mit RPMI 1640 vor den jeweiligen Tests vorbereitet und auf Zimmertemperatur erwärmt.

<b>Imatinib / STI 571</b>	
<b>Chemische Bezeichnung</b>	Imatinib-Mesylat
<b>Summenformel</b>	C <sub>3</sub> OH <sub>35</sub> N <sub>7</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Molmasse</b>	589,72

Tabelle 1: Chemische Eigenschaften von Imatinib

## Etoposid

Etoposid gehört zur Gruppe der Podophyllinderivate und wirkt über eine Hemmung der Topoisomerase II und die daraus resultierenden DNA-Doppelstrangbrüche. Es kommt zu einem Mitosearrest zellzyklusspezifisch in der G<sub>2</sub>-, S- und M-Phase.

Etoposid für die Versuche wurde von der Firma Sigma bezogen (Kat. Nr. E1383). Es wurde eine Stammlösung von 50 mM in DMSO hergestellt und bei minus 20° C aufbewahrt.

Die einzelnen Versuchskonzentrationen wurden durch Verdünnungsreihen mit RPMI 1640 Medium vor den jeweiligen Tests vorbereitet und auf Zimmertemperatur erwärmt.

<b>Etoposid</b>	
<b>Chemische Bezeichnung</b>	4'-Desmethylepipodophyllotoxin 9-4,6-O-ethylidene-β-D-glucopyranoside
<b>Summenformel</b>	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub>
<b>Molmasse</b>	588,6

**Tabelle 2: Chemische Eigenschaften von Etoposid**

## Estramustinphosphat (EMP)

Estramustinphosphat bewirkt eine Depolymerisation der zytoplasmatischen Mikrotubuli und Mikrofilamente. Die Bindung erfolgt an Proteine, die an die Mikrotubuli assoziiert sind.

Estramustinphosphat für die Versuche wurde freundlicherweise von der Firma Pharmacia & Upjohn in Form der unter dem Handelsnamen Estracyt 3 bekannten Substanz zur Verfügung gestellt. Es wurde eine Stammlösung von 2 mM in DMSO hergestellt und bei minus 20° C aufbewahrt.

Die einzelnen Versuchskonzentrationen wurden durch Verdünnungsreihen mit RPMI 1640 Medium vor den jeweiligen Tests vorbereitet und auf Zimmertemperatur erwärmt.

<b>Estramustinphosphat</b>	
<b>Chemische Bezeichnung</b>	Estracyt 3
<b>Summenformel</b>	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
<b>Molmasse</b>	440,41

**Tabelle 3: Chemische Eigenschaften von Estramustinphosphat**

## Docetaxel

Docetaxel gehört zur Gruppe der Taxane, die antimikrotubulär wirken. Es kommt zu einer vermehrten Bildung und Stabilisierung funktionsgestörter Mikrotubuli aus Tubulin-Dimeren. Durch den stabilisierenden Effekt wird die normale, dynamische Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes gestört, was in einer Zerstörung des Spindelapparates mit nachfolgendem Zelltod endet.

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

Die einzelnen Versuchskonzentrationen wurden durch Verdünnungsreihen mit RPMI 1640 Medium vor den jeweiligen Tests vorbereitet und auf Zimmertemperatur erwärmt.

<b>Docetaxel</b>	
<b>Chemische Bezeichnung</b>	Taxotere
<b>Summenformel</b>	$C_{43}H_{53}NO_{14} / 3 H_2O$
<b>Molmasse</b>	807,9

Tabelle 4: Chemische Eigenschaften von Docetaxel

## 2.3 Handhabung und Subkultivierung der Zellen

Bei der Kultivierung muss die Art der verwendeten Zellen bezüglich der Herkunft definiert werden.

Direktabkömmlinge von Organen oder Geweben eines Spenderorganismus werden per Definition als primäre Zelllinien bezeichnet. Diese werden bis zur ersten Subkultur Primärkulturen genannt und gehen dann in Zelllinien über. Eine bestehende Zelllinie muss nach der Primärkultur noch mindestens 70 Passagen zulassen.

Die Verwendung einer Reinluftaerobikbank mit vertikalem Luftstrom (Lamin Air HB 2448 der Firma Heraeus) soll ebenso wie eine an die Anforderungen der Sterilität angepasste Arbeitstechnik die optimale Arbeit mit den Zelllinien garantieren. Darunter fallen auch die Reinigung der Arbeitsfläche vor und nach der Benutzung mit Ethanol (70%), die Verwendung von sterilem Einmalgerät und das Abflammen der verschiedenen Öffnungen, Verschlüsse und Pipettenspitzen.

### **2.3.1 Passagieren und Anzucht**

Für die Experimente wurden eingefrorene und wiederaufgetaute oder in Kulturflaschen übernommene Subkulturen verwendet. Die Passagenzahl lag für alle Versuche im Bereich zwischen 40 und 70. Die Proliferationsrate sinkt bei Erreichen einer gewissen Zelldichte, wodurch die Kulturen absterben können. Die Kulturen werden aus diesem Grund vor Erreichen der Maximaldichte durch Passagieren verdünnt.

Bei der praktizierten Methode wird das Medium unter sterilen Bedingungen in der Reinluftsaugwerkbank mittels Pasteurpipette abgesaugt, und die Zellen werden mit 5 ml einer PBS-Lösung versetzt, um die Kulturflasche von Rückständen zu reinigen. PBS-Lösung und Rückstände werden abgesaugt, die adhärenen Zellen verbleiben in der Kulturflasche. Durch Behandlung mit 2 ml einer Trypsinlösung und Inkubation im Brutschrank bei 37° C für einige Minuten werden die Zellen abgelöst. Die Ablösung wird unter dem Durchlichtmikroskop (Zeiss Axiovert 135) kontrolliert. Bei erfolgter Ablösung wird zur Trypsinlösung 5 ml frischen Mediums zur Neutralisation einpipettiert. Die Zellsuspension wird 5 min bei 400g zentrifugiert (Rotina 48, Typ 4360, Firma Hettich, Tuttlingen) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wird in 10 ml Medium aufgeschwemmt und nach Anfärbung mit Trypanblaulösung und Auszählung in der Neugebauer-Zählkammer unter dem Durchlichtmikroskop in definierter Konzentration in neue Kulturflaschen mit circa 5 ml Medium übertragen. Die Kulturflaschen werden im Brutschrank gelagert.

### **2.3.2 Medienwechsel**

Um Vitalität und Wachstum der Zellen zu fördern, ist es nötig, in regelmäßigen Abständen das Medium unter sterilen Bedingungen auszuwechseln. Die Intervalle sind hier abhängig von Wachstumsgeschwindigkeit und Metabolisierungsrate der jeweiligen Zelllinie.

Das Medium in den Anzuchtgefäßen wurde nach vorheriger mikroskopischer Inspektion auf mögliche Infektionen oder Kontaminationen alle 72 h gewechselt. Das alte Medium wurde in der Reinluftbank mittels Pasteurpipette abgesaugt, ohne jedoch die adhärenente Zellkultur zu berühren. Eine äquivalente Menge frischen Mediums wurde im Anschluss am Rand des Testgefäßes einpipettiert.

### **2.3.3 Lagerung und Konservierung**

Um einen Vorrat an Zellmaterial zu halten, wurden Zellen in flüssigem Stickstoff bei minus 196 °C kryokonserviert. Dies soll der Variabilität der Zellen durch Subkultivierung

entgegenwirken. Zur Prävention von Kälteschäden wurde DMSO verwendet. Bei diesem Verfahren werden nach dem Passagieren  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml einer Lösung aus 4 ml FKS, 1 ml DMSO und 0,8 ml RPMI 1640 Medium gelöst und zunächst für 24 h bei minus 80 °C aufbewahrt, um eine langsame Temperaturadaptation zu ermöglichen. Im Anschluss wird die Suspension der Temperatur von minus 196 °C im flüssigen Stickstoff ausgesetzt.

### **2.3.4 Mykoplasmenkontrolle**

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen mit einem Mykoplasmen Detection Kit (Best. Nr. 1296744, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) auf Kontaminationen mit Mykoplasmen getestet. Alle im Zeitraum der Versuche durchgeführten Tests waren negativ.

### **2.3.5 Rezeptorbestimmung der Zelllinien**

Die Rezeptorbestimmung der drei Zelllinien hinsichtlich c-Kit (CD117) wurde freundlicherweise vom pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar (TU München) durchgeführt.

Die Rezeptorbestimmung hinsichtlich PDGF-R- $\alpha$  und PDGF-R- $\beta$  wurde mittels Antikörper (Maus IgG<sub>1</sub> der Firma R&D Systems, Wiesbaden, Katalog Nr. MAB1264 für PDGF-R- $\alpha$  und MAB1263 für PDGF-R- $\beta$ ) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden definierte Zellzahlen mit analogen Zahlenwerten zu den Versuchen in einer 96-Well Flachboden Gewebekulturplatte ausgesät. Nach 72-96 h werden die Zellen mit einer PBS-Lösung versetzt, die abgesaugt wird. Anschließend werden die Zellen mit Methanol (Firma Merck Darmstadt, Kat. Nr. 1.06009.1000) für 10 min bei 4°C inkubiert und fixiert. Danach wird erneut mit einer PBS-Lösung gespült und 50  $\mu$ l einer AK-Verdünnung in Antibody Diluent (Firma DAKO, Glostrup/Dänemark, Kat. Nr. S2022) hinzugefügt, die 12 h bei 4°C im Well verbleibt. Anschließend erfolgt eine zweimalige Spülung mit PBS-Lösung für jeweils 5 min. Die Zellen werden nun für 30 min mit einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Firma Merck, Darmstadt, Kat. Nr. 1.07209.1000) inkubiert und erneut zweimalig für 5 min mit PBS-Lösung gespült. Die nachfolgende Anfärbung der Zellen wird mit dem Peroxidase Detection Kit (Firma DAKO, Glostrup/Dänemark, Kat. Nr. K5001) durchgeführt, so dass sich rezeptorpositive Zellen braun färben. Unter dem Durchlichtmikroskop wird der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen ausgezählt.

## 2.4 Testverfahren

### 2.4.1 Versuchsvorbereitung und Durchführung

Bereits vor Versuchsbeginn wurden alle nötigen Materialien bereitgestellt und gegebenenfalls erwärmt, um den reibungslosen Ablauf des Experiments zu gewährleisten.

Nach vorherigem Abgleich der Wachstumskurven unbehandelter Zellen erstreckten sich die Versuche jeweils über 144 h. Die Aussaat der Zellen in den Gewebekulturplatten wurde als Stunde 0 festgesetzt, die zytotoxische Zugabe erfolgte nach 24 h und die Messung nach weiteren 120 h.

Für die Versuchsdurchführung wurden 96-Well Flachboden-Gewebekulturplatten der Firma Greiner (Best. Nr. 655180) verwendet. Je nach Versuchsart (Monosubstanz, Kombinationsversuche) muss eine genügend große Anzahl an Zellen zur Verfügung stehen.

Pro Well wurde in Abhängigkeit von der Zelllinie eine definierte Zellzahl in je 200 µl Medium ausgesät:

- PC-3                      3000 Zellen / Well
- DU 145                    1000 Zellen / Well
- LNCaP                    6000 Zellen / Well

Bei jeder Gewebekulturplatte wurde eine Anzahl Wells alleine mit 200 µl Medium ohne Zellen gefüllt, um bei der Titerplattenphotometer-Messung den sogenannten Blank-Wert zu ermitteln.

### 2.4.2 Inkubation mit Zytostatika

Die zu testenden Zellen wurden in Gewebekulturplatten ausgesät und nach 24 h behandelt. Die jeweiligen Zytostatika wurden mit Medium soweit vorverdünnt, dass die Zugabe von 10 beziehungsweise 5 µl dieser Verdünnung die gewünschte Konzentration im Well ergibt. Das Zytostatikum wurde für die restliche Versuchszeit im Well belassen.

### 2.4.3 Titerplattenphotometer-Messung

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde mittels Titerplattenphotometer im XTT-Assay gemessen. Diese Art der Quantifizierung der Zellproliferation wurde von Roehm et al. beschrieben (56). Den einzelnen Wells der Gewebekulturplatten wird hierbei das wasserlösliche XTT (ein Tetrazoliumsalz) in Kombination mit dem Elektronenkoppler PMS zugefügt. Durch die Reduktion im Zellstoffwechsel entsteht ein ebenfalls wasserlösliches, gefärbtes Formazanprodukt. Über das Titerplattenphotometer (THERMOmax Microplate Reader, Molecular Devices, Ismaning) kann diese Farbveränderung direkt durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer zweiten Referenzmessung bei einer Wellenlänge von 650 nm quantifiziert werden. Der Blank-Control wird aus dem Mittelwert der Wells gebildet, die zwar Medium und XTT/PMS-Lösung, aber keine Zellen enthalten, und von den Absorptionswerten subtrahiert. Der Vergleich der Absorptionswerte von Wells mit unterschiedlich hoher Zytostatikakonzentration ermöglicht die Bestimmung des Einflusses auf den Zellstoffwechsel. Je höher die Absorption, desto größer die Proliferationsrate.

Bei allen vorliegenden Ergebnissen wurde jedes Well mit 50  $\mu$ l der XTT/PMS-Lösung inkubiert.

## 2.4.4 Statistische Auswertung und Darstellung

### 2.4.4.1 Dose-Response Kurven

Die Darstellung der Zellproliferation in Abhängigkeit von der applizierten Dosis einer Einzelsubstanz erfolgt durch Dose-Response Kurven (Abb. 5). Bei dieser Darstellungsweise wird die X-Achse nach der Konzentration der Substanz und die Y-Achse nach dem prozentualen Anteil weiterhin proliferierender Zellen (Cell survival rate, anteilig im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollpopulation) skaliert. Typischerweise sind diese Kurven sigmoid mit einem steilen Abfall der Zellproliferation im optimalen Wirkungsbereich der Substanz. Über diese Diagramme ist es möglich den IC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>80</sub>-Wert (Proliferationshemmung bei 50 % bzw. 80 % der Zellen) zu ermitteln, der für die späteren Kombinationsversuche benötigt wird. Voraussetzung für die Erstellung von Dose-Response-Kurven ist die Proliferationsmessung der Tumorzellen nach Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen der Zytostatika. Die Ergebnisse lassen sich zusätzlich in tabellarischer Form darstellen, um eine Zuordnung der Werte zu ermöglichen (Tabelle 5):

Substanz A/ $\mu$ M	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,0	100,0	27,4	11,4	111,4	88,6	8
0,1	99,0	18,0	9,4	108,4	89,6	8
0,5	95,0	18,4	12,8	107,8	82,2	8
1,0	92,0	22,0	9,4	101,4	82,6	8
5,0	83,7	14,2	12,4	96,1	71,3	8
10,0	71,3	18,0	7,7	79,0	63,6	8
12,5	63,5	14,9	6,4	69,9	57,1	8
15,0	43,1	12,0	12,3	55,4	30,8	8
17,5	39,5	15,4	5,0	44,5	34,5	8
20,0	17,1	5,5	4,4	21,5	13,7	8
25,0	8,9	1,8	1,4	10,3	7,5	8
50,0	2,0	1,0	0,4	2,4	1,6	8

Tabelle 5: Beispiel einer Dose-Response, tabellarische Darstellung

#### Legende:

% Überleben: 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

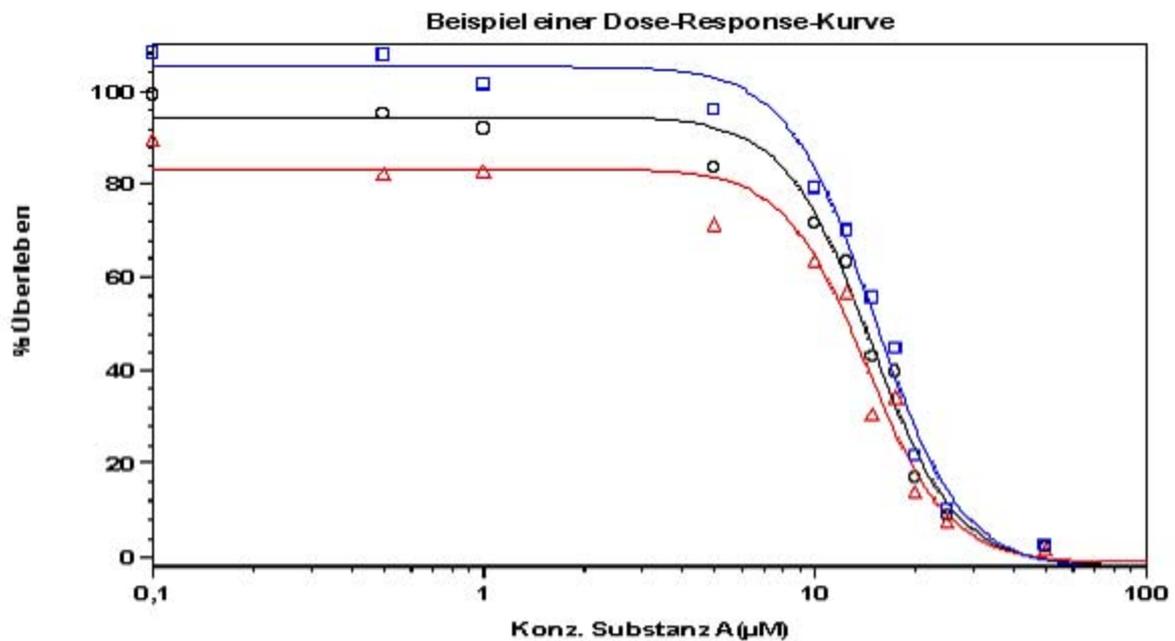


Abbildung 5: Beispiel einer Dose-Response, grafische Darstellung

**Legende:**

Schwarz (○): Dose-Response-Kurve der Substanz A

Blau (□): Obergrenze des 95%-Konfidenzintervall

Rot (△): Untergrenze des 95%-Konfidenzintervall

Die Dose-Response Kurven der eigenen Versuche wurde durch das Programm SOFTmaxPRO, Version 3.0 (Molecular Devices, Ismaning) für Macintosh berechnet. Im Beispiel läge der IC<sub>50</sub>-Wert bei 14,1 µM (95%-Konfidenzintervall: 12,7-15,4 µM) und der IC<sub>80</sub>-Wert bei 21,1 µM (95%-Konfidenzintervall 19,6-22,6 µM).

Zur besseren Übersicht wurde auf die graphische Darstellung der Ober- und Untergrenze des 95%-Konfidenzintervalls im Ergebnisteil verzichtet. Die Zahlenwerte lassen sich in den entsprechenden Tabellen ansehen.

#### 2.4.4.2 Isobologramme

Bei der Auswertung synergistischer Mechanismen zweier Substanzen stellt sich die Frage nach der geeigneten Darstellung. Diese muss eine klare und reproduzierbare Definition des Begriffs Synergismus beinhalten.

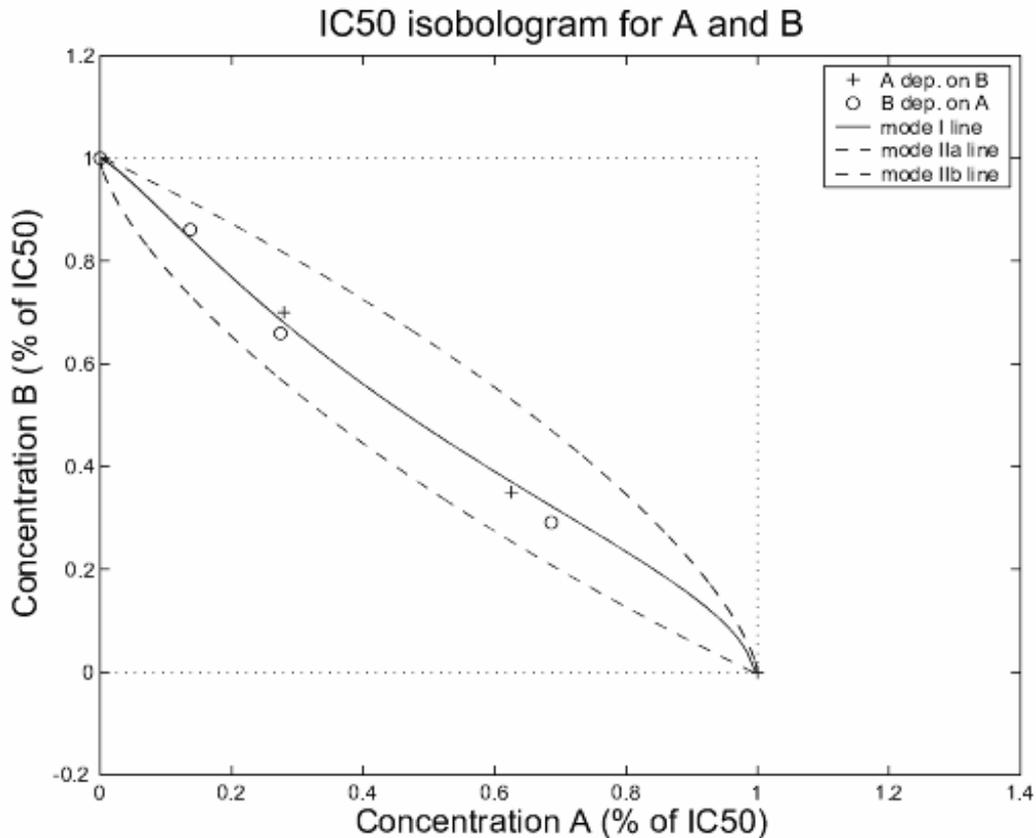
Nach Berenbaum et al. stellt man graphisch in sogenannten Isobogrammen eine empirische Dose-Response Kurve dar, die keiner Interaktion entspricht. Auf der X- und Y-Achse ist der relative Anteil von Substanz A und B einer bekannten Wirkung, z.B. der Konzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Zellproliferation bewirkt ( $IC_{50}$ ), eingezeichnet. Während die Verwendung des  $IC_{80}$ -Wertes unter dem klinischen Aspekt der Vernichtung eines größtmöglichen Anteils an neoplastischem Gewebe von Bedeutung ist, ist der Verwendung des  $IC_{50}$ -Wertes unter dem Gesichtspunkt der generellen Beurteilung der Interaktion völlig ausreichend. Die Bestimmung des  $IC_{90}$ -Wertes ist mit dem Titerplattenphotometer nicht mit ausreichender Reproduzierbarkeit möglich (33).

