

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

Proliferation und Apoptose von Prostatakarzinomzelllinien unter dem Einfluss von
Topotecan, Etoposid, Estramustinphosphat und Docetaxel

Meike B. A.-R. Adam

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. H. van Randenborgh
2. Univ.-Prof. Dr. J. E. Gschwend

Die Dissertation wurde am 14.06.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.09.2010 angenommen.

für meine Familie

Gliederung	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	5
1.1 Das Prostatakarzinom	5
1.1.1 Epidemiologie	5
1.1.2 Ätiologie	6
1.1.3 Der hormonelle Regelkreis	8
1.1.4 Entstehung der Hormonresistenz	10
1.1.5 Chemotherapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms	12
1.1.5.1 Monotherapien	13
1.1.5.2 Taxanbasierte Chemotherapie	14
1.1.5.3 Estramustinbasierte Chemotherapie	15
1.1.5.4 Mitoxantrone	16
1.1.5.5 Topoisomerasehemmer	17
1.1.5.6 Etoposid	18
1.1.5.7 Camptothecin	18
1.1.5.8 Bisphosphonate	19
1.1.6 Innovative Strategieansätze	20
1.2 Mechanismen des Zelltodes	21
1.2.1 Nekrose	21
1.2.2 Apoptose	21
1.2.3 Unterschiede der Nekrose und Apoptose	24
1.3 Isobologramme	24
1.4 Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Zelllinien	26
2.1.1 LNCaP	26
2.1.2 DU-145	26
2.1.3 PC-3	26
2.2 Medien	27
2.2.1 Lösungen, Chemikalien und Testansätze	28
2.2.2 Geräte und Material	29
2.2.3 Zytostatika	29

Gliederung	2
2.2.3.1 Topotecan	29
2.2.3.2 Etoposid	30
2.2.3.3 Docetaxel	31
2.2.3.4 Estramustinphosphat	31
2.3 Zellkultivierung	32
2.3.1 Kulturbedingungen	32
2.3.2 Subkultivierung	32
2.3.3 Kryokonservierung	33
2.4 Testverfahren	33
2.4.1 Erstellen von Dose-Response-Kurven	33
2.4.2 Apoptosenachweisverfahren	35
2.4.2.1 Annexin-V-Fluos	36
2.4.2.2. Messung der SubG ₀ G ₁ -Population	37
2.4.2.3 M30-Testverfahren	37
2.5 Auswertung	38
2.5.1 Dose-Response-Kurven	38
2.5.2 Isobologramm	39
3 Ergebnisse	43
3.1 Proliferation	43
3.1.1 Monotherapie	43
3.1.1.1 Etoposid	43
3.1.1.2 Topotecan	45
3.1.1.3 Docetaxel	48
3.1.1.4 Estramustinphosphat	50
3.1.2 Kombinationstherapien	53
3.1.2.1 LNCaP-Zelllinie	53
3.1.2.1.1 Etoposid und Topotecan	53
3.1.2.1.2 Docetaxel und Topotecan	57
3.1.2.1.3 Estramustinphosphat und Topotecan	59
3.1.2.2 DU-145-Zelllinie	63
3.1.2.2.1 Etoposid und Topotecan	63
3.1.2.2.2 Docetaxel und Topotecan	65
3.1.2.2.3 Estramustinphosphat und Topotecan	68

Gliederung	3
3.1.2.3 PC-3-Zelllinie	71
3.1.2.3.1 Etoposid und Topotecan	71
3.1.2.3.2 Docetaxel und Topotecan	74
3.1.2.3.3 Estramustinphosphat und Topotecan	77
3.1.2.4 Zusammenfassung der Kombinationstherapien	81
3.2 Apoptose	82
3.2.1 Annexin-Färbung	82
3.2.2 Messung der SubG0G1-Population	84
3.2.3 M30-Antikörpernachweis	86
3.2.4 Vergleich der einzelnen Testergebnisse	87
4 Diskussion	90
4.1 Einführung	90
4.2 Proliferation der Monotherapien	91
4.3 Proliferations der Kombinationstherapien	94
4.3.1 Etoposid und Topotecan	94
4.3.2 Docetaxel und Topotecan	96
4.3.3 Estramustinphosphat und Topotecan	97
4.4 Apoptose	99
5 Zusammenfassung	102
6 Literaturverzeichnis	105
7 Abbildungsverzeichnis	124
8 Tabellenverzeichnis	127
9 Danksagung	129
10 Lebenslauf	130

Abkürzungsverzeichnis

ABM	Antibiotic Antimycotic Solution
9-AC	9-Aminocamptothecin
AP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
bcl-2	B-cell lymphoma 2
casp	Caspase
CLS	Cell Line Service
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMP	Estramustinphosphat
FKS	Fetales Kälberserum
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HPC-1	Hereditary prostate cancer-1
HRP	hormonrefraktäres Prostatakarzinom
k.A.	keine Angabe
LH-RH	luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
LOH	Loss of heterozygosity
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NEAS	Nichtessentielle Aminosäuren
n.s.	nicht signifikant
PCA	Prostatakarzinom
PI	Propidiumiodid
PMS	Phenazine Methosulfate
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RPTK	Receptor Protein Tyrosin Kinase
s.	signifikant
TPT	Topotecan
TXT	Taxotere
unb.	unbehandelt

1 Einleitung

As the eyes grow dim, the trunk bends, the cartilages ossify, and the arteries change in their coats, so the prostate is supposed to grow large and hard...

James Miller, 1864

1.1 Das Prostatakarzinom

Die Prostata (abgeleitet vom Griechischen *prostátēs*: vorstehen) ist eine akzessorische Geschlechtsdrüse des Mannes und besteht neben dem Drüsengewebe aus einem dichten Flechtwerk von glatten Muskelzellen und Bindegewebe. Prostataveränderungen sind typische Erkrankungen des älteren Mannes; sie treten ab dem 50. Lebensjahr bei jedem zweiten Mann auf. Dabei kann es sich um eine gutartige Vergrößerung der Drüse handeln, die sogenannte benigne Prostatahyperplasie, oder als schwerwiegendere Erkrankung um das Prostatakarzinom, bei dem sich eine bösartige Geschwulst im Gewebe bildet.

1.1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen des Mannes. In den USA und Westeuropa stellt es die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache der männlichen Bevölkerung nach dem Bronchialkarzinom dar (Nelson 2003b).

Im Jahr 2006 erkrankten nach Schätzungen 234.460 Männer in den USA neu an dieser Krebsart. 27.870 Männer starben in diesem Jahr an einem Prostatakarzinom (Jemal 2006). Auch die Anzahl der Neuerkrankungen nimmt weiter zu: Während in den USA im Jahr 1981 109 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner auftraten, lag im Jahr 2001 die Inzidenz des Prostatakrebs bereits bei 179/100000 (Jemal 2005). Die hohe Zahl von Neuerkrankungen hängt unter anderem mit der steigenden Lebenserwartung zusammen. Als weiterer Faktor sind die Methoden zur Früherkennung des Prostatakrebs zu nennen, die in den vergangenen Jahren dazu geführt haben, dass mehr Prostatakarzinome diagnostiziert wurden. Durch optimierte Screening-Verfahren konnte so die Rate der Patienten, die bei Diagnosestellung bereits an einem metastasierten Prostatakarzinom erkrankt waren, von 33% auf 7% gesenkt werden (Wolff et al, 2004).

Auch die Behandlungsmethoden sind in der Vergangenheit sukzessive verbessert worden. Allerdings ist eine Heilung bislang nur möglich, wenn das entartete Gewebe die Organgrenzen noch nicht überschritten hat und keine Metastasen vorliegen. Im lokalisierten Stadium wird das Prostatakarzinom durch chirurgische Resektion,

Strahlentherapie, Brachytherapie oder durch eine Unterdrückung der Androgenproduktion, die chirurgisch und medikamentös erfolgen kann, behandelt.

Die Kastration ist dabei eine palliative Therapie, die sofort, verzögert oder intermittierend eingesetzt wird. Nach der Hormondeprivation kann sich jedoch in über 80% der Fälle aus einem primär androgen-abhängigen Tumor ein hormonunabhängiger Tumor entwickeln.

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist nicht geklärt. Als Ursache für das Entstehen dieser Krebsart wird eine multifaktorielle Genese angenommen.

In der gesunden Prostata herrscht ein Gleichgewicht zwischen proliferierenden und absterbenden Zellen durch Apoptose. Die Zeit bis zur kompletten Erneuerung der Epithelschicht beträgt in der gesunden Drüse circa 500 Tage (Berges 1995b). Wird diese Balance durch Transformation normaler Prostataepithelzellen in präneoplastische, intraepitheliale Neoplasien verschoben, nehmen sowohl proliferierende als auch absterbende Zellen zu; es kommt bei einem Ungleichgewicht auf Seite der Proliferation zu einem erhöhten Zellumsatz. In der Folge genetischer Transformationen kann durch eine erhöhte Proliferationsrate bei gleichzeitig verminderter Apoptose ein Nettowachstum des Gewebes resultieren. So ergeben sich in der erkrankten Prostata deutlich verkürzte Verdopplungszeiten von 33 bis 126 Tagen (Berges 1995a). Man nimmt an, dass durch den erhöhten Zellumsatz weitere genetische Veränderungen wahrscheinlicher werden und so das Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms steigt.

Neben den molekulargenetischen Faktoren scheinen auch Ernährung und Lebensstil bei der Genese eine Rolle zu spielen. Zudem zeigen sich zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen große Unterschiede in der Inzidenz. In den USA ist die Rate der Neuerkrankungen mehr als zweimal so hoch wie in Schweden und Australien, mehr als dreifach so hoch wie in Europa und zehnmals so hoch wie in Asien (Singapur, Japan, Indien und China) (Quinn 2002). Die schwarze Bevölkerung der USA scheint dabei ein erhöhtes Risiko zu haben, an einem malignen Prostataatumor zu erkranken. Auch der Krankheitsverlauf ist zwischen den ethnischen Gruppen unterschiedlich: So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Stadien des PCA bei Schwarzen bei 62%, hingegen bei Weißen bei 72%. In einer Studie an in die USA immigrierten Japanern wurde gezeigt, dass sich das Erkrankungsrisiko nach einiger Zeit angleicht (Shimizu 1991). Als Grund hierfür werden Umweltbedingungen und veränderte Ernährungsgewohnheiten genannt. In den USA scheint die fettreiche und faserarme Nahrung ein wichtiger Risikofaktor zu sein. Den Vitaminen A, D und E sowie dem Spurenelement Zink wird hingegen eine

protektive Wirkung zugeschrieben. Giovanucci zeigte mit der Health-Professional-Followup-Studie, dass durch den regelmäßigen Konsum von Lycopenen, die beispielsweise in Tomaten enthalten sind, das Erkrankungsrisiko sinkt (Giovanucci 2002).

Bedeutsam ist auch die genetische Disposition: so sind 10-15% aller Prostatakarzinome hereditär bedingt. In Studien an Zwillingspaaren konnte gezeigt werden, dass sich das relative Risiko für den monozygotischen Zwillingsbruder eines an einem Prostatakarzinom erkrankten Patienten um das 12,3fache erhöht. (Lichtenstein 2000). Als eine genetische Veranlagung für Prostatakrebs wurde das HPC-1-Gen (Dong 1997) auf Chromosom 1 in der Region q24 beschrieben (Cooney 1997). Mittlerweile sind eine Vielzahl von Keimzellmutationen, Tumorsuppressorgenen und Onkogenen bekannt, die an der Tumorentstehung beteiligt sind.

Durch Veränderungen der Chromosomen und der Genexpression werden nicht nur die Zellproliferation und die Apoptoserate beeinflusst, sondern auch die Angiogenese und die Metastasierung des Tumors. Mehrere LOH-Studien (Loss of heterozygosity) fanden unter anderem Deletionen im Bereich der Chromosomen 8p, 10q, 13q, 16q, 17q und 18q. Fast 70% der Patienten mit einem lokal begrenzten PCA besitzen Deletionen auf Chromosom 8p22. (Macoska 1994) Etwa 36% der Patienten mit lokal begrenztem Tumorleiden und etwa 60% der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom weisen Deletionen im Bereich des Chromosoms 16q auf, auf dem sich das Tumorsuppressorgen befindet, das E-Cadherin codiert (Isaacs 1995). E-Cadherin ist ein Zelloberflächenmolekül, das die Zell-Interaktionen beeinflusst. Der Verlust des Moleküls erhöht die Fähigkeit der mutierten Karzinomzellen das Gewebe zu verlassen und Metastasen zu bilden (Umbas 1994). Anwar et al fanden (Anwar 1992) bei ca. 25% japanischer Prostatakarzinompatienten eine Mutation des ras-Onkogens. Zu weiteren Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen, die an der Karzinogenese beteiligt sind, zählen z.B. das Retinoblastom-Gen (Bookstein 1990), das KAI1-Gen (Dong 1995) sowie p53.

Das Alter der Patienten ist der wichtigste Risikofaktor. Man spricht deshalb beim Prostatakarzinom von einer Erkrankung des alten Mannes. Mit wachsendem Lebensalter steigt die Inzidenz der Erkrankung sprunghaft an. Autopsien von Männern zwischen 30 und 40 Jahren haben bei 2,9% ein Prostatakarzinom entdeckt; in der Altersgruppe zwischen 60 und 70 Jahren waren bereits 64% der Untersuchten betroffen. (Nelson 2003a). Eine Studie ergab, dass mit steigendem Alter und fortgeschrittener Tumorerkrankung strukturelle Veränderungen der DNA verbunden sind (Malins 2003).

1.1.3 Der hormonelle Regelkreis

Auch wenn die Früherkennungsprogramme deutliche Erfolge zeigen, sind einige Prostatakarzinome bei der Erstdiagnose bereits metastasiert. Bei diesen Patienten müssen systemische Therapien eingesetzt werden. Eine wichtige Therapieoption besteht dabei darin, die Androgenwirkung auf die Tumorzelle zu blockieren. Der Einfluss der Androgene auf das Wachstum des Prostatakarzinoms wurde bereits 1941 vom späteren Nobelpreisträger Charles Brenton Huggins nachgewiesen.

Körpereigene Hormone werden nach chemischer Struktur und Herkunft klassifiziert. Man unterscheidet Steroidhormone (z.B. Aldosteron, Cortisol, Estradiol, Östrogen, Testosteron), Polypeptidhormone (z.B. die im Hypothalamus gebildeten Releasinghormone), Amine (z.B. Thyroxin (T4), Trijodthyronin, Adrenalin, Histamin, Noradrenalin) und Fettsäurederivate (Prostaglandine, Leukotriene). Um den hormonellen Regelkreis zu beschreiben, wird im Folgenden nur auf die Hormone eingegangen, die im Zusammenhang mit der Wirkung auf die Androgensynthese beim Mann von Bedeutung sind.

Das oberste Kontrollorgan des androgenen Hormonhaushalts ist der Hypothalamus, der durch Ausschüttung der Releasing-Hormone in das obere Portalkreislaufsystem die Freisetzung zahlreicher Hormone in der Adenohypophyse steuert.

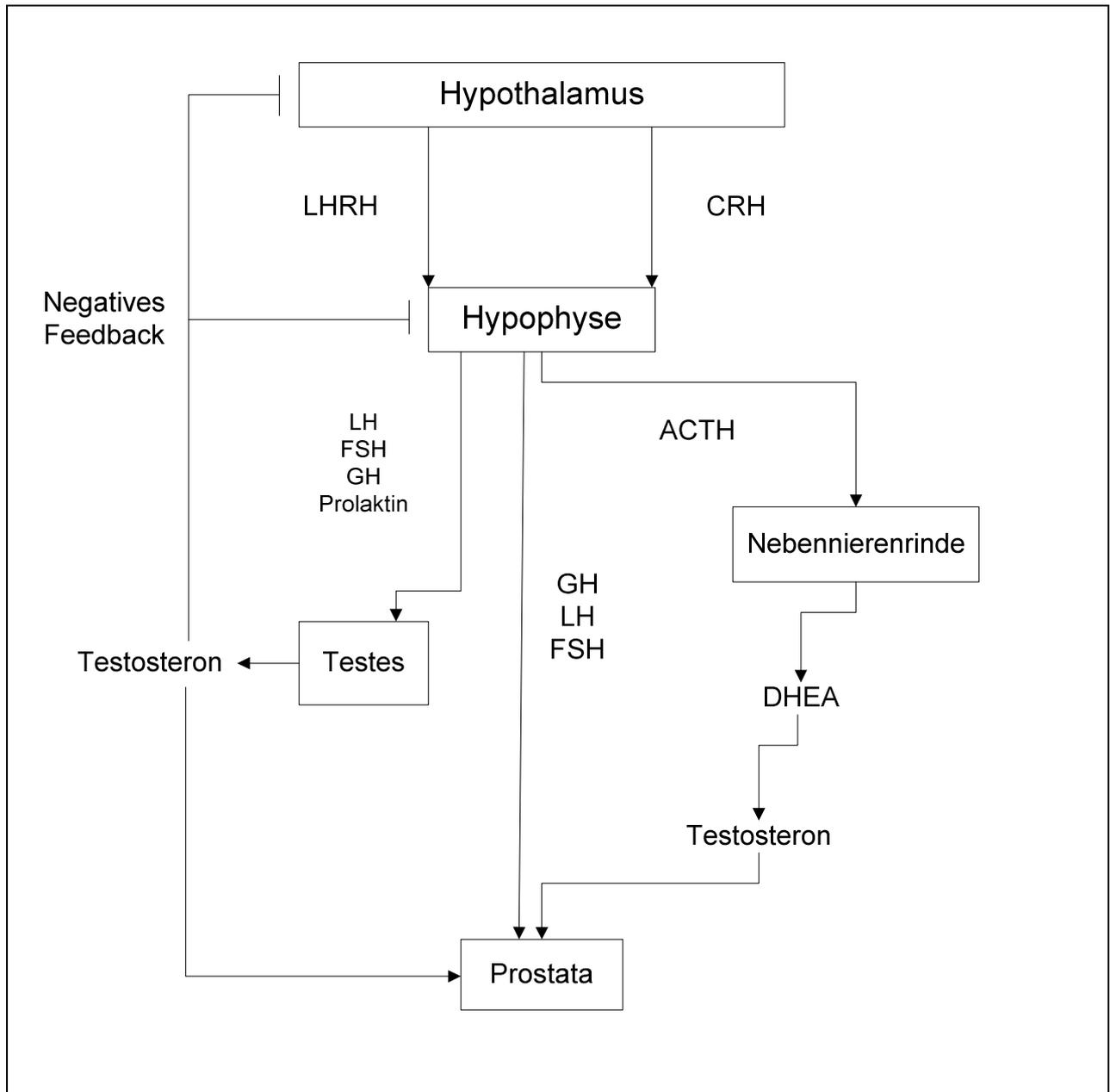


Abbildung 1: hormoneller Regelkreis

Hormone hypothalamischen Ursprungs

Das Luteinisierende Hormon-Releasing-Hormon (Yasin 1995) (Syn.: Gonadotropin-Releasing-Hormon, GnRH) wird pulsatil sezerniert und bewirkt die Freisetzung des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und des Luteinisierenden Hormons (LH).

Nach Ausschüttung des Corticotropin Releasing Hormons (CRH) wird Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) in der Hypophyse synthetisiert.

Hormone hypophysären Ursprungs

Das Luteinisierende Hormon wird in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet und unter dem Einfluss von GnRH freigesetzt. Ein Teil des LH wird sofort nach seiner Synthese direkt und konstitutiv sezerniert. Die Leydig-Zellen des Hodens werden über LH zur Testosteronproduktion stimuliert.

Die Freisetzung von FSH wird vor allem durch eine niedrige Pulsfrequenz von GnRH induziert (Yasin 1995). FSH regt über die Sertolizellen die Spermatogenese an. Außerdem führt es zu einer Vergrößerung der Samenkanälchen im Hoden und zu einer vermehrten Bildung von Testosteron in den Sertolizellen.

Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) ist ein zu den Gonadotropinen gehörendes Proteohormon, das im Hypophysenvorderlappen gebildet wird. Es bewirkt in der Nebennierenrinde die Bildung androgener Substanzen.

Die Wirkung des Testosterons auf die Prostatazelle

95% des Testosterons wird im Hoden von den Leydigzwischenzellen, der Rest durch periphere Konversion anderer Steroide gebildet. Nach Transfer durch die Zellmembran wird das fettlösliche Testosteron durch die 5 α -Reduktase in das aktive Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. DHT bildet mit dem zytoplasmatischen Androgenrezeptor einen Androgen-Rezeptor-Komplex, der durch Konformationsänderung aktiviert wird. Nach Translokation in den Zellkern wird durch Bindung an die DNA die Transkription von Genen initiiert, die unter anderem zur Steigerung der Proliferation und Differenzierung androgenabhängiger Gewebe und zur Unterdrückung des programmierten Zelltodes.

1.1.4. Entstehung der Hormonresistenz

Da das Wachstum des Prostatakarzinoms in vielen Fällen noch stark testosteronabhängig ist, kommt es durch Androgensuppression meist zu einem Rückgang bzw. Stillstand der Krankheit. Fast immer entwickelt sich aber aus einem primär androgenabhängigen in einen hormonunabhängigen Tumor. In der Literatur werden verschiedene Theorien genannt, die die Entstehung des hormonrefraktären Prostatakarzinoms erklären. Die Mechanismen, die letztlich zu einer Hormonunabhängigkeit führen, sind jedoch nur cursorisch erforscht.

Die Klonselktionstheorie

Die unterschiedlichen Phänotypen der Tumorzellen (Stamey 1988) berücksichtigt die Klonselktionstheorie. Diese geht davon aus, dass bereits primär ein Nebeneinander von hormonabhängigen und hormonunabhängigen Zellen besteht. (Isaacs 1991, Logothetis 1994) Nach Androgenentzug werden androgeninsensitive Tumorzellen selektiert, da es durch die Hormontherapie zur Apoptose der androgensensitiven Zellen kommt (Tang 1997). Am Shionogi-Karzinommodell konnte diese Theorie untermauert werden: nach Androgenablation vergrößerte sich hier der Anteil androgenunabhängiger Stammzellen um den Faktor 500 (Bruchovsky 1990).

Die Adaptionstheorie

Dieses Konzept geht davon aus, dass sich homogene hormonsensible Zellklonen an eine sich verändernde Umgebung anpassen können. Sie adaptieren sich nach primärer Androgenblockade an ein androgenarmes Milieu. Eine Tumorprogression wäre nur durch eine vollständige Androgenblockade aufzuhalten, die neben den testikulären auch die adrenalen Androgene einschließen müsste. Dieser Erklärungsversuch vernachlässigt jedoch die primäre Heterogenität des Tumors durch die genetische Instabilität der Zellen (Isaacs 1982). Tumorzellen liegen als unterschiedliche Phänotypen vor, so dass nicht alle Zellen adaptieren.

Mehrere Adaptationsmechanismen sind vorstellbar.

Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Androgenresistenz spielt der Androgenrezeptor (AR), der auf dem X-Chromosom, Xq11-12, lokalisiert ist. Seit der Entdeckung einer Punktmutation im Codon 877 des AR-Gens der LNCaP-Prostatakarzinomzelllinie (Veldscholte 1990) wurden weitere Mutationen in Karzinomzelllinien gefunden. Die Literatur vermutet bei 20-40% aller malignen Prostatatumore Punktmutationen des Androgenrezeptors. In Metastasen finden sich bereits bei fünf von zehn Patienten Mutationen des AR (Taplin 1995). Diese Zahlen lassen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Malignität des Tumors und der Alteration der Androgenrezeptoren schließen. Die Sensitivität des Rezeptors wird erhöht; die Entwicklung eines androgeninsensitiven Prostatakarzinoms ist möglich.

Aufgrund niedriger Androgenspiegel können zudem durch die Amplifikation des AR vermehrt Rezeptoren exprimiert werden, so dass ein Tumorwachstum trotz eines androgenarmen Milieus weiterhin möglich ist. Amplifikationen des Androgenrezeptors wurden z.B. bei 23% der Fälle in androgenunabhängigen Karzinomen gefunden (Visakorpi 1995).

Ein weiterer Erklärungsversuch für die Entwicklung eines hormonrefraktären Prostatakarzinoms ist eine Dysregulation der Apoptose. Veränderungen des bcl-2-Protoonkogens können Ursache sein für eine verminderte Apoptose (Navone 1993). Auch die Überexpression von bcl-2 und p53, sowie die Inaktivierung des Retinoblastoma-Gens scheinen für die Progression des PCA wesentlich zu sein (Bookstein 1997, MacGrogan 1997, Theodorescu 1997). Bei hormonrefraktären Tumorzellen konnten Mutationen von p53 bei 16 von 17 Patienten gefunden werden, während diese bei nur 6 von 27 Patienten mit einem unbehandelten primären Prostatakarzinom nachgewiesen wurden (Heidenberg 1995).

Wirkung von Wachstumsfaktoren

Ein wichtiger Mechanismus für die Progression des Prostatakarzinoms ist die Liganden-unabhängige Aktivierung des AR durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie dem Insulin-like-growth-factor IGF-I, dem Transforming growth factor-beta (TGF- β) dem Keratinozyten growth factor (KGF), dem epidermal growth factor (EGF), dem Interleukin 6 und Aktivatoren des Proteinkinase A Signalwegs (Culig 1994, Jenster 1999, Sadar 1999, Sadar 1999).

Eine Androgenblockade führt zu einer Bildung dieser Wachstumsfaktoren, da es zu einer Dereprimierung androgensupprimierter Zellen kommt.

1.1.5 Chemotherapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms

12 bis 18 Monate nach Beginn der Androgenablation kommt es bei 50% der Prostatakarzinomzellen zu einer Hormonresistenz (Eisenberger 1999), so dass nach durchschnittlich drei bis fünf Jahren die Hormontherapie nicht mehr anspricht (Abrahamsson 2005). Diesen Patienten kann eine nichthormonelle systemische Chemotherapie angeboten werden, um eine Verlangsamung des Tumorwachstums und eine Symptomverbesserung zu erreichen. Anfang der 70er Jahre wurden verschiedene Chemotherapien gegen das Prostatakarzinom umfassend getestet. Die Remissionsraten waren jedoch sehr gering. Trotz zahlreicher Studien konnte kein Überlebensvorteil gezeigt werden; außerdem war die therapieinduzierte Toxizität teilweise immens (Wirth 2003).

Yagoda et al. (Yagoda 1993) fassten die Ergebnisse von 26 Studien zusammen, die zwischen 1988 und 1991 durchgeführt wurden. Es zeigten sich eine Gesamtansprechrate von 8,7% und kein medianer Überlebensvorteil durch eine Chemotherapie. Die schlechte Wirksamkeit wurde dabei mit der geringen Proliferations-

und Zellverluste des sehr langsam wachsenden Prostatakarzinoms erklärt. Daher scheinen Chemotherapeutika, die in die Zellteilung eingreifen, für die Therapie des Prostatakarzinoms weniger geeignet zu sein. So rückte man von der Chemotherapie als kurative Behandlungsoption beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom ab und setzte sie nur als palliative Behandlung ein, um z. B. tumorbedingte Knochenschmerzen zu reduzieren.

1.1.5.1 Monotherapien

Viele Substanzen sind in Studien bei Patienten mit hormonrefraktären PCA getestet worden. Die Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse von Phase II-Studien (Mitoxantron-Daten von Phase II- und III-Studien) (Bhandari 2005).

Substanz	Patienten n=	PSA ↓ ≥50% (in %)	Ansprechen (%)	Zeit bis Progression (in Jahren)	Überleben (in Monaten)
Docetaxel	138	38-46	28	4,6-5,1	9,4-27
Paclitaxel	126	4-39	17	3,7-8,1	9-13,5
Mitoxantrone	255	33-48	13	k. A.	12,3-23
Cyclophosphamide	53	4	k. A.	k. A.	8-12,7
Estramustine	42	21	k. A.	2,9-3	k. A.
Doxorubicin	135	k. A.	9	3,5-4,3	8-10,8
Epirubicin	260	24-32	61	k. A.	9-13

Tabelle 1: Studien bei Einsatz von Docetaxel, Paclitaxel, Mitoxantrone, Cyclophosphamid, Estramustine, Doxorubicin und Epirubicin

Die Taxane wurden am häufigsten getestet. Sie besitzen sowohl mitotische als auch nicht-mitotische Wirkungen. Besonders der Einsatz von Docetaxel ist erfolgversprechend. Bei 38-46% der Patienten fiel das PSA um 50% des Ausgangswerts; die Remissionsrate ist mit 28% nach Epirubicin am höchsten. Der Focus richtet sich neben den Taxanen auf die Chemotherapeutika Mitoxantron und Estramustin. Im Folgenden soll auf diese Gruppen auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika näher eingegangen werden.

1.1.5.2 Taxanbasierte Chemotherapie

Taxane führen zu einer beschleunigten Polymerisation von Tubulin-Dimeren zu Mikrotubuli, die in ihrer Funktion gestört sind. Durch Hemmung der Depolymerisation werden die Mikrotubuli stabilisiert. Der Spindelapparat der Zelle wird dadurch zerstört, die Zellteilung wird behindert und vitale Zellfunktionen werden blockiert. Dadurch geht die Zelle in Apoptose. Zudem kommt es durch Phosphorylierung des Onkogens bcl-2 zu einer bcl-xl-Downregulierung (Stein 1999).

Das zur Gruppe der Taxane gehörende semisynthetisch hergestellte Docetaxel wurde erstmals 1995 zur Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms zugelassen. Das Alkaloid stammt aus der europäischen Eibe (*Taxus baccata*), einem langsam wachsenden Nadelbaum. Als Nebenwirkung kann es durch erhebliche Flüssigkeitsretention zu Ödemen („fluid lung“) kommen. Dosislimitierend ist vor allem die Knochenmarkssuppression.

Mit Docetaxel konnte erstmals ein Durchbruch in der Chemotherapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms erreicht werden. Zwei randomisierte Phase III-Studien (SWOG 9916 (Petrylak 2004) und TAX 327 (Tannock 2004)) mit insgesamt 1800 Patienten haben erstmals eine Verlängerung des Überlebens bei Männern mit einem bereits metastasiertem HRPC durch eine taxanhaltige Chemotherapie gezeigt. Der Vergleichsarm war in beiden Studien Mitoxantron. In der Tax 327-Studie wurde durch Docetaxel ein statistisch signifikant längeres Überleben von 2,5 Monaten, erwirkt, außerdem im Vergleich zu Mitoxantron höhere PSA-Ansprechraten und ein günstigeres schmerztherapeutisches Ansprechen. In der SWOG 9916-Studie ergab sich eine Überlebensverlängerung von zwei Monaten.

Studie	Patienten n=	PSA ↓ ≥50% (in %)	Mittleres Überleben (in Monate)
TAX 327*	1006	46,5	18,15
SWOG 9916 **	770	50	17,5

Tabelle 2 : Zulassungsstudien zum Einsatz von Docetaxel

* 335 Patienten behandelt mit 75mg/m² Docetaxel alle 3 Wochen plus Prednison (5mg 2x/d), 334 Patienten behandelt mit 30mg/m² Docetaxel pro Woche über 5 Wochen plus Prednison (5mg 2x/d) und 337 Patienten 12mg/m² Mitoxantron alle 3 Wochen plus Prednison (5mg 2x/d)

** 338 Patienten behandelt mit 60mg/m² Docetaxel und 250mg Estramustin alle 3 Wochen und 336 Patienten behandelt mit 12mg/m² Mitoxantron alle 3 Wo. und 5mg Prednison 2x/d

1.1.5.3 Estramustinbasierte Chemotherapie

Estramustin wurde Mitte der 60er Jahre speziell für die Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms nach sekundärer Hormontherapie synthetisiert.

Estramustinphosphat ist ein stabiles Konjugat aus Estradiol-17β-Phosphat und dem Alkylans Nor-Stickstoff-Lost, das über eine Carbaminsäure miteinander verbunden ist. Es gehört zur Klasse der Alkylanzien und bewirkt durch Bindung an den Mikrotubulusapparat eine Depolymerisation der zytoplasmatischen Mikrotubuli und Mikrofilamente. Zusätzlich führt es zu einer DNA- und RNA-Alkylierung.

In 18 Phase-II-Studien mit Estramustinphosphat als Monotherapie wurde eine durchschnittliche objektive Ansprechrate von 20% ermittelt (Benson 1990). In Kombination mit anderen am Tubulin angreifenden Substanzen zeigte sich in vivo eine synergistische beziehungsweise additive zytostatische Wirkung. Eine erste getestete Kombination bestand aus Estramustinphosphat und Vinblastin. Hudes et al. (Hudes 1992) stellten fest, dass bei 61,1% der untersuchten Patienten ein PSA-Abfall von mehr als 50% zu sehen war.

In einer Phase-III-Studie wurde EMP versus EMP in Kombination mit Vinblastin getestet (Hudes 1999). Durch die Kombination wurde eine verzögerte Progression und eine Abnahme Vinblastin-induzierter Granulozytopenien erreicht. Das Gesamtüberleben unterschied sich aber nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Andere Daten belegen, dass durch eine Estramustin-basierte Kombinationstherapie unerwünschte Nebenwirkungen begünstigt werden. Die SWOG-9916-Studie zeigt starke Nebenwirkungen von Estramustin in Kombination mit Docetaxel. So traten während der

Kombinationstherapie bei 20% der Patienten Nausea und bei 15% der Patienten kardiovaskuläre Ereignisse und Blutgerinnungsstörungen auf. In der TAX 327-Studie, die Docetaxel als Monosubstanz testete, wurden diese Nebenwirkungen hingegen nicht beobachtet. Die Dosisabhängigkeit der Nebenwirkungen spielt eine wichtige Rolle. Beim Vergleich zweier Studien zeigte sich: Die Behandlung mit niedrig dosiertem Estramustin (280mg EMP/Tag) wurde mit 42,4% häufiger aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen abgebrochen als die Therapie mit sehr niedrig dosiertem EMP in Kombination mit einem LH-RH-Agonisten (140mg EMP/Tag plus LH-RH-Agonist, 16,1% Abbruchrate) (Kitamura 2002).

1.1.5.4 Mitoxantron

Mitoxantron, ein Antrazyklinderivat, interkaliert in die DNA und hemmt die DNA- sowie die RNA-Synthese durch Inaktivierung der Topoisomerase II. Ursprünglich wurde es für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie entwickelt. Als wichtigste Nebenwirkung ist die Kardiotoxizität des Medikaments zu nennen, die jedoch unter den Anthrazyklinen am geringsten ist.

Durch die Kombination von Mitoxantron und Steroiden wurde in einer Studie (Tannock 1996) eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität von Patienten mit hormonrefraktären Prostatakarzinom im Vergleich zur Steroidmonotherapie erreicht (29% versus 12%). Ein Überlebensvorteil wurde jedoch nicht nachgewiesen. In einer parallel durchgeführten größeren Untersuchung der „Cancer and Leukemia Group B“ wurde bestätigt, dass sich die Kombinationstherapie nicht auf das Überleben auswirkt (Kantoff 1999). Aber 40% der Patienten berichteten über eine deutliche Schmerzreduktion und eine Verbesserung der Lebensqualität unter Kombinationstherapie. Diese Ergebnisse führten dazu, dass Mitoxantron als Chemotherapeutikum beim hormonrefraktären Prostatakarzinom zugelassen wurde.

Autor	Patienten n=	PSA- Abfall	Progressionsfreies Überleben	Schmerzre- duktion	Verbesserte Lebensqualität
Tannock* 1996	161	Ja	Ja	Ja	Ja
Kantoff** 1999	242	Ja	Ja	Nein	Nein

Tabelle 3: Studien zur Kombinationstherapie Mitoxantron und Steroide

*Prednison 10mg/d + Mitoxantron 12mg/m² alle 21Tage

** Hydrokortison 40mg/d + Mitoxantron 14mg/d alle 21Tage

Die Bedeutung von Mitoxantron bei der Therapie des Prostatakarzinoms ist jedoch eher gering. In jüngeren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Docetaxel in Kombination mit Estramustinphosphat zu weitaus besseren Ergebnissen führt als Mitoxantron mit Prednison (Oudard 2005a, Oudard 2005b).

3 Studienarme	D+E+P* n=43	D↓+E+P** n=42	M+P*** n=42
PSA≥50%	29	26	7
TTP in Monate	8,8	9,3	18,4
Mittleres Überleben	18,6	1,7	13,4

Tabelle 4: Studien zum Einsatz von Docetaxel (D), niedrigdosiertem Docetaxel (D↓), Estramustinphosphat (E) und Prednison (P)

*70 mg/m² Docetaxel + 280mg Estramustin + 10mg/d Prednison an Tag 2 alle 21 Tage

** 35 mg/m² Docetaxel + 280mg Estramustin + 10mg/d Prednison an Tag 2 und 9 alle 21 Tage

*** 280mg Mitoxantron + 10mg/d Prednison alle 21 Tage

1.1.5.5 Topoisomerasehemmer

Die DNA muss sich in einem adäquaten topologischen Zustand befinden, damit ihre Funktion ausgeübt werden kann. Die beiden komplementären Polynucleotidstränge trennen sich vor grundlegenden biologischen Prozessen wie Replikation und Transkription. Dabei hilft die negative Superspiralisierung natürlicher DNA, die durch die

Topoisomerasen kontrolliert wird. Sie verhindern eine zu starke Torsionsspannung der noch nicht replizierten DNA-Stränge, indem sie vorübergehende Einzel- (Pratesi 1995b) oder Doppelstrangbrüche (Aisner 2003) in der DNA katalysieren.

Typ-I-Topoisomerasen, auch „nicking-closing enzymes“ genannt, entspannen sukzessive negativ superspiralisierte DNA durch schrittweise Erhöhung der Verwindungszahl.

Typ-II-Topoisomerasen hingegen benötigen ATP-Hydrolyse, um beide DNA-Stränge zu spalten, Doppelstrang-DNA durch den Bruch zu schieben und die Spaltung zu verschließen.

1.1.5.6 Etoposid

Etoposid ist ein Glykosidderivat des Podophyllotoxins, ein Mitosehemmstoff aus der Alraune (*Podophyllum peltatum*).

Es hemmt die Topoisomerase II durch direkte Bindung, ohne in die DNS zu interkalieren und induziert als Topoisomeraseinhibitor II permanente DNS-Doppelstrangbrüche und letztendlich einen Mitosearrest in der G2- und S-Phase.

Zum Einsatz kommt es vor allem bei Bronchial-, Hoden- und Ovarialkarzinomen.

Eine 5-Jahres-Follow-up-Studie (Phase II-Trial) (Berruti 2005) zeigte, dass die Kombination von Etoposid und Estramustinphosphat synergistisch wechselwirkend auf der Ebene der Kernmatrix wirkt, und bestätigte die Wirksamkeit bei Patienten mit hormonrefraktären Prostatakarzinom.

Autor	Patienten	PSA- Abfall≥50%	Symptomabnahme in %	TTP≥1Jahr	TTP≥18 Monate in %
Berruti	46	54,7	61,3	30,9	19,5

Tabelle 5: Studie zum Einsatz von Etoposid kombiniert mit Estramustinphosphat beim Prostatakarzinom

TTP = time to progression

1.1.5.7 Camptothecin

1966 wurde zum ersten Mal Camptothecin als Medikament mit einer potentiellen Antitumoraktivität wahrgenommen.

Wegen seiner hydrophoben Eigenschaften, die die klinische Einsetzbarkeit stark beeinträchtigt, wurde von der amerikanischen Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln das wegen seiner Carbonseitenkette am A-Ring

wasserlösliche Topotecan (TPT) entwickelt. Auch Irinotecan mit seinem 1000fach stärkeren Metabolit SN-38 ist ein semi-synthetisches Derivat des Alkaloids Camptothecin.

Durch Bildung eines stabilen Komplexes wird die Topoisomerase I selektiv gehemmt. Es kommt in der S-Phase zum irreversiblen DNA-Strangbruch und zur Apoptose der Zelle. In-vitro wurde eine 100-1000 x höhere Sensitivität der Zellen in der S-Phase als die in der G1- oder G2-Phase ermittelt (Li 1972). Außerdem erhöht TPT die Sensitivität von Prostatakarzinomzelllinien für TRAIL/Apo-2L-induzierende Apoptose-Liganden, die zytotoxisch gegen mehrere Tumorzelllinien wirken (Griffith 2003).

Tumoxenograftmodelle zeigten eine zytotoxische Aktivität in mehreren Tumortypen, darunter Ovar- und Kolonkarzinome, Tumoren des zentralen Nervensystems und Sarkome (Friedman 1994, Houghton 1992, Pratesi 1995a).

In einer Phase II Studie von 2002 konnte kein adäquates Tumoransprechen nach Einsatz von Topotecan bei Patienten mit hormonunabhängigem Prostatakarzinom bestätigt werden (Klein 2002). Die Nebenwirkungen waren überdies immens.

Die Resistenzentwicklung vieler Tumoren kann möglicherweise durch die Hochregulation der Topoisomerase II erklärt werden. Es wurde dabei eine reziproke Beziehung zwischen TOPI-Inhibitoren und TOPII-Inhibitoren beobachtet. So führt der TOPI-Inhibitor zu einer Hochregulation von TOPII und einer Down-Regulation von TOP I (Aisner 2003). Dies lässt über eine sequentielle Gabe von TOPI- und TOPII-inhibitoren nachdenken.

1.1.5.8 Bisphosphonate

Die Behandlung des Knochenschmerzes ist wesentlich, da diese Komplikation bei 88% der Patienten mit Knochenmetastasen im Vordergrund steht (Berruti 2000). Daher werden zur Schmerzreduktion Bisphosphonate eingesetzt, die die Knochenresorption durch Inhibierung der Osteoklastenaktivität senken.

Noch in Erprobung beim HRPC ist der Endothelin- (ET) Rezeptorantagonist Atrasentan, der Osteoblasten inhibiert, so dass die ossäre Metastasierung verhindert und Knochenschmerzen gelindert werden. Vogelzang et al. (Vogelzang 2005) zeigten, dass es zu einer signifikanten Verzögerung der Tumorprogression unter Atrasentan 10mg kommt.

Ein neues Agens zur Inhibierung der Osteoklastenaktivität ist AMG162, ein monoklonaler AK gegen den Liganden des Rezeptoraktivators, der die Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Osteoklasten steuert.

1.1.6 Innovative Strategieansätze

Immuntherapie

Die Strategie, mit Hilfe dendritischer Zellen eine Impfung gegen Tumoren zu erzielen, ist in der Tumorthherapie vielversprechend. Auch beim HRPC wurden erste Erfolge verzeichnet.

Ein Ansatz ist der Versuch durch Beladung dendritischer Zellen mit Prostata-spezifischen Membranantigen (PSMA) primäre zytotoxische T-Zellantworten zu induzieren und dadurch eine B-Zell-Aktivierung mit Produktion spezifischer Antikörper zu erreichen.

2004 konnte zum ersten Mal in einer randomisierten Phase III Studie ein Überlebensvorteil (3,9 Monate) einer Immuntherapie mit APC8015 beim Prostatakarzinom nachgewiesen werden (Small 2005).

Parameter	APC8015 (n=82)	Placebo (n=45)
Medianes Überleben	25,9 Monate	22 Monate
3-JÜR	33%	11%
T-Zellproliferation	16,9-fach	1,99-fach

Proteasomeninhibition

Proteasomen sind ubiquitäre Enzymkomplexe, die u.a. eine regulierende Funktion auf die Apoptose ausüben. In einer Phase II-Studie zeigte die Kombination des Proteasomeninhibitors Bortezomib mit Docetaxel bei 36% der Patienten einen mehr als 50%igen PSA-Abfall (Price 2004). Bortezomib wurde sowohl niedrig als auch hoch dosiert gut vertragen.

Hemmung der Angiogenese

Da progrediente Tumore einen erhöhten Energiebedarf besitzen, um wachsen zu können, müssen neue Blutgefäße durch Steuerung vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktoren (VEGF), Matrix Metalloproteine und Integrine gebildet werden. Durch Inhibition dieser Targets sind ein Wachstumsstopp und eine Verhinderung von Metastasenbildung möglich.

Ein wichtiger potenter Angiogenesehemmer ist Thalidomid. Es zeigt sich im Vergleich zwischen der Kombination Docetaxel und Thalidomid mit Docetaxel alleine, dass die PSA-Antwort mit 53% in der Kombinationsgruppe versus 37% in der Docetaxelgruppe signifikant höher ist (Smith 2005).

1.2 Mechanismen des Zelltodes

1.2.1 Nekrose

Im heutigen Sprachgebrauch bezeichnet Nekrose die „passive“ Form des Zelltods, d.h. Zellen sterben dadurch, dass ihnen die Lebensgrundlage entzogen wird ohne aktive Beteiligung am Zelltod. Zelltod durch Nekrose führt zur „Zersetzung“ der passiven Desintegration der Zelle mit Freisetzung der Zellinhalte, was im Gewebe zu einer Entzündungsreaktion führt. Nekrose kann experimentell in Zellkultur einfach induziert und demonstriert werden, tritt aber in vivo sehr viel seltener auf als die Apoptose. Nach Vaux tritt die Nekrose nur dann auf, wenn die Zelle an der Aktivierung ihres Apoptosesystems gehindert wird (Vaux 1996).

1.2.2 Apoptose

Bereits vor 150 Jahren war bekannt, dass Zellen während ihrer normalen Entwicklung sterben, ohne dass ihr Zellmetabolismus in unmittelbar bedenklicher Weise beeinträchtigt ist.

Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod. Der Vorgang läuft nach einem uniformen bzw. definierten Schema ab.

Die Apoptose kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. In der Anfangsphase erhält die Zelle das Signal, zu sterben und aktiviert den programmierten Zelltod. Es kommt zur Exekutionsphase, in der der eigentliche Prozess stattfindet.

Es werden hierbei zwei Wege unterschieden: der rezeptorabhängige mitochondriale durch die bcl-2 Familie gesteuerte Signalweg und der Weg über die Interaktion der Todesrezeptoren und ihrer Liganden. In der Endphase treten die typischen morphologischen Veränderungen der Zelle auf, die den point-of-no-return einläuten. Hierbei unterscheidet sich die Apoptose nur in Hinsicht der Stimuli und ihrer Aktivierung, nicht aber in Hinsicht der Vorgänge.

Die molekularen Protagonisten der Apoptose können in vier Hauptgruppen eingeteilt werden.

- die Tumornekrosefaktorrezeptor-Familie

Ihre Mitglieder enthalten die Todesdomäne (DD: death domain), die die Apoptose induzieren (Itoh 1993).

Eine Untergruppe der TNF-R-Familie stellen die Todesrezeptoren dar (Wajant 2003), zu denen TNF-R1, Fas(Pan 1998), DR3/WSL und der TRAIL/Apo-2L-Rezeptor gehören. Sie vermitteln einen extrazellulären Stimulus nach intrazellulär. Beispiele

für Liganden, die mit dem Rezeptor einen Komplex bilden, sind TNF α mit TNF-R1 oder ein FAS-Ligand mit deren FAS-Rezeptor.

- **bcl-2-Familie**

antiapoptische Proteine: bcl-2, bcl-x_L, bcl-w, A1, Mcl-1, Boo

Die Mitglieder der bcl-2-Familie regulieren die mitochondriale Signaltransduktion als ein Weg der Apoptose.

Bcl-2 kann die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytosol blockieren, oder zusammen mit bcl-x_L den Caspase 9 aktivierenden Apaf-1/Cyto-C-Komplex hemmen. (Green 1998, Kluck 1997, Pan 1998, Yang 1997)

Du (Du 2000) und Verhagen (Verhagen 2000) beschrieben ein neues Protein Smac/DIABLO, das durch apoptische Stimuli aus den Mitochondrien frei wird und neben Cytochrom C die Caspasen aktiviert.

- **Adaptorproteine**

Sie verbinden die Effektorcaspasen mit den Apoptoseregulatoren, die Todesrezeptoren und bcl-2. Vertreter dieser Gruppe sind FAAD, TRAD, RIP.

Sie leiten die Signale weiter, indem sich die DD-Domäne des Liganden-Rezeptor-Komplexes an die Apoptoseregulatoren bindet. Ein Beispiel für ein solches Bindeprotein ist FAAD (Fas Associates Death Domain).

- **Caspasen**

Die proteolytisch aktiven Cysteincaspasen spalten eine Vielzahl zytosolischer Proteine. 11 Caspasen im Menschen wurden von Rudel et al. beschrieben (Rudel 1997).

Gruppe I: Initiatorcaspasen -2, -8, -9, -10

Gruppe II: Effektorcaspasen -3,-6,-7

Die Caspasen der Gruppe I, die durch proapoptische Reize stimuliert werden, aktivieren hierbei die Enzyme der Gruppe II. Die Effektorproteasen sind u.a. zuständig für Bildung der Apoptosekörper und Aktivierung der DNase, die die internukleosomale DNA spaltet. Die wichtigste Rolle spielt Caspase-3 durch Spaltung mehrerer wichtiger Substrate.

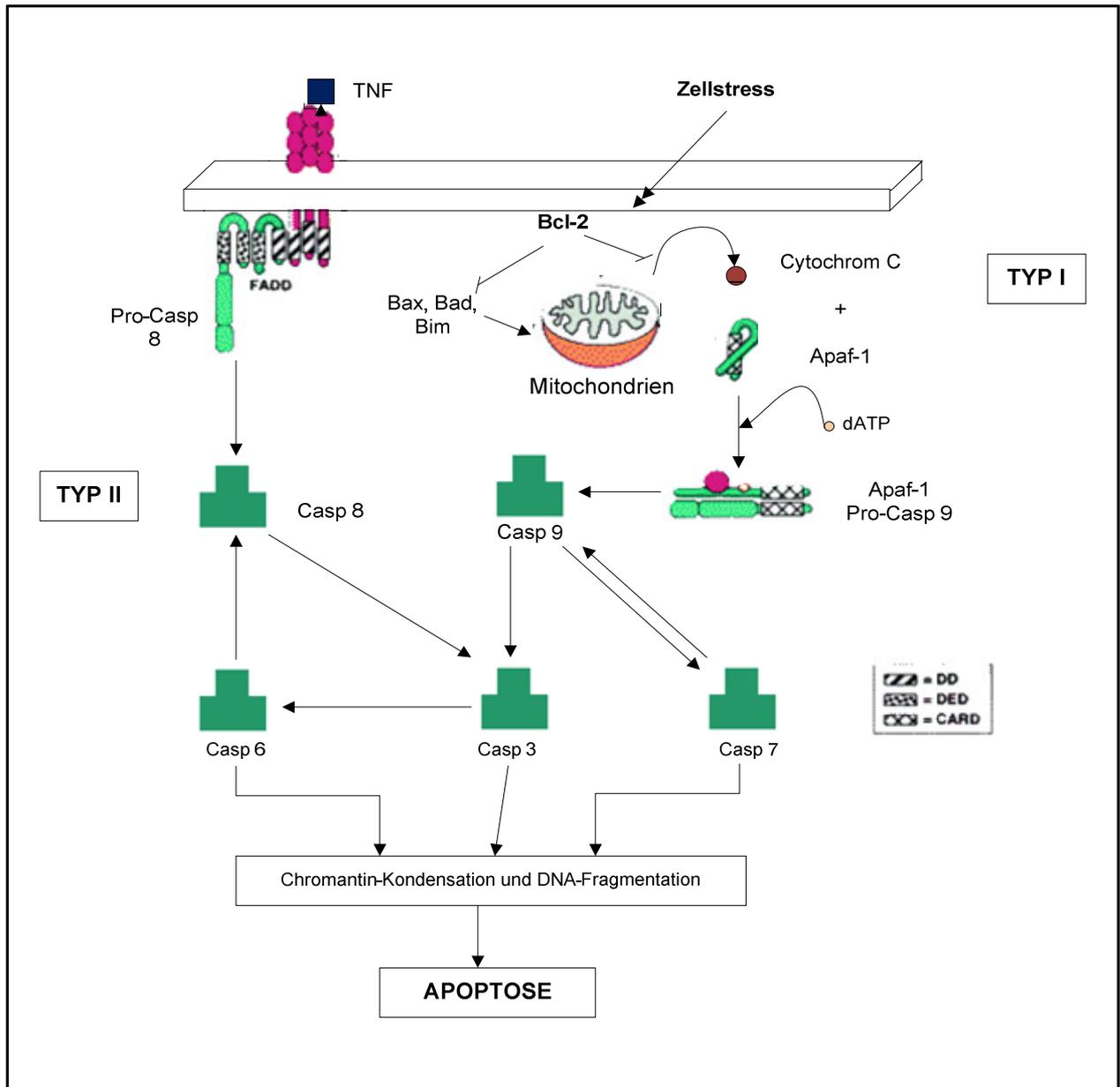


Abbildung 2: vereinfachte Darstellung des Apoptosewegs über den Todesrezeptorenweg (Typ 1) und den mitochondrialen Weg (Typ 2) modifiziert nach Los et al. (Los 1999)

Morphologisch kommt es zu stark geschrumpften, kugelförmigen Zellen mit ausgestülpten Zellmembranen. Die Filamente des Zytoskeletts aggregieren, das Chromatin kondensiert und der Zellkern fragmentiert. Durch Einwirkung einer Caspase-aktivierten DNase (CAD) entstehen DNA-Bruchstücke definierter Größe ($n \times 200$ Basenpaare), die in der Gelelektrophorese das charakteristische Bild einer Leiter ergeben (DNA-Laddering) (Cohen 1994). Die Zellfragmente bilden sogenannte Apoptosekörper, apoptotic bodies. Diese werden von Makrophagen phagozytiert.

1.2.3 Unterschiede der Nekrose und Apoptose

Während man bei der Apoptose von einer gezielten Eliminierung einzelner Zellen sprechen kann, muss man die Nekrose als Tod von Zellgruppen, der durch nicht-physiologische Stimuli induziert wurde, sehen. Die unterschiedlichen physikalischen Merkmale und Mechanismen werden in Tabelle 6 zusammengefasst.

APOPTOSE	NEKROSE
Morphologische Veränderungen	
Keine Veränderungen der Membran	zerstörte Membranintegrität
Schrumpfung der Zelle	Schwellung des Zytoplasmas und der Mitochondrien
Apoptotic bodies	Komplette Lyse
Erhalt der Organellen	Zerstörung der Zellstruktur
Verlust des Kontaktes zu Nachbarzellen bzw. Basalmembran	Erhaltene Adhäsion zwischen den Zellen und zur Basalmembran
Physikalische Merkmale	
Regulierter Prozess	Verlust der zellulären Homöostase
ATP-abhängig	Passiver Prozess
Internukleosomale DNA-Fragmentierung	Karyolyse
Physiologische Stimuli	Pathologische Noxe
Phagozytose	Frühzeitige Freisetzung in der Umgebung

Tabelle 6: Unterschiede der Nekrose und Apoptose

1.3 Isobologramme

Um den Erfolg einer Polychemotherapie zu erhalten, müssen die Substanzen untereinander so wirken, dass das Resultat auf die Proliferations- und Apoptoserate so stark verbessert wird, so dass die Monotherapie deutlich unterlegen ist. Auch eine dadurch mögliche Dosisreduktion der Einzelsubstanzen und die damit verbundene geringere Toxizität spricht für die Therapieform.

Man unterscheidet bei der Interaktion zweier Substanzen eine synergistische und antagonistische Wirkung. Um in der vorliegenden Arbeit die Wirkbeziehung zu beschreiben, wurde zur Auswertung Isobologramme verwendet, die in der experimentellen Tumorforschung fest etabliert sind.

1.4 Zielsetzung

Die therapeutischen Optionen im hormonrefraktären Stadium sind extrem begrenzt. Die Forschung konzentriert sich unter anderem darauf, durch eine Optimierung der etablierten Therapien eine Verbesserung des Überlebens zu erreichen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb in vitro untersucht, ob die Kombination verschiedener Chemotherapeutika wirksam ist, um die Proliferation von Prostatakarzinomzellen zu hemmen, Apoptose zu induzieren bzw. die Apoptoserate zu steigern.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Für alle Versuche wurden die humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3 der American Type Culture Collection (ATCC) verwendet. Diese wurden vom Heidelberger Labor Cell Line Services (CLS) bezogen.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf Mykoplasmenkontamination mit einem Enzym-Immunoassay von Boehringer Mannheim überprüft.

2.1.1 LNCaP (ATCC Nummer: CRL-1740)

Die LNCaP-Zelllinie besteht aus Zellen einer linksseitigen supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50jährigen Mannes mit Prostatakarzinom von 1977. LNCaP sind androgenabhängige Zellen, die mit einer mittleren Verdopplungszeit von 72h ein langsames Wachstumsmuster zeigen. Sie bilden Prostata-spezifisches Antigen (Small 2005) und Prostata-spezifische saure Phosphatase. Die im Elektronenmikroskop sichtbaren Desmosomen weisen auf einen epithelialen Charakter hin.

2.1.2 DU-145 (ATCC-Nummer: HTB-81)

Die epitheliale Zelllinie DU-145 stammt aus der ZNS-Metastase eines 69jährigen Mannes mit Prostatakarzinom von 1975. Die Zelllinie ist nicht androgenabhängig, nur schwach positiv für Prostata-spezifische saure Phosphatase und exprimiert kein Prostata-spezifisches Antigen (Small 2005).

2.1.3 PC-3 (ATCC-Nummer: CRL-1435)

Hierbei handelt es sich um Prostatakarzinomzellen, die aus der Metastase eines Lendenwirbelkörpers eines 62jährigen kaukasischen Mannes mit einem ossär metastasierten Prostatakarzinom nach einer Androgensuppressionstherapie gewonnen wurden. Die Zelllinie PC-3 wächst mit einer mittleren Verdopplungszeit von 33h und ist epithelialer Differenzierung. Die Zellen sind androgenunabhängig.

2.2 Medien

Die Medien für die Zelllinien werden bei +2° bis +8° Grad gelagert. Verwendet wurde RPMI 1640 Medium (mit 2.0 g/l NaHCO₃ und 0.532 g/l stabiles Glutamin), Kat. Nr. FG1215 (Firma Biochrom AG Berlin).

Dem Kulturmedium wurden 5ml nicht-essentielle Aminosäuren (NEAS) Kat. Nr.K0293 der Firma Biochrom AG Berlin zugegeben.

Für die Anzucht der Zellen sind dem Medium 50ml fetales Kälberserum (FKS) Kat. Nr. L0473 von Biochrom AG Berlin, für die Versuche 25ml FKS hinzupipettiert worden.

Für die Prostatakazinomzelllinie PC-3 sind den Medien 5ml Natriumpyruvat 100mM Kat. Nr. L0473 von Biochrom AG Berlin beigefügt.

Zur Verhinderung einer mikrobiellen Verunreinigung wurde den Medien eine 1%ige antibiotische, mykotische Lösung Kat Nr. A5955 der Firma Sigma Steinheim, die 10.000 U/ml Penicillin, 10mg Streptomycin und 25 µg/ml Amphotericin B enthält, beigesetzt.

2.2.1 Lösungen, Chemikalien und Testansätze

Name	Eigenschaften
Trypsin/EDTA Lösung	0,05%/ 0,02% (w/v) in PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Kat Nr. L2143 100ml Biochrom AG Berlin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (pH7,2 – pH7,4) 8g NaCl / 0,2gKH ₂ PO ₄ / 1,15g Na ₂ HPO ₄ / 0,2g KCl
XTT	Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-2H-tetrazolium-5-carboxanilide-innersalt Best. Nr. X-4626 500mg Sigma Steinheim, Germany
PMS	Phenazin Methosulfat Best. Nr. P-5812 1g, Sigma Chemicals Co St. Louis, USA
Annexin-V-Fluos	Fa. Roche Boehringer Mannheim, Kat. Nr.: 1828681
PI-Färbelösung	Phosphat/Citrat-Puffer 2 ml RNase A (1mg/ml) 2 ml Tween 20 0,01 ml PI-Lösung (1mg/ml) 0,12 ml
M30-Apoptosense	PEVIVA/M30-Apoptosense TMELISA/ALEXIS; Kat. Nr.:850-270-KI01
Tris/Saline	10mM Tris, pH 7; 50mM NaCl
Trypanblau	Best. Nr. L6323, Biochrom AG Berlin

Tabelle 7: Eigenschaften der verwendeten Lösungen

2.2.2 Geräte und Material

Name	Hersteller
Hettich Zentrifuge:	Rotina 48, Typ 4360, Firma Hettich, Tuttlingen
Brutschrank:	Typ B5061 EC/CO2 Firma Heraeus
Sterilbank	Lamin Air: Heraeus Instruments HB2448
ELISA-Reader	Thermomax Microplate Reader Firma Merck Biotech
Lichtmikroskop Axiovert 135 für Durchlicht-Hellfeld und Phasenkontrast	Best.Nr.: 4913069804 D-73446, Firma Zeiss
Gewebekulturflaschen	50ml/25cm ² , Best. Nr. 690175 Firma Greiner, Germany
Software	Becton & Dickinson
Durchflußzytometer	CellQuest™
96-Well-Gewebekulturplatte	Firma Greiner (Best. Nr. 655180)
6-Well-Gewebekulturplatte	Firma Greiner (Best. Nr. 657160)
Kryoröhrchen	Firma Nunc (Best. Nr. 179707)

Tabelle 8: Geräte und Verbrauchsmaterial

2.2.3 Zytostatika

2.2.3.1 Topotecan

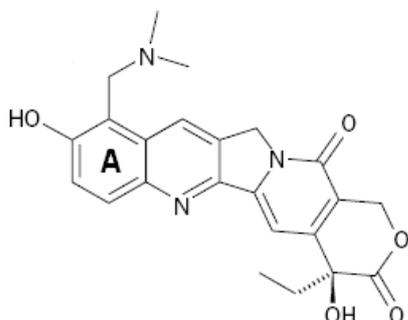


Abbildung 3: Strukturformel von Topotecan

Chemische Bezeichnung: 9-Dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin

Summenformel: C₂₃H₂₅N₃O₅ HCl

Handelsnamen: Hycamtin

Topotecan ist ein semisynthetisches Derivat des Alkaloids Camptothecin (aus *Camptotheca acuminata*) mit einem gesättigten sechsgliedrigen Lactonring.