Der volle Effekt einer 50%igen Hemmung wird bei beiden Substanzen durch die Applikation der  $IC_{50}$ -Konzentration erreicht. Diese Konzentration wird auf X- und Y-Achse mit 1 gleichgesetzt. Bei Verwendung von 0,8 der  $IC_{50}$ -Konzentration einer Substanz bedeutet jeder Verbrauch über 0,2 der  $IC_{50}$ -Konzentration der anderen Substanz Antagonismus, während der Verbrauch von weniger als 0,2 Synergismus ausdrückt. Wird eine 50%ige Proliferationshemmung genau durch das Verhältnis 0,8/0,2 erreicht, besteht keine signifikante biologische Interaktion zwischen den Substanzen.

Die ursprüngliche Beschreibung dieser zweidimensionalen Isobologramme stammt von Steel und Peckham (63) und wurde schon von Kano et al. für die Analyse antineoplastischer Agenzien in Zellkulturen verwendet (34, 35). Voraussetzung für die Erstellung der Isobologramme ist die Ermittlung der kompletten Dose-Response-Kurven der Einzelsubstanzen.

Die Dose-Response-Kurven zytotoxischer Einzelsubstanzen sind in der Regel sigmoid. Die Isobologramme werden hier durch die sogenannten Mode-II Kurven modifiziert, die den als Envelope of additivity bezeichneten Bereich umschreiben.

Für die isobolographische Auswertung der eigenen Versuche wurde eine MATLAB-basierte Software verwendet, die von Wagenpfeil et al. entwickelt wurde (70).



**Abbildung 6: Beispiel eines klassischen  $IC_{50}$ -Isobogramms für die Interaktion zweier Substanzen A und B bei sigmoidem Verlauf der Monosubstanz Dose-Response**

Bei der isobolographischen Auswertung werden diejenigen Datenpunkte als additiv bezeichnet, die innerhalb des mit den entsprechenden Mode-I und Mode-II Linien gekennzeichneten Bereich (Envelope of additivity) liegen. Datenpunkte, die links unterhalb des Envelope of additivity liegen, drücken Synergismus aus, während Datenpunkte, die rechts oberhalb liegen, auf antagonistische Mechanismen hinweisen. Die Datenpunkte ermitteln sich aus den relativen Werten der jeweils benötigten Konzentration für eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation bei den Kombinationsversuchen im Verhältnis zum  $IC_{50}$ -Wert der Monosubstanz-Dose-Response.

Die Resultate können tabellarisch und graphisch dargestellt werden. Grundlage sind die Dose-Response Kurven der Monosubstanzen. In tabellarischer Form werden die einzelnen Dose-Response-Werte für das prozentuale Überleben der Substanz A ohne und mit einer steigenden Konzentration der Substanz B aufgelistet (Tab. 6).

A [ $\mu\text{M}$ ]	B [ $\mu\text{M}$ ]								
	0	0,01	0,1	0,5	1	2	3	5	100
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
0,0	100,0	95,8	90,6	82,8	76,2	46,6	31,3	11,7	0,3
0,1	103,3	97,5	95,1	89,3	74,7	45,2	32,1	11,7	0,4
0,5	106,9	92,2	89,9	80,5	72,2	42,1	32,1	12,7	0,6
5,0	78,0	69,3	71,4	59,7	47,1	36,1	27,5	15,9	0,5
7,5	73,6	58,3	63,6	55,7	45,3	32,9	27,0	18,2	0,4
10,0	58,1	43,9	55,6	49,4	39,1	32,3	25,9	16,9	0,4
15,0	37,5	28,8	38,2	33,7	30,7	23,8	22,2	19,6	0,4
20,0	30,9	21,1	26,1	25,5	27,7	18,0	20,4	14,5	0,4
30,0	5,6	5,0	5,9	3,7	4,4	2,8	2,4	1,5	0,4
50,0	0,6	0,4	0,6	1,1	0,8	0,5	0,4	0,7	0,1

**Tabelle 6: Beispiel der tabellarischen Darstellung einer Dose-Response der Substanz A in Abhängigkeit von B und umgekehrt**

Je nach Konzentration an Substanz B sinkt das prozentuale Überleben bei gleichen Konzentrationen von A. Praktisch bedeutet dies, dass verschiedene Dose-Response-Kurven der Substanz A in Abhängigkeit der applizierten Dosis an Substanz B und umgekehrt erstellt werden.

Die Mode-I und Mode-II Kurven, die den Bereich umschreiben, innerhalb dessen die Datenpunkte als additiv bezeichnet werden können, errechnen sich aus den Dose-Response-Kurven der nicht-kombinierten Experimente, also den Werten für A in ansteigender Konzentration plus 0  $\mu\text{M}$  B und B in ansteigender Konzentration plus 0  $\mu\text{M}$  A. Hier können Datenpunkte nahe der Mode-I Linie als heteroadditiv (unterschiedlicher Mechanismus) und Datenpunkte nahe der Mode-II Linie als isoadditiv interpretiert werden. Die Skalierung erfolgt nicht in absoluten, sondern in relativen Werten, wobei die  $\text{IC}_{50}$ -Konzentration gleich 1 gesetzt wird.

Die Datenpunkte, die den Envelope of additivity begrenzen, lassen sich auch in tabellarischer Form darstellen (Tab. 7). Hier wird für jede Konzentration von A ein prädiktives Minimum und Maximum für den benötigten Wert von B errechnet, die in einer 50%ige Hemmung der Zellproliferation resultiert (entsprechend den Mode-II Linien im Isobologramm). Wenn die Mode-I Linie außerhalb der beiden Mode-II Linien liegt, werden die Zahlenwerte der Mode-I Linie als prädiktives Maximum oder Minimum verwendet. Liegt der ermittelte Wert in diesem Bereich, wird die Kombination als additiv betrachtet. Ist der Wert kleiner als der prädiktive Bereich, gilt die Kombination als synergistisch, ist er größer, gilt die Kombination als antagonistisch. Die Kombinationen wurden nur bei signifikanten Werten ( $p < 0,05$ ) als

synergistisch oder antagonistisch klassifiziert. Bei nicht signifikanten Werten wurden die Kombinationen als additiv bis synergistisch oder additiv bis antagonistisch klassifiziert. Für die praktische Auswertung sind daher Ober- und Untergrenze des 95%-Konfidenzintervalls angegeben. Auch bei der tabellarischen Darstellung werden alle Werte in relativen Zahlenwerten zum  $IC_{50}$ -Wert der Monosubstanz-Dose-Response angegeben.

Anteil $IC_{50}$ A	Anteil $IC_{50}$ B	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,907	1,155	1,000	1,000
<b>0,003</b>	<b>0,978</b>	0,897	1,103	0,910	0,972
<b>0,006</b>	<b>1,115</b>	1,018	1,260	0,883	0,972
<b>0,028</b>	<b>1,020</b>	0,928	1,203	0,780	0,967
<b>0,056</b>	<b>1,050</b>	0,955	1,224	0,711	0,955
<b>0,278</b>	<b>1,058</b>	0,907	1,373	0,456	0,842
<b>0,556</b>	<b>0,967</b>	0,781	1,350	0,271	0,676
<b>0,696</b>	<b>0,911</b>	0,777	1,084	0,196	0,589
<b>0,835</b>	<b>0,798</b>	0,673	0,923	0,119	0,482

**Tabelle 7: Beispiel einer tabellarischen Darstellung der Ergebnisse eines Kombinationsversuchs**

Die Wertepaare A 0,0 / B 1,0 und B 0,0 / A 1,0 sind keine Datenpunkte im eigentlichen Sinne, da sie aus den Monosubstanz-Dose-Response-Kurven beider Substanzen stammen und den absoluten  $IC_{50}$ -Wert (entsprechend dem relativen 1,0-Wert) definieren.

Für die zusammenfassende Endauswertung wurden alle Datenpunkte eines Kombinationsversuchs und alle entsprechenden prädiktiven Minima und Maxima gemittelt und tabellarisch am Ende des Ergebnisteils aufgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rezeptoreigenschaften der Zelllinien

Alle drei Zelllinien wurden immunzytochemisch mittels Antikörper auf ihre Rezeptoreigenschaften hinsichtlich PDGF-R- $\alpha$ , PDGF-R- $\beta$  und c-Kit (CD117) Rezeptoren getestet (Tabelle 8).

Zelllinie	PDGF-R- $\alpha$	PDGF-R- $\beta$	c-Kit (CD117)
PC-3	+++	+++	0
DU 145	+++	+++	0
LNCaP	++	+++	0

**Tabelle 8: Rezeptoreigenschaften der Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP**

0: keine Reaktion (<10%)

+: schwach positiv (10-25%)

++: positiv (25-75%)

+++: stark positiv (>75%)

### 3.2 Wachstumsverhalten bei Monotherapie

Das Wachstumsverhalten bei Monotherapie wurde durch das XTT-Assay bestimmt. Aus Vorversuchen ist bekannt, dass alle drei Zellreihen nur für eine gewisse Zeitspanne ein lineares Wachstum zeigen. Aus diesem Grund wurden die Zellen nach Aussaat 24 h ohne Manipulation im Well belassen und dann die Substanzen in steigender Konzentration appliziert. Nach weiteren 120 h wurde die Proliferationsmessung durchgeführt, so dass sich die zytotoxische Wirkung innerhalb des linearen Wachstumsbereichs entfaltete, und die Ergebnisse nicht durch das natürliche Absterben der Zellen bei Erreichen einer gewissen Populationsdichte verfälscht wurden.

Für jeden Versuchsansatz wurden pro Konzentration 4-8 Wells gemessen. Die Ergebnisse stammen aus jeweils mindestens zwei unabhängigen Versuchsreihen. Datenpunkte (n) unter 8 resultieren aus dem Ansetzen bestimmter Konzentrationen in nur einer Versuchsreihe. Die Auswertung erfolgte durch das Programm Softmax Pro über den Vergleich der Extinktion

behandelter und unbehandelter Zellen. Tabellarisch ist der Anteil überlebender Zellen in % dargestellt. Der Extinktionswert der unbehandelten Zellen wird hier gleich 100% gesetzt. Aus den Dose-Response-Kurven errechnen sich die IC<sub>50</sub>- und IC<sub>80</sub>-Werte.

### 3.2.1 Imatinib

PC-3: Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,1 bis 60 µM Imatinib inkubiert.

Imatinib/µM	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,0	100,0	27,4	11,4	111,4	88,6	22
0,1	107,6	18,0	9,4	117,1	98,2	14
0,5	112,1	18,4	12,8	124,8	99,3	8
1,0	100,6	22,0	9,4	110,0	91,2	21
5,0	83,7	14,2	12,4	96,1	71,3	5
10,0	71,3	18,0	7,7	79,0	63,6	21
12,5	63,5	14,9	6,4	69,9	57,2	21
15,0	39,5	12,0	5,0	44,5	34,5	22
17,5	43,1	15,4	12,3	55,4	30,8	6
20,0	17,1	5,5	4,4	21,6	12,7	6
25,0	8,9	1,8	1,4	10,3	7,5	6
30,0	8,8	5,7	2,8	11,6	6,0	16
45,0	3,4	0,6	0,4	3,8	3,0	8
50,0	7,0	4,0	2,2	9,2	4,8	13
60,0	2,8	0,8	0,5	3,3	2,3	8

Tabelle 9: PC-3 Wachstum abhängig von Imatinib

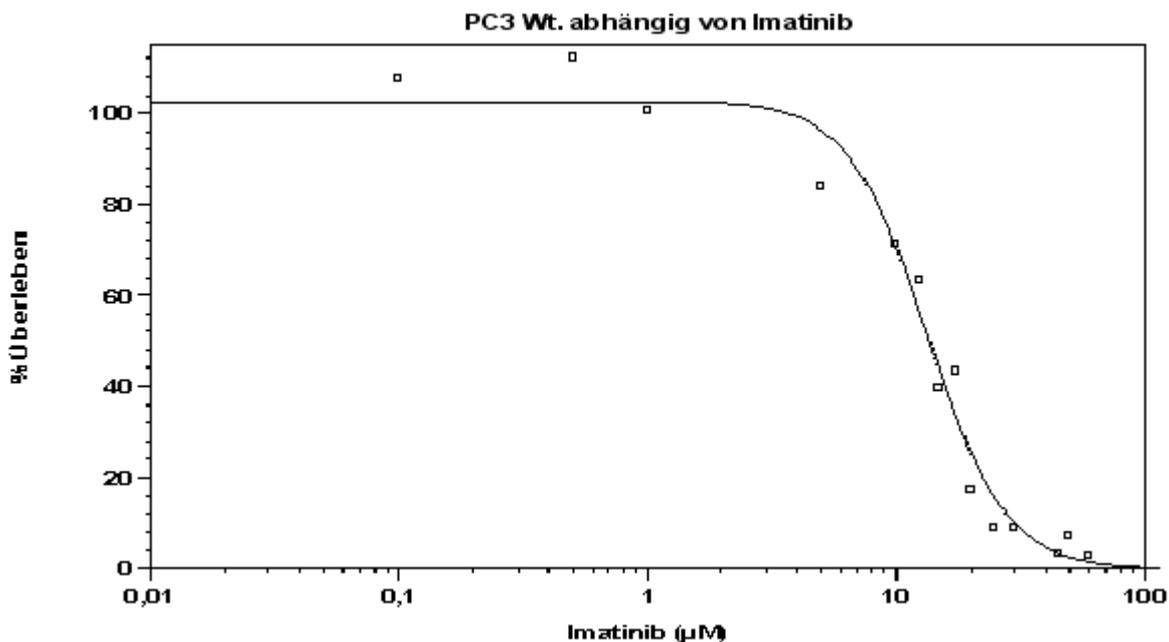


Abbildung 7: PC-3 Wachstum abhängig von Imatinib

Bei PC-3 Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 5 und 15 µM bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 13,8 µM und einem IC<sub>80</sub>-Wert von 22,4 µM.

**DU 145:** Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,1 bis 60  $\mu\text{M}$  Imatinib inkubiert.

Imatinib/ $\mu\text{M}$	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,0	100,0	28,0	11,7	111,7	88,3	22
0,1	68,5	4,5	3,9	72,4	64,6	5
1,0	100,7	27,0	14,7	115,4	86,0	13
5,0	97,5	32,1	19,9	117,4	77,6	10
10,0	87,6	26,3	11,8	99,4	75,7	19
12,5	36,9	2,5	2,0	38,9	34,9	6
15,0	60,7	28,7	12,0	72,7	48,7	22
17,5	17,0	2,4	2,1	19,1	14,8	5
20,0	21,7	12,1	6,4	28,1	15,4	14
25,0	7,4	1,9	1,5	8,9	5,9	6
30,0	3,2	1,1	0,8	4,0	2,5	7
40,0	3,1	1,0	0,7	3,8	2,4	8
45,0	1,0	0,2	0,2	1,2	0,9	5
50,0	1,7	0,8	0,6	2,4	1,1	6
60,0	0,6	0,3	0,2	0,8	0,4	12

Tabelle 10: DU 145 Wachstum abhängig von Imatinib

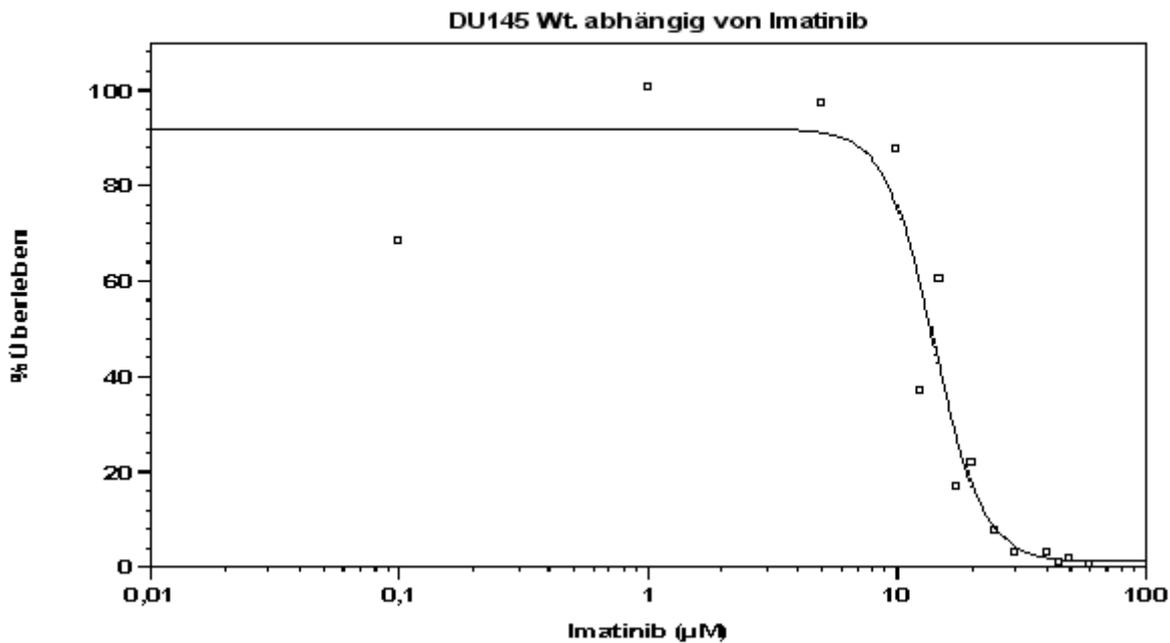


Abbildung 8: DU 145 Wachstum abhängig von Imatinib

Bei DU 145 Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 10 und 20  $\mu\text{M}$  bei einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 13,7  $\mu\text{M}$  und einem  $\text{IC}_{80}$ -Wert von 19,2  $\mu\text{M}$ .

**LNCaP:** Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,001 bis 75  $\mu\text{M}$  Imatinib inkubiert.

Imatinib/ $\mu\text{M}$	MV-%FCS	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,000	100,0	34,0	14,2	114,2	85,8	22
0,001	87,9	14,4	14,1	102,0	73,8	4
0,010	95,1	31,2	30,5	125,7	64,6	4
0,100	87,4	22,4	13,9	101,3	73,5	10
0,500	72,1	7,2	7,1	79,2	65,0	4
1,000	114,6	33,8	18,3	132,9	96,2	13
5,000	62,2	7,5	6,6	68,8	55,7	5
10,000	72,3	41,9	19,4	91,7	53,0	18
12,500	54,7	34,8	18,2	73,0	36,5	14
15,000	50,8	33,3	17,5	68,2	33,3	14
17,500	28,2	11,4	6,0	34,2	22,2	14
20,000	30,2	24,1	12,6	42,9	17,6	14
22,500	37,4	7,7	5,3	42,7	32,1	8
25,000	16,7	17,3	8,0	24,7	8,7	18
30,000	3,0	1,1	0,8	3,8	2,2	8
50,000	0,6	1,2	0,8	1,4	-0,3	8
75,000	1,9	1,6	2,2	4,1	-0,3	2

Tabelle 11: LNCaP Wachstum abhängig von Imatinib

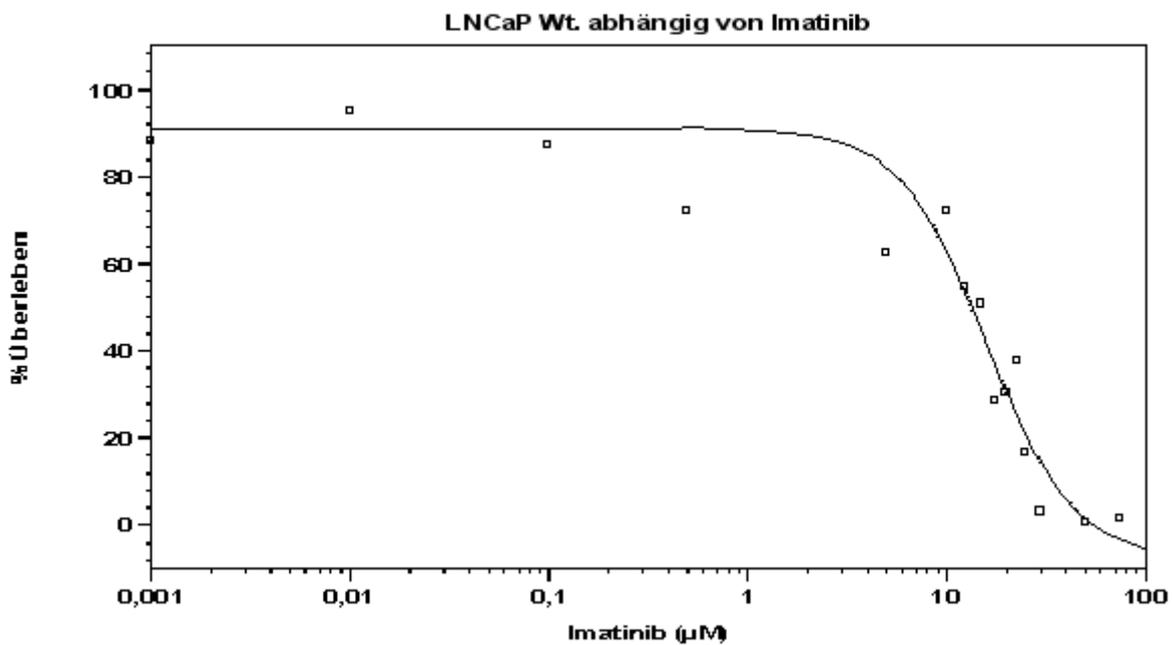


Abbildung 9: LNCaP Wachstum abhängig von Imatinib

Bei LNCaP Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 10 und 20  $\mu\text{M}$  bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 13,4  $\mu\text{M}$  und einem IC<sub>80</sub>-Wert von 25,6  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.2 Etoposid

PC-3: Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,001 bis 100  $\mu\text{M}$  Etoposid inkubiert.

Etoposid/ $\mu\text{M}$	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,000	100,0	6,1	3,5	103,5	96,5	12
0,001	99,1	8,6	6,9	106,0	92,2	6
0,005	91,5	11,7	9,4	100,9	82,2	6
0,010	94,0	9,8	5,5	99,5	88,4	12
0,100	98,5	4,0	2,4	100,9	96,1	11
0,250	87,8	7,6	4,5	92,3	83,3	11
0,500	82,1	8,9	5,3	87,4	76,9	11
1,000	61,3	6,7	4,0	65,2	57,3	11
5,000	35,0	5,1	3,0	38,1	32,0	11
10,000	29,0	4,3	2,5	31,5	26,5	11
50,000	9,0	1,2	0,7	9,6	8,3	12
100,000	5,5	0,7	0,4	5,9	5,1	12

Tabelle 12: PC-3 Wachstum abhängig von Etoposid

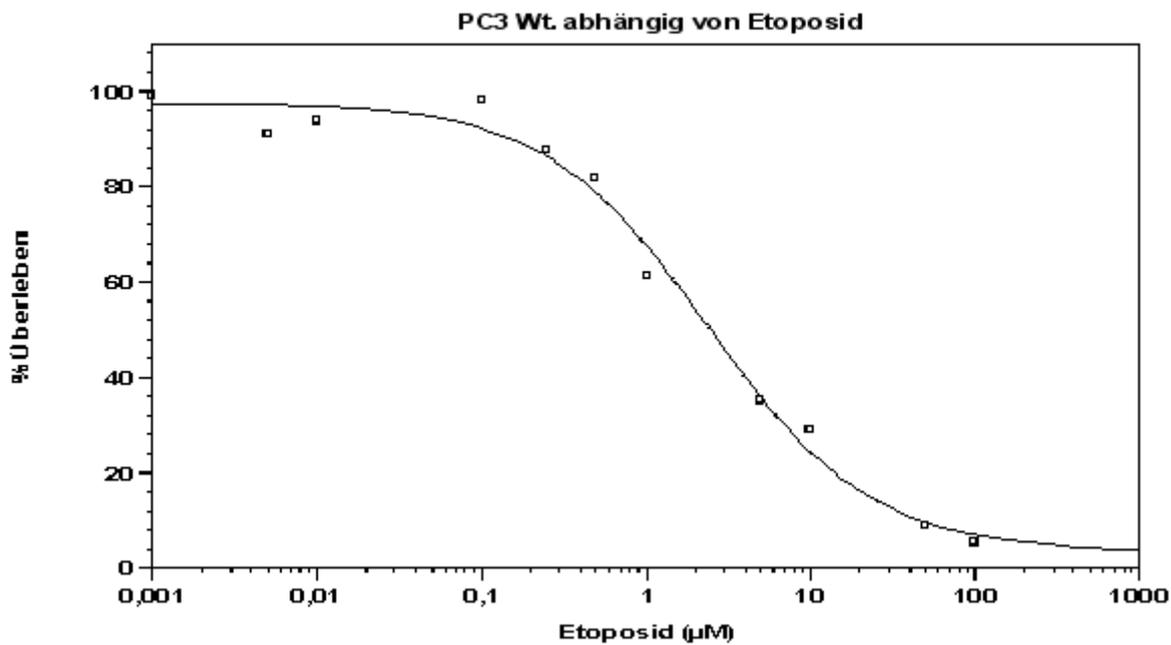


Abbildung 10: PC-3 Wachstum abhängig von Etoposid

Bei PC-3 Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 1 und 5  $\mu\text{M}$  bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 2,5  $\mu\text{M}$  und einem IC<sub>80</sub>-Wert von 14,0  $\mu\text{M}$ .

**DU 145:** Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,001 bis 250  $\mu\text{M}$  Etoposid inkubiert.

Etoposid/ $\mu\text{M}$	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,000	100,0	8,7	4,9	104,9	95,1	12
0,001	108,7	11,5	9,2	117,9	99,5	6
0,010	97,1	14,9	9,2	106,3	87,9	10
0,050	94,9	19,1	11,3	106,2	83,6	11
0,100	94,2	21,1	12,5	106,7	81,7	11
0,250	60,8	15,2	12,2	73,0	48,7	6
0,500	34,7	7,3	4,1	38,8	30,6	12
1,000	18,7	3,8	2,4	21,1	16,3	10
5,000	3,2	1,6	1,4	4,5	1,8	5
10,000	3,2	1,2	0,7	3,9	2,5	12
100,000	2,5	0,6	0,3	2,8	2,2	12
250,000	3,1	0,9	0,7	3,7	2,4	6

Tabelle 13: DU 145 Wachstum abhängig von Etoposid

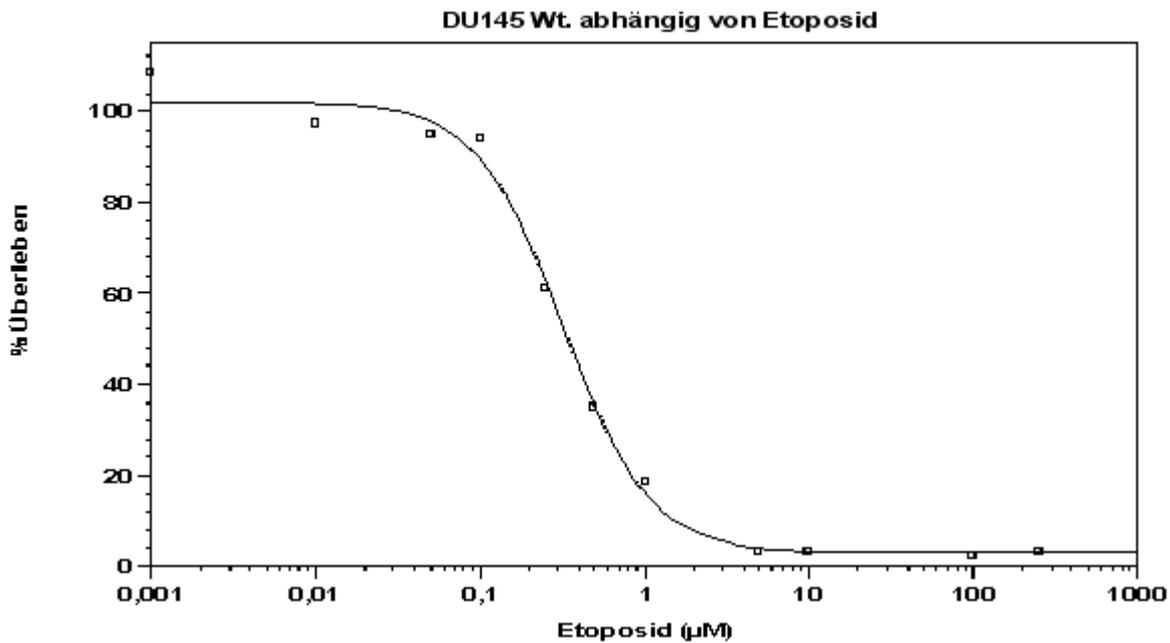


Abbildung 11: DU 145 Wachstum abhängig von Etoposid

Bei DU 145 Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,25 und 0,5  $\mu\text{M}$  bei einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0,34  $\mu\text{M}$  und einem  $\text{IC}_{80}$ -Wert von 0,84  $\mu\text{M}$ .

**LNCaP:** Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,001 bis 250  $\mu\text{M}$  Etoposid inkubiert.

Etoposid/ $\mu\text{M}$	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,000	100,0	6,7	4,1	104,1	95,9	10
0,001	96,2	9,9	6,2	102,3	90,0	10
0,010	95,1	8,6	5,3	100,4	89,7	10
0,100	88,8	9,7	6,0	94,8	82,8	10
0,500	60,5	7,5	4,7	65,2	55,8	10
1,000	51,6	7,5	4,9	56,5	46,7	9
5,000	39,9	5,6	3,5	43,4	36,4	10
10,000	36,4	2,6	1,6	38,1	34,8	10
100,000	28,6	1,5	0,9	29,5	27,6	10
250,000	26,5	0,8	0,6	27,2	25,9	6

Tabelle 14: LNCaP Wachstum abhängig von Etoposid

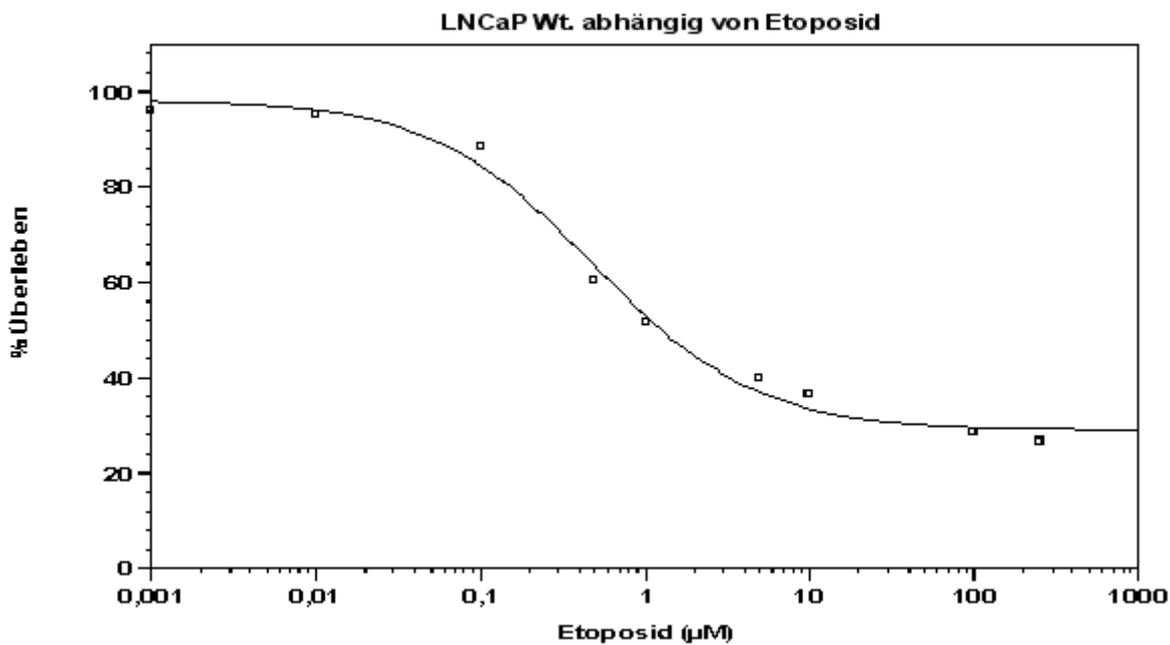


Abbildung 12: LNCaP Wachstum abhängig von Etoposid

Bei LNCaP Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 1 und 5  $\mu\text{M}$  bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,26  $\mu\text{M}$ . Eine 80%ige Hemmung der Zellproliferation wurde in keinem der durchgeführten Versuche erreicht.

### 3.2.3 Estramustinphosphat

**PC-3:** Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  Estramustinphosphat inkubiert.

EMP/ $\mu\text{M}$	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,00	100,0	6,9	3,9	103,9	96,1	12
0,01	98,9	8,8	5,2	104,1	93,7	11
0,10	91,0	8,1	4,6	95,6	86,4	12
1,00	83,7	12,1	6,9	90,6	76,8	12
2,00	47,4	15,1	8,9	56,3	38,5	11
2,50	22,6	5,2	4,2	26,7	18,4	6
3,00	26,6	12,2	7,2	33,8	19,4	11
4,00	15,9	5,9	3,5	19,4	12,4	11
5,00	14,3	5,0	2,8	17,1	11,4	12
10,00	12,7	3,7	2,1	14,7	10,6	12
100,00	0,4	0,1	0,1	0,5	0,3	7

Tabelle 15: PC-3 Wachstum abhängig von Estramustinphosphat

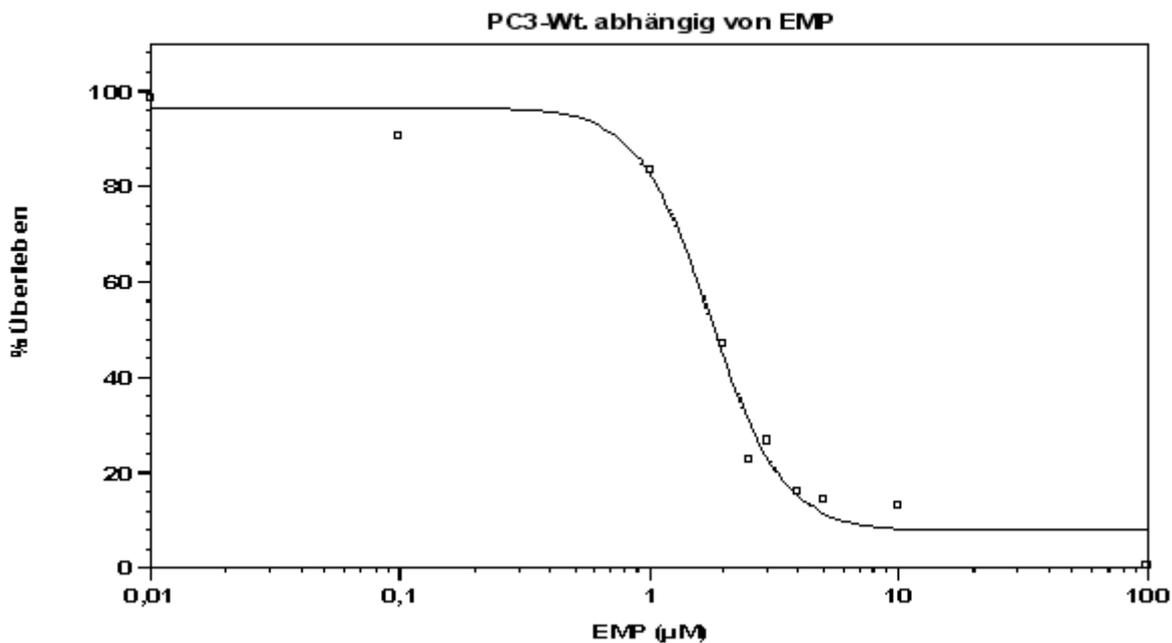


Abbildung 13: PC-3 Wachstum abhängig von Estramustinphosphat

Bei PC-3 Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 1 und 2,5  $\mu\text{M}$  bei einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 1,8  $\mu\text{M}$  und einem  $\text{IC}_{80}$ -Wert von 3,3  $\mu\text{M}$ .

**DU 145:** Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  Estramustinphosphat inkubiert.

EMP/ $\mu\text{M}$	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,00	100,0	12,7	7,2	107,2	92,8	12
0,01	104,1	17,8	10,5	114,6	93,6	11
0,10	101,2	20,6	11,7	112,8	89,5	11
1,00	94,7	17,4	10,3	105,0	84,5	11
2,00	78,7	14,2	8,1	86,8	70,7	12
2,50	73,7	12,7	10,2	83,9	63,5	6
3,00	56,9	22,8	12,9	69,7	44,0	12
4,00	36,7	16,4	9,3	46,0	27,4	12
5,00	19,9	7,1	4,0	24,0	15,9	12
7,50	9,5	2,4	1,9	11,5	7,6	6
10,00	4,3	2,7	1,5	5,8	2,8	12
100,00	0,4	0,2	0,2	0,7	0,2	4

Tabelle 16: DU 145 Wachstum abhängig von Estramustinphosphat

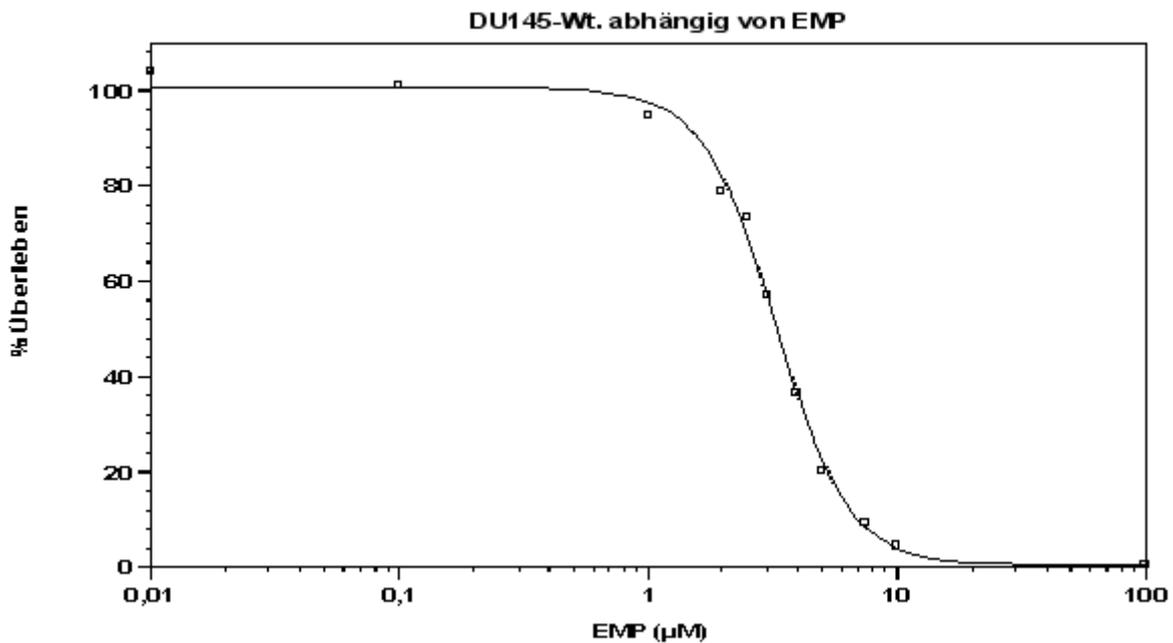


Abbildung 14: DU 145 Wachstum abhängig von Estramustinphosphat

Bei DU 145 Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 3 und 4  $\mu\text{M}$  bei einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 3,3  $\mu\text{M}$  und einem  $\text{IC}_{80}$ -Wert von 5,3  $\mu\text{M}$ .

**LNCaP:** Die Zellreihe wurde mit Molaritäten von 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  Estramustinphosphat inkubiert.