Es wurde von der Firma GlaxoSmithKline bezogen und eine Stammlösung von 2,4 mM hergestellt, die bei vier Grad gelagert wurde.

Die Stammlösung wurde mit RPMI 1640 zur Herstellung der jeweiligen Konzentrationen verdünnt nachdem sie auf Zimmertemperatur aufgetaut wurde.

2.2.3.2 Etoposid

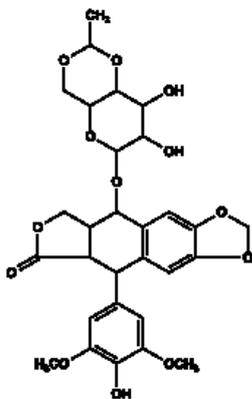


Abbildung 4: Strukturformel von Etoposid

Chemische Bezeichnung: 4'-Desmethylepipodophyllotoxin 9-Oethylidene- β -D-glucopyranoside

Summenformel: $C_{29}H_{32}O_{13}$

Handelsnamen: Etoposid

Etoposid ist ein Glykosidderivat des Podophyllotoxins, ein Mitosehemmstoff aus der Alraune (*Podophyllum peltatum*) und wirkt über Hemmung der Topoisomerase II.

Etoposid wurde von der Firma Sigma bezogen (Kat.Nr. E1383) und als Stammlösung von 50 mM in DMSO bei minus 20°C gelagert.

Nach Erwärmung auf Zimmertemperatur wurde sie für die Versuchsreihen mit RPMI 1640 verdünnt.

2.2.3.3 Docetaxel

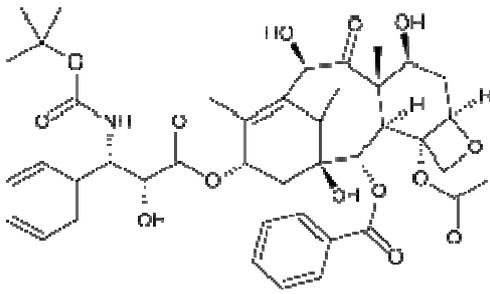


Abbildung 5: Strukturformel von Docetaxel

Chemische Bezeichnung: (2R,3S)-N-carboxy-3-phenylisoserine, N-*tert*-butyl ester, 13-ester mit 5, 20-epoxy-1, 2, 4, 7, 10, 13-hexahydroxytax-11-en-9-one 4-acetate 2-benzoate, trihydrate

Summenformel: $C_{43}H_{53}NO_{14} \cdot 3H_2O$

Handelsname: Taxotere

Docetaxel beschleunigt die Polymerisation von Tubulusdimeren zu Mikrotubuli und blockiert dann deren Depolymerisation. Es folgt eine Zerstörung des Spindelapparates, durch die eine Störung der Zellteilung und weiterer vitaler Zellfunktionen resultieren, und somit der Zelltod.

Es wurde von der Firma Aventis bezogen und als Stammlösung von 5 mg/ml in DMSO bei minus 20°C aufbewahrt. Die weitere Verdünnung erfolgte mit RPMI 1640 bei Raumtemperatur.

2.2.3.4 Estramustinphosphat

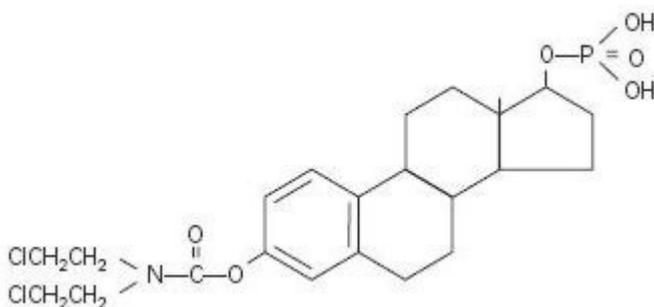


Abbildung 6: Strukturformel von Estramustinphosphat

Chemische Bezeichnung: estra-1,3,5(10)-triene-3,17diol-3-N-(bis-[chloroethyl])-carbamate-17-di-hydrogenphosphate

Summenformel: $C_7H_{15}Cl_2N_2O_4P$

Handelsname: Estrazyt

Estramustinphosphat, eine Kombination aus Estradiol-17 β -Phosphat und dem Alkylans Nor-Stickstoff-Lost, gehört zur Klasse der Alkylanzien und bewirkt durch Bindung an den Mikrotubulusapparat eine Depolymerisation der zytoplasmatischen Mikrotubuli und Mikrofilamente. Zusätzlich führt es zu einer DNA- und RNA-Alkylierung.

Die Substanz wurde von der Firma Pharmacia & Upjohn bezogen und als Stammlösung von 2 mM in DMSO bei minus 20°C aufbewahrt. Bei Zimmertemperatur wurde Estramustinphosphat mit RPMI 1640 für die Versuchsreihen verdünnt.

2.3 Zellkultivierung

2.3.1 Kulturbedingungen

Die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3 werden im Brutschrank bei 37°C angezüchtet. Die 5%ige CO₂-Begasung und die 95%ige Luftfeuchtigkeit gewährleisten optimale Wachstumsbedingungen.

Die Zellen werden in sterilen, mit Filter versehenen Gewebekulturflaschen gelagert.

2.3.2. Subkultivierung

Jeder Arbeitsvorgang mit den Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Sterilbank.

Die Zellen erforderten jeden siebten Tag eine Neuaussaat, da sie sich dann aufgrund eines zu dichten Wachstums innerhalb der Gewebekulturflaschen in ihrer Vermehrung gegenseitig hemmten.

Das Nährmedium wurde aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen von PBS wurde 2ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzupipettiert, um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen, und jede Flasche für etwa 5 bis 10 Minuten in den 37°C-Wärmeschrank gestellt.

Nachdem das Ablösen durch Mikroskopieren überprüft wurde, sind zu den in Trypsin gelösten Zellen 5ml 10%iges Medium gegeben und der Inhalt in ein steriles Röhrchen überführt worden. Anschließend wurden die Röhrchen bei 300g fünf Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediumüberstandes sind 10ml 10%iges Nährmedium zum Zellsediment gegeben und vermischt worden.

Das Zählen der Zellen erfolgte in einer Neubauerzählkammer. Hierfür sind 50µl Zellsuspension mit 50µl Trypanblau (1:2) nach der „dye exclusion“-Methode gemischt und in die Zählkammer gefüllt worden. Die Zellzahl konnte nun nach Auszählung der ungefärbten Zellen unter dem Mikroskop durch folgende Gleichung berechnet werden (Chen 2002):

$$\text{Zellzahl} = (\text{gezählte Zellen in allen vier Quadranten}/2) \times 10^4 \times \text{Volumen}$$

Zur Kultivierung wurden die Zellen in neue Kulturflaschen ausgesät.

Ein Mediumwechsel zur Zellvitalitätserhaltung fand alle vier Tage nach Neuaussaat statt.

2.3.3 Kryokonservierung

Um sehr hohe Passagezahlen der Zelllinien zu vermeiden, sind regelmäßig tiefgefrorene Zellen aufgetaut und kultiviert worden.

Für die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff (N₂) bei -196°C wurden 1 x 10⁷ Zellen in einem Einfriermedium aufgenommen und auf Kryoröhrchen im Eisbett verteilt. In einer Einfrierbox erfolgte eine langsame Abkühlung auf -70°C und nach 24h eine dauerhafte Konservierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Zum Auftauen sind die gefrorenen Zellen rasch in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und zu 10ml 10%igem Kulturmedium gegeben worden.

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach dem gleichen Prinzip der Subkultivierung.

2.4 Testverfahren

2.4.1 Erstellen von Dose-Response-Kurven

Der XTT-Test dient der Bestimmung der Anzahl stoffwechselaktiver Zellen und ist ein semiautomatisches, quantitatives kolorimetrisches Verfahren (Scudiero 1988, Roehm 1991). Die Spaltung des Licht-empfindlichen Tetrazoliumsalzes XTT durch mitochondriale Dehydrogenaseenzyme der metabolisch aktiven Zellen erzeugt bei Anwesenheit eines elektronenbindenden Agens (PMS) einen wasserlöslichen Formazanfarbstoff. Die Extinktion wird in einem Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzlänge von 650nm gemessen und korreliert positiv mit der vorhandenen Zahl der noch lebenden Zellen im Well. Um die reine

Extinktion des Formazanfarbstoffs im Well zu erhalten, wurde von jedem Well die Extinktion des Blanks (200µl 5%iges Medium ohne Zellen) subtrahiert.

In ein 96-Well-Platte wurde eine definierte Zellzahl in 100µl 5%igem Medium pro Well gegeben. Die Wells A1-F1 wurden mit 200µl 5%igem Medium pipettiert.

Zellzahlen

Zelllinie	Zellzahl/well
LNCaP	6000
DU-145	1000
PC-3	3000

Nach einer Adhärenzzeit von 24h sind 50µl der jeweils vorher festgesetzten Konzentrationen der jeweiligen Zytostatika (A und B) zu jeweils 6 wells zugegeben worden, so dass das Endvolumen im Well 200µl betrug. Bei jeder Gewebekulturplatte wurde eine Anzahl Wells alleine mit 200 µl Medium ohne Zellen gefüllt, um den sogenannten Blank-Wert als Kontrolle zu ermitteln.

In Spalte 2 wurden 50 µl der Substanz A und 50 µl Medium beigefügt.

Am fünften Tag sind zu den befüllten Wells 50 µl des Gemisches XTT/PMS hinzugegeben und die Extinktionen nach vier Stunden im Mikrotiterplattenphotometer gemessen worden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	50 µl A + 50 µl Medium										
B	Blank											
C	Blank											
D	Blank											
F	Blank											
G	Blank											
H												
I												

BLANK = 200 µl 5%iges Medium

Abbildung 7: 96well-Platte nach Inkubationen mit A- und B-Konzentration

2.4.2 Apoptosenachweisverfahren

Der Versuchsansatz fand bei sterilen Bedingungen statt.

Nach Herstellung der Einzelzellsuspensionen wurde die definierte Anzahl der jeweiligen Prostatakarzinomzelllinie mit 2ml 5%Medium/well auf eine 6well-Makroplatte gegeben.

Zelllinie	Zellzahl/well
LNCaP	$1,5 \times 10^5$
DU-145	$0,3 \times 10^5$
PC-3	$0,8 \times 10^5$

Die Chemotherapeutika sind nach 24h Adhärenzzeit in die Wells pipettiert worden. Ihre Konzentrationen sind so gewählt worden, dass je zwei Wells die IC50-Konzentration und die IC80-Konzentration der jeweiligen Substanz enthielten. Um Referenzwerte einer unbehandelten Probe zu erhalten, sind zwei Wells ohne Chemotherapie geblieben.

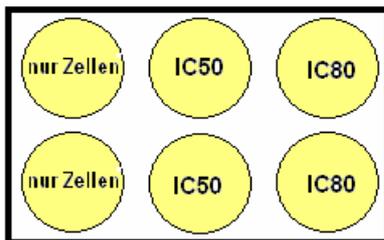


Abbildung 8: Kulturplatte für den Apoptosenachweis

Bei Vorversuchen sind die Messtage mit den höchsten Apoptoseraten festgelegt worden, so dass je nach Substanzen die Proben für die Annexin-V-Fluos, PI- und M30-Messung am vierten Tag nach Inkubation aus dem Ansatz des Überstandes entnommen wurden.

Die Arbeitsschritte an den Messtagen fanden nicht unter sterilen Bedingungen statt.

Für die Annexin-V-Fluos- und PI-Messung sind aus jedem Well der gesamte Zellüberstand mit einer Plastikpasteurpipette in je ein 10ml Röhrchen pipettiert worden. Nachdem in jedes Well 2ml PBS zum Waschen und wieder in die dazugehörigen 10ml Röhrchen gegeben worden ist, sind 500µl Trypsin zum Lösen der adhärennten Zellen hinzugefügt worden. Nach fünf bis sieben Minuten im Brutschrank sind die

Zellsuspensionen in die korrespondierenden Röhrchen zugegeben worden. Nach Zentrifugieren mit 300g sind die Zellüberstände in 1ml suspendiert worden. Die Zellzahl ist nun mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer bestimmt worden. Hierzu sind die Zellsuspensionen im Verhältnis 1:2 (20 l) mit Trypanblau vermischt worden.

Nun sind je 500 Öl der Zellsuspension auf je ein Röhrchen für die Annexinmessung und ein Röhrchen für die PI-Messung aufgeteilt worden.

Die weiteren Arbeitsschritte sind unter der jeweiligen Methode im Folgenden beschrieben.

2.4.2.1 Annexin-V-Fluos

Während der frühen Phasen des Zelltodes kommt es an der Plasmamembran der Zelle zu einer Alteration der Phosphatidylserine von der Membraninnenseite auf die Membranaussenseite (Vermes 1995).

Für den sensitiven Nachweis dieser Translokation wird Annexin-V als ein kalziumabh ngiges, phospholipidbindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin (PS) verwendet.

Um die Bindung der beiden Proteine bestätigen zu können, wird Annexin-V mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) konjugiert. Das so markierte Annexin kann nun im Durchflußzytometer durch die grüne Fluoreszenz des FITC sichtbar gemacht werden.

Die durchflußzytometrischen Messungen wurden an einem FACSCalibur (B&D) im Labor der Frauenklinik (Prof. Dr. M. Schmitt) durchgeführt.

Nach Zentrifugieren der mit 500 l PBS vermischten Zellen und Absaugen des Überstandes sind je nach vorhandener Zellanzahl 25 bzw. 50 l Annexinl sung hinzugefügt und für 15 Minuten durch Eis gekühlt worden.

Zellanzahl	Menge der Annexinl�sung	Menge des Inkubationspuffers
< 2,5 10 ⁵	25 Öl	100 Öl
> 2,5 10 ⁵	50 Öl	200 Öl

Nach Zugabe von 100 bzw. 200 l Inkubationspuffer wurden die Röhrchen auf Eis gelegt und im Durchflußzytometer (FACSCalibur, B&D) gemessen.

Mit Hilfe der Propidiumiodid-Markierung kann nun die Art des Zelltodes charakterisiert werden, indem die Intaktheit der Zellmembran, die in nekrotischen nicht aber in apoptotischen Zellen verloren ist, geprüft wird. Dieses Verfahren wird eingesetzt, um zwei verschiedene Mechanismen des Zelltodes, die Apoptose und die Nekrose charakterisieren und unterscheiden zu können. (Darzynkiewicz 1992)

Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) wird nach Aufnahme in die Zelle durch Interkalierung mit Basen der DNA und RNA gebunden.

2.4.2.2 Messung der subG₀G₁-Population

Durch Fixation der Zellen mit Alkohol wird die Membran durchlässig für PI. Es treten degradierte, apoptotische DNA-Fragmente aus den apoptotischen Körperchen aus. Durch Hinzugeben von RNase wird zusätzlich die RNA abgebaut während die DNA erhalten bleibt. Durch Anfärbung der DNA durch PI lässt sich nun im Durchflußzytometer der niedrigere DNA-Gehalt der apoptotischen Zelle nachweisen, der sich subdiploider G₁-Peak in der Fluoreszenz ausdrückt (Li 2000).

Die in je 500 µl PBS gelösten Prostatakarzinomzelllinien werden zentrifugiert, die Überstände abgesaugt. Hierauf werden die Zellen mit Tris/Saline (10mM Tris, pH 7,0, 50mM NaCl) gewaschen und wieder in 100 µl Tris/Saline resuspendiert. Anschließend erfolgt die Fixation zwischen einer Stunde und einer Woche mit 900 µl kaltem 90%igem Ethanol bei 4 °C.

Nach Ablauf der Fixation werden 2ml PBS zugegeben und die Zellsuspension abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in Phosphat/Citratpuffer gewaschen und in 100 µl Färbelösung resuspendiert. Nach 10 Minuten Kühlung auf einem Eisbett werden die Zellen im Durchflußzytometer gemessen.

2.4.2.3 M30-Testverfahren

M30-Apoptosense-ELISA ist ein Enzym-abhängiger immunologischer Test (ELISA = enzym-linked Immunosorbent Assay) für die quantitative Messung der Apoptose-assoziierten CK18Asp396 („M30“) Neo-Epitope. Die Expression des Neoepitops aus Zytokeratin 18 ist ein früher Indikator für Apoptose in epithelialen Zellen (Morsi 2000), weil während der Apoptose Caspasen unterschiedliche Proteine wie das intermediäre Filamentprotein Zytokeratin 18 spalten.

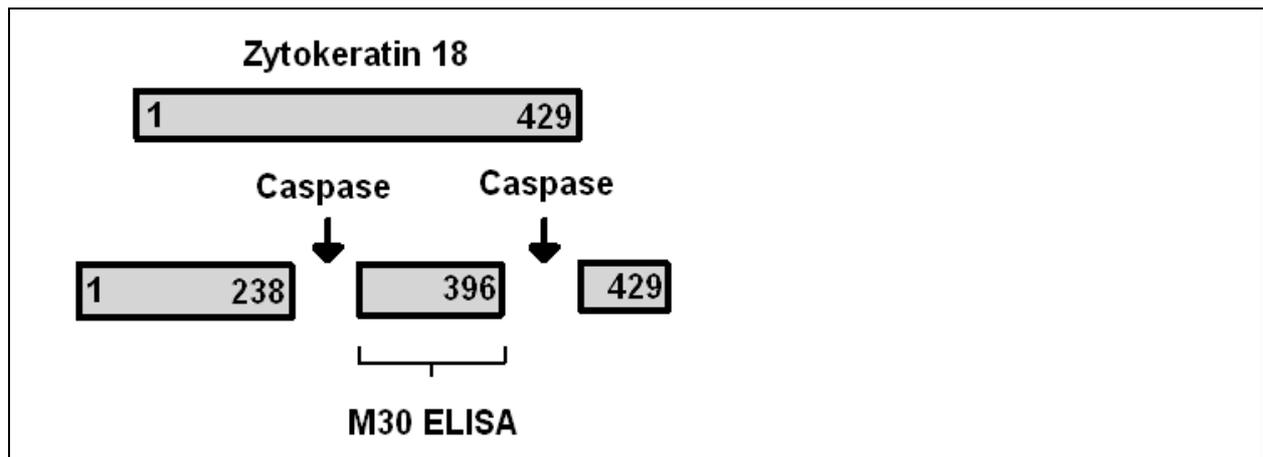


Abbildung 9: Nachweis der Caspaseaktivität durch M30-ELISA

Der M-30 Antikörper, ein monoklonaler Maus IgG2b Antikörper, detektiert spezifisch die Neopeptide, die nach der Spaltung der CK18 hinter Aspartat 396 (CK18Asp396) frei werden.

Die Vorbereitung der Reagenzien erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

25 µl des Standards, der Kontrolle und der Proben wurden in je zwei Wells pipettiert, die mit dem M30-Antikörper beschichtet waren und mit 75 µl der Horse-Radish-Peroxidase-Lösung gemischt.

Die Platten wurden nun für vier Stunden bei 600rpm auf den Schüttler gegeben. Nach Abklopfen der Flüssigkeit sind die Wells fünfmal mit jeweils 400 µl Waschlösung gewaschen worden. Nun wurden 200 µl TMB Substratlösung zu jedem Well pipettiert und im Dunklen bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung/well beendet und die Wells für fünf bis zehn Sekunden auf den Schüttler gelegt.

Nach fünf Minuten wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

2.5 Auswertung

2.5.1 Dose-Response-Kurven

Als Grundlage für die statistische Auswertung der Versuche fungierte die Erstellung der einzelnen Dose-Response-Kurven der Substanzen. Diese wurden durch das Programm SOFTmax® Pro Version 4.8 der Fa. Molecular Devices für Macintosh erstellt.

In diesen Kurven wird der Anteil lebender Zellen (in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle) als y-Werte gegen die jeweiligen Konzentrationen der Substanzen als x-Werte aufgetragen. Bei vielen Chemotherapeutika stellen sich diese Kurven sigmoid dar.

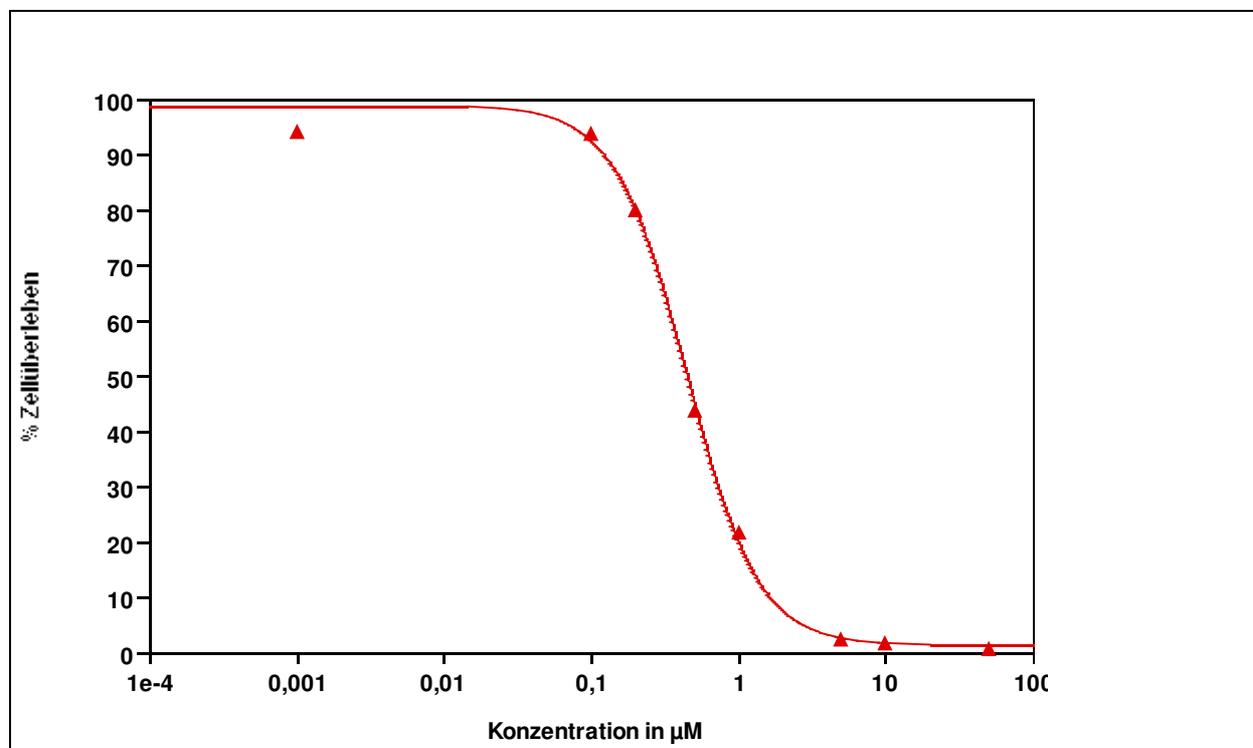


Abbildung 10: Beispiel für eine Dose-Response-Kurve

Ausgehend von den in den Vorversuchen gemessenen IC_{50} -Werten wurden für jede Zelllinie Dose-Response-Kurven mit mindestens fünf Konzentrationen unterhalb des IC_{50} -Wertes erstellt. Eine Gewebekulturplatte wurde nur mit Topotecan bzw. mit der zu kombinierenden Substanz behandelt, um eine vergleichende Dosis-Wirkungsbeziehung zu ermitteln. Den restlichen Gewebekulturplatten wurden kombiniert konstante, ansteigende Konzentrationen im Bereich des IC_{50} -Wertes der jeweiligen Zytostatika zugesetzt, um so die abhängigen IC_{50} -Werte für die Kombinationen zu ermitteln.

2.5.2 Isobologramm

Um jedoch Aussagen über die pharmakodynamische Interaktion zweier Substanzen zu erhalten, ist die Erstellung von Isobogrammen notwendig. Es handelt sich um in einem Koordinatensystem aufgetragene Iso-Effektkurven zweier unterschiedlicher potenter Zytostatika. So ist visuell die Beschreibung der Wirkungsbeeinflussung möglich. Mit Hilfe

des Isobogramms sollen die Messpunkte, die von einer bestimmten Referenzlinie, die für die additive Wirkweise anzeigt, bestimmt werden.

Diese sind von Steel und Peckham (Steel 1979) entwickelt und von Kano Y et al. (Kano 1998, Kano 2001) zum ersten Mal für Chemotherapeutika benutzt worden.

Für die isobographische Auswertung der eigenen Versuche wurde eine MATLAB-basierte Software verwendet, die von Wagenpfeil et al. entwickelt wurden (Wagenpfeil 2006).

Anhand der Dose-Response-Kurven lassen sich die jeweiligen IC_{50} – Konzentrationen ermitteln, d.h. die Konzentration, bei der bei 50% der Zellen eine Wachstumsinhibition eintritt.

Die Konzentrationen mit 50%iger Wachstumshemmung werden als 1 (= IC_{50A}/IC_{50B}) auf der Abszisse bzw. im Isobogramm auf Ordinate und Abszisse definiert.

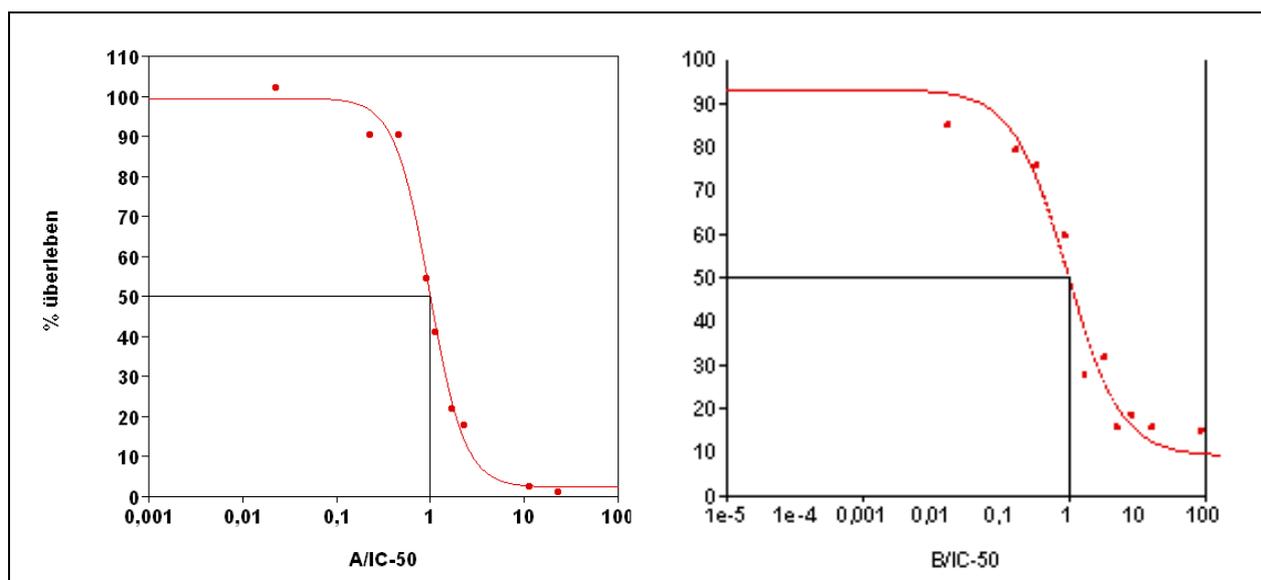


Abbildung 11: Dose-Responsekurven der Substanz A und der Substanz bei $x = 1$ werden 50% der Zellen von A bzw. von B abgetötet.

Auf der Grundlage der Dose-Response der Substanzen A und B werden auf Basis der 50%igen Abtötung drei Isoeffekturven mode I, mode IIA und mode IIB erzeugt.

Graph Mode-I zeigt die Konzentrationen von Substanz A/ IC_{50A} , die mit den jeweiligen Konzentrationen von B/ IC_{50B} ergänzt werden müssen, um eine 50%ige Abtötung zu erreichen. Das heißt, dass eine definierte Konzentration von A bzw. B für die

korrespondierende Konzentration von B bzw. A benötigt wird, um eine 50%ige Abtötung zu erreichen.

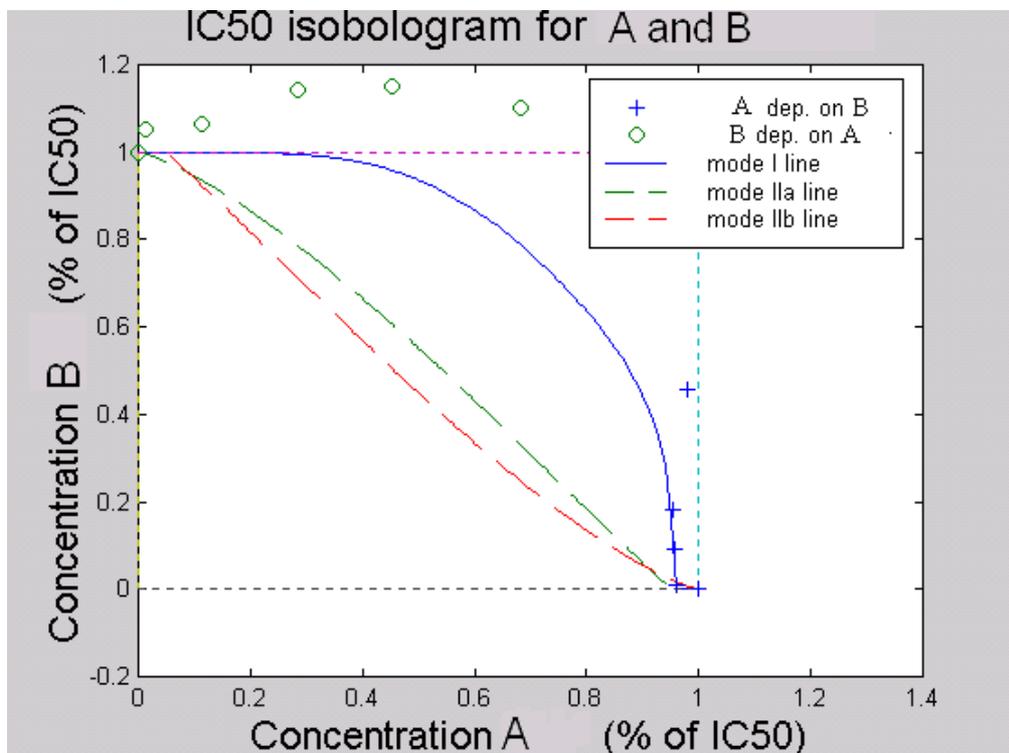


Abbildung 12: Beispiel für den Verlauf eines Isobogramms zur Darstellung der Wirkbeziehung zweier Substanzen A und B

Für die isobolographische Auswertung sind die Datenpunkte verwendet worden, die sich aus den relativen Werten der benötigten Konzentration von A oder B im Bezug zur IC_{50} der jeweiligen Monosubstanz ermitteln, um immer eine 50%ige Abtötung zu erreichen.