EMP/ $\mu\text{M}$	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,00	100,0	10,8	6,7	106,7	93,3	10
0,01	105,7	15,6	9,7	115,4	96,0	10
0,10	106,3	12,4	7,7	114,0	98,6	10
0,50	89,2	10,6	10,4	99,6	78,8	4
1,00	89,5	9,9	6,1	95,7	83,4	10
2,00	42,6	8,2	5,7	48,3	36,9	8
2,50	27,3	8,2	6,6	33,9	20,7	6
3,00	20,5	5,5	3,4	23,9	17,0	10
4,00	12,8	4,5	3,4	16,2	9,5	7
5,00	11,1	4,4	2,7	13,9	8,4	10
10,00	13,0	4,1	2,6	15,6	10,4	10
100,00	0,7	0,5	0,3	1,0	0,3	8

Tabelle 17: LNCaP Wachstum abhängig von Estramustinphosphat

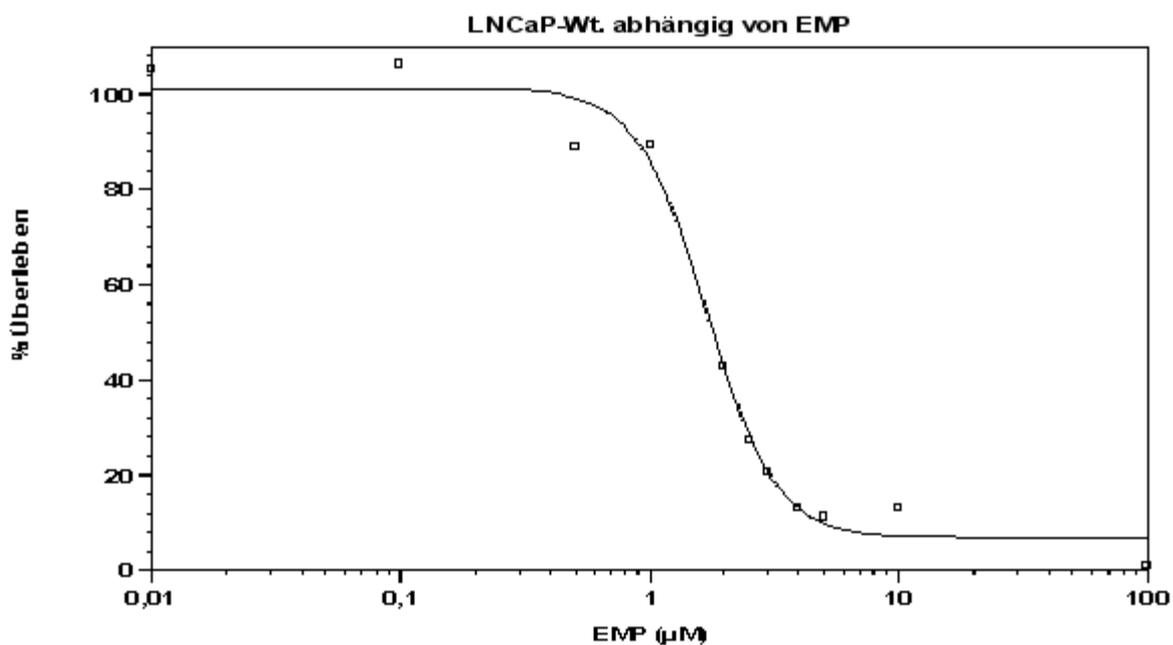


Abbildung 15: LNCaP Wachstum abhängig von Estramustinphosphat

Bei LNCaP Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 1 und 2  $\mu\text{M}$  bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,8  $\mu\text{M}$  und einem IC<sub>80</sub>-Wert von 3,1  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.4 Docetaxel

PC-3: Die Zellreihe wurde mit Konzentrationen von 0,0001 bis 50 µg/ml Docetaxel inkubiert.

Docetaxel/µg/ml	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,00000	100,0	16,2	9,1	109,1	90,9	12
0,00010	98,2	15,0	8,5	106,7	89,8	12
0,00050	84,2	12,9	7,3	91,5	77,0	12
0,00075	70,6	10,8	6,1	76,7	64,5	12
0,00100	51,0	13,4	7,9	59,0	43,1	11
0,00250	24,9	13,5	8,0	32,8	16,9	11
0,00500	14,3	9,3	5,3	19,6	9,1	12
0,00750	11,1	7,1	4,0	15,1	7,1	12
0,01000	9,6	5,8	3,3	13,0	6,3	12
0,05000	7,3	3,8	2,2	9,6	5,1	11
0,10000	9,2	5,3	3,7	12,9	5,6	8
1,00000	12,8	5,6	3,2	15,9	9,6	12
10,00000	1,1	0,6	0,3	1,4	0,8	12
50,00000	1,2	0,2	0,1	1,3	1,1	12

Tabelle 18: PC-3 Wachstum abhängig von Docetaxel

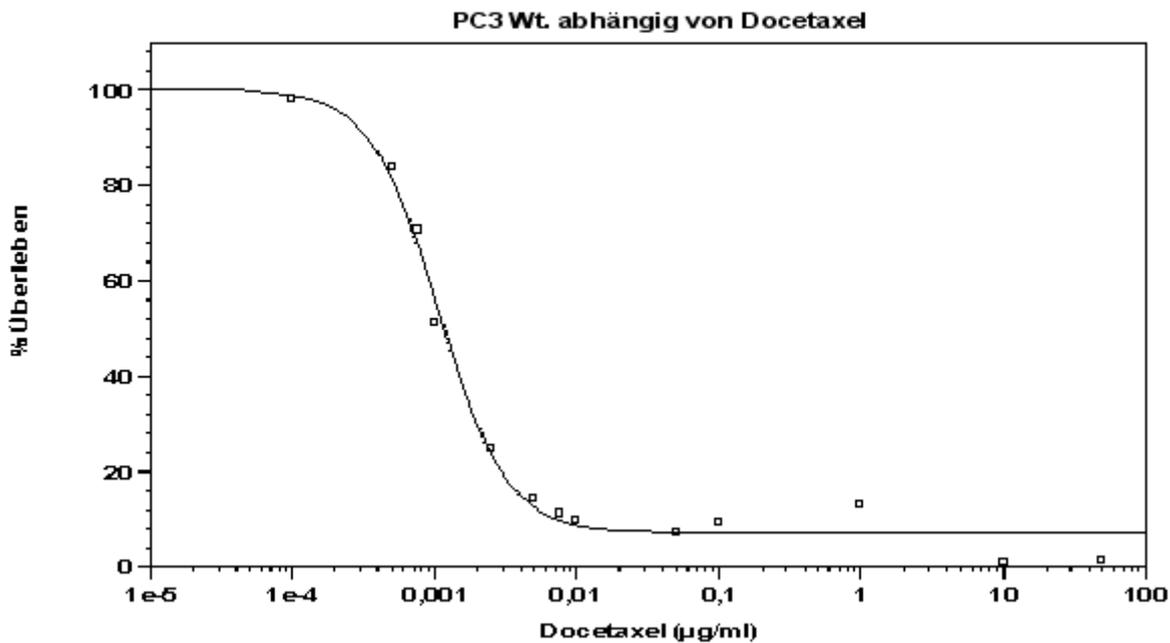


Abbildung 16: PC-3 Wachstum abhängig von Docetaxel

Bei PC-3 Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,0005 und 0,0025 µg/ml bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,0012 µg/ml und einem IC<sub>80</sub>-Wert von 0,0029 µg/ml.

**DU 145:** Die Zellreihe wurde mit Konzentrationen von 0,0001 bis 50 µg/ml Docetaxel inkubiert.

Docetaxel/µg/ml	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,00000	100,0	14,6	8,3	108,3	91,7	12
0,00010	101,4	14,5	8,2	109,6	93,2	12
0,00050	99,7	22,7	12,8	112,6	86,9	12
0,00075	80,6	33,5	18,9	99,6	61,7	12
0,00100	67,5	35,1	19,8	87,4	47,7	12
0,00250	10,4	4,5	2,7	13,0	7,7	11
0,00500	1,7	1,2	0,8	2,5	1,0	9
0,00750	1,4	0,7	0,5	1,9	0,9	8
0,01000	1,7	0,3	0,2	2,0	1,5	7
0,05000	0,9	0,4	0,3	1,2	0,6	7
0,10000	1,0	0,4	0,3	1,3	0,8	7
1,00000	0,8	0,5	0,3	1,1	0,5	11
10,00000	1,3	0,7	0,4	1,6	0,9	12
50,00000	2,1	0,5	0,3	2,4	1,8	12

Tabelle 19: DU 145 Wachstum abhängig von Docetaxel

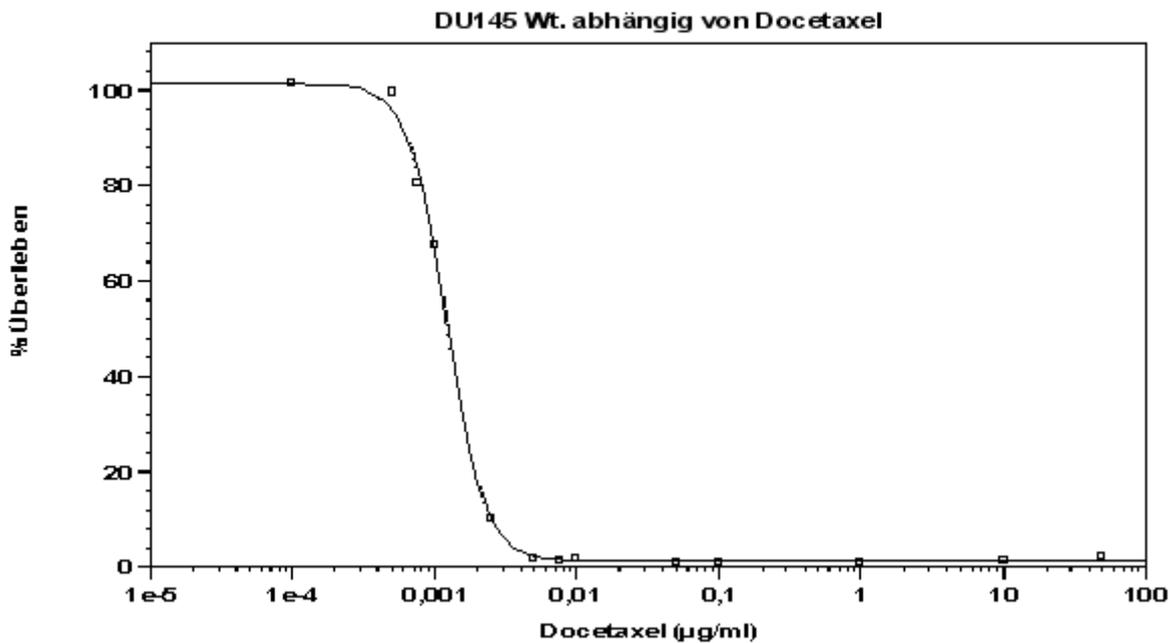


Abbildung 17: DU 145 Wachstum abhängig von Docetaxel

Bei DU 145 Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,00075 und 0,0025 µg/ml bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,0012 µg/ml und einem IC<sub>80</sub>-Wert von 0,0019 µg/ml.

**LNCaP:** Die Zellreihe wurde mit Konzentrationen von 0,0001 bis 50 µg/ml Docetaxel inkubiert.

Docetaxel/µg/ml	%Überleben	SD-%FCS	95%	Ki-o	Ki-u	n
0,00000	100,0	8,1	4,6	104,6	95,4	12
0,00010	105,0	13,0	7,4	112,3	97,6	12
0,00050	90,9	8,9	5,0	95,9	85,9	12
0,00075	81,6	10,2	5,8	87,3	75,8	12
0,00100	69,2	11,0	6,2	75,4	63,0	12
0,00250	20,2	1,7	1,0	21,2	19,3	12
0,00500	3,8	1,0	0,6	4,4	3,2	11
0,00750	3,4	1,1	0,6	4,0	2,8	11
0,01000	3,4	0,9	0,5	3,9	2,9	12
0,05000	3,3	0,9	0,5	3,8	2,8	11
0,10000	2,9	0,7	0,4	3,4	2,5	12
1,00000	5,2	1,1	0,7	5,8	4,5	11
10,00000	0,6	0,1	0,1	0,7	0,5	11
50,00000	1,6	0,2	0,1	1,8	1,5	12

Tabelle 20: LNCaP Wachstum abhängig von Docetaxel

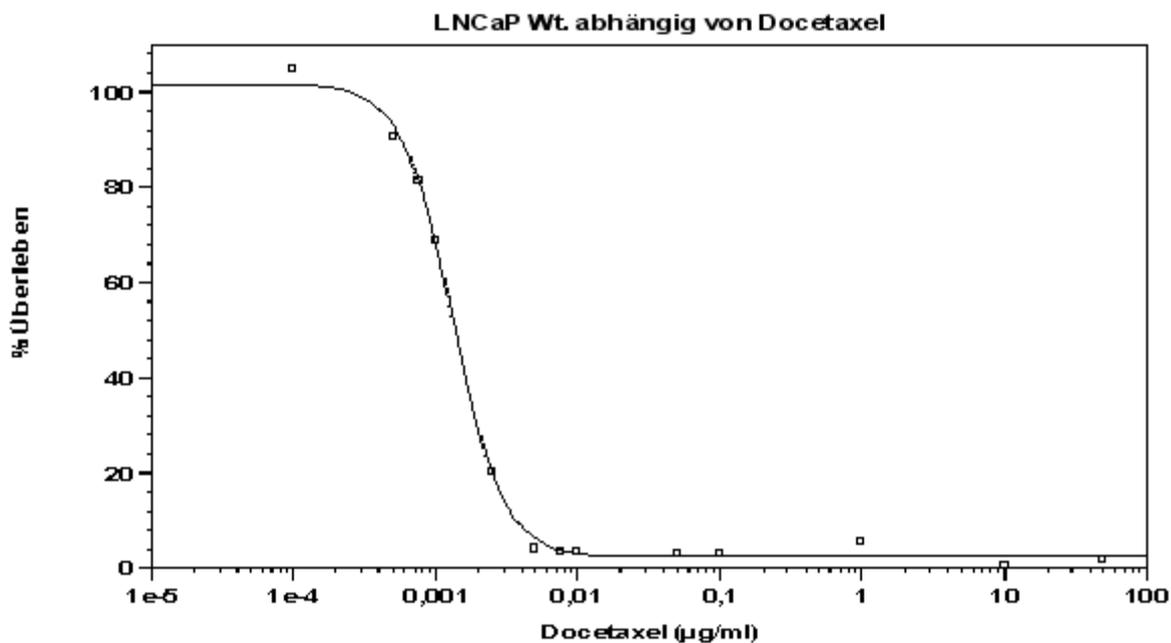


Abbildung 18: LNCaP Wachstum abhängig von Docetaxel

Bei LNCaP Zellen zeigt sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,00075 und 0,0025 µg/ml bei einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,0014 µg/ml und einem IC<sub>80</sub>-Wert von 0,0025 µg/ml.

### 3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Monotherapie

Alle durch die Experimente bestimmten Konzentrationen und 95%-Konfidenzintervalle für eine 50%ige beziehungsweise 80%ige Hemmung der Zellproliferation sind in Tabelle 21 zusammengestellt. Zu Vergleichszwecken wurden die Werte für Docetaxel in die entsprechende Molarität umgerechnet (5 mg/ml entsprechen 6,2 nM).

<b>Substanz</b>		<b>IC<sub>50</sub></b>		<b>IC<sub>80</sub></b>	
<b>Imatinib (µM)</b>	PC 3	<b>13,6</b>	(12,2 - 15,0)	<b>22,4</b>	(20,1 - 24,6)
	DU 145	<b>13,7</b>	(12,6 - 14,7)	<b>19,2</b>	(18,0 - 20,4)
	LNCaP	<b>13,4</b>	(9,0 - 17,2)	<b>25,6</b>	(20,6 - 28,2)
<b>Etoposid (µM)</b>	PC 3	<b>2,50</b>	(2,05 - 3,00)	<b>14,00</b>	(11,55 - 16,75)
	DU 145	<b>0,34</b>	(0,26 - 0,41)	<b>0,84</b>	(0,76 - 0,89)
	LNCaP	<b>1,26</b>	(0,86 - 1,84)	*	
<b>EMP (µM)</b>	PC 3	<b>1,8</b>	(1,6 - 2,0)	<b>3,3</b>	(2,8 - 3,8)
	DU 145	<b>3,3</b>	(2,9 - 3,7)	<b>5,3</b>	(4,6 - 5,9)
	LNCaP	<b>1,8</b>	(1,7 - 2,0)	<b>3,1</b>	(2,7 - 3,5)
<b>Docetaxel (nM)</b>	PC 3	<b>1,49</b>	(1,24 - 1,86)	<b>3,60</b>	(2,48 - 5,46)
	DU 145	<b>1,49</b>	(1,24 - 1,86)	<b>2,36</b>	(1,98 - 2,60)
	LNCaP	<b>1,74</b>	(1,61 - 1,86)	<b>3,10</b>	(2,98 - 3,22)

Tabelle 21: Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>- und IC<sub>80</sub>-Werte

\* Der IC<sub>80</sub>-Wert wurde in den Versuchsreihen durch keine Konzentration erreicht

### 3.3 Wachstumsverhalten bei Kombinationstherapie

Ausgehend von den  $IC_{50}$ -Werten, die aus den Messungen mit Monosubstanzen stammen, wurde jede Zelllinie pro Kombinationsversuch mit Imatinib-Konzentrationen im Bereich des  $IC_{50}$ -Wertes inkubiert. Eine Gewebekulturplatte wurde nur mit Imatinib behandelt, um eine Vergleichs-Dose-Response zu ermitteln. Den restlichen Gewebekulturplatten wurden innerhalb der Platte konstante, ansteigende Konzentrationen im Bereich des  $IC_{50}$ -Wertes der Kombinationssubstanz zugesetzt, um so die abhängigen  $IC_{50}$ -Werte zu ermitteln. Eine Gewebekulturplatte wurde zusätzlich ausschließlich mit der Kombinationssubstanz behandelt, um auch hier eine Vergleichs-Dose-Response zu ermitteln.

Die gesammelten Datenpunkte sind tabellarisch mit dem prädiktiven Minimum und Maximum dargestellt, innerhalb dessen der benötigte Anteil an der  $IC_{50}$  liegen muss, um als additiv bezeichnet zu werden. Liegt das 95%-Konfidenzintervall (Ki-u bis Ki-o) innerhalb dieses Bereichs, gilt der Datenpunkt statistisch signifikant als additiv, liegt das Konfidenzintervall insgesamt darüber (darunter), gilt der Datenpunkt statistisch signifikant als antagonistisch (synergistisch). Überlappen sich das Konfidenzintervall und das Intervall des prädiktiven Minimums und Maximums, wird der Datenpunkt als additiv bis antagonistisch oder additiv bis synergistisch bezeichnet. Umschließt das Konfidenzintervall das Intervall des prädiktiven Minimums und Maximums und liegt der Datenpunkt innerhalb, gilt er ebenfalls als additiv. Zusätzlich sind diese Datenpunkte in Form von Isobogrammen präsentiert.

### 3.3.1 Imatinib und Etoposid

PC-3:

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 30  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,01 bis 50  $\mu\text{M}$  Etoposid durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	Etoposid [ $\mu\text{M}$ ]									
	0,00	0,01	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	1,00	10,00	50,00
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
0,00	100,0	95,3	93,7	92,3	85,3	75,9	79,1	72,2	31,6	9,3
0,05	94,0	86,3	86,2	86,3	80,4	86,3	81,5	69,6	36,4	8,4
0,10	95,1	96,7	87,0	79,6	84,2	82,3	74,8	64,3	37,7	7,9
0,50	87,6	87,7	87,9	77,6	83,6	89,4	75,5	63,3	40,6	8,3
1,00	93,1	91,1	89,6	84,7	80,1	89,6	78,8	68,9	39,4	9,1
5,00	75,8	87,1	81,3	78,6	75,9	68,6	74,4	58,6	37,4	8,5
10,00	58,3	70,3	68,6	64,6	60,9	61,4	58,4	51,6	38,4	8,6
12,50	50,9	64,2	62,6	52,6	51,6	54,1	54,0	47,6	37,6	8,1
15,00	45,1	51,2	54,3	43,1	40,6	48,5	49,8	38,7	32,7	9,2
30,00	10,8	16,4	13,6	10,4	9,6	13,8	14,3	16,5	14,5	7,3

Tabelle 22: Kombinierte Dose-Response für PC-3 und Imatinib/Etoposid

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> Etoposid	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
0,000	1,000	0,691	1,556	1,000	1,000
0,004	1,363	0,915	2,144	0,820	0,999
0,008	1,187	0,756	2,019	0,803	0,999
0,038	1,494	0,741	3,432	0,691	0,991
0,076	1,497	0,934	2,568	0,589	0,979
0,381	1,066	0,549	2,441	0,208	0,825
0,763	0,845	0,313	2,491	0,035	0,483
0,953	0,412	0,060	2,299	0,003	0,228

Tabelle 23: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Imatinib/PC-3

Anteil IC <sub>50</sub> Etoposid	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
0,000	1,000	0,888	1,133	1,000	1,000
0,003	1,194	1,058	1,446	0,953	1,000
0,028	1,298	1,155	1,489	0,792	1,000
0,057	1,012	0,879	1,237	0,685	1,000
0,085	0,968	0,905	1,038	0,605	1,000
0,114	1,071	0,854	1,446	0,539	1,000
0,142	1,124	0,979	1,351	0,484	1,000
0,285	0,772	0,545	0,979	0,290	0,914

Tabelle 24: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Etoposid/PC-3

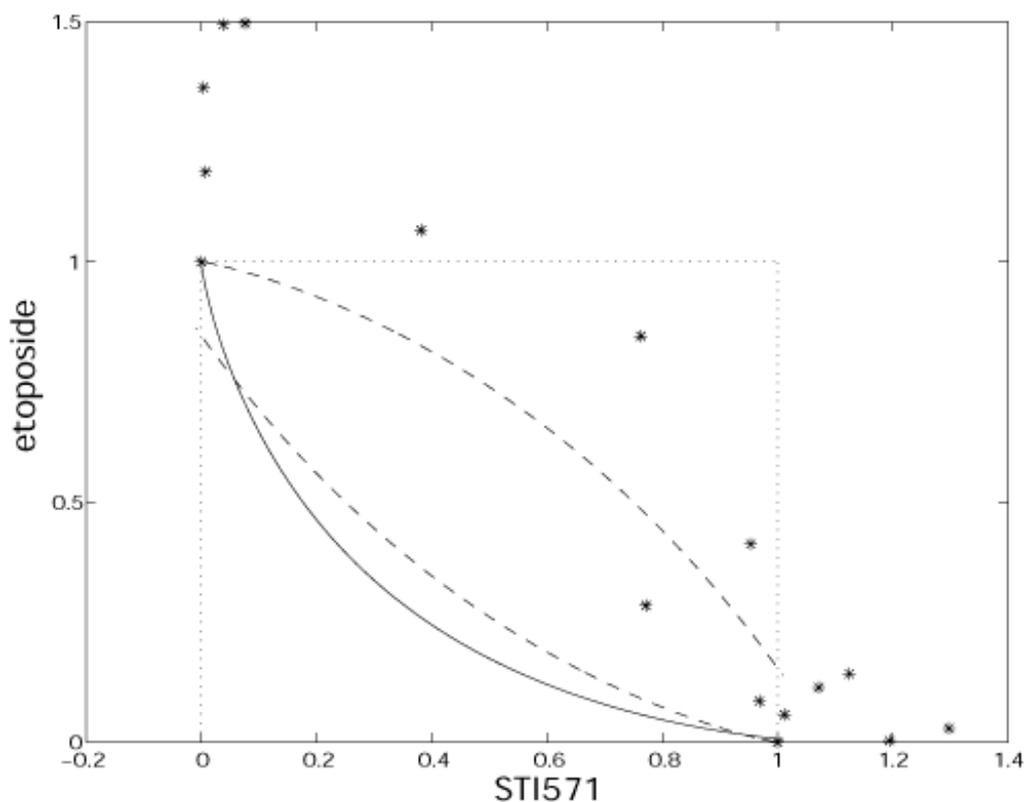


Abbildung 19: Isobologramm für Imatinib/Etoposid und PC-3

**DU 145:**

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 30  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,01 bis 10  $\mu\text{M}$  Etoposid durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	Etoposid [ $\mu\text{M}$ ]								
	0,00	0,01	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	1,00	10,00
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
0,0	100,0	84,4	80,8	66,1	43,8	30,9	22,6	9,0	0,7
0,5	101,2	91,4	86,2	63,5	44,8	29,3	20,5	8,3	1,3
1,0	95,2	84,7	86,0	60,6	37,9	26,9	16,7	8,8	1,1
5,0	95,9	86,7	76,0	39,0	19,3	13,5	10,7	11,9	0,9
10,0	89,3	75,0	53,3	18,3	11,6	12,8	12,8	12,2	0,9
12,5	83,9	65,0	50,9	13,3	10,1	13,5	12,4	8,7	0,6
15,0	72,1	55,8	40,9	11,1	8,3	13,0	13,6	8,0	0,7
20,0	46,1	34,6	20,8	9,8	8,7	10,6	7,8	4,7	0,5
25,0	20,6	18,2	10,0	8,5	4,8	6,3	6,8	2,7	0,3
50,0	2,3	2,3	1,5	1,9	1,4	1,6	1,9	0,9	0,2

**Tabelle 25: Kombinierte Dose-Response für DU 145 und Imatinib/Etoposid**

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> Etoposid	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
0,000	1,000	0,821	1,176	1,000	1,000
0,027	0,983	0,884	1,083	0,999	1,000
0,053	0,918	0,799	1,034	0,997	1,000
0,265	0,617	0,514	0,715	0,584	1,000
0,531	0,392	0,267	0,518	0,233	0,997
0,663	0,376	0,246	0,579	0,118	0,844
0,796	0,098	0,017	0,270	0,042	0,623

**Tabelle 26: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Imatinib/DU 145**

Anteil IC <sub>50</sub> Etoposid	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,955	1,045	1,000	1,000
<b>0,037</b>	<b>0,850</b>	0,806	0,891	0,809	0,999
<b>0,372</b>	<b>0,625</b>	0,551	0,693	0,410	0,918
<b>0,744</b>	<b>0,182</b>	0,083	0,603	0,178	0,727

Tabelle 27: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Etoposid/DU 145

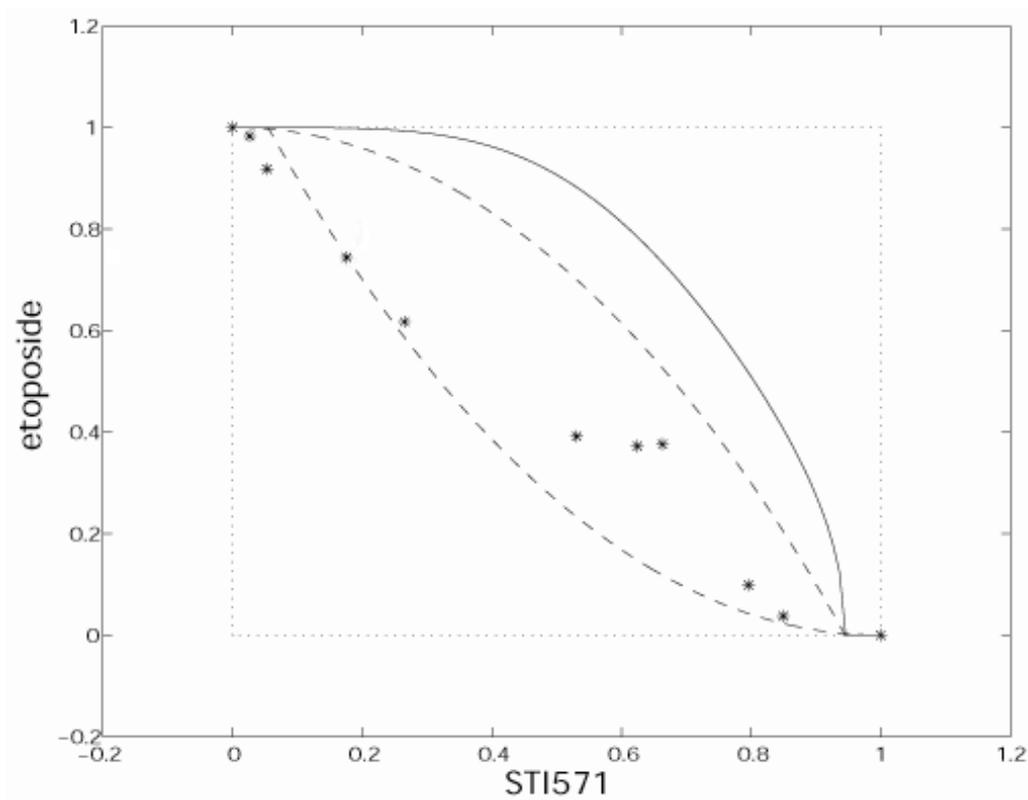


Abbildung 20: Isobologramm für Imatinib/Etoposid und DU 145

## LNCaP:

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 30  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,01 bis 50  $\mu\text{M}$  Etoposid durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	Etoposid [ $\mu\text{M}$ ]									
	0,00	0,01	0,05	0,10	0,25	0,50	1,00	2,50	5,00	50,00
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
<b>0,0</b>	100,0	106,5	92,7	83,1	62,1	48,1	37,6	24,7	19,4	10,3
<b>0,1</b>	101,7	105,1	102,7	84,3	64,9	46,2	36,6	27,7	20,4	10,2
<b>1,0</b>	103,6	102,5	103,2	82,0	59,5	43,3	33,8	28,2	19,9	9,8
<b>5,0</b>	94,4	87,1	79,3	65,7	49,7	39,5	29,3	25,0	20,3	11,0
<b>7,5</b>	75,4	81,1	79,3	59,2	45,5	38,8	32,6	25,4	22,4	12,5
<b>10,0</b>	63,9	64,4	59,8	53,4	43,3	33,9	30,8	24,5	21,2	13,2
<b>15,0</b>	43,0	44,7	41,3	37,8	32,5	32,3	29,2	24,0	21,9	13,7
<b>20,0</b>	36,4	37,0	37,5	33,3	28,8	28,7	27,8	26,2	24,0	12,4
<b>30,0</b>	2,9	4,1	4,5	3,3	4,3	3,3	2,6	2,0	1,7	0,9

Tabelle 28: Kombinierte Dose-Response für LNCaP und Imatinib/Etoposid

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> Etoposid	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,811	1,260	1,000	1,000
<b>0,007</b>	<b>1,004</b>	0,756	1,379	0,897	1,000
<b>0,071</b>	<b>0,847</b>	0,613	1,223	0,764	0,992
<b>0,355</b>	<b>0,556</b>	0,458	0,677	0,350	0,884
<b>0,532</b>	<b>0,508</b>	0,295	0,844	0,190	0,759
<b>0,709</b>	<b>0,292</b>	0,202	0,398	0,083	0,577

Tabelle 29: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Etoposid in Abhängigkeit von Imatinib/LNCaP

Anteil IC <sub>50</sub> Etoposid	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,867	1,173	1,000	1,000
<b>0,021</b>	<b>1,040</b>	0,937	1,162	0,872	1,000
<b>0,103</b>	<b>0,982</b>	0,794	1,244	0,669	0,993
<b>0,207</b>	<b>0,796</b>	0,693	0,910	0,512	0,945
<b>0,517</b>	<b>0,428</b>	0,244	0,575	0,220	0,755

Tabelle 30: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Etoposid/LNCaP

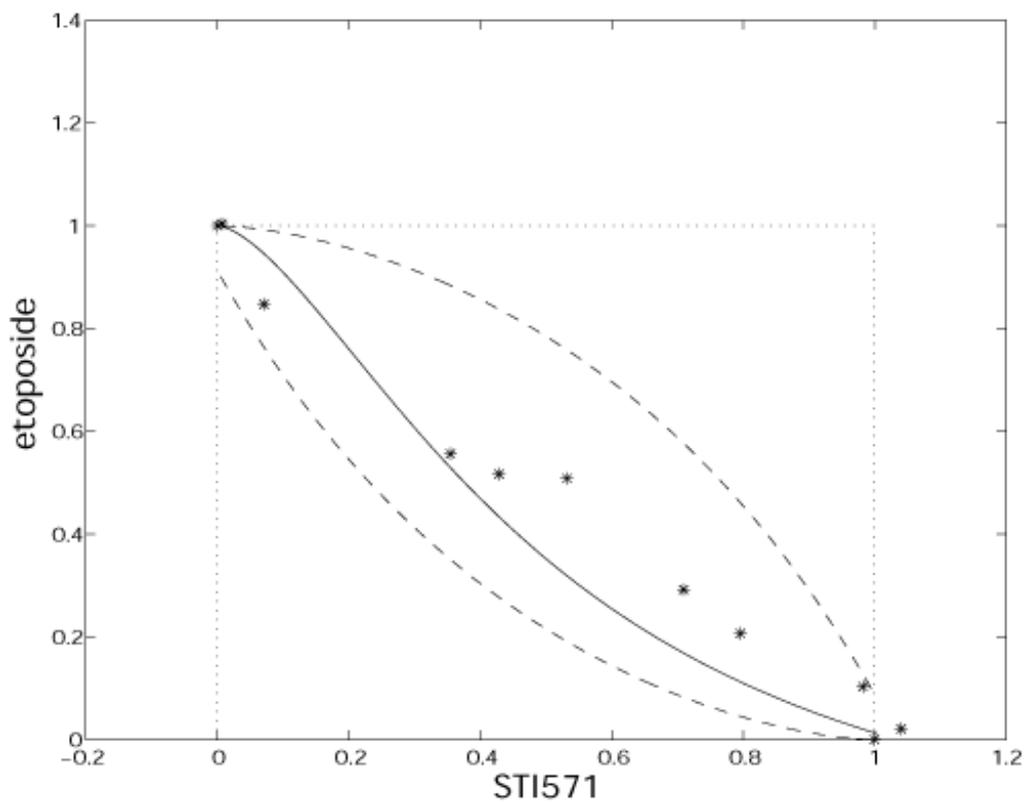


Abbildung 21: Isobologramm für Imatinib/Etoposid und LNCaP

### 3.3.2 Imatinib und Estramustinphosphat

#### PC-3:

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 50  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  Estramustinphosphat durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	EMP [ $\mu\text{M}$ ]								
	0,00	0,01	0,10	1,00	1,50	2,00	2,50	5,00	100,00
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
0,00	100,0	71,0	85,5	88,2	79,6	52,1	42,8	12,3	0,5
0,05	86,5	68,3	102,8	83,4	73,2	57,1	43,4	13,1	0,5
0,10	86,7	64,9	91,5	88,0	78,2	63,6	41,4	11,6	0,5
0,50	92,4	68,4	86,3	83,1	77,5	54,5	37,1	13,5	0,7
1,00	100,0	67,4	92,1	87,1	72,1	53,9	35,8	12,6	0,6
5,00	93,2	64,7	80,8	72,1	54,6	38,5	23,8	10,5	0,5
10,00	74,6	50,4	71,4	52,3	48,9	30,6	21,2	10,8	0,5
12,50	62,5	56,3	57,1	48,4	40,4	26,3	17,5	8,2	0,5
30,00	19,9	16,2	20,6	15,8	11,0	11,2	10,9	8,7	0,3
50,00	5,9	6,4	5,5	5,7	6,5	5,7	5,7	4,6	0,0

Tabelle 31: Kombinierte Dose-Response für PC-3 und Imatinib/EMP

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> EMP	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
0,000	1,000	0,897	1,162	1,000	1,000
0,000	0,975	0,737	1,445	0,965	1,000
0,003	1,000	0,714	1,585	0,965	0,989
0,006	1,014	0,784	1,460	0,955	0,980
0,031	0,946	0,744	1,263	0,933	0,965
0,062	0,923	0,664	1,372	0,886	0,965
0,312	0,716	0,487	0,935	0,604	0,916
0,625	0,537	0,243	0,792	0,329	0,722
0,781	0,426	0,312	0,534	0,200	0,587

Tabelle 32: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für EMP in Abhängigkeit von Imatinib/PC-3

Anteil IC <sub>50</sub> EMP	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,824	1,347	1,000	1,000
<b>0,004</b>	<b>0,696</b>	0,176	1,613	0,999	1,000
<b>0,044</b>	<b>0,971</b>	0,784	1,294	0,982	1,000
<b>0,437</b>	<b>0,702</b>	0,569	0,884	0,496	0,905
<b>0,655</b>	<b>0,487</b>	0,359	0,617	0,263	0,705
<b>0,874</b>	<b>0,118</b>	0,047	0,233	0,071	0,403

Tabelle 33: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Anhängigkeit von EMP/PC-3

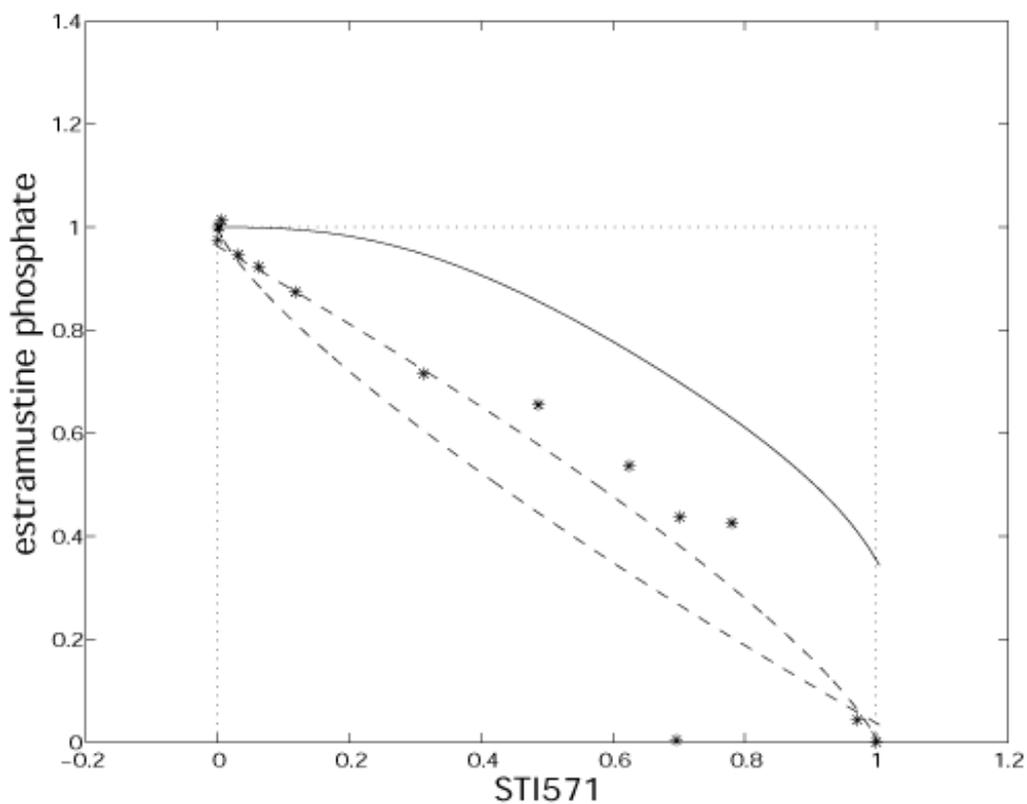


Abbildung 22: Isobologramm für Imatinib/EMP und PC-3

**DU 145:**

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 50  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,01 bis 10  $\mu\text{M}$  Estramustinphosphat durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	EMP [ $\mu\text{M}$ ]							
	0,0	0,1	1,0	2,0	3,0	5,0	7,5	10,0
0,0	100,0	71,1	76,5	78,0	61,6	41,4	10,6	3,7
0,5	103,1	78,1	85,8	77,4	78,3	40,9	11,2	3,6
1,0	101,8	81,1	83,2	78,7	74,7	45,2	11,2	3,8
2,5	103,5	78,6	82,1	76,1	71,0	38,4	12,1	3,5
5,0	103,7	78,0	80,9	74,8	65,2	39,8	10,9	3,4
10,0	95,6	73,7	74,6	64,3	48,1	23,1	5,6	1,5
12,5	89,8	68,7	70,3	56,3	35,9	13,8	3,3	1,1
15,0	78,2	63,5	65,4	39,7	26,7	9,4	2,3	0,9
20,0	47,8	30,4	44,7	21,1	13,4	4,0	1,4	0,8
25,0	27,0	20,9	20,5	10,6	7,8	3,2	1,5	0,6
50,0	2,3	2,2	1,5	1,3	0,8	0,7	0,3	0,4

**Tabelle 34: Kombinierte Dose-Response für DU 145 und Imatinib/EMP**

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> EMP	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,580	1,539	1,000	1,000
<b>0,025</b>	<b>1,104</b>	0,757	1,497	0,998	1,000
<b>0,051</b>	<b>1,119</b>	0,800	1,497	0,994	1,000
<b>0,127</b>	<b>1,026</b>	0,684	1,470	0,967	1,000
<b>0,253</b>	<b>0,985</b>	0,630	1,456	0,815	1,000
<b>0,506</b>	<b>0,693</b>	0,444	0,998	0,387	1,000
<b>0,633</b>	<b>0,551</b>	0,340	0,764	0,227	1,000
<b>0,759</b>	<b>0,404</b>	0,258	0,534	0,105	0,886

**Tabelle 35: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für EMP in Abhängigkeit von Imatinib/DU 145**

Anteil IC <sub>50</sub> EMP	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,978	1,018	1,000	1,000
<b>0,025</b>	<b>0,862</b>	0,792	0,930	0,825	1,000
<b>0,246</b>	<b>0,923</b>	0,867	0,987	0,615	0,984
<b>0,492</b>	<b>0,672</b>	0,648	0,695	0,435	0,926
<b>0,739</b>	<b>0,477</b>	0,378	0,558	0,292	0,831