Die Mode I-, Mode IIA- und Mode IIB-Linien grenzen eine Fläche ein, innerhalb der die Datenpunkte der einzelnen Konzentrationen der Kombinationsversuche liegen, wenn die beiden Substanzen additiv wirken.

In diesem Bereich gilt:

$$xA + yB = 1$$

Bei $xA + yB > 1$ (alle Punkte, die oberhalb der Begrenzungskurven liegen) werden jedoch höhere Konzentrationen von den kombinierten Substanzen benötigt, um eine 50%ige Abtötung zu erreichen. Die Wirkstoffe verhalten sich antagonistisch.

Bei $x_A + y_B < 1$ (alle Punkte, die unterhalb der Begrenzungskurven liegen) werden niedrigere Konzentrationen von den kombinierten Substanzen benötigt, um eine 50%ige Abtötung zu erreichen. Die Wirkstoffe wirken synergistisch.

Es wurden für jede Konzentration der Substanz A oder B ein prädiktives Minimum oder Maximum für die Substanz B errechnet, die kombiniert eine 50%ige Wachstumshemmung ergeben. Graphisch entspricht dies den Mode I- bzw. Mode II-Linien.

Die gesammelten Datenpunkte wurden 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 bzw. darunter, gilt der Datenpunkt statistisch signifikant als antagonistisch bzw. 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.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferation

3.1.1 Monotherapie

Das Wachstumsverhalten der Tumorzellen bei Monotherapie der Substanzen Etoposid, Topotecan, Docetaxel und Estramustinphosphat wurde mit dem XTT-Assay bestimmt. Für jeden Versuchsansatz wurden pro Konzentration 6-8 Wells einer 96-Lochplatte gemessen. Die Ergebnisse stammen aus jeweils mindestens zwei unabhängigen Versuchsreihen.

Es wurden die Extinktionen behandelter und unbehandelter Zellen verglichen; die Auswertung erfolgte durch das Programm Softmax Pro 4.8. Der Extinktionswert der unbehandelten Zellen wird hier gleich 100%-Überleben gesetzt.

Aus den Dosis-Wirkungs-Kurven errechnen sich die IC_{50} - und IC_{80} -Werte.

3.1.1.1 Etoposid

Für folgende Dose-Response-Kurven wurde die Wirkung von Etoposid auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen aller drei Zelllinien untersucht.

LNCaP

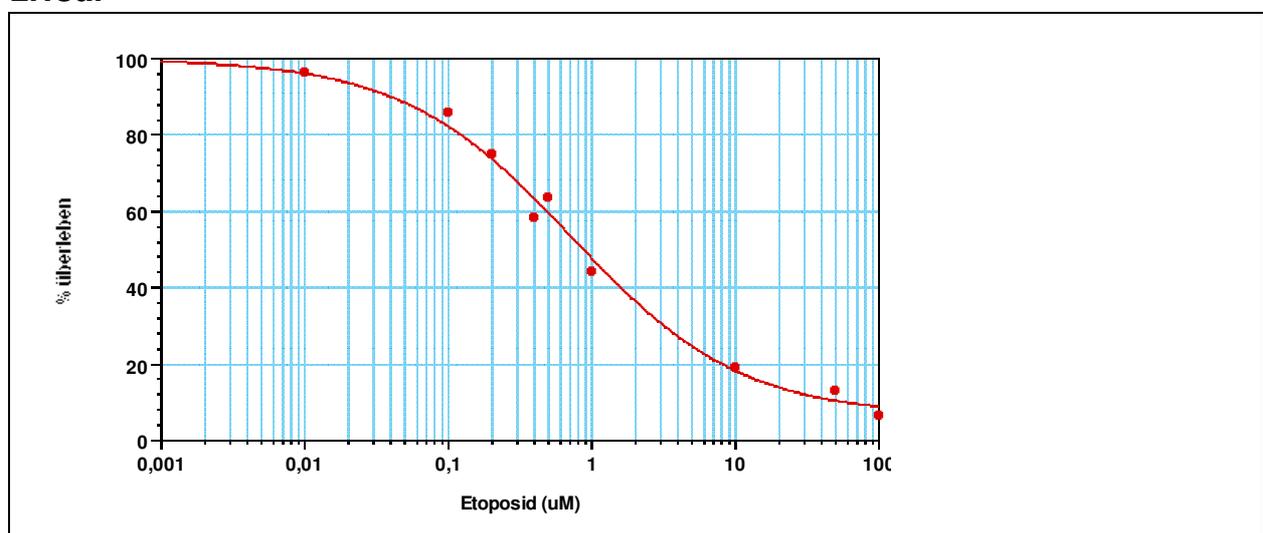
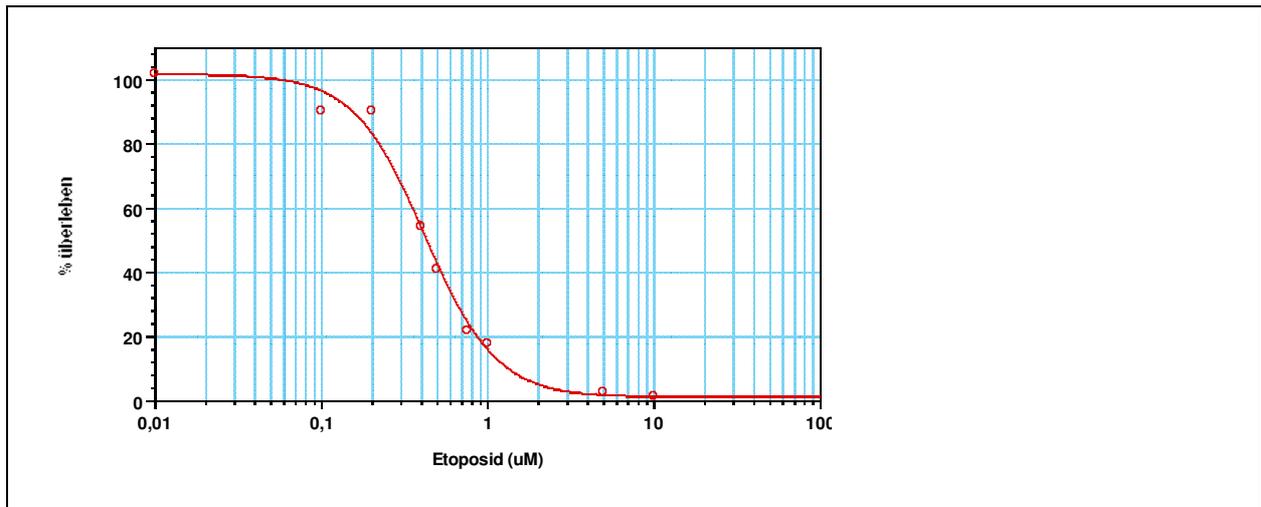
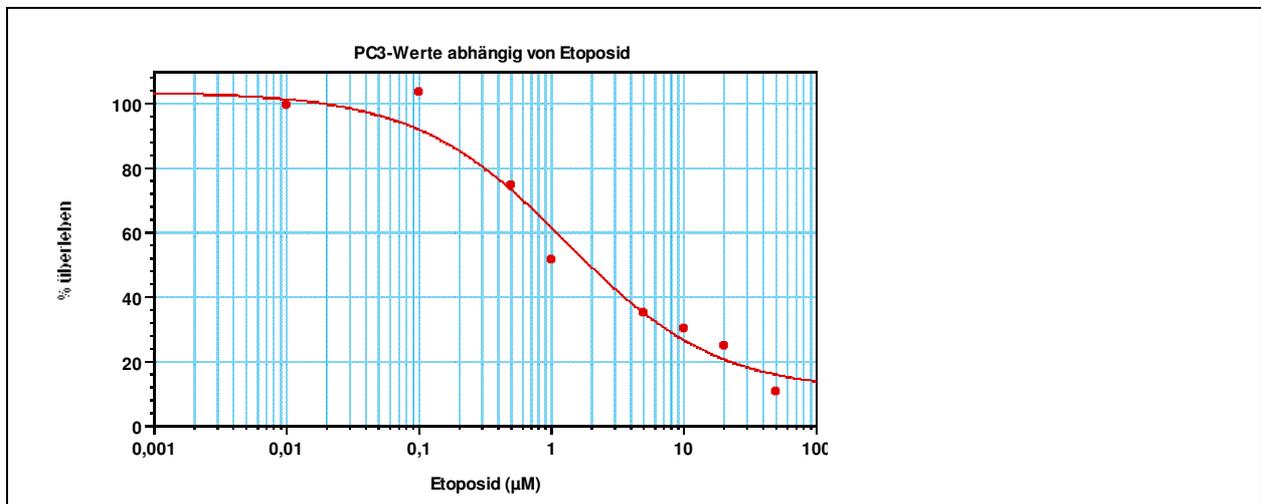


Abbildung 13: Proliferation der LNCaP-Zellen abhängig von Etoposid

Bei LNCaP-Zellen zeigte sich ein langsamer Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,01 und 10µM bei einem IC_{50} -Wert von 0,81µM und einem IC_{80} -Wert von 6,7 µM.

DU-145**Abbildung 14: Proliferation der DU-145-Zellen abhängig von Etoposid**

Bei den DU-145-Zellen zeigte sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,1 und 1 µM bei einem IC_{50} -Wert von 0,44 µM und einem IC_{80} -Wert von 0,82 µM.

PC-3**Abbildung 15 : Proliferation der PC-3-Zellen abhängig von Etoposid**

Bei den PC-3-Zellen zeigte sich ein langsamer Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,1 und 10 µM bei einem IC_{50} -Wert von 1,45 µM und einem IC_{80} -Wert von 74,3 µM.

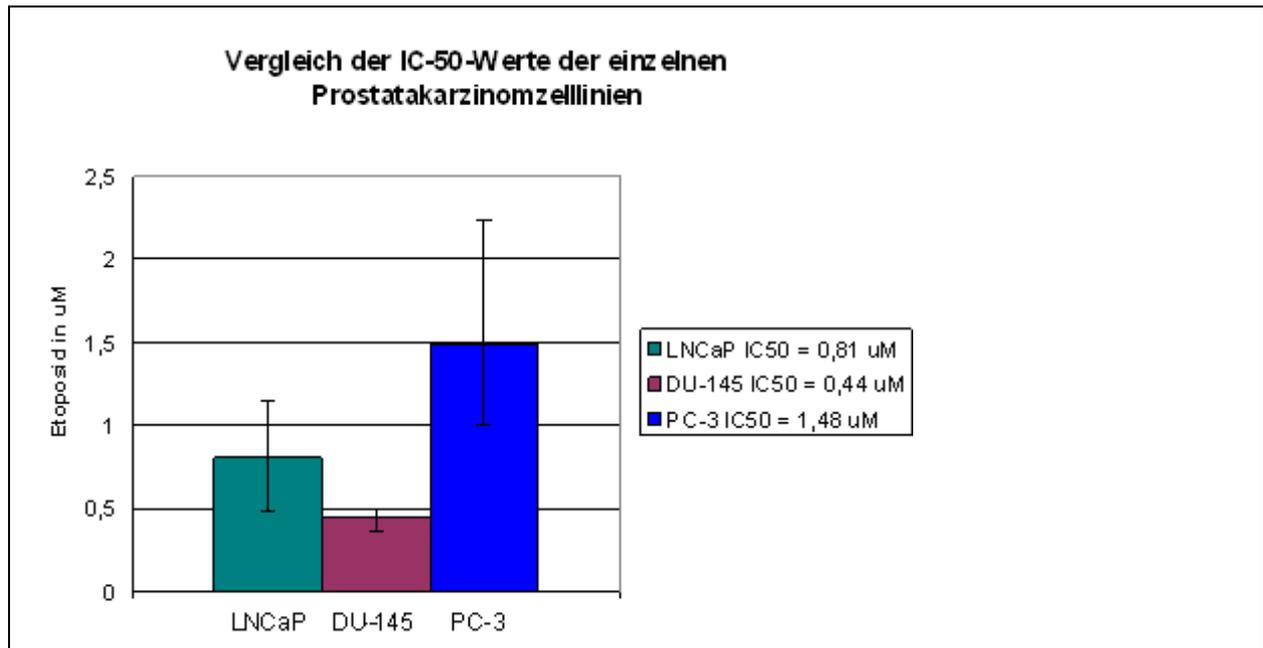


Abbildung 16: Vergleich der IC₅₀-Werte der Prostatakarzinomzelllinien

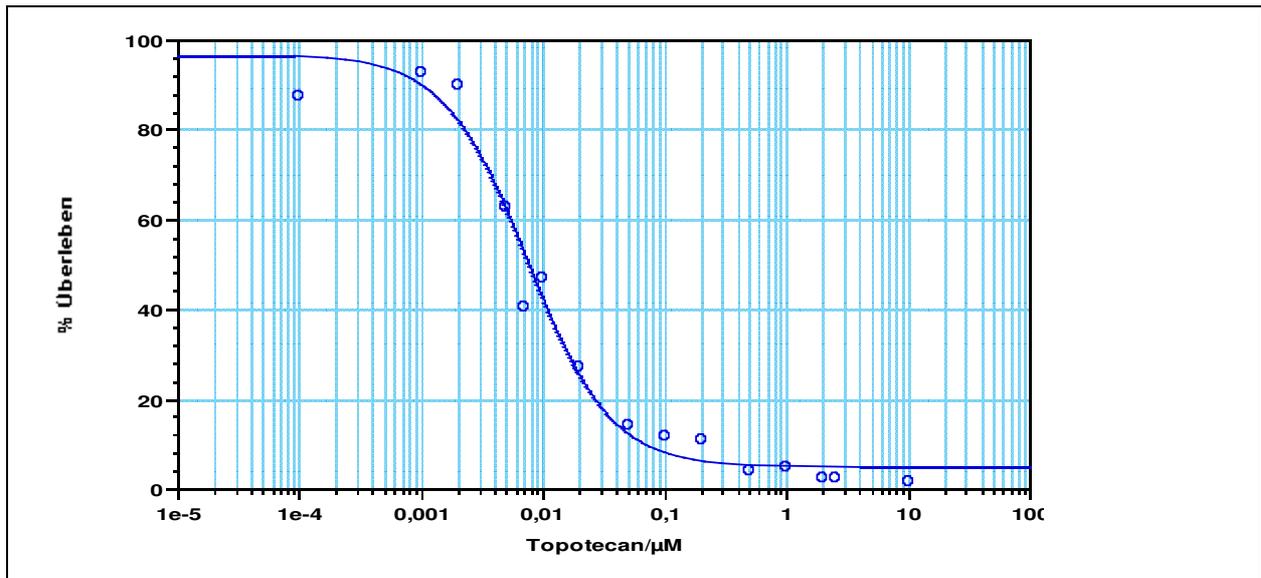
Beim Vergleich der jeweiligen IC₅₀ - Werte der drei Zelllinien zeigte sich, dass für die Zelllinie PC-3 (1,45 µM) die höchste Etoposidkonzentration nötig ist, um eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation zu erreichen.

Eine 50%ige Hemmung wurde bei der Zelllinie DU-145 bereits in einem niedrigen Konzentrationsbereich von 0,44 µM erlangt. Bereits ab 5 µM ergab sich eine Hemmung der Zellproliferation von 97,5%.

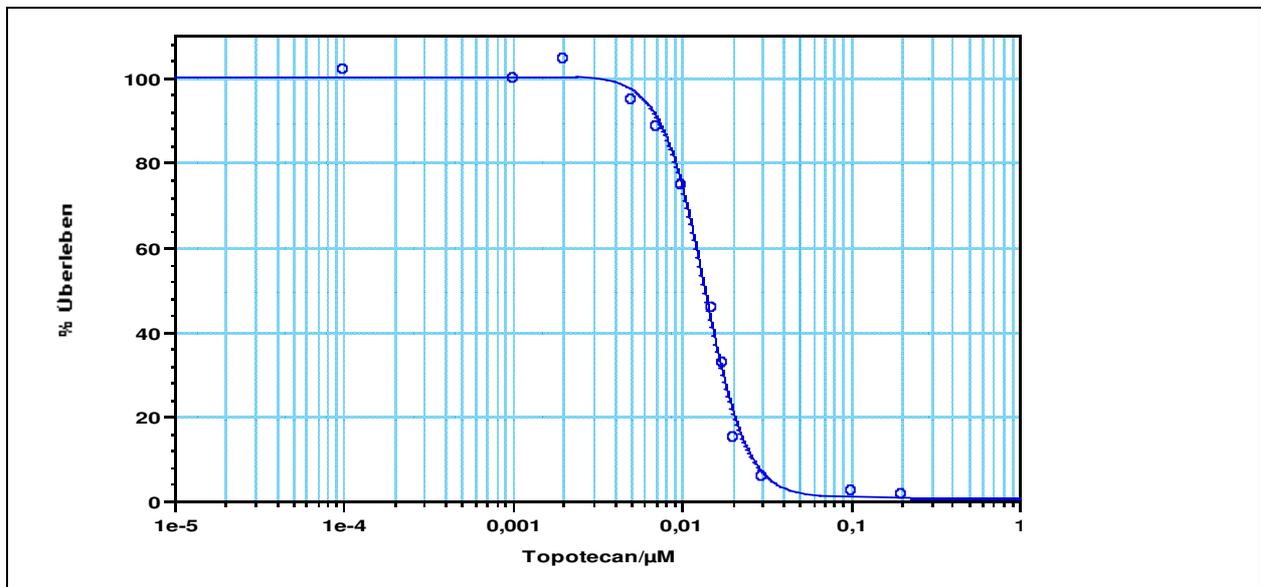
Für die LNCaP-Zelllinie fand sich ein IC₅₀ – Wert von 0,81µM.

3.1.1.2 Topotecan

Für folgende Dose-Response-Kurven wurde die Wirkung von Topotecan auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen aller drei Zelllinien untersucht.

LNCaP**Abbildung 17: Proliferation der LNCaP-Zellen abhängig von Topotecan**

Bei den LNCaP-Zellen zeigte sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,001 und 0,1 μM bei einem IC_{50} -Wert von 0,0077 μM und einem IC_{80} -Wert von 0,0268 μM .

DU-145**Abbildung 18: Proliferation der DU-145-Zellen abhängig von Topotecan**

Bei den DU-145-Zellen ergab sich ein steiler Wachstumsabfall im Bereich zwischen 0,005 und 0,03 μM bei einem IC_{50} -Wert von 0,0137 μM und einem IC_{80} -Wert von 0,021 μM .

PC-3

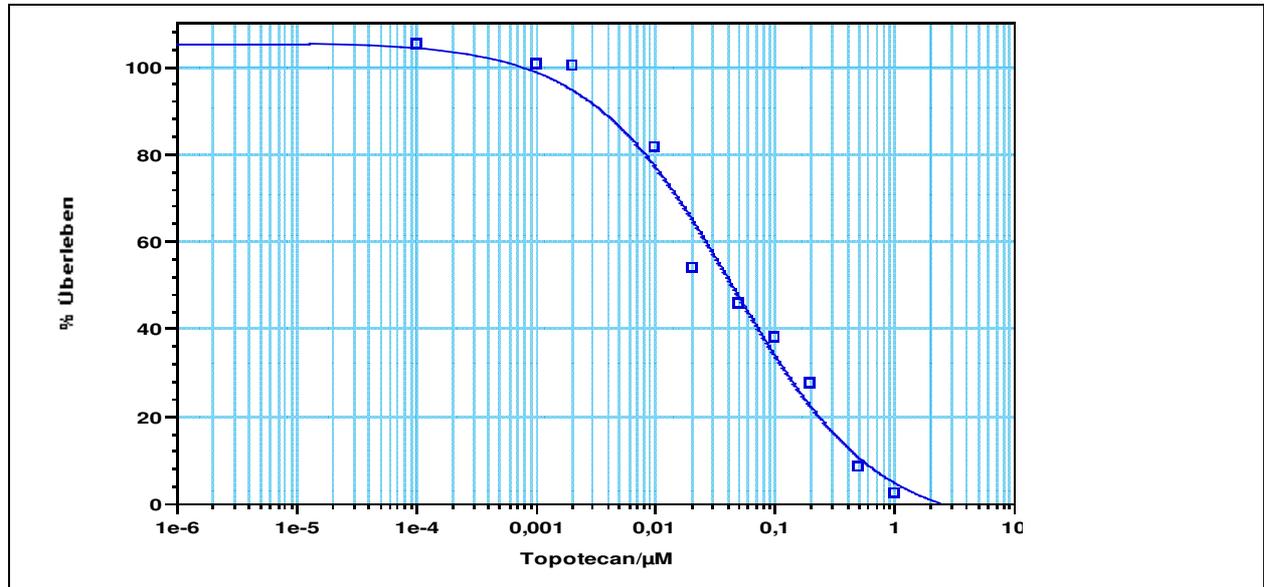


Abbildung 19: Proliferation der PC-3-Zellen abhängig von Topotecan

Bei den PC-3-Zellen zeigte sich ein langsamer Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,001 und 1 μM bei einem IC_{50} -Wert von 0,044 μM und einem IC_{80} -Wert von 0,23 μM .

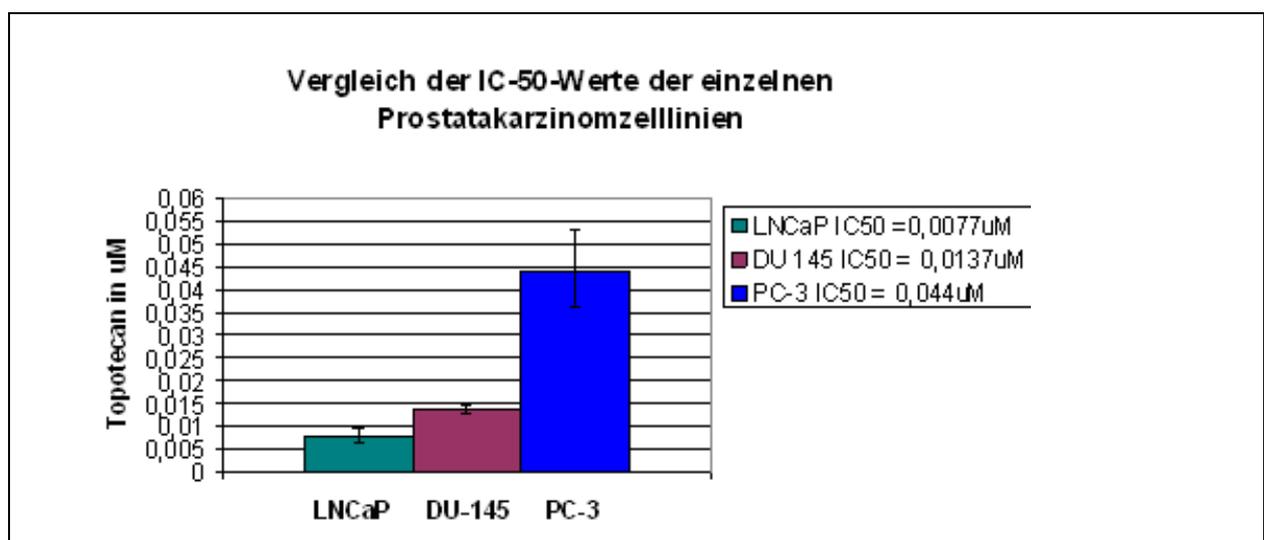


Abbildung 20: Vergleich der IC_{50} -Werte der Prostatakarzinomzelllinien abhängig von Topotecan

Beim Vergleich der jeweiligen IC_{50} - Werte der drei Zelllinien zeigte sich, dass für die Zelllinie PC-3 ($0,044\mu\text{M}$) der signifikant höchste Wert eingesetzt werden muss, um eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation zu erreichen.

Bei der Zelllinie LNCaP wurde bereits in einem niedrigen Konzentrationsbereich von $0,0077\mu\text{M}$ eine 50%ige Hemmung erlangt. Bereits ab $0,5\mu\text{M}$ ergab sich eine Hemmung der Zellproliferation von 96%.

Der IC_{50} -Wert von $0,0137\mu\text{M}$ für die DU-145-Zelllinie war im mittleren Bereich gelegen.

3.1.1.3 Docetaxel

Für folgende Dose-Response-Kurven wurde die Wirkung von Docetaxel auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen aller drei Zelllinien untersucht

LNCaP

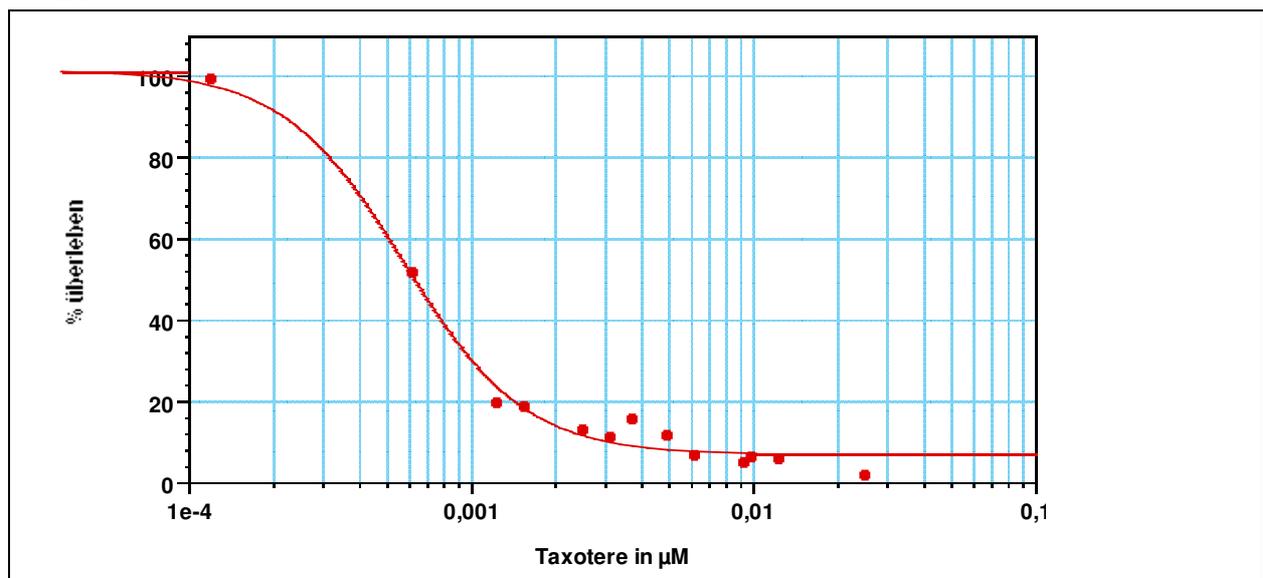
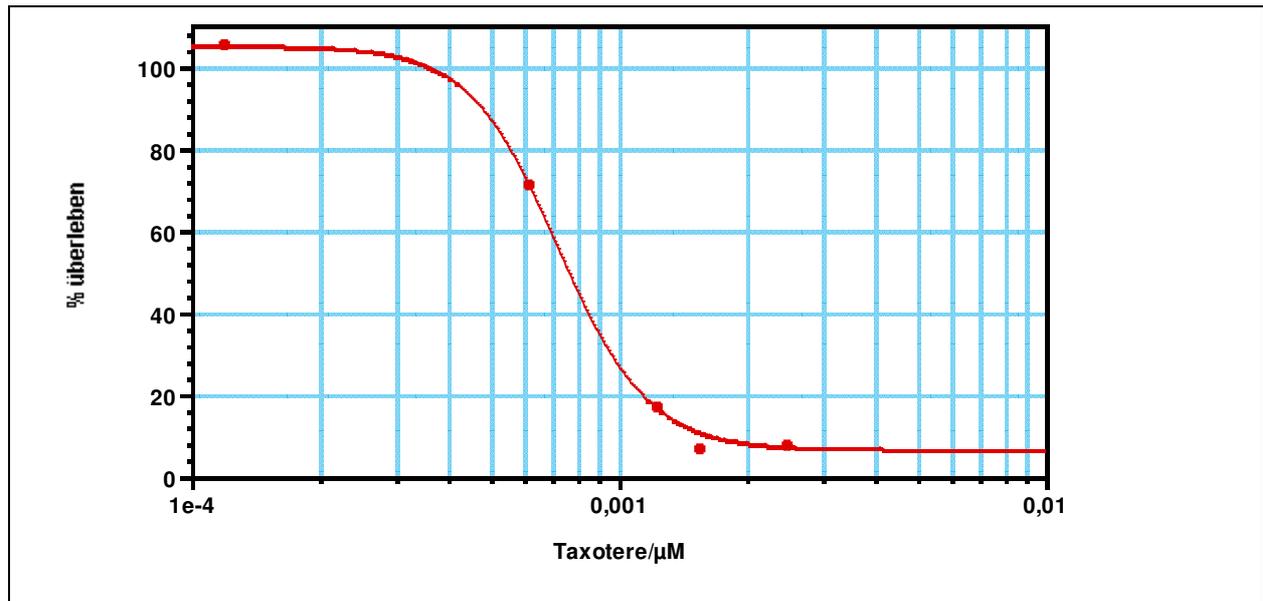
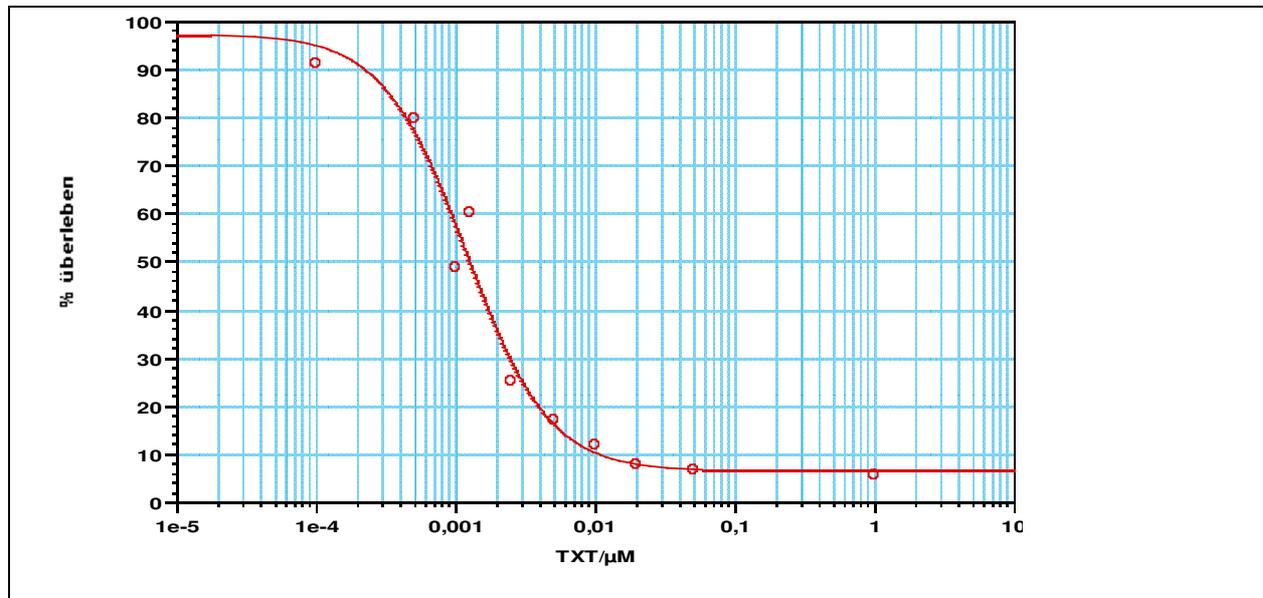


Abbildung 21: Proliferation der LNCaP-Zellen abhängig von Docetaxel

Bei LNCaP-Zellen zeigte sich ein langsamer Abfall des Wachstums im Bereich zwischen $0,0001$ und $0,0025\mu\text{M}$ bei einem IC_{50} -Wert von $0,0006\mu\text{M}$ und einem IC_{80} -Wert von $0,00142\mu\text{M}$.

DU-145**Abbildung 22: Proliferation der DU-145-Zellen abhängig von Docetaxel**

Bei den DU-145-Zellen zeigte sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 0,0003 und 0,002 μM bei einem IC₅₀-Wert von 0,0008 μM und einem IC₈₀-Wert von 0,0012 μM.

PC-3**Abbildung 23: Proliferation der PC-3-Zellen abhängig von Docetaxel**

Bei PC-3 ergab sich ein steiler Wachstumsabfall im Bereich zwischen 0,0001 und 0,01 μM bei einem IC_{50} -Wert von 0,00125 μM und einem IC_{80} -Wert von 0,0039 μM .

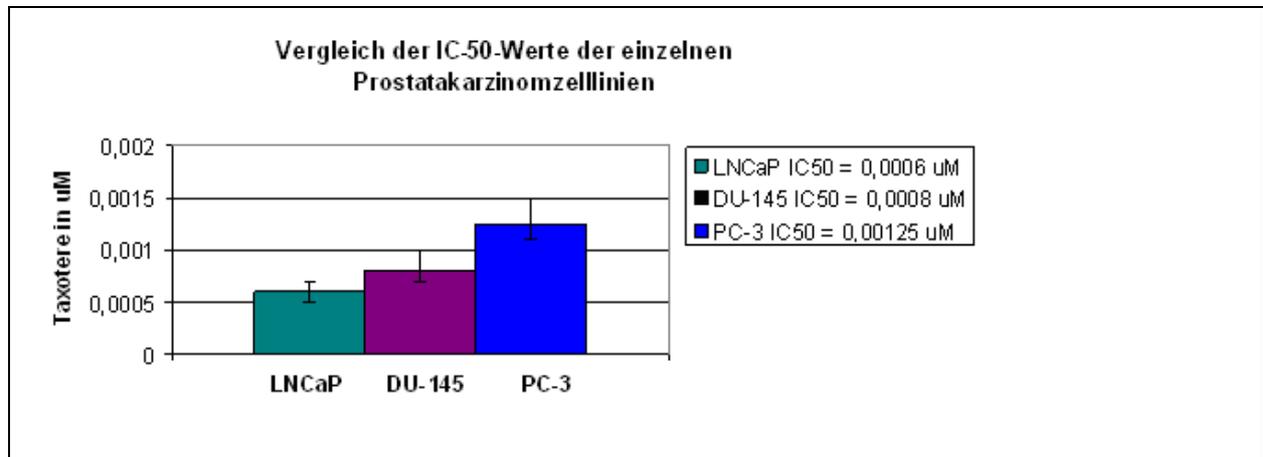
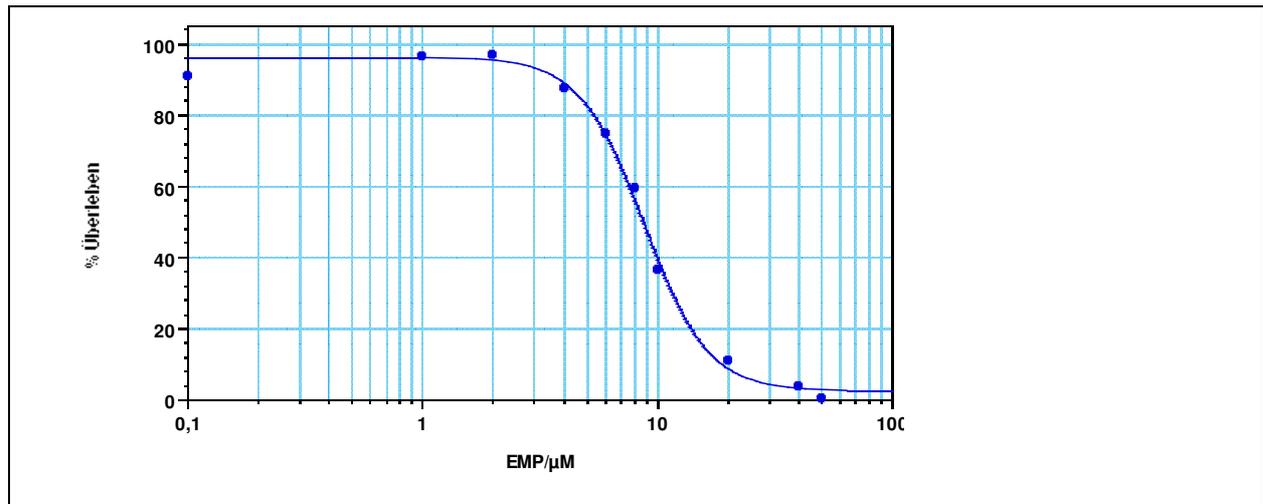


Abbildung 24: Vergleich der IC_{50} -Werte der Prostatakarzinomzelllinien abhängig von Docetaxel

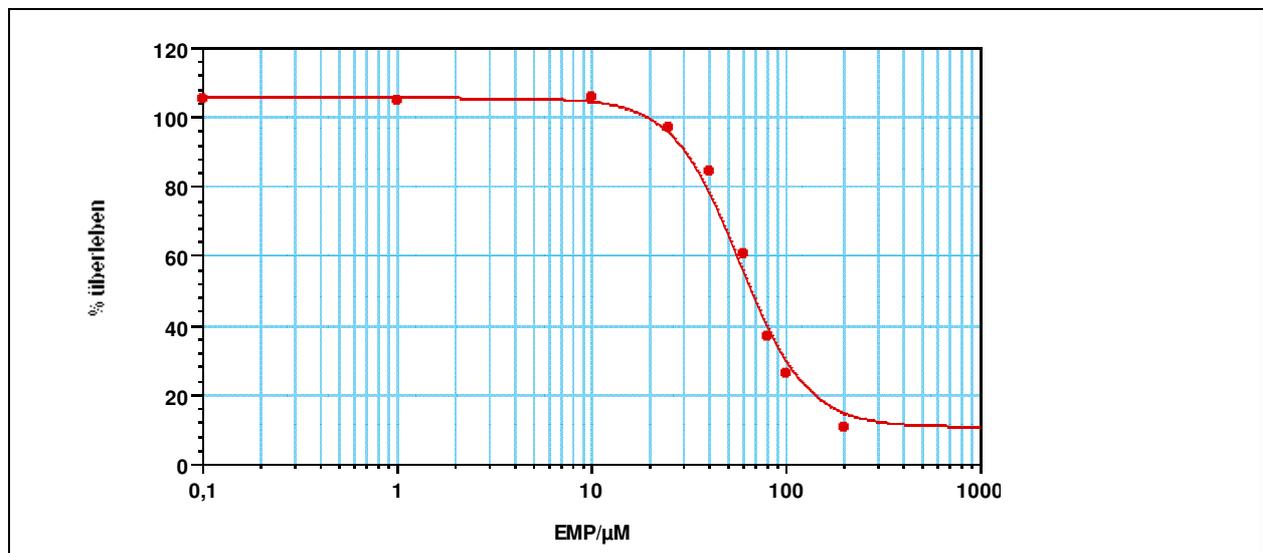
Beim Vergleich der jeweiligen IC_{50} - Werte der drei Zelllinien zeigte sich, dass für die Zelllinie PC-3 ($\text{IC}_{50} = 0,00125 \mu\text{M}$) die höchste Konzentration erforderlich war, um eine 50%ige Hemmung der Zellproliferation zu erreichen. Bei der Zelllinie LNCaP wurde bereits in einem niedrigen Konzentrationsbereich von 0,0006 μM eine 50%ige Hemmung erlangt. Während sich bei LNCaP erst bei 0,0062 μM eine Hemmung der Zellproliferation von 93,1% ergab, zeigte sich bei der DU-145-Zelllinie bereits ab 0,00155 μM eine 90,3%ige Proliferationshemmung.

3.1.1.4 Estramustinphosphat

Für folgende Dose-Response-Kurven wurde die Wirkung von Estramustinphosphat auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen aller drei Zelllinien untersucht.

LNCaP**Abbildung 25: Proliferation der LNCaP-Zellen abhängig von Estramustinphosphat**

Bei LNCaP-Zellen zeigte sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 4 und 20 μM bei einem IC_{50} -Wert von 8,72 μM und einem IC_{80} -Wert von 13,96 μM.

DU-145**Abbildung 26: Proliferation der DU-145-Zellen abhängig von Estramustinphosphat**

Bei DU-145-Zellen zeigte sich ein steiler Abfall des Wachstums im Bereich zwischen 10 und 100 μM bei einem IC_{50} -Wert von 67,80 μM und einem IC_{80} -Wert von 116,60 μM.

PC-3

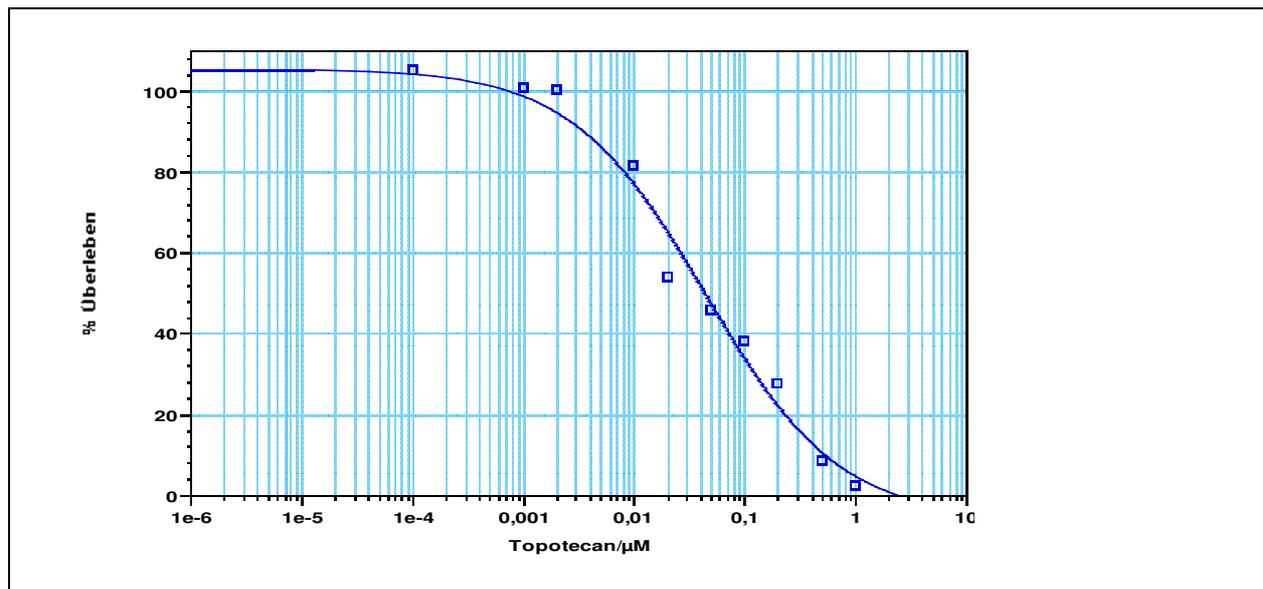


Abbildung 27: Proliferation der PC-3-Zellen abhängig von Estramustinphosphat

Bei PC-3 ergab sich ein steiler Wachstumsabfall im Bereich zwischen 10 und 100 µM bei einem IC_{50} -Wert von 34,34 µM und einem IC_{80} -Wert von 75,28 µM.

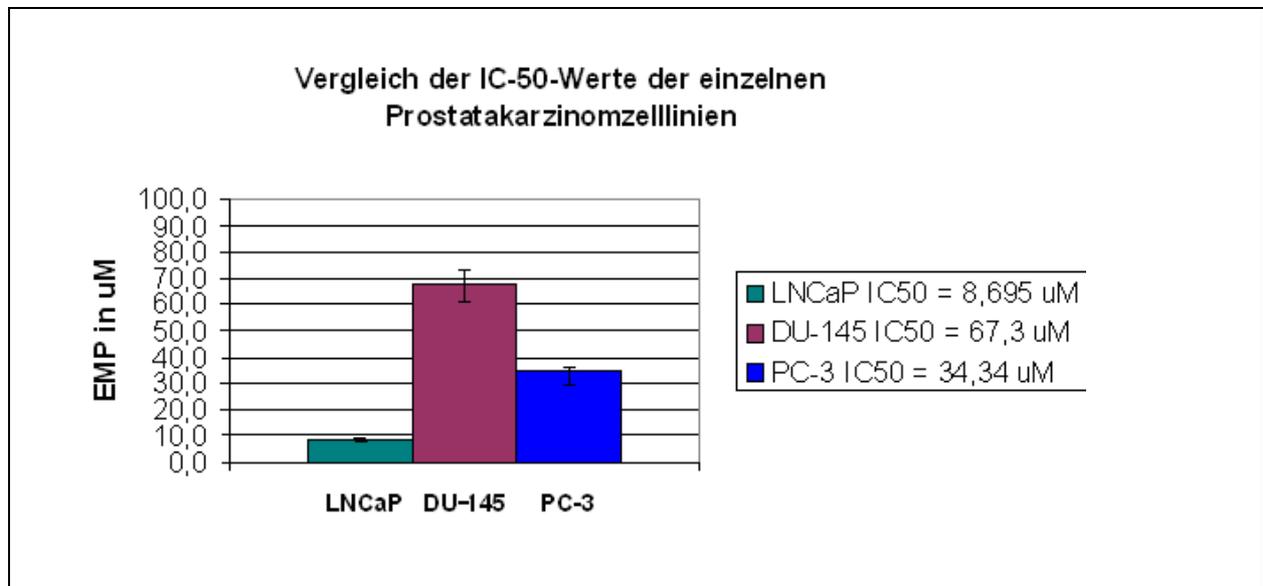


Abbildung 28: Vergleich der IC_{50} -Werte der Prostatakarzinomzelllinien abhängig von Estramustinphosphat

Die LNCaP-Linie war im Vergleich sehr sensibel für EMP; bereits in einem niedrigen Konzentrationsbereich von 8,69µM wurde eine 50%ige Hemmung erlangt. Schon ab 40µM ergab sich eine Hemmung der Zellproliferation von 97,1%.

Die Zellen DU-145 hingegen erwiesen sich resistenter bei einer IC_{50} von $67,8\mu\text{M}$. Für die PC-3-Zelllinie ergab sich ein IC_{50} – Wert von $34,34\mu\text{M}$.

3.1.2 Kombinationstherapien

In einer nächsten Versuchsreihe wurde die Wirkung von Zytostatikakombinationen untersucht. Als Grundsubstanz wurde Topotecan benutzt, dass in Kombination mit Etoposid, Docetaxel und Estramustinphosphat getestet wurde.

3.1.2.1 LNCaP-Zelllinie

3.1.2.1.1 Etoposid und Topotecan

Der Kombinationversuch erfolgte mit Etoposid und Topotecan. Die IC_{50} -Werte der Einzelsubstanzen waren hierbei:

IC_{50} : Etoposid = $0,81\mu\text{M}$ ($0,7\mu\text{M}$ - $1,2\mu\text{M}$)

IC_{50} : Topotecan = $0,0077\mu\text{M}$ ($0,0061\mu\text{M}$ - $0,0095\mu\text{M}$).

Die Proliferationskurven zeigten sowohl bei Etoposid mit jeweils ansteigenden Topotecankonzentrationen als auch bei Topotecan mit ansteigenden Etoposidkonzentrationen (siehe Abbildung 29) einen deutlichen dosisabhängigen Abfall.

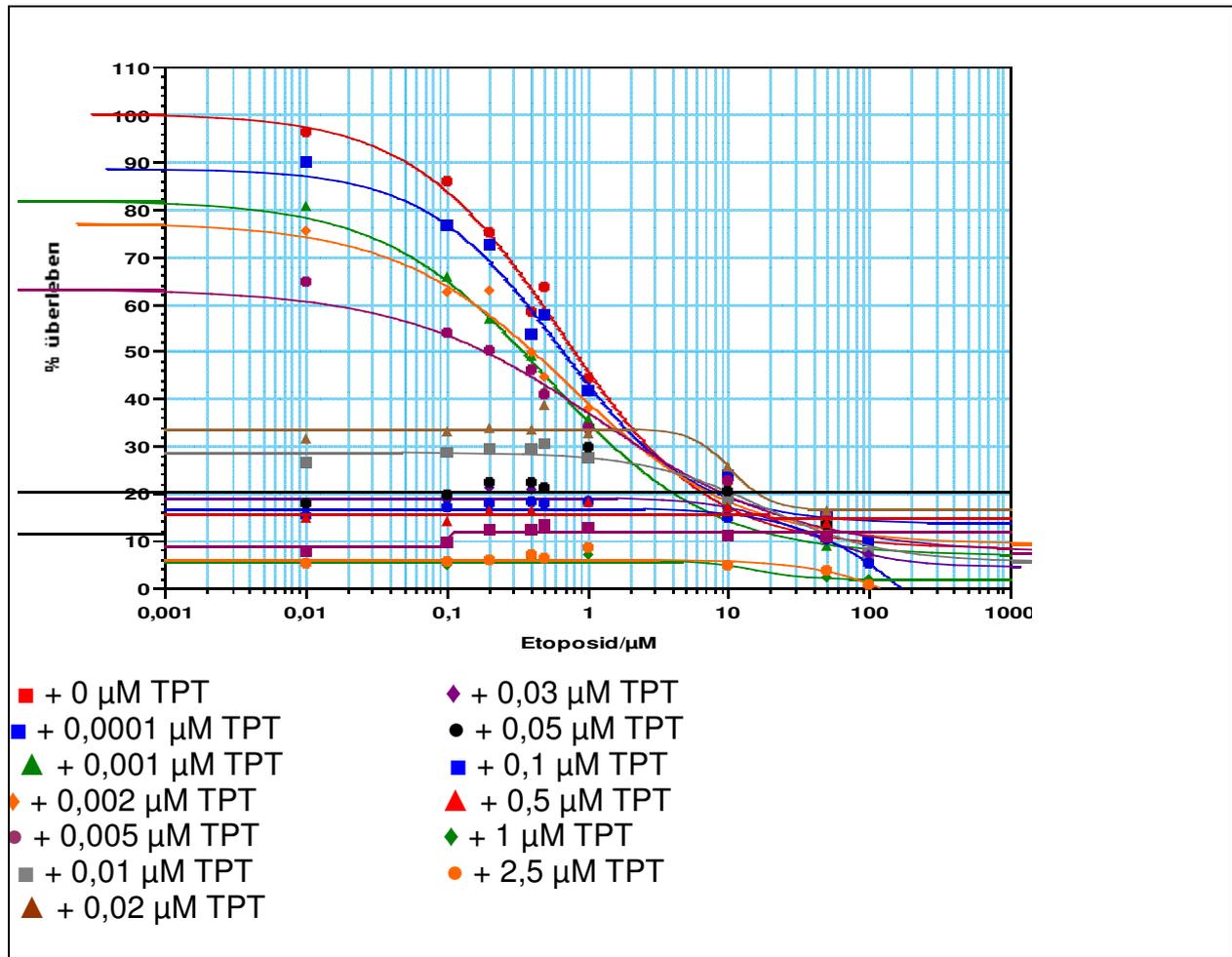


Abbildung 29: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von Etoposid und Topotecan

Die Tabelle 9 zeigt das %-Überleben der LNCaP-Zellen, die mit Etoposid bzw. Topotecan der IC₅₀-Konzentration inkubiert wurden. Es ergab sich ein %-Überleben von 33,4%.

TPT/µM	Eto/µM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
0,0077	0,81	33,4	28,0	38,0

Tabelle 9: %-Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Etoposid bzw. Topotecan

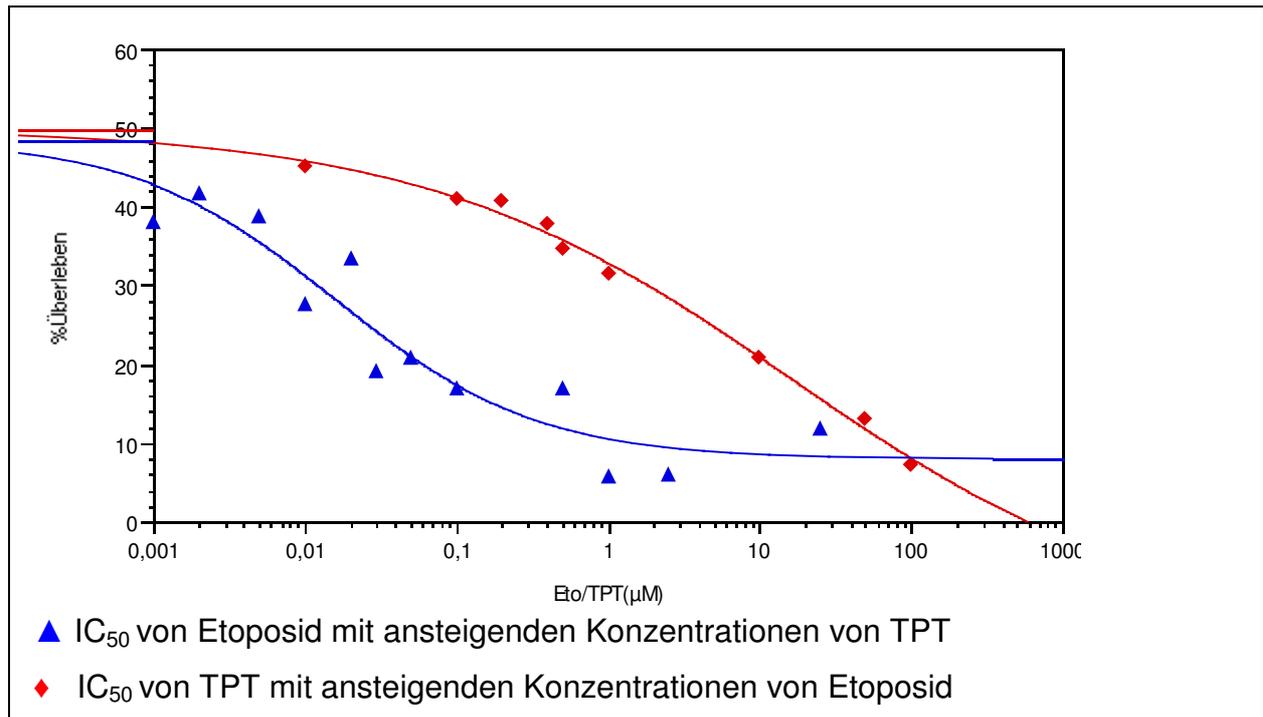


Abbildung 30: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz

Tabelle 10 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC_{50} von Topotecan bzw. Etoposid, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich eine synergistische Wirkbeziehung mit Anteil an im additivem Bereich liegenden Datenpunkten.

$\frac{\text{TPT - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,420	0,274	0,626	0,596	0,785	Synergistisch, n.s.
$\frac{\text{Eto - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,498	0,317	0,783	0,657	0,822	Synergistisch, n.s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
0,454	0,293	0,696	0,623	0,801	Synergistisch, n.s.

Tabelle 10: gemittelte relative IC50-Werte für TPT bzw. Eto in Abhängigkeit von Eto und TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

Die ermittelte Isobologrammkurve (siehe Abbildung 31) zeigt graphisch die Datenpunkte, die im synergistischen als auch additiven Bereich liegen.

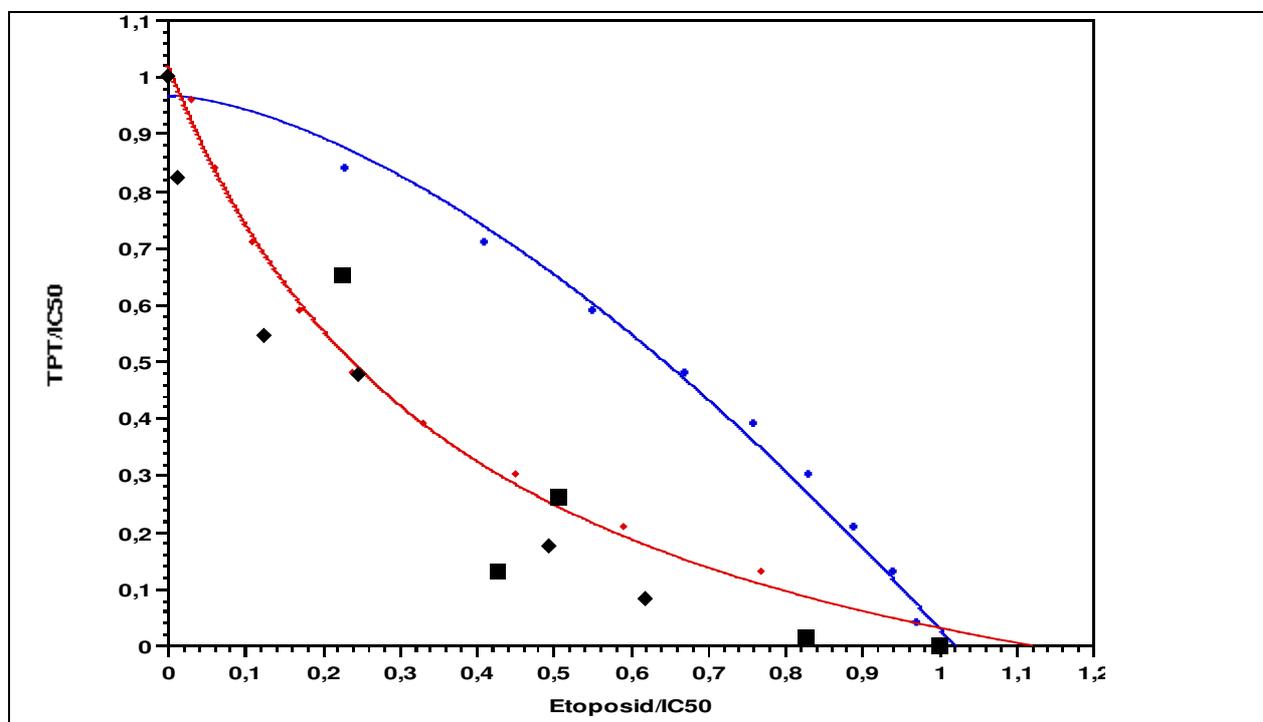


Abbildung 31: Isobologramm der LNCaP-Zelllinie für Etoposid und Topotecan

3.1.2.1.2 Docetaxel und Topotecan

Die jeweiligen IC_{50} –Werte lagen im folgenden Bereich:

IC_{50} von TXT = $0,0006\mu\text{M}$ ($0,0005\mu\text{M}$ - $0,0007\mu\text{M}$)

IC_{50} von TPT = $0,0077\mu\text{M}$ ($0,0061\mu\text{M}$ - $0,0095\mu\text{M}$)

Auch die Proliferationskurven der LNCaP-Zelllinie zeigten einen sigmoiden Abfall bei steigenden Docetaxelkonzentrationen.