Tabelle 36: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Abhängigkeit von EMP/DU 145

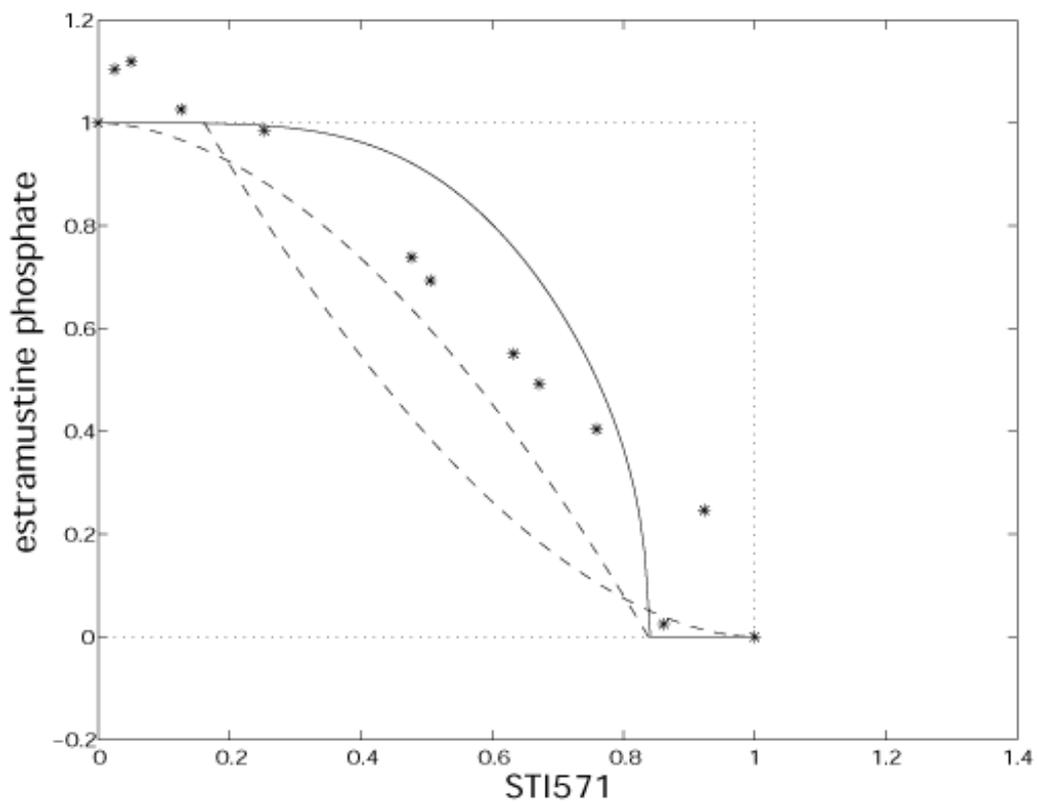


Abbildung 23: Isobologramm für Imatinib/EMP und DU 145

## LNCaP:

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 50  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,01 bis 100  $\mu\text{M}$  Estramustinphosphat durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	EMP [ $\mu\text{M}$ ]								
	0,00	0,01	0,10	0,50	1,00	2,00	3,00	5,00	100,00
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
0,0	100,0	95,8	90,6	82,8	76,2	46,6	31,3	11,7	0,3
0,1	103,3	97,5	95,1	89,3	74,7	45,2	32,1	11,7	0,4
0,5	106,9	92,2	89,9	80,5	72,2	42,1	32,1	12,7	0,6
5,0	78,0	69,3	71,4	59,7	47,1	36,1	27,5	15,9	0,5
7,5	73,6	58,3	63,6	55,7	45,3	32,9	27,0	18,2	0,4
10,0	58,1	43,9	55,6	49,4	39,1	32,3	25,9	16,9	0,4
15,0	37,5	28,8	38,2	33,7	30,7	23,8	22,2	19,6	0,4
20,0	30,9	21,1	26,1	25,5	27,7	18,0	20,4	14,5	0,4
30,0	5,6	5,0	5,9	3,7	4,4	2,8	2,4	1,5	0,4
50,0	0,6	0,4	0,6	1,1	0,8	0,5	0,4	0,7	0,1

Tabelle 37: Kombinierte Dose-Response für LNCaP und Imatinib/EMP

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> EMP	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
0,000	1,000	0,844	1,163	1,000	1,000
0,008	0,987	0,870	1,105	0,983	1,000
0,042	0,910	0,665	1,188	0,931	1,000
0,420	0,495	0,361	0,631	0,476	0,745
0,629	0,394	0,190	0,644	0,239	0,508
0,839	0,159	0,000	0,552	0,000	0,284

Tabelle 38: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für EMP in Abhängigkeit von Imatinib/LNCaP

Anteil IC <sub>50</sub> EMP	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,880	1,153	1,000	1,000
<b>0,005</b>	<b>0,743</b>	0,685	0,796	0,826	1,000
<b>0,054</b>	<b>0,914</b>	0,820	1,012	0,784	0,991
<b>0,269</b>	<b>0,735</b>	0,572	0,888	0,600	0,852
<b>0,538</b>	<b>0,446</b>	0,254	0,613	0,366	0,601

Tabelle 39: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Abhängigkeit von EMP/LNCaP

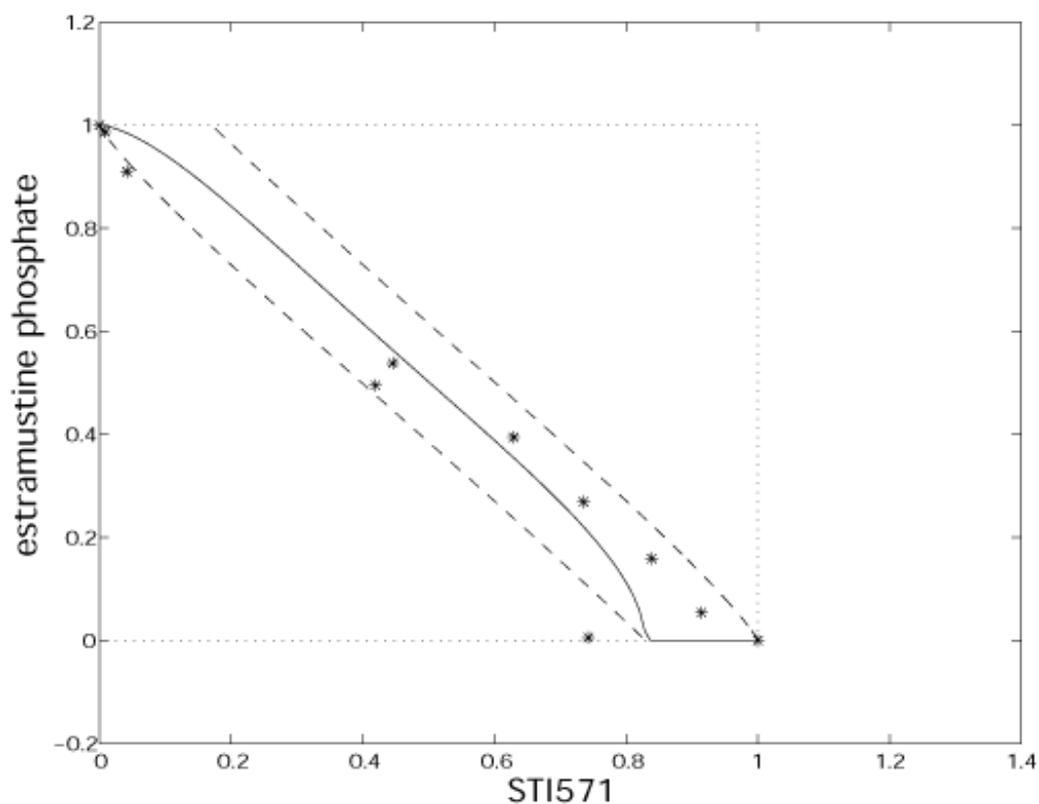


Abbildung 24: Isobologramm für Imatinib/EMP und LNCaP

### 3.3.3 Imatinib und Docetaxel

#### PC-3:

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 50  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,00025 bis 0,01  $\mu\text{g/ml}$  Docetaxel durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	TXT [ $\mu\text{g/ml}$ ]								
	0,00000	0,00025	0,00050	0,00075	0,00100	0,00200	0,00250	0,00500	0,01000
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
<b>0,00</b>	100,0	98,7	97,2	70,0	51,5	24,0	17,4	20,6	12,6
<b>0,05</b>	103,6	98,8	93,8	73,4	47,7	24,3	19,1	22,3	13,6
<b>0,10</b>	98,9	103,3	95,9	77,9	58,0	26,8	18,8	20,9	14,7
<b>0,50</b>	94,4	94,4	99,2	76,9	53,0	24,9	21,2	22,2	14,2
<b>1,00</b>	93,6	95,6	96,4	75,3	55,0	24,6	19,9	22,4	14,5
<b>5,00</b>	88,0	92,7	97,4	68,5	57,5	21,4	18,7	19,0	13,4
<b>10,00</b>	70,6	81,9	83,1	59,3	50,5	21,5	18,6	20,3	13,8
<b>12,50</b>	62,5	62,9	68,1	55,0	46,8	18,8	18,0	18,8	13,5
<b>15,00</b>	62,4	56,6	59,1	53,6	40,3	19,2	14,8	15,9	11,2
<b>30,00</b>	24,3	24,0	25,1	23,1	21,4	20,9	19,1	18,0	14,8
<b>50,00</b>	8,2	10,6	5,3	7,2	6,1	5,9	4,3	4,1	3,2

Tabelle 40: Kombinierte Dose-Response für PC-3 und Imatinib/Docetaxel

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> Docetaxel	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,907	1,155	1,000	1,000
<b>0,003</b>	<b>0,978</b>	0,897	1,103	0,910	0,972
<b>0,006</b>	<b>1,115</b>	1,018	1,260	0,883	0,972
<b>0,028</b>	<b>1,020</b>	0,928	1,203	0,780	0,967
<b>0,056</b>	<b>1,050</b>	0,955	1,224	0,711	0,955
<b>0,278</b>	<b>1,058</b>	0,907	1,373	0,456	0,842
<b>0,556</b>	<b>0,967</b>	0,781	1,350	0,271	0,676
<b>0,696</b>	<b>0,911</b>	0,777	1,084	0,196	0,589
<b>0,835</b>	<b>0,798</b>	0,673	0,923	0,119	0,482

Tabelle 41: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Docetaxel in Abhängigkeit von Imatinib/PC-3

Anteil IC <sub>50</sub> Docetaxel	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,880	1,164	1,000	1,000
<b>0,247</b>	<b>0,938</b>	0,845	1,075	0,603	0,985
<b>0,495</b>	<b>1,007</b>	0,925	1,130	0,231	0,819
<b>0,742</b>	<b>0,844</b>	0,742	0,972	0,042	0,446

Tabelle 42: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Docetaxel/PC-3

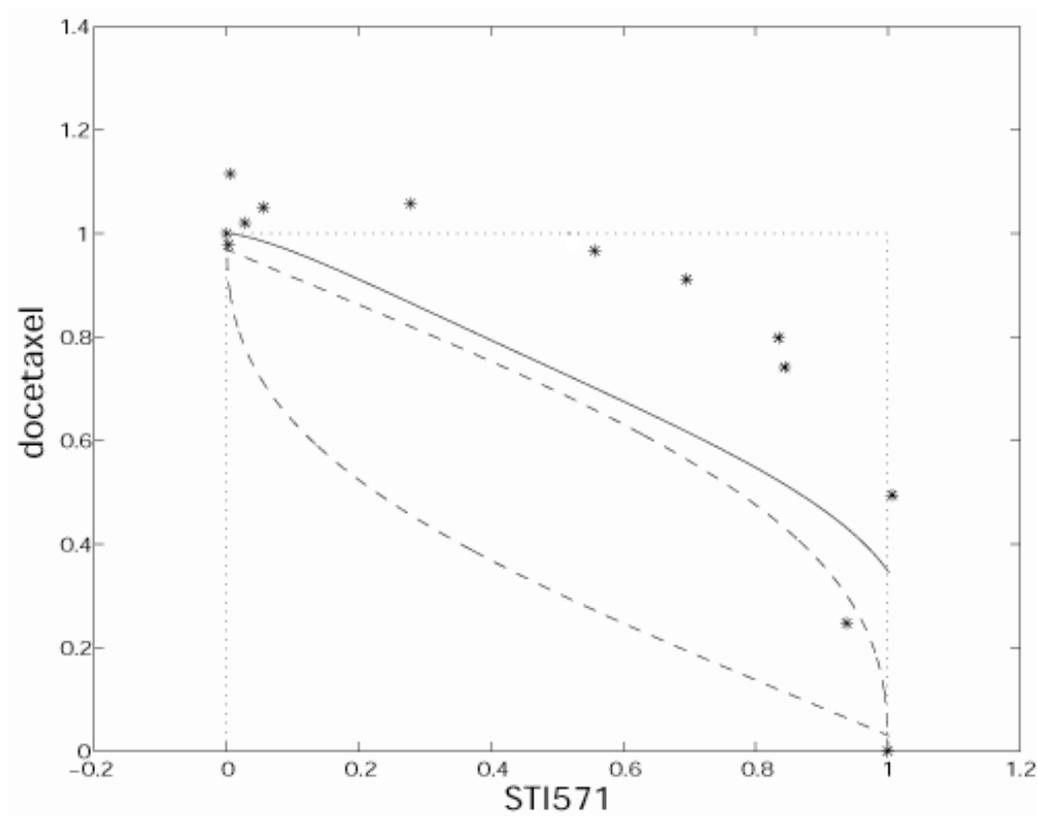


Abbildung 25: Isobologramm für Imatinib/Docetaxel und PC-3

**DU 145:**

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 50  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,00025 bis 0,02  $\mu\text{g/ml}$  Docetaxel durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	TXT [ $\mu\text{g/ml}$ ]								
	0,00000	0,00025	0,00040	0,00050	0,00060	0,00075	0,00100	0,00150	0,00200
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
<b>0,0</b>	100,0	105,9	83,3	81,9	71,1	52,9	21,2	8,5	4,7
<b>0,5</b>	95,5	89,6	84,7	81,7	65,0	35,2	15,9	6,5	4,1
<b>1,0</b>	91,7	83,0	92,4	85,8	59,5	35,9	12,2	6,2	3,6
<b>2,5</b>	100,0	89,0	97,6	85,7	58,4	31,6	11,1	4,8	4,4
<b>5,0</b>	93,9	100,9	95,4	84,1	55,9	37,9	11,5	4,7	4,2
<b>10,0</b>	90,2	85,6	95,8	75,2	47,7	25,4	8,3	3,5	2,9
<b>12,5</b>	80,4	72,5	83,3	66,6	33,8	17,8	5,2	3,3	2,6
<b>15,0</b>	71,1	59,7	68,4	38,6	20,1	9,5	4,1	2,6	2,4
<b>20,0</b>	39,2	41,9	26,5	18,7	10,7	5,8	2,8	2,4	1,6
<b>25,0</b>	21,6	25,7	15,1	8,4	6,4	4,5	2,3	2,3	1,5
<b>50,0</b>	1,7	2,2	1,8	1,4	1,3	1,4	0,9	1,3	0,7

**Tabelle 43: Kombinierte Dose-Response für DU 145 und Imatinib/Docetaxel**

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> Docetaxel	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,912	1,123	1,000	1,000
<b>0,027</b>	<b>0,907</b>	0,868	0,949	0,916	0,987
<b>0,055</b>	<b>0,897</b>	0,834	0,972	0,885	0,971
<b>0,137</b>	<b>0,873</b>	0,822	0,935	0,798	0,944
<b>0,274</b>	<b>0,884</b>	0,830	0,949	0,648	0,944
<b>0,548</b>	<b>0,814</b>	0,759	0,876	0,368	0,885
<b>0,685</b>	<b>0,748</b>	0,688	0,802	0,238	0,798
<b>0,821</b>	<b>0,630</b>	0,558	0,688	0,120	0,664

**Tabelle 44: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Docetaxel in Abhängigkeit von Imatinib/DU 145**

Anteil IC <sub>50</sub> Docetaxel	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,957	1,047	1,000	1,000
<b>0,335</b>	<b>0,971</b>	0,848	1,134	0,582	0,982
<b>0,537</b>	<b>0,939</b>	0,865	1,016	0,381	0,908
<b>0,671</b>	<b>0,773</b>	0,737	0,807	0,254	0,815
<b>0,805</b>	<b>0,497</b>	0,388	0,586	0,128	0,676

Tabelle 45: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Docetaxel/DU 145

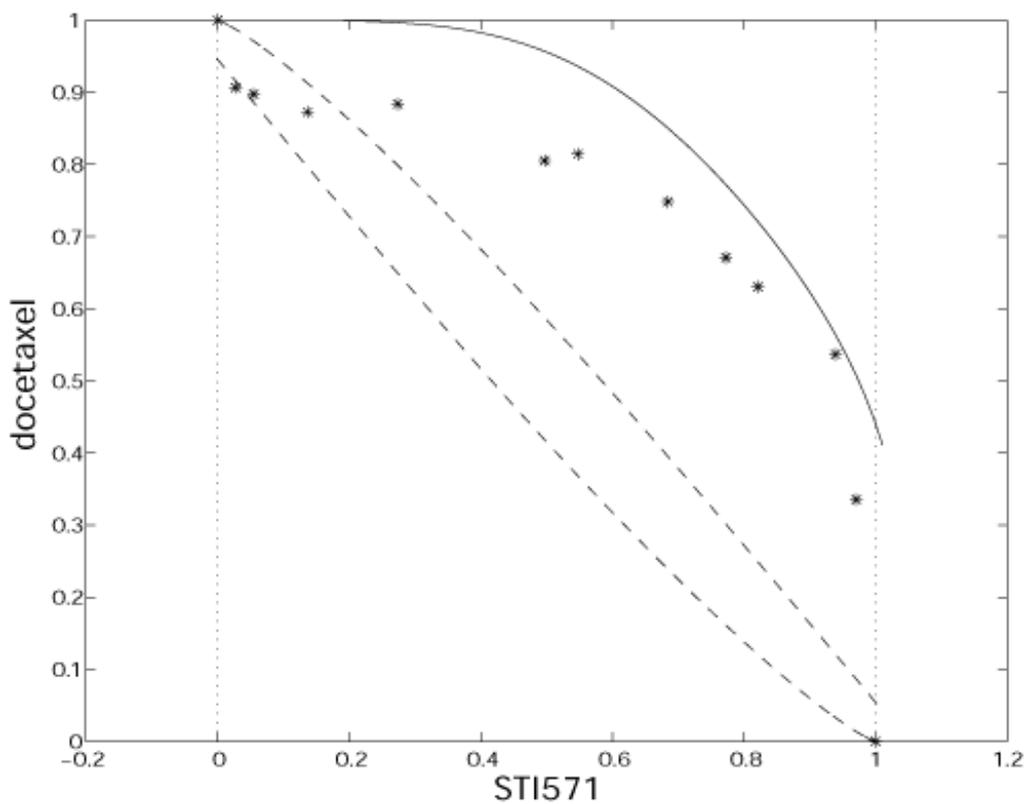


Abbildung 26: Isobologramm für Imatinib/Docetaxel und DU 145

## LNCaP:

Die Kombinationsversuche wurden mit Konzentrationen von 0,05 bis 50  $\mu\text{M}$  Imatinib und 0,00025 bis 0,01  $\mu\text{g/ml}$  Docetaxel durchgeführt.