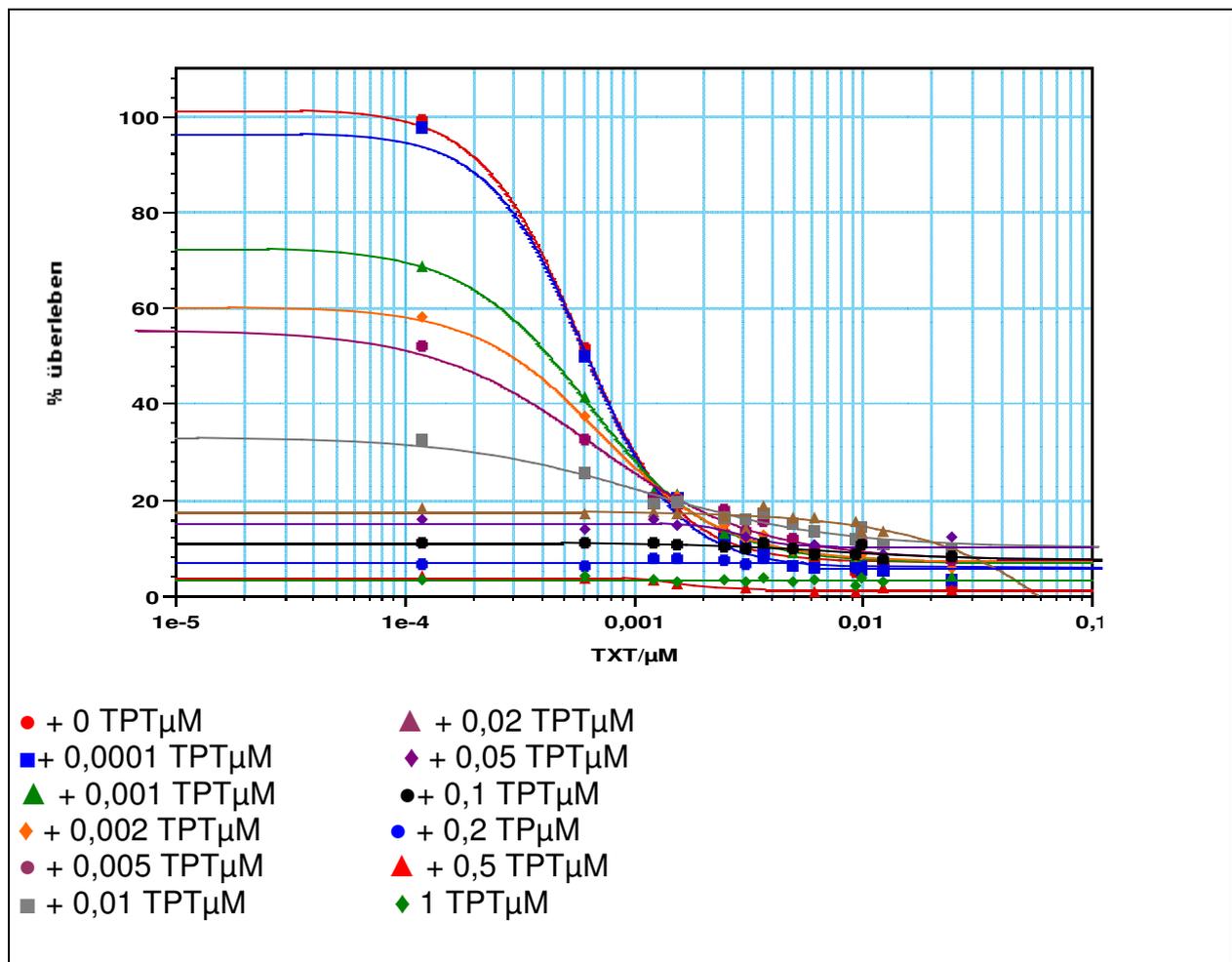


Abbildung 32: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von Docetaxel und Topotecan

Bei der Inkubation mit beiden IC_{50} -Konzentrationen von Docetaxel und Topotecan ergab sich ein %-Überleben von etwa 26,4%.

TPT/ μM	TXT/ μM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
0,0077	0,0006	26,4	22,2	30,7

Tabelle 11: %Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Docetaxel bzw. Topotecan

Abbildung 33 zeigt graphisch den Abfall vom %-Überleben bei der IC_{50} von Docetaxel bzw. Topotecan und steigenden Konzentrationen von Topotecan bzw. Docetaxel.

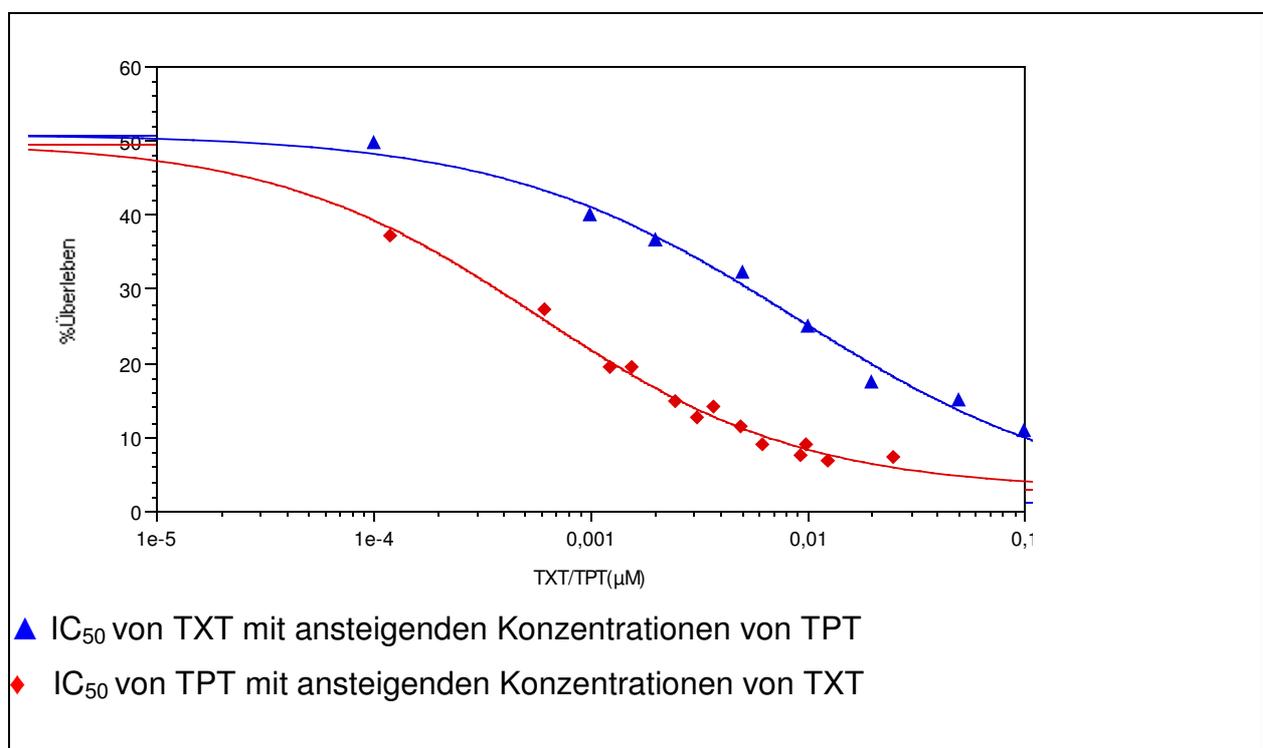


Abbildung 33: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz

Tabelle 12 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC_{50} von Topotecan bzw. TXT, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich eine synergistische Wirkbeziehung mit Anteil an im additivem Bereich liegenden Datenpunkten.

$\frac{\text{TPT - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,243	0,274	0,431	0,355	0,502	Synergistisch, n.s.
$\frac{\text{TXT - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,583	0,429	0,795	0,580	0,824	Additiv, n.s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
0,470	0,390	0,673	0,505	0,717	Synergistisch, n.s.

Tabelle 12: gemittelte relative IC50-Werte für TPT bzw. TXT in Abhängigkeit von TXT bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

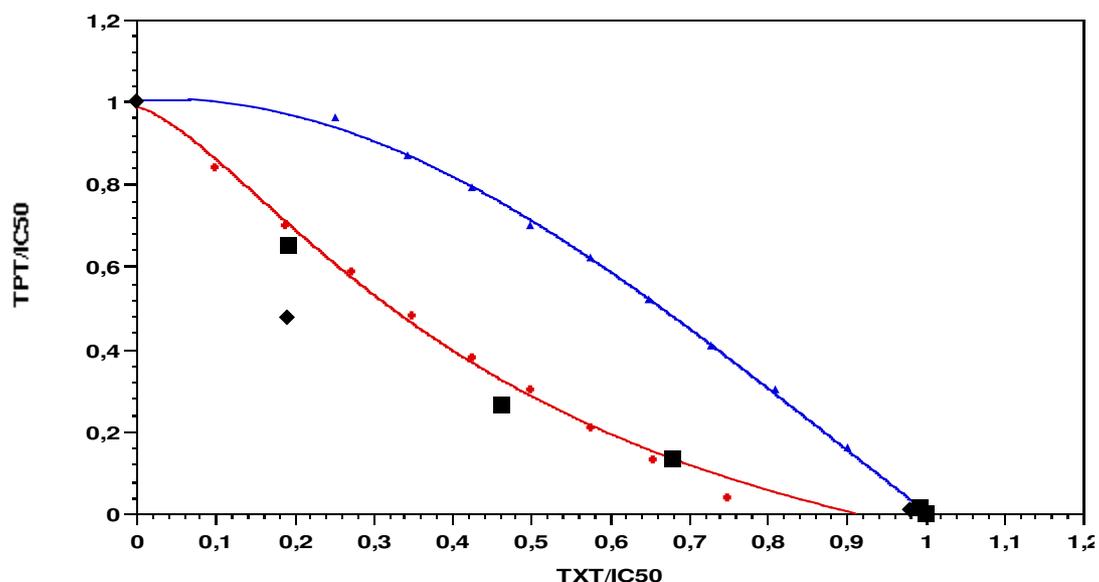


Abbildung 34: Isobologramm der LNCaP-Zelllinie für Docetaxel und Topotecan

3.1.2.1.3 Estramustinphosphat und Topotecan

Beim Kombinationsversuch mit Estramustinphosphat und Topotecan lagen die jeweiligen IC₅₀-Werte im folgenden Bereich:

IC₅₀/EMP = 8,72 µM (8,00 µM - 9,44µM)

IC₅₀/TPT = 0,0077 µM (0,0061 µM -0,0095 µM)

Die Proliferationskurven der LNCaP-Zelllinie zeigten einen sigmoiden Abfall bei steigenden Estramustinphosphatkonzentrationen.

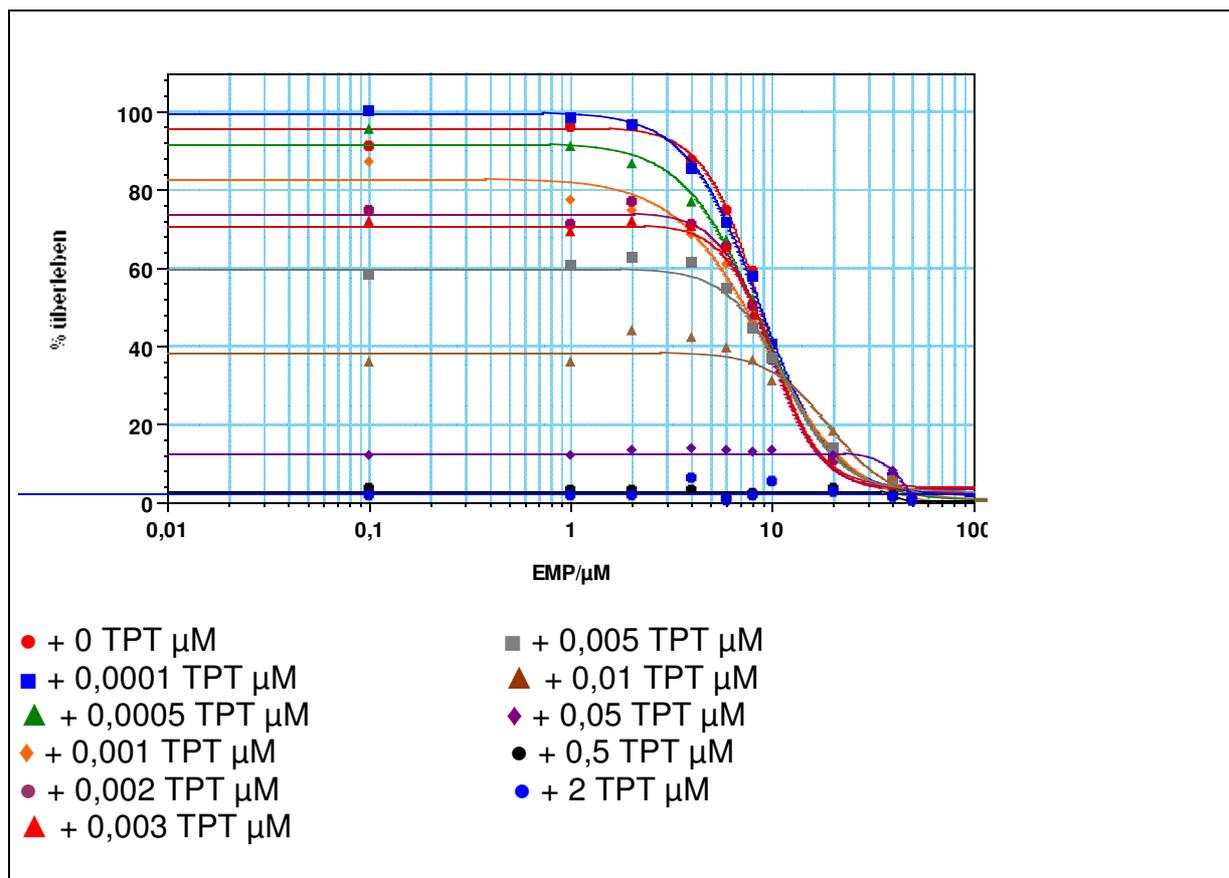


Abbildung 35: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von EMP und TPT

Bei der Inkubation mit beiden IC_{50} -Konzentrationen von EMP und Topotecan ergab sich ein %-Überleben von etwa 38,3%.

TPT/ μM	EMP / μM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
	8,72	38,3	34,7	41,8

Tabelle 13: %-Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Estramustinphosphat bzw. Topotecan

Abbildung 36 zeigt graphisch den Abfall vom %-Überleben bei der IC_{50} von Estramustinphosphat bzw. Topotecan und steigenden Konzentrationen von Topotecan bzw. Estramustinphosphat.

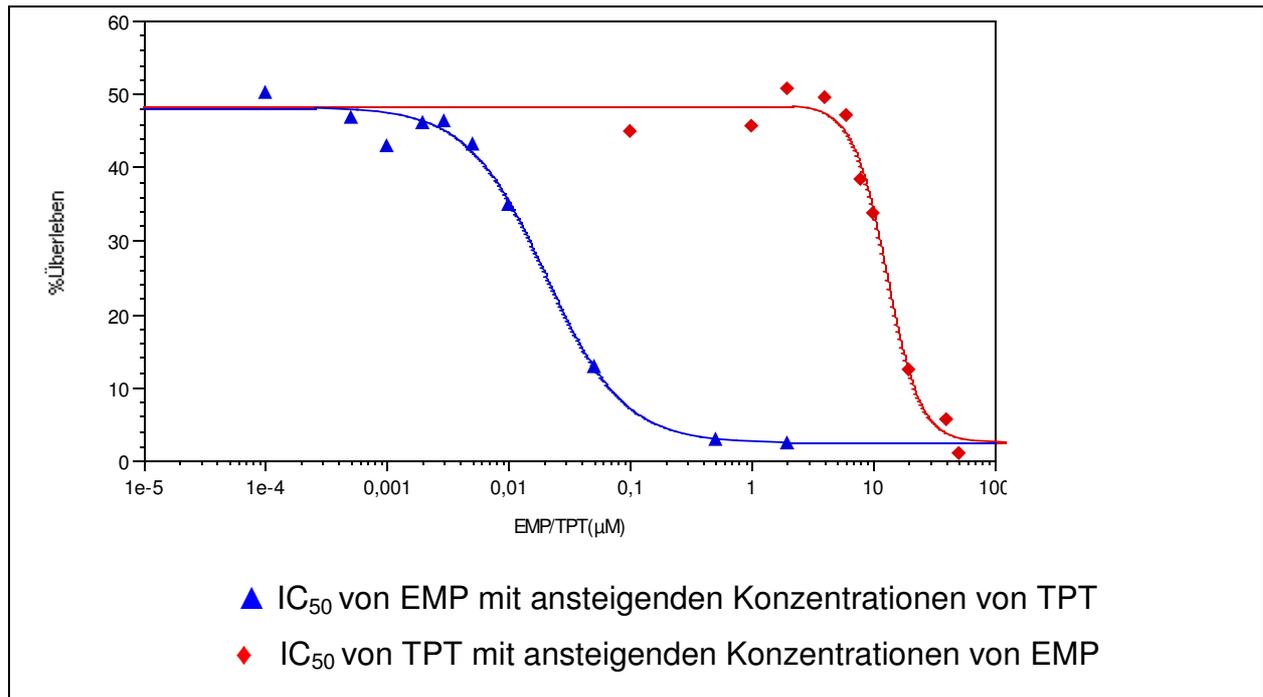


Abbildung 36: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz

Tabelle 14 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC_{50} von Topotecan bzw. TXT, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich eine deutliche antagonistische Wirkbeziehung.

<u>TPT - Konzentration</u> <u>IC50 - Konzentration</u>	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,797	0,570	1,050	0,422	0,769	antagonistisch, n.s.
<u>EMP - Konzentration</u> <u>IC50 - Konzentration</u>	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,910	0,808	0,987	0,510	0,880	antagonistisch, n.s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
0,85	0,69	1,02	0,47	0,82	antagonistisch, n.s.

Tabelle 14: gemittelte relative IC50-Werte für TPT bzw. EMP in Abhängigkeit von EMP bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

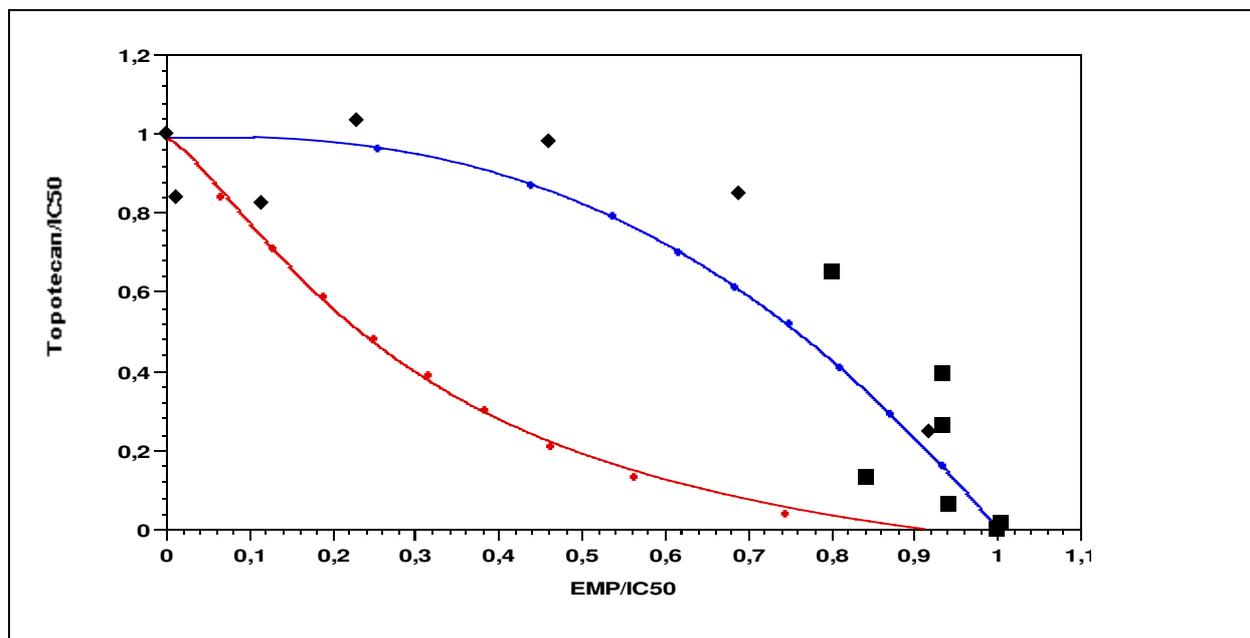


Abbildung 37: Isobologramm der LNCaP-Zelllinie für Estramustinphosphat und Topotecan

3.1.2.2 DU-145-Zelllinie

3.1.2.2.1 Etoposid und Topotecan

Beim Kombinationsversuch mit Etoposid und Topotecan lagen die jeweiligen IC_{50} – Werte im folgenden Bereich:

$IC_{50}/\text{Etoposid} = 0,44\mu\text{M}$ (0,39 μM -0,49 μM)

$IC_{50}/\text{Topotecan} = 0,0137\mu\text{M}$ (0,0127 μM -0,0145 μM)

Die Proliferationskurven der DU-145-Zelllinie zeigten einen sigmoiden Abfall bei steigenden Etoposidkonzentrationen.

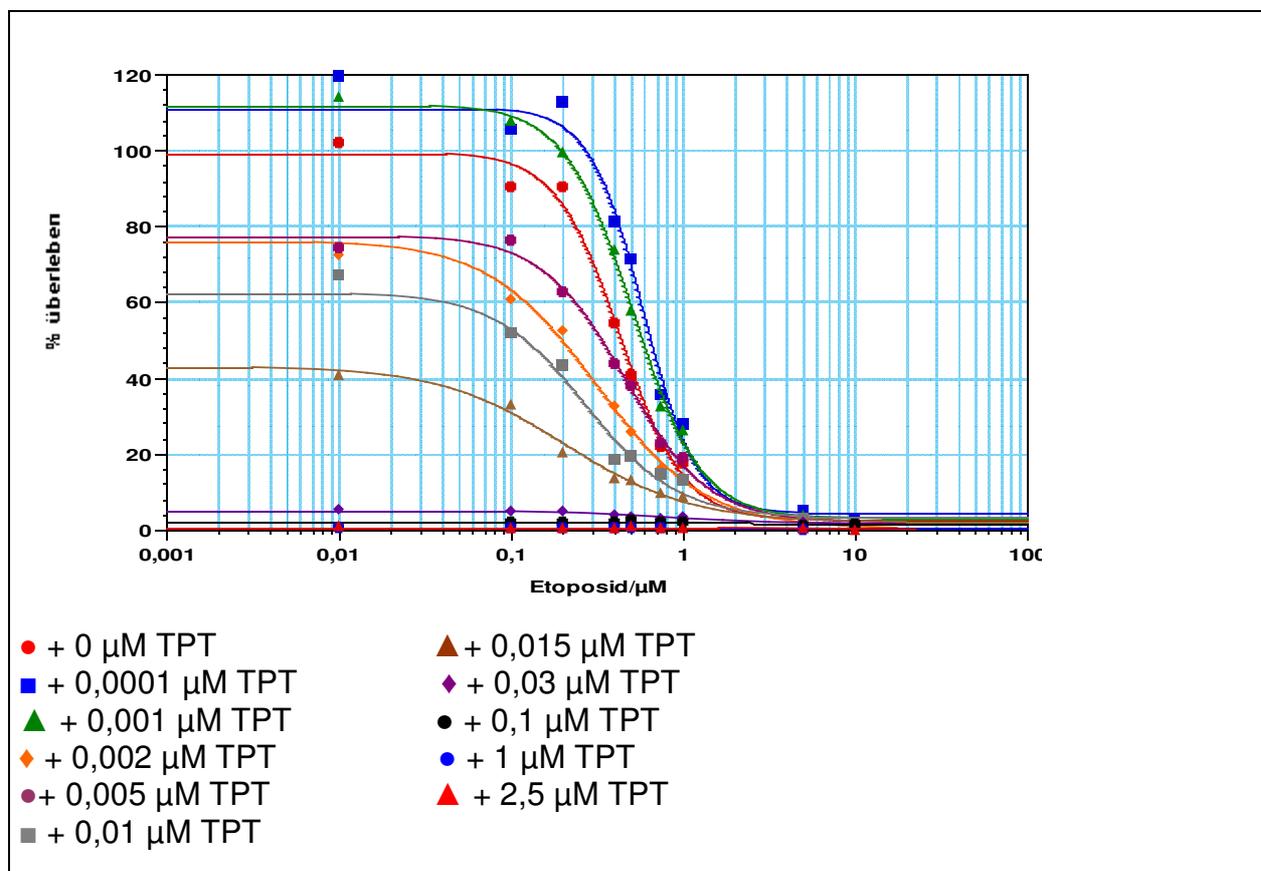
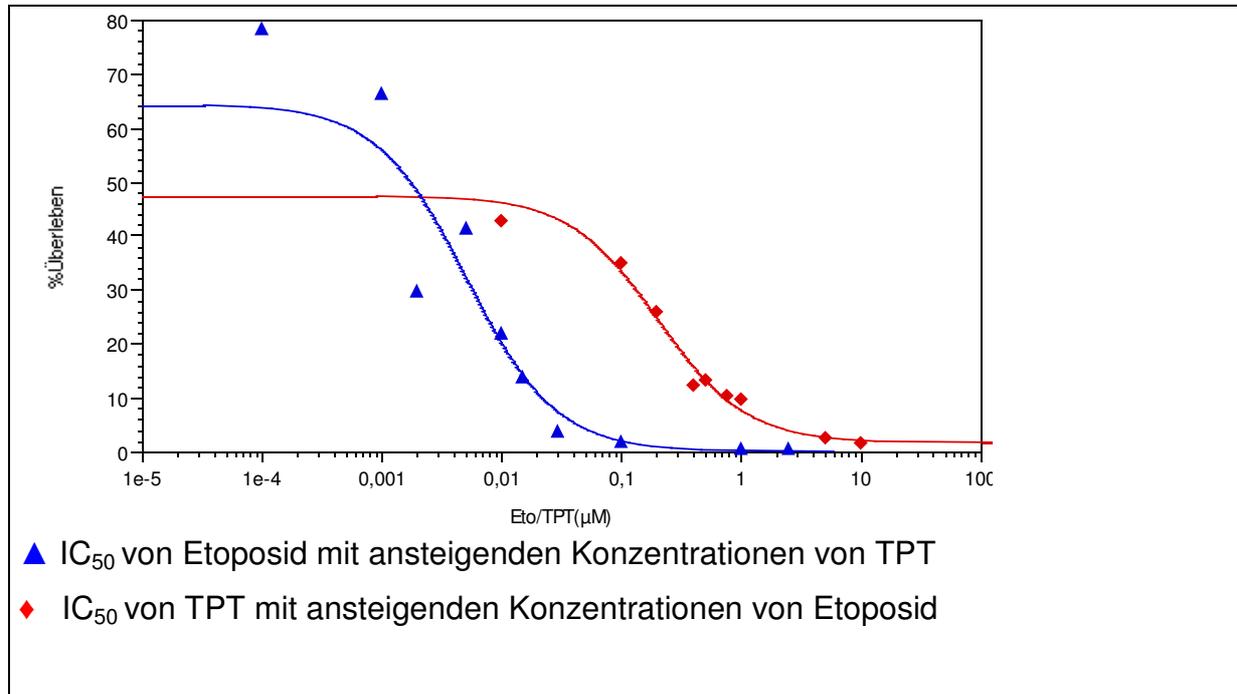


Abbildung 38: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von Etoposid und Topotecan

Bei der Inkubation mit beiden IC_{50} -Konzentrationen von Etoposid und Topotecan ergab sich ein %-Überleben von etwa 15,2%.

TPT/ μM	Eto / μM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
0,014	0,44	15,2	11,6	18,4

**Tabelle 15: %Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinations-
substanz, abhängig von Etoposid bzw. Topotecan**



**Abbildung 39: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten
Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz**

Tabelle 16 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC_{50} von Topotecan bzw. Etoposid, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich eine deutliche additive Wirkbeziehung.

$\frac{\text{TPT - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,607	0,506	0,699	0,458	0,693	additiv, n.s.
$\frac{\text{Eto - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,861	0,821	1,037	0,793	0,890	additiv, n.s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
0,748	0,608	0,887	0,625	0,803	additiv, n.s.

Tabelle 16: gemittelte relative IC₅₀-Werte für TPT bzw. Eto in Abhängigkeit von Etoposid bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

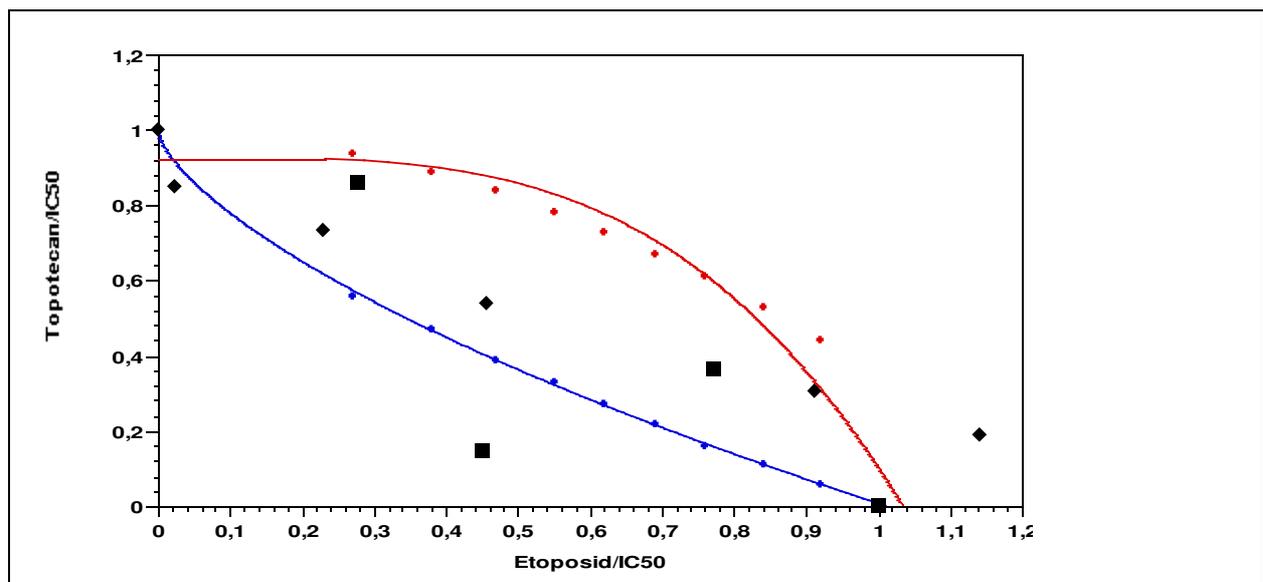


Abbildung 40: Isobologramm der DU-145-Zelllinie für Etoposid und Topotecan

3.1.2.2.2 Docetaxel und Topotecan

Beim Kombinationsversuch mit Docetaxel und Topotecan lagen die jeweiligen IC₅₀ – Werte im folgenden Bereich:

Docetaxel/IC₅₀ = 0,0008 µM (0,0007 µM -0,00085 µM)

Topotecan/IC₅₀ = 0,0137 µM (0,0127 µM -0,0145 µM)

Die Proliferationskurven der DU-145-Zelllinie zeigten einen sigmoiden Abfall bei steigenden Docetaxelkonzentrationen.

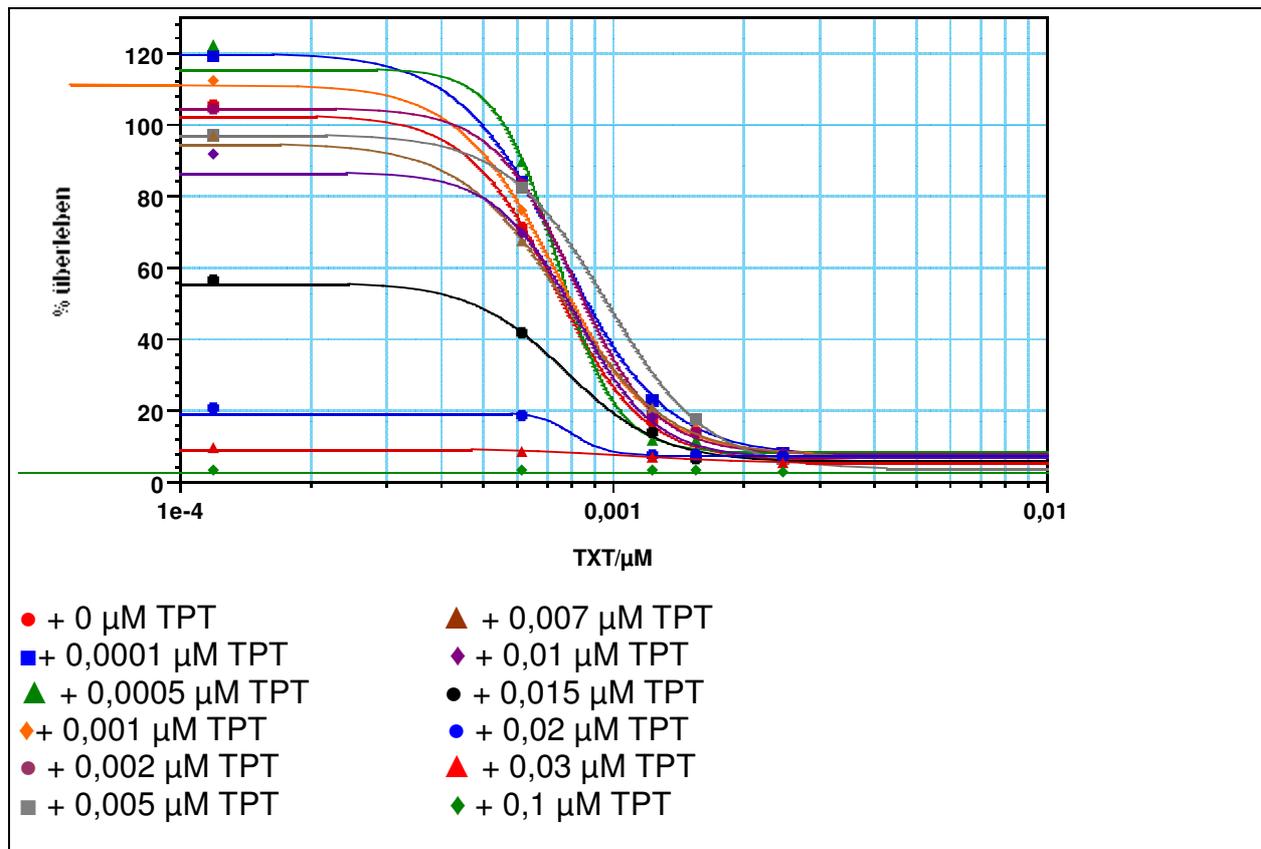


Abbildung 41: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von TXT und TPT

Bei der Inkubation mit beiden IC_{50} -Konzentrationen von Docetaxel und Topotecan ergab sich ein %-Überleben von etwa 37,4%

TPT/ μM	TXT/ μM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
0,0137	0,0008	37,4	32,6	41,5

Tabelle 17: %Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinations-substanz, abhängig von Docetaxel bzw. Topotecan

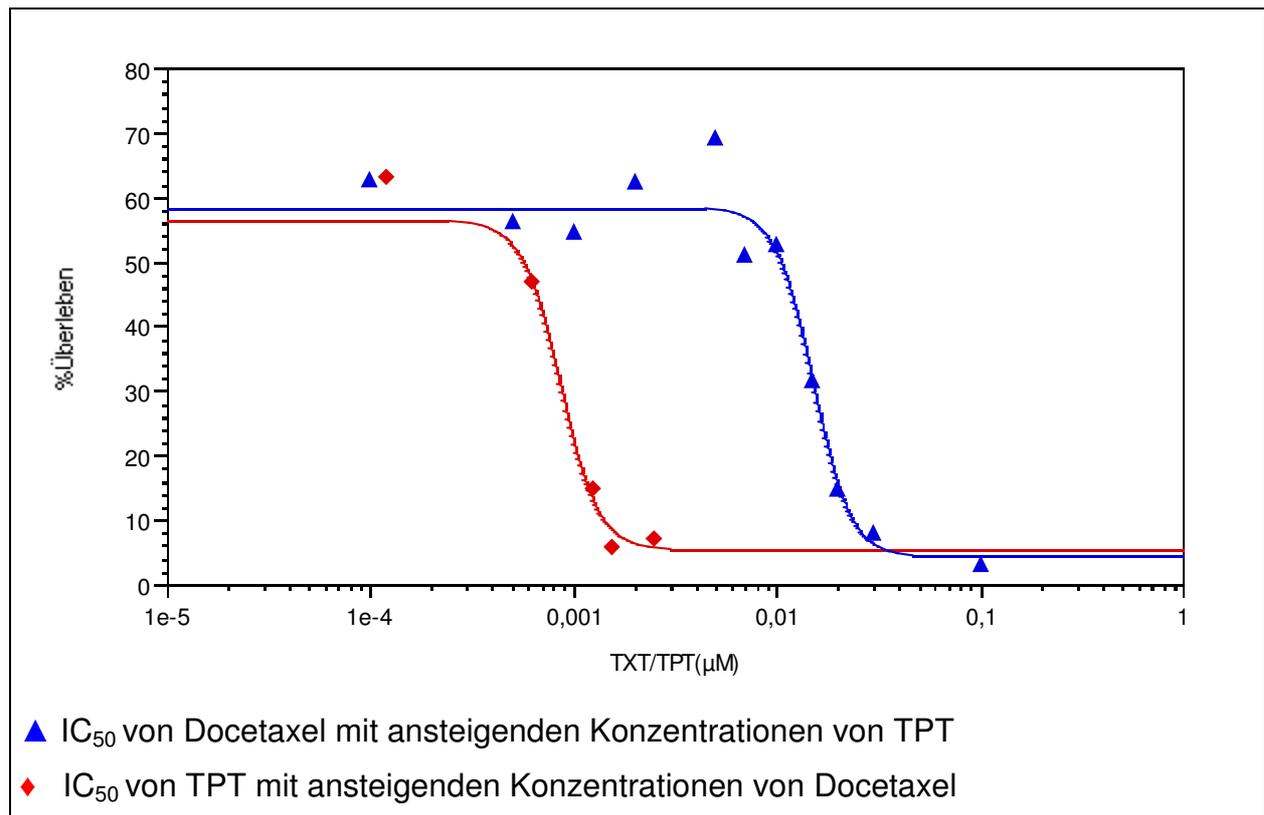


Abbildung 42: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von IC₅₀ der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz

Tabelle 18 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC₅₀ von Topotecan bzw. TXT, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich eine deutliche antagonistische Wirkbeziehung.

<u>TPT - Konzentration</u> <u>IC50 - Konzentration</u>	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
1,044	0,955	1,103	0,41	0,713	antagonistisch, s.
<u>TXT - Konzentration</u> <u>IC50 - Konzentration</u>	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
1,093	0,987	1,194	0,576	0,784	antagonistisch, s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
1,082	0,980	1,174	0,539	0,768	antagonistisch, s.

Tabelle 18: gemittelte relative IC50-Werte für TPT bzw. TXT in Abhängigkeit von TXT bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

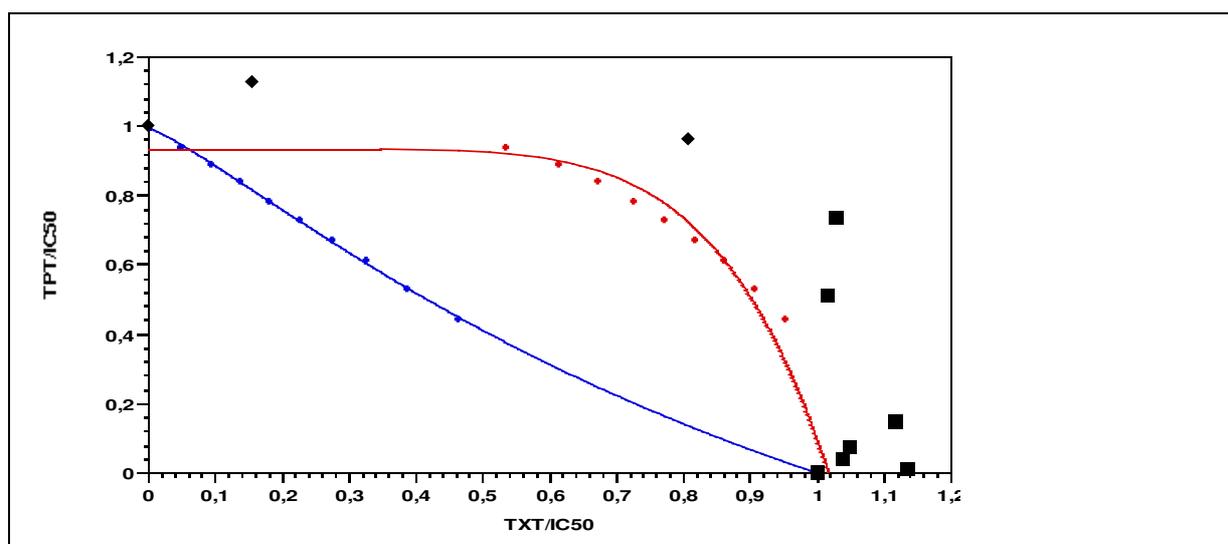


Abbildung 43: Isobologramm der DU-145-Zelllinie für Docetaxel und Topotecan

3.1.2.2.3 Estramustinphosphat und Topotecan

Beim Kombinationsversuch mit EMP und Topotecan lagen die jeweiligen IC₅₀ –Werte im folgenden Bereich:

EMP/ IC₅₀ = 67,8 µM (61,21µM -73,04 µM)

Topotecan/IC₅₀ = 0,0137 µM (0,0127 µM -0,0145 µM)

Die Proliferationskurven der DU-145-Zelllinie zeigten einen sigmoiden Abfall bei steigenden EMP-Konzentrationen.

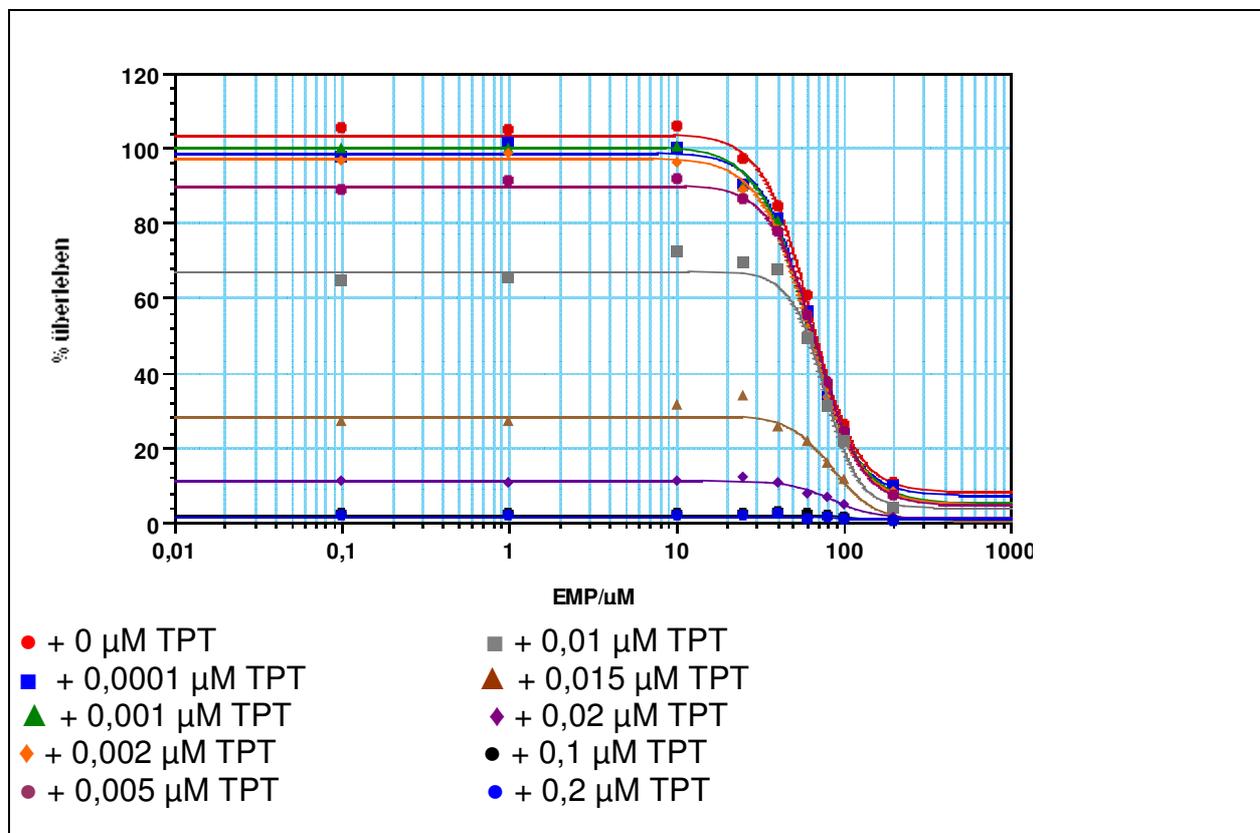


Abbildung 44: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von EMP und TPT

Bei der Inkubation mit beiden IC₅₀-Konzentrationen von EMP und Topotecan ergab sich ein %-Überleben von etwa 26,6%.

TPT/μM	EMP/μM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
0,0137	67,8	26,6	22,0	31,5

Tabelle 19: %Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentration der Kombinations-substanz, abhängig von EMP bzw. Topotecan

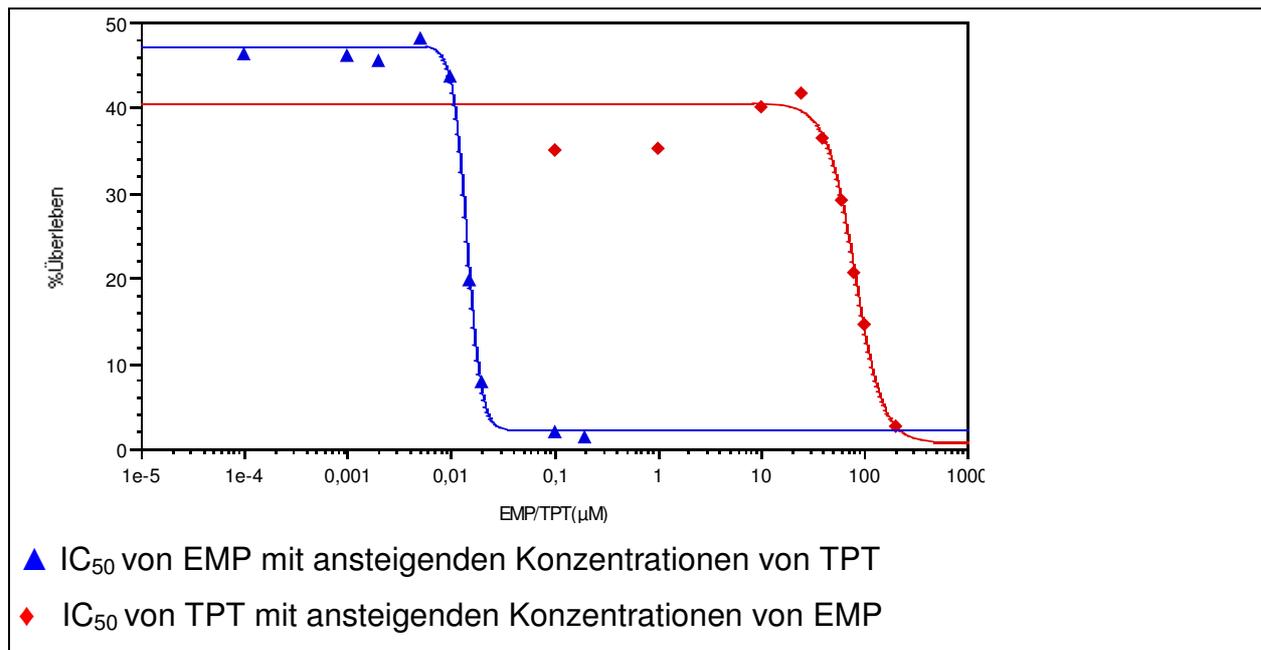


Abbildung 45: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von IC₅₀ der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz

Tabelle 20 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC₅₀ von Topotecan bzw. EMP, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich eine deutliche antagonistische Wirkbeziehung.

<u>TPT - Konzentration</u> <u>IC50 - Konzentration</u>	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,880	0,791	0,948	0,779	0,791	antagonistisch, s.
<u>EMP - Konzentration</u> <u>IC50 - Konzentration</u>	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,940	0,838	1,019	0,729	0,740	antagonistisch, s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
0,910	0,815	0,983	0,754	0,766	antagonistisch, s.

Tabelle 20: gemittelte relative IC₅₀-Werte für TPT bzw. EMP in Abhängigkeit von EMP bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

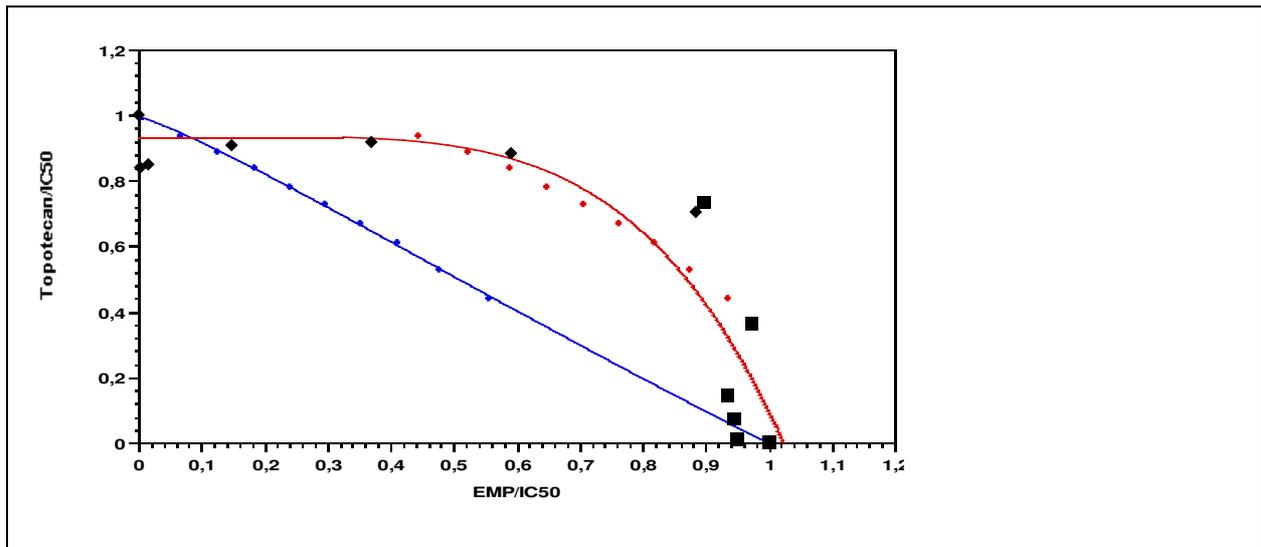


Abbildung 46: Isobologramm der DU-145-Zelllinie für Estramustinphosphat und Topotecan

3.1.2.3 PC-3-Zelllinie

1.2.3.1 Etoposid und Topotecan

Beim Kombinationsversuch mit Etoposid und Topotecan lagen die jeweiligen IC_{50} – Werte im folgenden Bereich:

$IC_{50}/\text{Etoposid} = 1,48 \mu\text{M}$ ($1 \mu\text{M} - 2,24 \mu\text{M}$)

$IC_{50}/\text{Topotecan} = 0,044 \mu\text{M}$ ($0,036 \mu\text{M} - 0,053 \mu\text{M}$)

Die Proliferationskurven der PC-3-Zelllinie zeigten einen sigmoiden Abfall bei steigenden Etoposid -Konzentrationen.

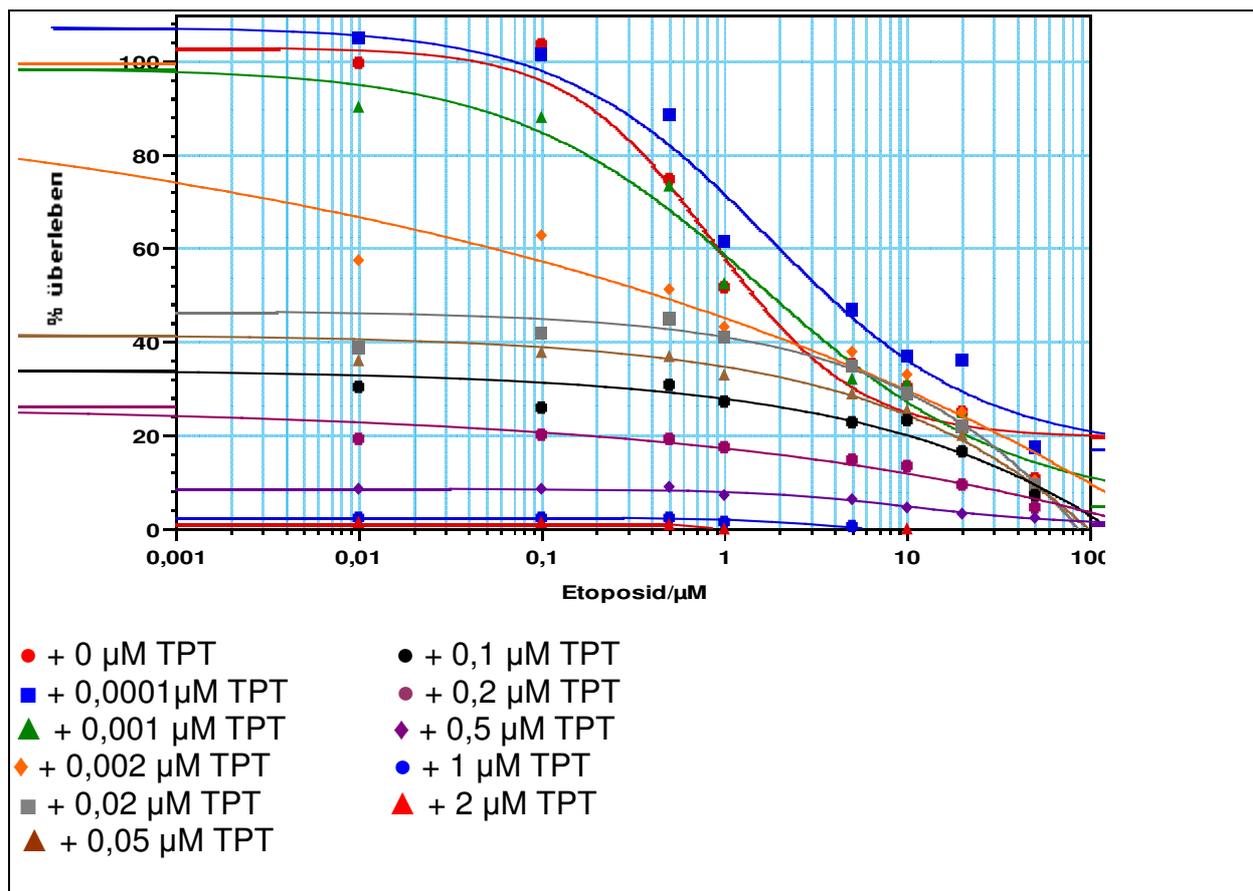


Abbildung 47: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von Etoposid und Topotecan

Bei der Inkubation mit beiden IC₅₀-Konzentrationen von Etoposid und Topotecan ergab sich ein %-Überleben von etwa 33,2%.

TPT/μM	Eto/μM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
0,044	1,45	27,5	21,3	33,5

Tabelle 21: %Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentration der Kombinations-substanz, abhängig von Etoposid bzw. Topotecan

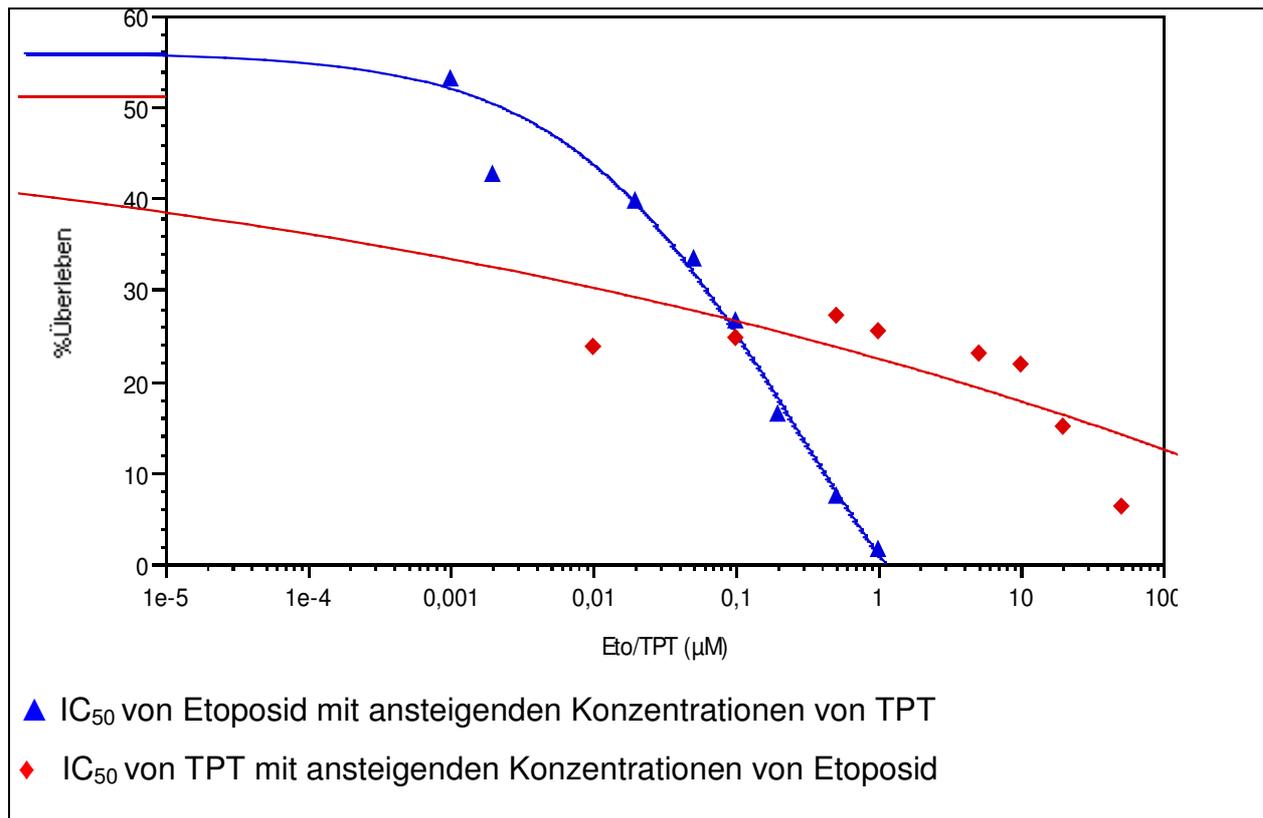


Abbildung 48: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von IC_{50} der einen Substanz mit steigenden Konzentrationen der anderen Substanz

Tabelle 23 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC_{50} von Topotecan bzw. Eto, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich eine synergistische und additive Wirkbeziehung.

$\frac{\text{TPT - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,138	0,090	0,245	0,702	0,755	synergistisch, s.
$\frac{\text{Eto - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
1,354	0,837	2,177	0,951	0,977	additiv, n.s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
0,659	0,464	1,073	0,809	0,850	additiv, n.s.

Tabelle 22: gemittelte relative IC50-Werte für TPT bzw. Eto in Abhängigkeit von Etoposid bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

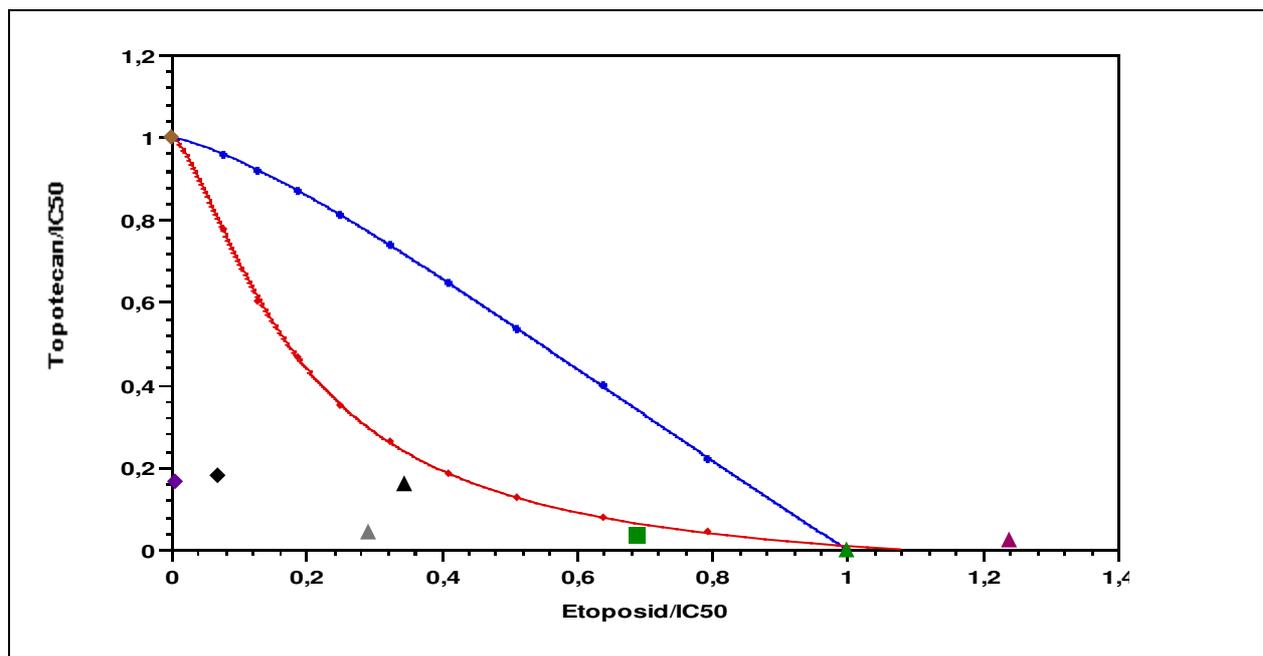


Abbildung 49: Isobologramm der PC-3-Zelllinie für Etoposid und Topotecan

3.1.2.3.2 Docetaxel und Topotecan

Beim Kombinationsversuch mit Docetaxel und Topotecan lagen die jeweiligen IC₅₀ – Werte im folgenden Bereich:

$$\text{IC}_{50}/\text{Docetaxel} = 0,0012 \mu\text{M} (0,0011 \mu\text{M} - 0,0015 \mu\text{M})$$

$IC_{50}/\text{Topotecan} = 0,044 \mu\text{M}$ ($0,036 \mu\text{M} - 0,053 \mu\text{M}$)

Die Proliferationskurven der PC-3-Zelllinie zeigten einen sigmoiden Abfall bei steigenden Docetaxel-Konzentrationen.