Imatinib [ $\mu\text{M}$ ]	TXT [ $\mu\text{g/ml}$ ]							
	0,00000	0,00010	0,00025	0,00050	0,00075	0,00150	0,00200	0,01000
	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.	%Überl.
0,0	100,0	98,5	93,4	68,9	45,9	20,5	12,2	5,1
0,1	96,9	100,0	96,6	67,2	46,5	19,4	9,9	6,2
0,5	90,6	96,9	92,8	69,8	43,9	20,2	10,9	5,0
5,0	83,7	83,4	81,8	51,4	36,1	18,7	10,1	6,1
7,5	71,7	72,5	66,8	40,8	35,9	18,8	10,1	7,9
10,0	57,5	64,8	57,8	40,6	34,4	18,5	10,7	9,7
15,0	42,9	47,3	41,5	32,0	27,9	18,3	15,0	15,7
20,0	32,7	37,5	33,6	28,2	24,0	21,2	18,4	19,3
30,0	8,7	6,9	7,4	7,8	8,6	7,3	6,4	6,0
50,0	0,9	1,0	0,8	0,6	1,2	0,9	1,3	1,1

Tabelle 46: Kombinierte Dose-Response für LNCaP und Imatinib/Docetaxel

Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Anteil IC <sub>50</sub> Docetaxel	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
0,000	1,000	0,944	1,059	1,000	1,000
0,008	0,984	0,885	1,109	0,918	0,976
0,039	0,988	0,865	1,145	0,893	0,922
0,394	0,775	0,647	0,910	0,557	0,713
0,590	0,617	0,480	0,781	0,393	0,556
0,787	0,537	0,336	0,743	0,240	0,386

Tabelle 47: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Docetaxel in Abhängigkeit von Imatinib/LNCaP

Anteil IC <sub>50</sub> Docetaxel	Anteil IC <sub>50</sub> Imatinib	Ki-u	Ki-o	prädiktives Min.	prädiktives Max.
<b>0,000</b>	<b>1,000</b>	0,896	1,118	1,000	1,000
<b>0,140</b>	<b>1,091</b>	0,970	1,232	0,915	0,976
<b>0,351</b>	<b>0,972</b>	0,872	1,088	0,646	0,824
<b>0,701</b>	<b>0,433</b>	0,254	0,585	0,233	0,409

Tabelle 48: Relative IC<sub>50</sub>-Werte für Imatinib in Abhängigkeit von Docetaxel/LNCaP

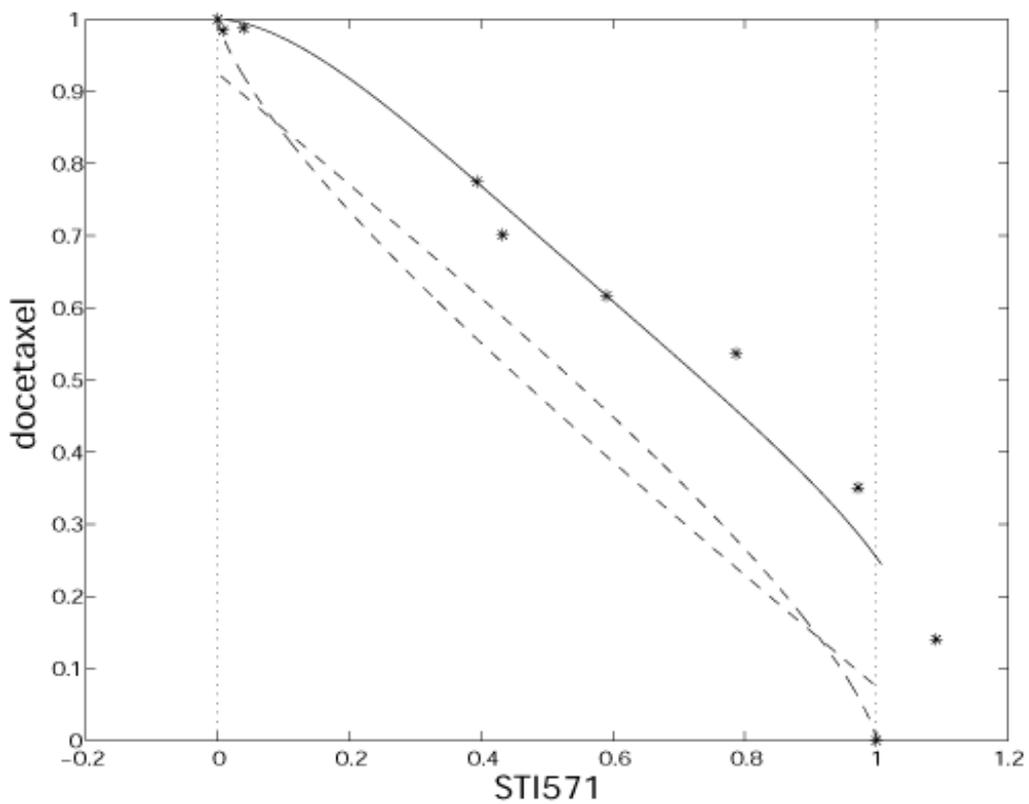


Abbildung 27: Isobologramm für Imatinib/Docetaxel und LNCaP

### 3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse bei Kombinationstherapie

Die Mittelwerte der Datenpunkte und der entsprechenden prädiktiven Minima und Maxima sind im Folgenden aufgeführt (Tab. 50). Entsprechend ist die Art der biologischen Interaktion benannt.

Kombinationspartner	Zelllinie	Datenpunkte (n)	Mittelwert der Datenpunkte	Mittelwert des prädiktiven Minimums	Mittelwert des prädiktiven Maximums	Interaktion
Etoposid	PC 3	14	<b>1,093</b> (0,760 - 1,884)	0,536	0,887	<b>add.-ant.</b>
	DU 145	9	<b>0,560</b> (0,463 - 0,709)	0,486	0,901	<b>add.-syn.</b>
	LNCaP	9	<b>0,717</b> (0,555 - 0,935)	0,506	0,878	<b>add.-ant.</b>
Estramustinphosphat	PC 3	13	<b>0,732</b> (0,509 - 1,079)	0,665	0,857	<b>add.</b>
	DU 145	11	<b>0,801</b> (0,600 - 1,035)	0,605	0,966	<b>add.</b>
	LNCaP	9	<b>0,643</b> (0,491 - 0,825)	0,578	0,776	<b>add.</b>
Docetaxel	PC 3	11	<b>0,971</b> (0,859 - 1,154)	0,473	0,791	<b>ant.</b>
	DU 145	11	<b>0,812</b> (0,745 - 0,883)	0,483	0,870	<b>add.-ant.</b>
	LNCaP	8	<b>0,800</b> (0,664 - 0,949)	0,599	0,720	<b>ant.</b>

**Tabelle 49: Zusammenfassung der Ergebnisse bei Kombinationstherapie**

## **4 Diskussion**

Das steigende Durchschnittsalter der Bevölkerung geht einher mit einer steigenden Anzahl maligner Erkrankungen, von denen viele bis heute nur unbefriedigend zu therapieren sind. Das HRPC fällt in die Gruppe therapieresistenter maligner Tumoren, die eine letale Prognose haben. Vor diesem Hintergrund befinden sich verschiedene neue therapeutische Ansätze in der Erprobung. Die Skepsis gegenüber der chemotherapeutischen Behandlung ist durch die neueren Ergebnisse von Phase-II Studien mit taxanhaltigen Protokollen verdrängt worden, so dass das HRPC nicht länger als Chemotherapie-resistent angesehen werden kann (23, 47). Im Jahr 2004 haben verschiedene neu veröffentlichte Studien zu einem neuen Standard bei der Behandlung in Form von Docetaxel-basierten Therapieregimen geführt (2, 44, 48). Die experimentelle und klinische Untersuchung zusätzlicher chemotherapeutischer Agenzien ist daher von großer Bedeutung.

Alle therapeutischen Ansätze haben das gemeinsame Ziel der Vernichtung eines maximalen Anteils neoplastischen Gewebes bei minimaler Schädigung von gesundem Gewebe. Die allermeisten Monotherapien beim HRPC sind bestenfalls von moderater Wirksamkeit, einzig mit docetaxelhaltige Therapien lässt sich eine Lebensverlängerung erzielen. Die Kombination der Substanzen Estramustinphosphat, Docetaxel und Etoposid, die sich in der klinischen Erprobung befinden, mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib stellt einen geeigneten neuen Therapieansatz zur experimentellen Untersuchung dar.

### **4.1 Beurteilung der Methoden**

Vor der klinischen Anwendung neuer Therapien ist eine Wirksamkeitskontrolle unverzichtbar. Die Erprobung in klinischen Studien ohne vorherige experimentelle Analyse ist bei malignen Erkrankungen sowohl ethisch nicht vertretbar, als auch schlecht kontrollierbar und meist teuer und zeitaufwändig (30). Aus diesem Grund sind präklinische Versuche am Tier oder an Zellkulturen unerlässlich.

Die Gleichförmigkeit von Monolayerkulturen und die standardisierten Bedingungen erlauben die Erhebung exakter Daten über die Wirkung externer Einflüsse auf Tumorzellen. Die in vitro/in vivo Korrelation von Experimenten an Monolayerkulturen im Vergleich zum klinischen Tumor liegt nach Dietel et al bei 84% mit einer Sensitivität von 72,8% (10). Aufgrund der erwiesenen Zuverlässigkeit dieser Experimente an Zellkulturen ist diese Methode gut dazu geeignet, Rückschlüsse auf durchzuführende Phase I Studien zuzulassen

und Therapieempfehlungen auszusprechen. Die drei verwendeten Zellklone PC-3, DU 145 und LNCaP sind in der Tumorforschung lange etabliert und stammen aus verschiedenen Metastasierungslokalisationen des Prostatakarzinoms (25, 32, 64). Die Analyse der Wirkungskonzentration in verschiedenen Versuchsreihen erfolgte immer über den prozentualen Vergleich mit dem Überleben unbehandelter Zellen und ermöglicht so den Ergebnisvergleich unabhängiger Versuche. Da bei Erreichen einer gewissen Zelldichte die Ergebnisse durch das natürliche Absterben der Zellen und durch die Zellkontakte verfälscht werden, wurden die vorgegebenen Ausgangskonzentrationen pro Well sowie der Ablesezeitpunkt (Behandlung 24 h nach Aussaat, Proliferationsmessung 144 h nach Aussaat) standardisiert. Die Modifikation der Medien erfolgte nach Kaighn et al., um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Die erhaltenen Ergebnisse waren in den Wiederholungsversuchen gut reproduzierbar, leichte Schwankungen lassen sich durch unterschiedliche Chargennummern der Substanzen, Serien der Einmalmaterialien, dem Klima bei Versuchsdurchführung oder externer Manipulation erklären. Auch die Zellzählungen in der Neubauer-Zählkammer erfolgten manuell und waren daher anfällig für zufällige Fehler. Zusätzlich differierten der Auftauvorgang und die Belegung des Brutschanks von Versuch zu Versuch. Auf einen Medienwechsel nach Inkubation der Zellen wurde verzichtet, um weitere Manipulationen am Zellrasen zu vermeiden.

Die Interpretation von Ergebnissen im Monolayermodell ist jedoch aufgrund der Zweidimensionalität eingeschränkt. So ist es nicht möglich, Aussagen zu Faktoren wie Diffusionseigenschaften, Mikromilieu, Oxygenierung und interzellulären Kontaktphänomenen zu treffen, die Einfluss auf die Zytostatikasensibilität der Zellen haben. Weiterhin ist kein toxischer Dosisbereich zu ermitteln, da keine Zellen des gesunden Gewebes untersucht wurden. Die Molaritäten der verabreichten Substanzen wurden in Anlehnung an Daten aus klinischen Studien bestimmt, bei denen die verabreichten Mengen an Wirkstoff bekannt sind. Die Bioverfügbarkeit der Zytostatika wurde nicht untersucht.

In der Gesamtbetrachtung lassen sich aber aus den ermittelten  $IC_{50}$ -Werten und den Kombinationsergebnissen gut konkrete Hinweise auf den anzustrebenden Plasmaspiegel im klinischen Gebrauch und die geeigneten Kombinationspartner ermitteln. Die Methode zur Analyse der biologischen Interaktion zweier Substanzen durch Isobologramme nach Steel und Peckham hat sich generell als wesentlich strenger bei der Beurteilung additiver oder synergistischer Effekte als andere Methoden erwiesen. Auch wenn eine große Anzahl an Datenpunkten gesammelt werden muss, ist die Berechnung additiver Effekte unabhängig vom

Verlauf der einzelnen Dose-Response-Kurven und des Mechanismus der Interaktion möglich (33).

## **4.2 Wirkungsvergleich Monotherapie versus Kombinationstherapie**

Zytostatische Monotherapien sind bei den allermeisten Tumorformen der Kombinationstherapie unterlegen. Die antineoplastische Therapie mit Ansatz verschiedener zytotoxischer Substanzen oder als kombinierte Radiochemotherapie bietet den Vorteil der Möglichkeit, in verschiedenen Phasen des Zellzyklus wirksam zu werden und unterschiedliche zelluläre Proliferationsmechanismen zu inhibieren. Auf diese Weise ist die Wahrscheinlichkeit der schnellen Entwicklung resistenter Zellpopulationen geringer. Darüber hinaus interagieren Substanzklassen zum Teil und zeigen in Kombination eine additive Wirkung, die über das Maß des zu erwartenden zytotoxischen Effekts hinausgeht, was eine Dosisreduktion der Einzelsubstanzen im Interesse einer geringeren Schädigung von gesundem Gewebe möglich macht.

Vor der Erprobung von Kombinationstherapien muss die Wirksamkeit der Einzelsubstanzen belegt werden. Alle verwendeten Substanzen greifen über jeweils unterschiedliche Mechanismen in die Zellproliferation ein. Im Vorfeld der Durchführung von Kombinationstest der Substanz Imatinib (Tyrosinkinase-Inhibitor) mit Substanzen aus der Gruppe der Alkylanzien (Estramustinphosphat), Alkaloide (Etoposid) und Taxane (Docetaxel) wurden die Wirksamkeit und der Dosisbereich der Einzelsubstanzen über das Proliferationsassay geprüft. Bei allen verwendeten Zelllinien konnte mit jeder Substanz eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation erreicht werden. Die proliferationshemmende Wirksamkeit der Substanzen *in vitro* ist damit im Generellen bestätigt. Bei der näheren Betrachtung der eingesetzten Konzentrationen fällt die im Verhältnis hohe benötigte Konzentration an Imatinib (13,4 – 13,8  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich mit den anderen Substanzen auf (Etoposid 0,34 – 2,50  $\mu\text{M}$ ; Estramustinphosphat 1,8 – 3,3  $\mu\text{M}$ ; Docetaxel 1,49 – 1,74 nM). Es lässt sich keine Tendenz unter den Zelllinien erkennen, sensibler oder weniger sensibel auf antiproliferative Substanzen zu reagieren.

Bei anderen soliden Tumoren wie dem Bronchialkarzinom liegt die optimale Konzentration von Imatinib für die Hemmung der Proliferation von A549 Zellen zwischen 2 und 3  $\mu\text{M}$  (74). Die  $\text{IC}_{50}$  für den PDGF-R liegt bei 386 nmol/l (40).

Bei den durchgeführten Versuchen konnten für die Kombination von Imatinib und Estramustinphosphat additive Effekte bei allen drei Zelllinien beobachtet werden, entsprechend wurden für den erwarteten Effekt Substanzkonzentrationen im Bereich der mittels der MATLAB-Software berechneten Grenzen benötigt. Für die Kombination von Imatinib und Etoposid konnten für die Zelllinien PC-3 und LNCaP additive bis antagonistische Effekte und für die Zelllinie DU 145 additive bis synergistische Effekte beobachtet werden. Für die Kombination von Imatinib und Docetaxel wurden bei den Zelllinien PC-3 und LNCaP antagonistische Effekte beobachtet, während die Ergebnisse für DU 145 Zellen auf additive bis antagonistische Effekte hindeuten.

### **4.3 Ergebnisinterpretation**

Die Substanz Imatinib ist ein neuer Wirkstoff bei der Behandlung von Leukämien, der selektiv die Bcr-Abl-Tyrosinkinase hemmt (11). Auch der PDGF-R wird in ähnlichem Maße gehemmt (5). Die Blockade von PDGF-Rezeptoren ist ein attraktiver neuer therapeutischer Ansatz bei der Behandlung des Prostatakarzinoms. Bereits Fudge et al. weisen auf die Bedeutung der PDGF-Signalkaskade für die Pathogenese und Progression des Prostatakarzinoms in epithelialen und stromalen Zellen (17) und intraepithelialen Neoplasien (16) hin.

In einer multizentrischen Phase II Studie mit dem PDGF-R-Inhibitor SU101 bei Patienten mit HRPC zeigte sich ein begrenzter Effekt. Bei 8% der Patienten fiel der PSA-Wert um mehr als 50% des Ausgangswertes, bei 26% stabilisierte sich der vorher steigende PSA-Wert (37). Auch die ersten klinischen Studien mit Imatinib zeigen eine minimale Wirksamkeit bei Applikation als Monotherapie (54). Die durch das XTT-Assay ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für Imatinib liegen bei allen getesteten Zelllinien im Bereich von 13  $\mu$ M. Bei oraler Applikation von  $\geq 400$  mg Imatinib/d lassen sich durchschnittliche Plasmakonzentrationen von 1,46  $\mu$ mol/l erreichen, weit unterhalb des  $IC_{50}$ -Wertes (12).

Eine der derzeit gebräuchlichen zytostatischen Therapien des HRPC ist Docetaxel oder Estramustinphosphat in Kombination mit Docetaxel. Bei dieser Kombination wurden signifikante PSA-Reduktionen in bis zu 74% der Fälle beobachtet (49). Auch Petrylak et al. berichten bei einer Studie an 674 Patienten mit HRPC von einem Überlebensvorteil gegenüber der palliativen Therapie mit Mitoxantron und Prednison bei gleicher Schmerzreduktion (50). Bei humanen Leukämie-Zelllinien zeigen sich bei der Kombination von Imatinib mit Docetaxel additive Effekte (68). Die Auswahl von Docetaxel als

Kombinationspartner erfolgte aufgrund dieser Ergebnisse. Bei der *in vitro* Kombination von Imatinib und Docetaxel zeigen sich antagonistische oder additiv bis antagonistische Effekte bei allen drei Prostatakarzinom-Zelllinien. Eine Erprobung dieser Kombination in klinischen Studien empfiehlt sich daher nicht. Der Mechanismus des antagonistischen Effekts ist nicht bekannt. Die Ergebnisse einer Phase I Studie zur Kombination von Imatinib mit einer wöchentlichen Gabe von Docetaxel bei Patienten mit HRPC zeigte bei 38% eine Abnahme des PSA-Wertes um mehr als 50% des Ausgangswertes, bei 29% eine Abnahme um weniger als 50% und bei 33% ein Zunahme des PSA-Wertes (42). Im Vergleich dazu wurde bei einer multizentrischen Phase III Studie an 1006 Patienten mit metastasiertem HRPC, die ebenfalls wöchentlich Docetaxel erhielten, eine Abnahme des PSA-Wertes um mehr als 50% bei 48% beobachtet (14). Aus diesen klinischen Daten lassen sich keine Vorteile bei der Verwendung der Kombination von Imatinib und Docetaxel gegenüber Docetaxel als Monosubstanz erkennen. Dies ist gut vereinbar mit den experimentellen Ergebnissen. Eine weitere randomisierte Phase II Studie mit Docetaxel und Imatinib versus Docetaxel und Placebo wird derzeit durchgeführt und bedarf der weiteren Beachtung (41).

Estramustinphosphat wird seit Mitte der 70er Jahre zur Behandlung des HRPC verwendet, bewirkt aber bei Applikation als Monosubstanz weder einen Überlebensvorteil noch eine Linderung der subjektiven Beschwerden oder eine Verlängerung der Zeit bis zur Progression (29). Als Kombinationspartner mit synergistisch wirkenden Substanzen ist Estramustinphosphat jedoch deutlich effektiver (39). So erreicht die Kombination von Estramustinphosphat und Doxorubicin eine 50%tige Reduktion des PSA-Wertes in 58% der Fälle (9). Auch die Kombination einer oralen Etoposid-Gabe und Estramustinphosphat bewirkt eine PSA-Reduktion und wird zurzeit unter dem Aspekt einer palliativen Therapie in einer prospektiven Phase II Studie geprüft (52, 60). Die *in vitro* Kombination von Imatinib und Estramustinphosphat zeigt bei allen drei Prostatakarzinom-Zelllinien additive Effekte. Die Ergebnisse der Experimente deuten darauf hin, dass diese Kombination bei der Behandlung des Prostatakarzinoms wirksam sein könnte. Obwohl der Mechanismus der zytotoxischen Interaktion noch untersucht werden muss, empfiehlt sich die klinische Erprobung von Imatinib in Kombination mit Estramustinphosphat.

Etoposidhaltige Protokolle erscheinen aufgrund der möglichen oralen Applikation interessant für die klinische Erprobung. Die Kombination von Imatinib und Etoposid zeigte bei humanen Leukämie-Zelllinien synergistische und additive Effekte (33, 68). Bei den *in vitro* Versuchen mit dieser Kombination zeigen sich für die Zelllinien PC-3 und LNCaP additive bis antagonistische Effekte. Bei der Zelllinie DU 145 zeigen sich additive bis synergistische

Effekte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die klinische Verwendung dieser Kombination bei der Behandlung des Prostatakarzinoms wirksam sein könnte.

Abschließend lässt sich berichten, dass die *in vitro* Kombination von Imatinib mit Estramustinphosphat oder Etoposid bei humanen Prostatakarzinom-Zelllinien zum überwiegenden Teil additive Effekte produziert. Im Gegensatz dazu bewirkt die *in vitro* Kombination von Imatinib und Docetaxel größtenteils antagonistische Effekte. Auch wenn die klinische Wirksamkeit nicht zu 100% mit den *in vitro* Modellen der Tumorforschung übereinstimmt, können die Ergebnisse als Grundlage zur Planung klinischer Studien verwendet werden. Als Fazit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Kombination von Imatinib mit Estramustinphosphat oder Etoposid bei der Behandlung des HRPC von Vorteil sein könnte. Zur Erprobung und Beurteilung der biologischen Wirksamkeit bei Patienten mit HRPC sollten mit diesen Kombinationen klinische Phase I Studien durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Analyse neuer therapeutischer Ansätze in der experimentellen Tumorforschung ist die *in vitro* Untersuchung von Monolayerkulturen etablierter Tumorzelllinien ein geeignetes Modell zur Testung antineoplastischer Wirkstoffe. Neben der beschriebenen hohen *in vitro/in vivo* Korrelation zwischen Zellkultur und klinischem Tumor steht vor allem die Gleichförmigkeit der Zellkulturen im Vordergrund, die es erlaubt, Reaktionen auf externe Einflüsse zu vergleichen und zu interpretieren. Die antiproliferativen Eigenschaften lassen sich hier über Dosis-Wirkungsbeziehung hinsichtlich der Überlebensrate beurteilen.

Die begrenzten Therapieoptionen bei der Behandlung des hormonrefraktären Prostatakarzinoms (HRPC) machen die intensive Analyse neuer Therapiemodalitäten im Rahmen einer zytostatischen Therapie erforderlich. 88% der primären Prostatakarzinomzellen und 80% der Metastasen exprimieren den Platelet-derived Growth Factor Rezeptor (PDGF-R), eine Tyrosinkinase. Der selektive Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (ST571) entfaltet seine Wirkung unter anderem beim PDGF-R, indem er über einen kompetitiven Mechanismus die PDGF-R-Autophosphorylierung hemmt und die Signaltransduktionskaskade inhibiert. Therapeutische Erfolge für diese Substanz sind vor allem bei chronisch myeloischen Leukämien und Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die zytotoxische Wirkung von Imatinib in Kombination mit den Substanzen Estramustinphosphat, Etoposid und Docetaxel an den drei humanen Prostatakarzinom-Zelllinien PC-3, DU 145 und LNCaP untersucht.

Die dosisabhängige Veränderung der Proliferationskinetik wurde über das XTT-Assay zunächst bei Applikation von Monosubstanzen getestet. Ausgehend von den ermittelten Werten einer 50%igen Hemmung der Zellproliferation wurden die zytotoxischen Kombinationseffekte für Imatinib und Estramustinphosphat, Imatinib und Etoposid und Imatinib und Docetaxel durch die Isobologramm-Methode nach Steel und Peckham ermittelt. Alle Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit den Substanzen inkubiert und nach weiteren 120 h im XTT-Assay untersucht.

Die Kombination von Imatinib und Estramustinphosphat produzierte bei allen drei Zelllinien additive Effekte. In Kombination mit Etoposid produzierte Imatinib bei der Zelllinie DU 145 additive bis synergistische Effekte und bei den Zelllinie PC-3 und LNCaP additive bis antagonistische Effekte. Für die Kombination von Imatinib mit Docetaxel konnten für die

Zelllinien PC-3 und LNCaP antagonistische Effekte und für die Zelllinie DU 145 additive bis antagonistische Effekte beobachtet werden.

In der Ergebnisinterpretation ist die kombinierte zytotoxische Therapie mit Imatinib und Estramustinphosphat effektiv gegen hormonsensitive und hormoninsensitive Prostatakarzinom-Zelllinien und sollte daher in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit untersucht werden. Die Kombination von Imatinib und Docetaxel hingegen ist wenig effektiv bei der antineoplastischen Therapie des Prostatakarzinoms. Die gute Anwendbarkeit des Monolayerproliferationsassays zur Beurteilung der Wirkung exogener Noxen auf Tumorzellen basiert auf seiner reproduzierbaren und vergleichbaren Wachstumskinetik und erlaubt keine Aussage über spezifische Reaktionen der Zellverbände, z.B. Diffusionsgeschwindigkeit und Bioverfügbarkeit der Substanzen oder Oxygenierung der Zellen. Die ermittelten Primärdaten eignen sich dennoch gut als Richtlinien zur Erstellung neuer Protokolle für die klinische Therapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms.

## Literaturverzeichnis

1. Amling CL, Blute ML, Bergstralh EJ, Seay TM, Slezak J, Zincke H.: „Long-term hazard of progression after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: continued risk of biochemical failure after 5 years“ J Urol 164 (1): 101-105, 2000
2. Armstrong AJ, Carducci MA: „Chemotherapy for advanced prostate cancer: results of new clinical trials and future studies“ Curr Oncol Rep 7 (3): 220-227, 2005
3. Berenbaum MC: „What is Synergy“ Pharmacological Reviews No. 41: 93-141, 1989
4. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ, Lydon NB: „Abl protein tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors“ J Pharmacol Exp Ther 295 (1): 139-145, 2000
5. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG, Druker BJ: „CGP57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL and TEL-PDGFR fusion proteins“ Blood 90 (12): 4947-4952, 1997
6. Chott A, Sun Z, Morganstern D, Pan J, Li T, Susani M, Mosberger I, Upton MP, Bublej GJ, Balk SP: „Tyrosine kinases expressed in vivo by human prostate cancer bone marrow metastases and loss of the type I insulin-like growth factor receptor“ Am J Pathol 155: 1271-1279, 1999
7. Colleoni M, Graiff C, Vicario G, Nelli P, Sgarbossa G, Pancheri F, Manente P: „Phase II study of estramustine, oral etoposide, and vinorelbine in hormone-refractory prostate cancer“ Am J Clin Oncol 20: 383-386, 1997
8. Copur MS, Ledakis P, Lynch J, Hauke R, Tarantolog S, Bolton M, Norvell M, Muhvic J, Hake L, Wendt J: „Weekly Docetaxel and estramustine in patients with hormone-refractory prostate cancer“ Semin Oncol 28(S4): 16-21, 2001
9. Culine S, Kattan J, Zanetta S, Theodore C, Fizazi K, Droz JP: „Evaluation of estramustine phosphate with weekly doxorubicin in patients with androgen-independent prostate cancer“ Am J Clin Oncol 21 (5): 470-474, 1998
10. Dietel M, Arps H, Bals U, Niendorf A: „Individualisierung der Chemotherapie durch prädiktive In-vitro-Bestimmung der Zytostatikasensitivität maligner Tumoren“ Dtsch med Wschr 114, 43: 1645-1652, 1989

11. Druker BJ, O'Brien SG, Cortes J, Radich J: „Chronic Myelogenous Leukemia“ *Hematology*: 111-135, 2002
12. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL: „Efficiency and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia“ *N Engl J Med* 344 (14): 1031-1037, 2001
13. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB: „Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells“ *Nat Med* 2 (5): 561-566, 1996
14. Eisenberger MA, de Wit R, Berry W, Bodrogi I, Pluzanska A, Chi K, Oudard S, Christine T, James N, Tannock U: „A multicenter phase III trial of docetaxel plus prednisone and mitoxantrone plus prednisone in patients with hormone-refractory prostate cancer (HRPC)“ *Proc Am Soc Clin Oncol* 23: 3, 2004
15. Fraley EE, Ecker S, Vincent MM: „Spontaneous in vitro neoplastic transformation of adult human prostatic epithelium“ *Science* 170: 540, 1970
16. Fudge K, Bostwick DG, Stearns ME: „Platelet derived growth factor A and B chain and the a and the b receptors in prostatic intraepithelial neoplasia“ *Prostate* 29 (5): 282-286, 1996
17. Fudge K, Wang CY, Stearns ME: „Immunohistochemistry analysis of platelet-derived growth factor A and B chains and platelet-derived growth factor a and the b receptor expression in benign prostatic hyperplasias and Gleason-graded human prostatic adenocarcinomas“ *Mod Pathol* 7: 549-554, 1994
18. George D: „Receptor tyrosin kinases as rational targets for prostate cancer treatment: platelet-derived growth factor receptor and imatinib mesylat“ *Urology* 60 (Suppl 3A): 115-122, 2002
19. George D: „Targeting PDGF receptors in cancer – rationales and proof of concept clinical trials“ *Adv Exp Med Biol* 532: 141-151, 2003
20. George D: „Platelet-Derived Growth Factor Receptors: A therapeutic Target in Solid Tumors“ *Semin in Oncol* Vol 28, No. 5, Suppl 17: 27-33, 2001
21. Gessner PK: „Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility“ *Toxicology* 105: 161-179, 1995

22. Hegeman RB, Liu G, Wilding G, McNeel DG: „Newer therapies in advanced prostate cancer“ Clin Prostate Cancer 3 (3): 150-156, 2004
23. Heine K, Wolff JM: „Chemotherapy of the hormone-refractory prostate cancer“ Aktuelle Urol 35 (3): 209-214, 2004
24. Hochhaus A, Lahaye T, Kreil S, Berger U, Metzgeroth G, Hehlmann R: „Selektive Hemmung von Tyrosinkinase als neues therapeutisches Prinzip in der Onkologie“ Onkologie 24 (suppl 5): 65-71, 2001
25. Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajzman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA.: „The LNCaP Cell Line - A new Model for Studies on Human Prostatic Carcinoma“ In: G.P. Murphy (ed.), Models for Prostate Cancer, New York; Alan R. Liss.Inc.: 115-132, 1980
26. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP.: „LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma“ Cancer Research 43 (4): 1809-1818, 1983
27. Hudes G, Einhorn L, Ross E, Balsham A, Loehrer P, Ramsey H, Sprandio J, Entmacher M, Dugan W, Ansari A, Monaco F, Hanna M, Roth B: „Vinblastine Versus Vinblastine Plus Oral Estramustine Phosphate for Patients With Hormone-Refractory Prostate Cancer: A Hoosier Oncology Group and Fox Chase Network Phase III Trial“ J Clin Oncol 17: 3160-3166, 1999
28. Hudes GR, Greenberg R, Krigel RL, Fox S, Scher R, Litwin S, Watts P, Speicher L, Tew K, Comis R: „Phase II Study of Estramustine and Vinblastine, Two Microtubule Inhibitors, in Hormone-Refractory Prostate Cancer“ J Clin Oncol 10: 1754-1761, 1992
29. Iversen P, Rasmussen F, Asmussen C, Christensen IJ, Eickhoff J, Klarskov P, Larsen E, Mogensen P, Mommsen S, Rosenkilde P: „Estramustine phosphate versus placebo as second line treatment after orchiectomy in patients with metastatic prostate cancer: DAPROCA study 9002. Danish Prostatic Cancer Group“ J Urol 157 (3): 929-934, 1997
30. Kaighn ME: „Human prostatic epithelial cell culture models“ Invest Urol 17, No 5: 382-385, 1980
31. Kaigh ME, Babcock MS: „Monolayer cultures of human prostatic cells“ Cancer Chem Reports Vol 59, No 1: 59-63, 1975

32. Kaighn ME, Shankar Narayan K, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW: „Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)“ *Invest. Urol* 17, No 1: 16-23, 1979
33. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mano H, Sato Y, Honma Y, Furukawa Y: „In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents“ *Blood* 97 (7): 1999-2007, 2001
34. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mori K, Suzuki K, Adachi KI: „In vitro schedule-dependent interaction between paclitaxel and SN-38 (the active metabolite of irinotecan) in human carcinoma cell lines“ *Cancer Chemoter Pharmacol* 42: 91-98, 1998
35. Kano Y, Suzuki K, Akutsu M, Suda K, Inoue Y, Yoshida M, Sakamoto S, Miura Y: „Effects of CPT-11 in combination with other anti-cancer agents in culture“ *Int J Cancer* 50 (4): 604-610, 1992
36. König JJ, Kamst E, Hagemeyer A, Romijn JC, Horoszewicz J, Schroder FH: „Cytogenetic characterization of several androgen responsive and unresponsive sublines of the human prostatic carcinoma cell line LNCaP“ *Urol Res* 17 (2): 79-86, 1989
37. Ko YL, Small EJ, Kabbinavar F, Chachoua A, Taneja S, Reese D, DePaoli A, Hannah A, Balk SP, Bubley GJ: „A multi-institutional phase II study of SU101, a platelet-derived growth factor inhibitor, for patients with hormone-refractory prostate cancer“ *Clin Cancer Res* 7: 800-805, 2001
38. „Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends“ 64-67, 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken, 2004, Hrsg. RKI, <http://www.rki.de>
39. Kreis W, Budman DR, Calabro A: „Unique synergism or antagonism of combinations of chemotherapeutic and hormonal agents in human prostate cancer cell lines“ *Br J Urol* 79 (2): 196-202, 1997
40. Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, Fabbro D, Fendrich G, Furet P, Meyer T, Zimmermann J: „Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor“ *Eur J Cancer* 38 (suppl 5) 19-27, 2002
41. Mathew P, Fidler IJ, Logothetis CJ: „Combination docetaxel and platelet-derived growth factor receptor inhibition with imatinib mesylate in prostate cancer“ *Semin Oncol* 31 (2 Suppl 6): 24-29, 2004

42. Mathew P, Thall PF, Jones D, Perez C, Bucana C, Troncoso P, Kim SJ, Fidler IJ, Logothetis C: „Platelet-derived growth factor receptor inhibitor imatinib mesylat and docetaxel: a modular phase I trial in androgen-independent prostate cancer“ J Clin Oncol 22 (16): 3322-3329, 2004
43. Miettien M, Lasota J: „Gastrointestinal stromal tumors – definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis“ Virchows Arch 438: 1- 12, 2001
44. Moore CN, George DJ: „Update in the management of patients with hormone-refractory prostate cancer“ Curr Opin Urol 15 (3): 157-162, 2005
45. Muthuramalingam SR, Patel K, Protheroe A: „Management of patients with hormone refractory prostate cancer“ Clin Oncol (R Coll Radiol) 16 (8): 505-516, 2004
46. Okada K, Schröder FH: „Human prostatic carcinoma in cell culture: preliminary report on the development and characterization of an epithelial cell line (EB 33)“ Urol Res 2: 111, 1974
47. Petrylak DP: „Chemotherapy for androgen-independent prostate cancer“ World J Urol 23 (1): 10-13, 2005
48. Petrylak DP: „The current role of chemotherapy in metastatic hormone-refractory prostate cancer“ Urology 65 (5 Suppl): 3-7, 2005
49. Petrylak DP: „Chemotherapy for androgen-independent prostate cancer“ Sem Oncol 20 (3 Suppl 1): 31-35, 2002
50. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED: „Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer“ N Engl J Med 351 (15): 1513-1520, 2004
51. Picus J, Schultz M: „Docetaxel (Taxotere) as monotherapy in the treatment of hormone-refractory prostate cancer: preliminary results“ Semin Oncol 26 (5 Suppl 17): 14-18, 1999
52. Pienta KJ, Fisher EI, Eisenberger MA, Mills GM, Goodwin JW, Jones JA, Dakhil SR, Crawford ED, Hussain MH: „A Phase II trial of estramustine and etoposide in hormone-refractory prostate cancer: A Southwest Oncology Group trial (SWOG 9407)“ Prostate 46 (4): 257-261, 2001

53. Pienta KJ, Smith DC: „Paclitaxel, estramustine, and etoposide in the treatment of hormone-refractory prostate cancer“ *Semin Oncol* 24 (5 Suppl 15): 72-77, 1997
54. Rao KV, Goodin S, Levitt MJ, Dave N, Shih WJ, Lin Y, Capanna T, Doyle-Lindrud S, Juvidian P, Dipaola RS: „A phase II trial of imatinib mesylat in patients with prostate specific antigen progression after local therapy for prostate cancer“ *Prostate* 62 (2): 115-122, 2005
55. Reichardt P, Pink D, Mrozek A, Lindner T, Hohenberger P: „Gastrointestinal stromal tumors (GIST)“ *Z Gastroenterol* 42 (4): 327-331, 2004
56. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL: „An improved colorimetric assay for cell proliferation and vialbility utilizing the tetrazolium salt XTT“ *J Immunol Methods* 142: 257-265, 1991
57. Rohl L: „Prostatic hyperplasia and carcinoma studies with tissue culture techniques“ *Act Chir Scand (Suppl)*: 240, 1959
58. Savarese DM, Halabi S, Hars V, Akerley WL, Taplin ME, Godley PA, Hussain A, Small EJ, Vogelzang NJ: „Phase II Study of docetaxel, estramustine and low-dose hydrocortisone in men with hormone-refractory prostate cancer: a final report of CALGB 9780“ *J Clin Oncol* 19 (9): 2509-2516, 2001
59. Schriftenreihe „Therapieempfehlungen“ des Interdisziplinären Tumorzentrum Tübingen „Prostatakarzinom“ S. 4, 2004
60. Schriftenreihe des Tumorzentrums München „Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Urogenitale Tumoren“ 1-42, 3. Auflage 2003
61. Schrodtt GR, Foreman CD: „In-vitro maintainance of human hyperplastic prostate tissue“ *Invest Urol* 9: 85, 1971
62. Smith MR, Nelson JB: „Future therapies in hormone-refraktory prostate cancer“ *Urology* 65 (5 Suppl): 9-16, 2005
63. Steel GG, Peckham MJ: „Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity“ *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 85-91, 1979
64. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF: „Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)“ *Int J Cancer* 21: 274-281, 1978

65. Stonington OG, Szweg N, Webber M: „Isolation and Identification of the Human Prostatic Epithelial Cell in pure Monolayer Culture“ J Urol 114: 903-908, 1975
66. Sühnel J: „Parallel Dose-Response Curves in Combination Experiments“ Bull Math Biol 60(2): 197-213, 1998
67. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA: „Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer“ N Engl J Med 351 (15): 1502-1512, 2004
68. Topaly J, Zeller WJ, Fruehauf S: „Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells“ Leukemia 15: 342-347, 2001
69. Van Steenbrugge GJ, Groen M, van Dongen JW, Bolt J, van der Korput H, Trapman J, Hasenson M, Horoszewicz J: „The human prostatic carcinoma cell line LNCaP and its derivatives. An overview“ Urol Res 17 (2): 71-77, 1989
70. Wagenpfeil S, Treiber U, Lehmer A: Isobologram analysis in MATLAB for combined Effects of two agents in dose-response Experiments“ In: Perner P, Brause R, Holzhütter HG (editors) Medical Data Analysis, Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag: 47-54, 2003
71. Williams LT: „Signaltransduction by the platelet-derived growth factor receptor“ Science 243, 1564-1570, 1989
72. Wirth M, Altwein JE: „Chemotherapy of prostatic carcinoma“ Urologe A: 30 (1): 17-24, 1991
73. Wolff JM: „Das hormonrefraktäre Prostatakarzinom“ S. 12, UNI-MED Verlag-AG, Bremen, 2001
74. Zhang P, Gao WY, Turner S, Ducatman BS: „Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro“ Mol Cancer 2: 1-9, 2003
75. Zincke H, Oesterling JE, Blute ML, Bergstralh EJ, Myers RP, Barrett DM: „Long-term (15 years) results after radical prostatectomy for clinically localized (Stage T2c or lower) prostate cancer“ J Urol 152: 1850-1857, 1994

# Anhang

## Lebenslauf

### Sebastian Wutzler

Geburtsdatum: 16.09.1977 in Bonn

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Schulbildung**

---

06/97 Abitur am städt. Ernst-Moritz-Arndt Gymnasium in Bonn

09/94-03/95 Owings Mills High School Maryland, USA

### **Zivildienst**

---

07/97-08/98 Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst Bonn

### **Studium**

---

10/98-02/01 Vorklinisches und klinisches Medizinstudium an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

09/00 Physikum

02/01-04/04 Klinisches Studium an der Technischen Universität München

08/01 1. Staatsexamen

04/04 2. Staatsexamen

04/04-03/05 Praktisches Jahr:  
1. Tertian in der Abteilung für Urologie des Hospital San Juan de Alicante, Spanien  
2. Tertian in der Abteilung für Chirurgie des Städtischen Klinikums Bogenhausen, München  
3. Tertian in der Abteilung für Innere Medizin des Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, München

04/05 3. Staatsexamen (Gesamtnote 1,66)

05/05 Approbation als Arzt

seit 06/05 Assistenzarzt an der Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

## **Danksagung**

Für das Thema und die Möglichkeit zur Promotion möchte ich mich bei Herrn PD Dr. R. Paul und Herrn Prof. Dr. R. Hartung bedanken. Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. H. Kübler für die geduldige Betreuung der Arbeit.

Den Mitarbeitern des Urologischen Forschungslabors des Klinikums Rechts der Isar, allen voran Frau Dr. A. Lehmer, die mir jederzeit und geduldig wertvolle Ratschläge gab, sowie Frau Doris Langer und Frau Stephanie Rämisch möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken. Herrn Dominik Blanz und Herrn Stephan Hundertmark danke ich für die Korrekturen der Arbeit. Herrn PD Dr. S. Wagenpfeil möchte ich außerdem für die Ratschläge bei der statistischen Auswertung danken. Ebenso möchte ich meiner Familie und meiner Freundin Katharina danken, die mich fortwährend motiviert und zu jeder Zeit unterstützt haben.