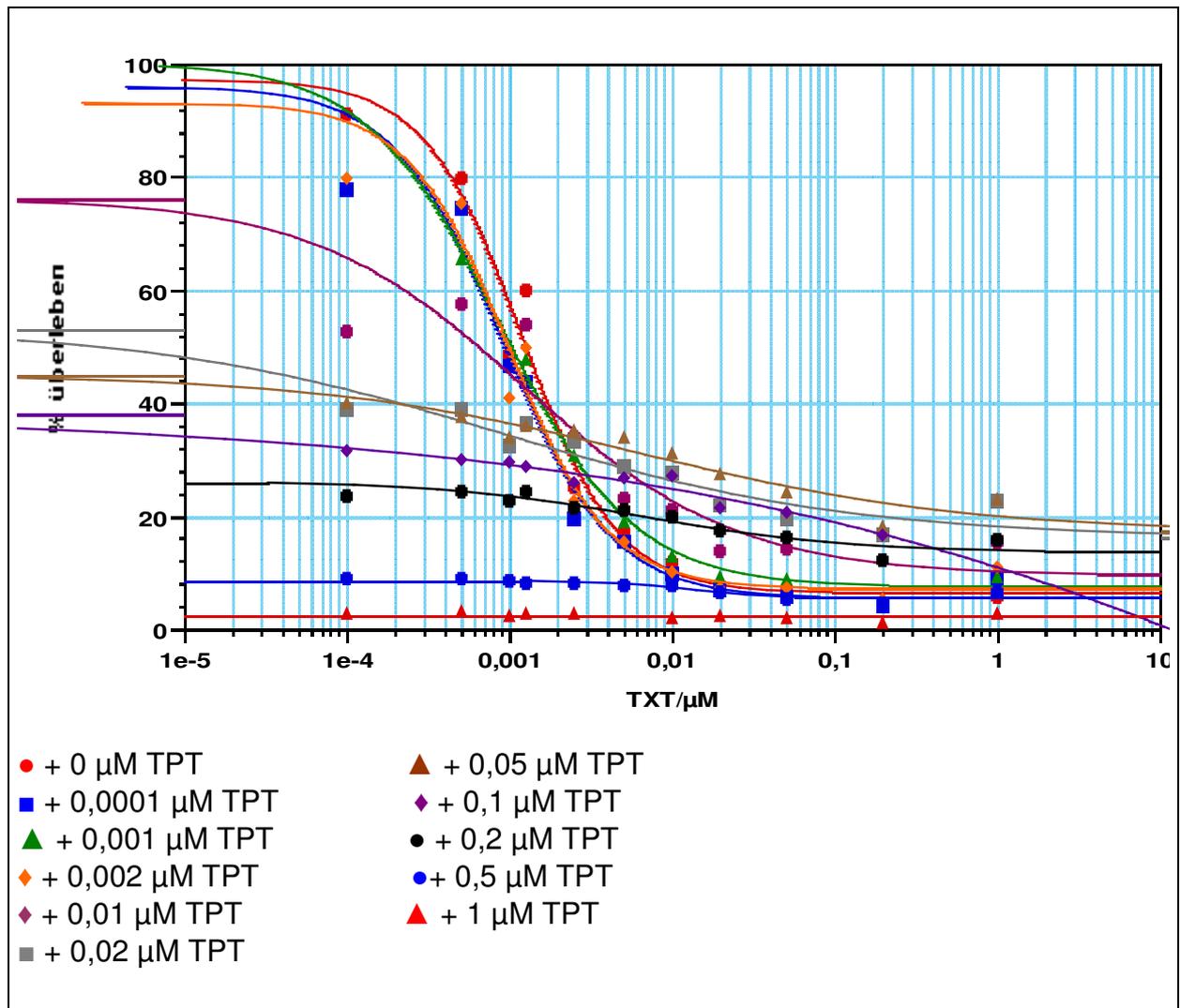


Abbildung 50: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von Docetaxel und Topotecan

Bei der Inkubation mit beiden IC_{50} -Konzentrationen von Docetaxel und Topotecan ergab sich ein %-Überleben von etwa 33,2%.

TPT/ μM	TXT/ μM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
0,044	0,00125	33,2	28,7	39,7

Tabelle 23: %-Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der

Kombinationssubstanz, abhängig von Docetaxel bzw. Topotecan

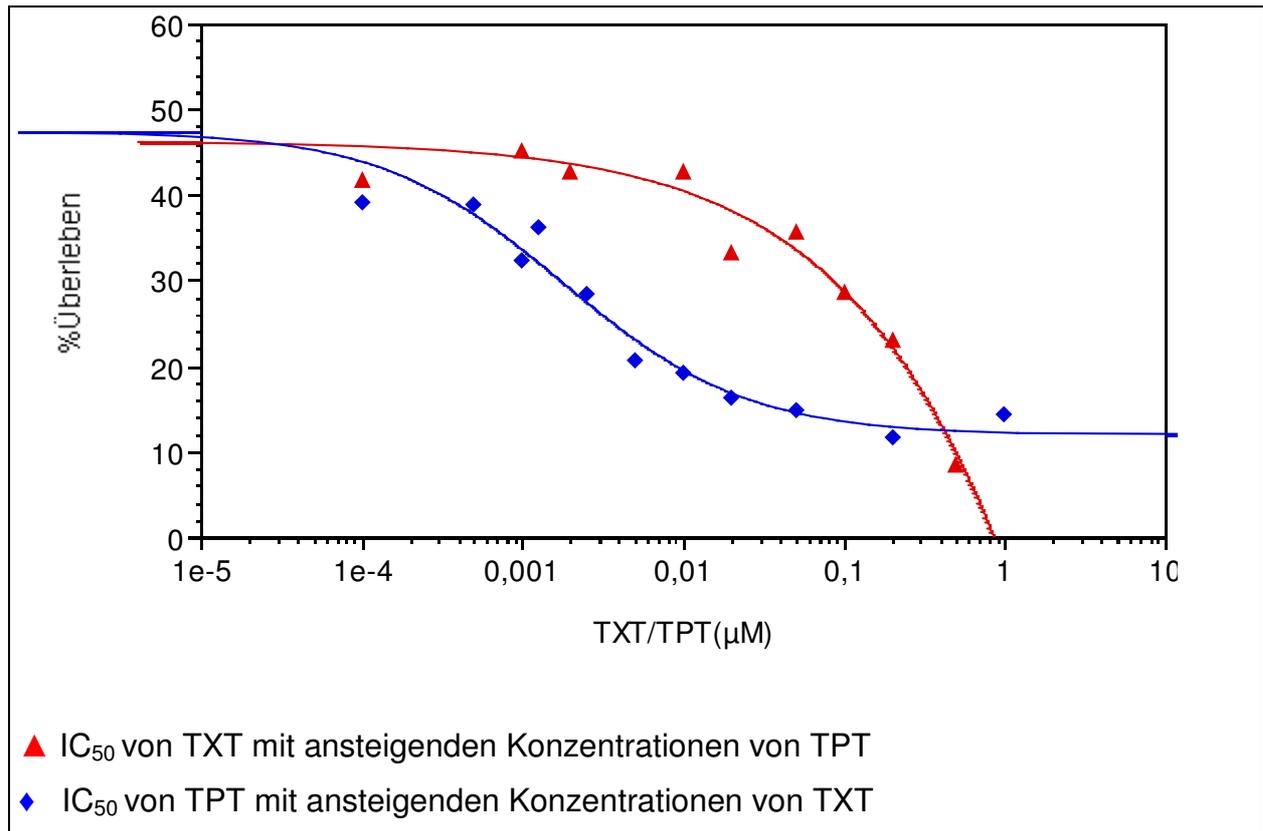


Abbildung 51: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz

Tabelle 24 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC_{50} von Topotecan bzw. TXT, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich eine synergistische Wirkbeziehung.

$\frac{\text{TPT - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,26	0,11	0,49	0,44	0,58	synergistisch, n.s.
$\frac{\text{TXT - Konzentration}}{\text{IC50 - Konzentration}}$	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,72	0,51	1,08	0,86	0,96	synergistisch, n.s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
0,52	0,34	0,83	0,68	0,80	synergistisch, n.s.

Tabelle 24: gemittelte relative IC50-Werte für TPT bzw. TXT in Abhängigkeit von TXT bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

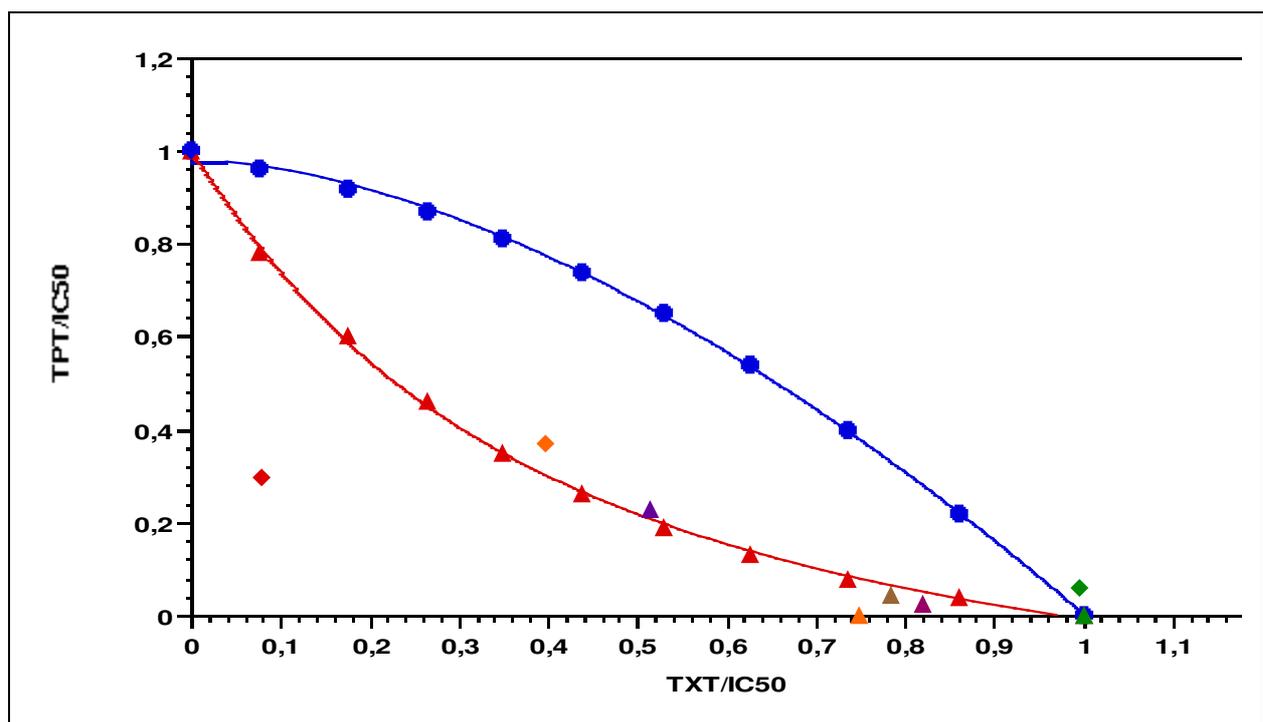


Abbildung 52: Isobologramm der PC-3-Zelllinie für Docetaxel und Topotecan

3.1.2.3.3 Estramustinphosphat + Topotecan

Beim Kombinationsversuch mit EMP und Topotecan lagen die jeweiligen IC_{50} -Werte im folgenden Bereich:

$$IC_{50}/EMP = 34,3\mu\text{M} (29,1-35,8)$$

$IC_{50}/TPT = 0,044\mu M (0,036-0,053)$

Die Dose-Response-Kurven der PC-3-Zelllinie zeigten einen sigmoiden Abfall bei steigenden EMP-Konzentrationen.

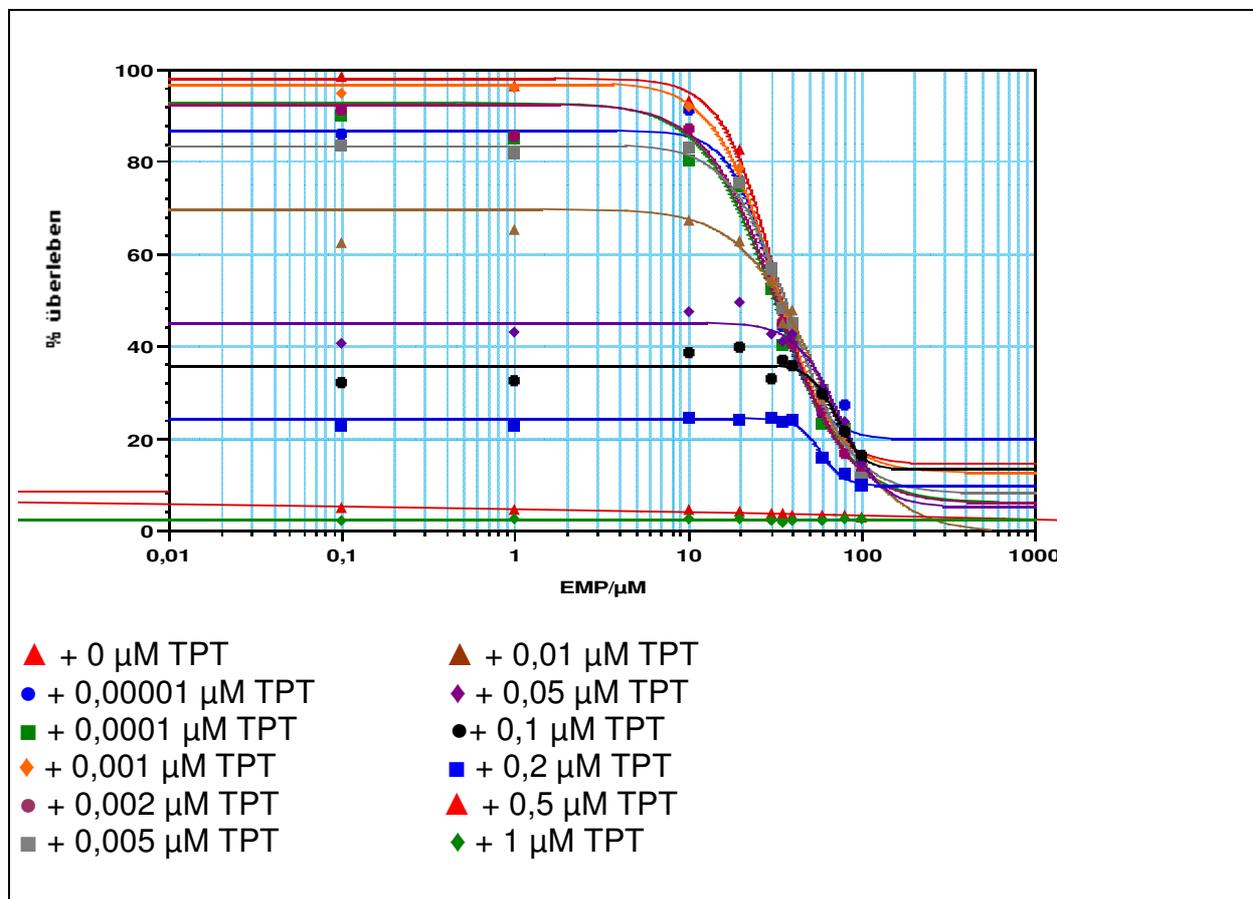


Abbildung 53: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von EMP und TPT

Bei der Inkubation mit beiden IC_{50} -Konzentrationen von EMP und Topotecan ergab sich ein %-Überleben von etwa 44,5%

TPT/ μM	EMP/ μM	%Überleben	%Überl./u	%Überl./o
0,044	34,34	44,5	38,7	49,2

Tabelle 25: %-Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Estramutinphosphat bzw. Topotecan

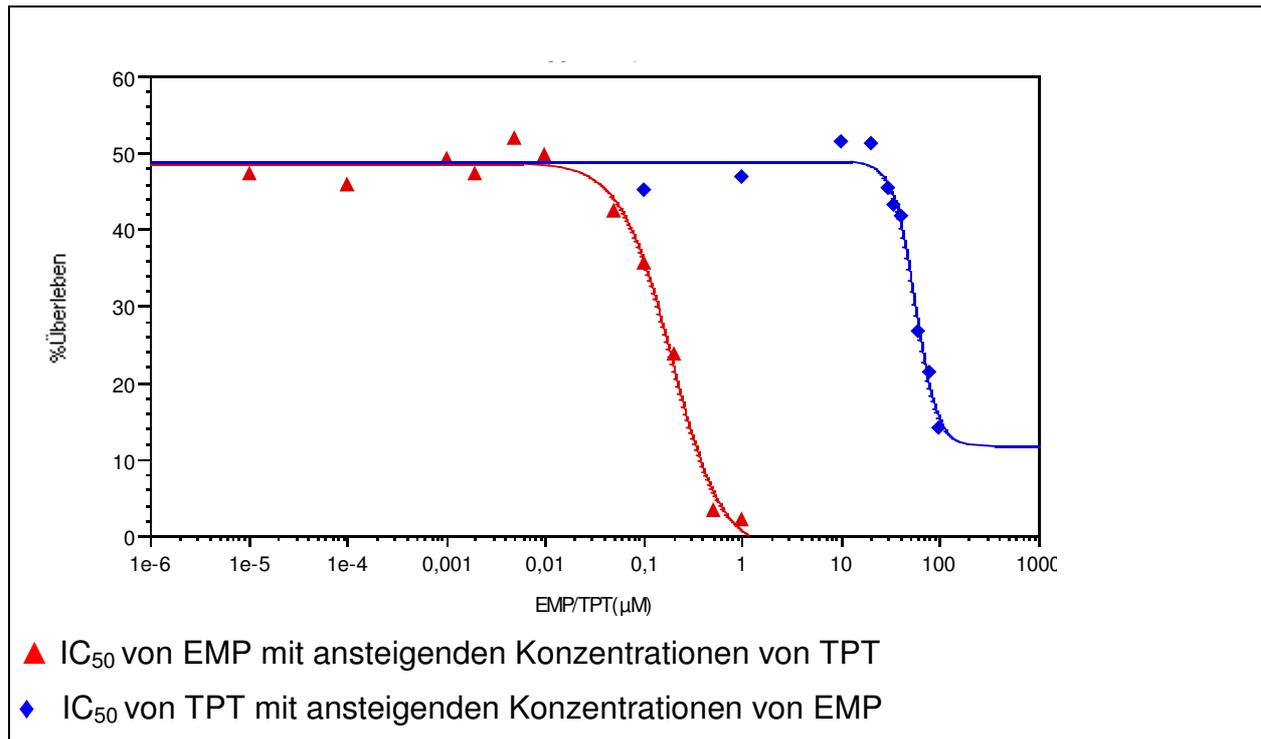


Abbildung 54: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von IC₅₀ der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz

Tabelle 26 zeigt den Mittelwert des Quotienten der eingesetzten Konzentration und der IC₅₀ von Topotecan bzw. EMP, das 95%-Konfidenzintervall Ki-u und Ki-o und die jeweiligen prädiktiven Minima und Maxima. Es ergab sich vor allem eine antagonistische Wirkbeziehung.

Anteil IC ₅₀ Topotecan	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,949	0,702	1,221	0,588	0,940	antagonistisch, n.s.
Anteil IC ₅₀ EMP	Ki-u	Ki-o	Prädiktives Min.	Prädiktives Max.	Wirkbeziehung
0,973	0,808	1,071	0,697	0,976	additiv, n.s.
Mittelwerte der Datenpunkte	Ki-u	Ki-o	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung
0,963	0,766	1,131	0,654	0,962	antagonistisch, n.s.

Tabelle 26: gemittelte relative IC₅₀-Werte für TPT bzw. EMP in Abhängigkeit von EMP bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

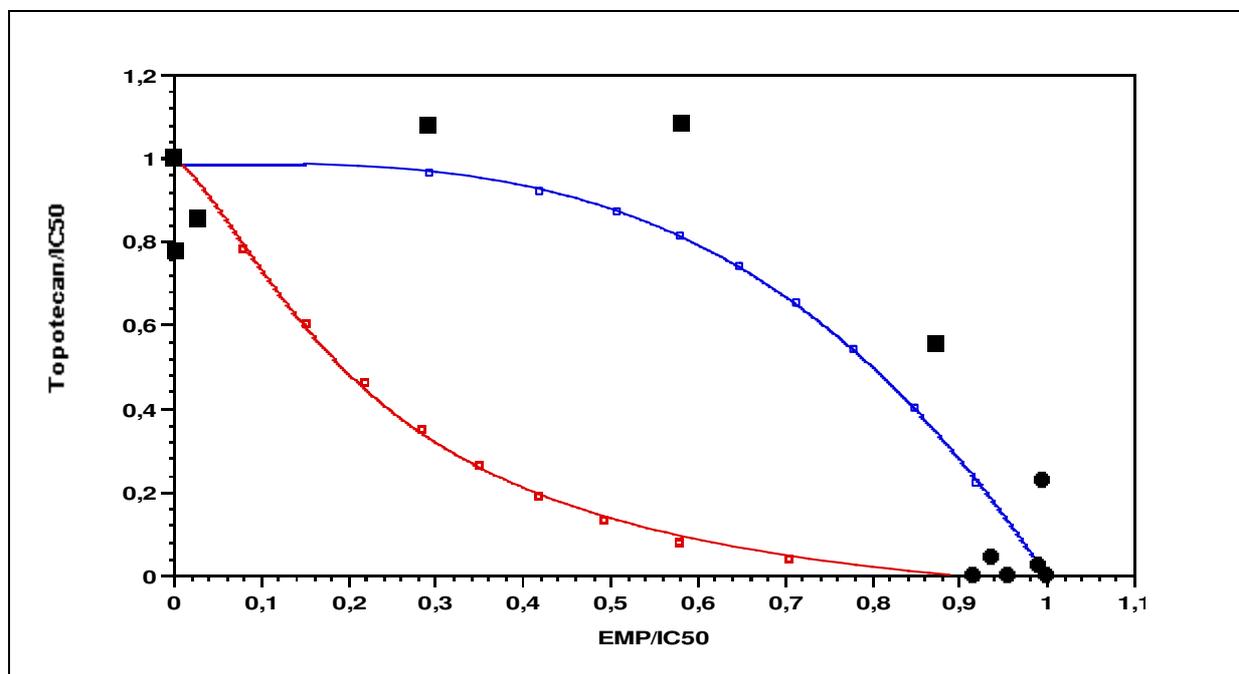


Abbildung 55: Isobologramm der PC-3-Zelllinie für Estramustinphosphat und Topotecan

3.1.2.4 Zusammenfassung der Kombinationstherapien

Das %-Überleben bei den IC₅₀-Konzentration beider Substanzen sowie die Wirkbeziehung der Kombinationstherapien wurden zum Überblick in Tabelle 27 und 28 zusammengefasst.

	Zelllinien	eingesetzte IC ₅₀ -Konzentrationen	%-Überleben in %
Etoposid	LNCaP	TPT/ μ M = 0,0077 Eto/ μ M = 0,81	33,4 (28,0 - 38,0)
+	DU-145	TPT/ μ M = 0,014 Eto/ μ M = 0,44	15,2 (11,6 - 18,4)
Topotecan	PC-3	TPT/ μ M = 0,044 Eto/ μ M = 1,45	27,5 (21,3 - 33,5)
Docetaxel	LNCaP	TPT/ μ M = 0,0077 TXT/ μ M = 0,0006	26,4 (22,2 - 30,7)
+	DU-145	TPT/ μ M = 0,014 TXT/ μ M = 0,0008	37,4 (32,6 - 41,5)
Topotecan	PC-3	TPT/ μ M = 0,044 TXT/ μ M = 0,00125	33,2 (28,7 - 39,7)
EMP	LNCaP	TPT/ μ M = 0,0077 EMP / μ M = 8,72	38,3 (34,7 - 41,8)
+	DU-145	TPT/ μ M = 0,014 EMP / μ M = 67,8	26,6 (22,0 - 31,5)
Topotecan	PC-3	TPT/ μ M = 0,044 EMP / μ M = 34,34	44,5 (38,7 - 49,2)

Tabelle 27: %-Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentrationen der Kombinationssubstanzen

	Zelllinien	Mittelwerte der Datenpunkte	Mittelwerte der präd. Minima	Mittelwerte der präd. Maxima	Wirkbeziehung	Stat. Signifikanz
Eto	LNCaP	0,454 (0,293 – 0,696)	0,623	0,801	synergistisch	n.s.
+	DU-145	0,748 (0,608 – 0,887)	0,625	0,803	additiv	n.s.
TPT	PC-3	0,659 (0,464 – 1,073)	0,809	0,850	synergistisch	n.s.
TXT	LNCaP	0,470 (0,390 – 0,673)	0,505	0,717	synergistisch	n.s.
+	DU-145	1,082 (0,980 – 1,174)	0,539	0,768	antagonistisch	s.
TPT	PC-3	0,521 (0,342 – 0,830)	0,678	0,796	synergistisch	n.s.
EMP	LNCaP	0,85 (0,69 – 1,02)	0,47	0,82	antagonistisch	n.s.
+	DU-145	0,910 (0,815 – 0,983)	0,754	0,766	antagonistisch	s.
TPT	PC-3	0,963 (0,766 – 1,131)	0,654	0,962	antagonistisch	n.s.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Kombinationstherapien

3.2 Apoptose

Bereits in frühen Apoptose-Stadien kommt es zu Änderungen der Zellmembran, u.a. die Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran. Mit Hilfe von Annexin-V, ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin, wurden die apoptotischen Zellen markiert und quantitativ festgehalten.

Zur Differenzierung von vitalen, apoptotischen und spätapoptotisch/nekrotischen Zellen wurde als zweiter Parameter die Interkalation von Propidiumjodid in die DNA untersucht.

Ausserdem wurde der M30-Apoptosesense-ELISA zur Bestimmung der Sub- G_0 -Population durchgeführt, das ein Nachweis des Zytokeratins 18 darstellt, das ein Spaltprodukt der Caspase-3-Aktivität ist.

Zur besseren Darstellung wurde der Apoptosefaktor als Steigerung des prozentualen Anteils der Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen berechnet.

3.2.1 Annexin-Färbung

		unb.	TXT	TPT	TXT + TPT
LNCaP	MV %	11,65	10,77	9,43	12,36
	Apoptosefaktor	1,00	0,92	0,81	1,06
	Ki-o	1,19	1,24	1,43	1,42
	Ki-u	0,81	0,62	0,66	0,93
DU-145	MV %	2,54	5,01	8,82	7,66
	Apoptosefaktor	1,00	1,97	3,47	3,02
	Ki-o	1,06	2,34	4,28	4,18
	Ki-u	0,94	1,38	2,86	2,28
PC-3	MV %	2,25	3,99	8,10	10,81
	Apoptosefaktor	1,00	1,77	3,60	4,80
	Ki-o	1,08	2,34	3,85	5,46
	Ki-u	0,92	1,44	3,46	2,32

Tabelle 29: Induktion von Apoptose durch Docetaxel und Topotecan und deren Kombination bei Messung mittels Annexin-Färbung

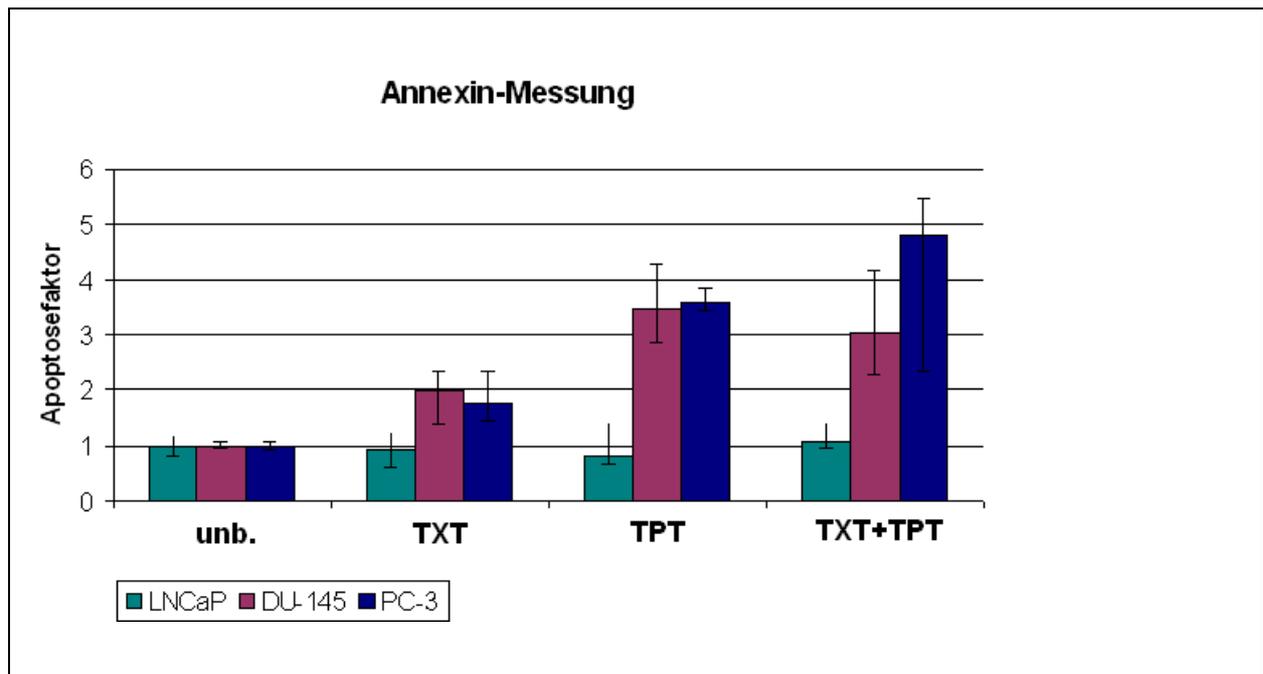


Abbildung 56: Induktion von Apoptose durch Monotherapie und Kombinationstherapie mittels Docetaxel und Topotecan bei Messung mit Annexin-Färbung

Bei der Zelllinie LNCaP konnte sowohl bei den Monotherapien als auch bei den Kombinationstherapien keine signifikante Senkung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellen nachgewiesen werden

Bei der Zelllinie DU-145 betrug der Anteil an apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit Docetaxel 5,01%, nach Topotecan-Behandlung 8,82%. Bei den Monotherapien wurde eine statistische Signifikanz erreicht. Der höchste Apoptosefaktor wurde nach der Behandlung mit Topotecan erzielt. Eine Behandlung mit der Kombinationstherapie hingegen zeigte sich ohne weiteren Effekt.

Bei der Zelllinie PC-3 betrug der Anteil an apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit Docetaxel 3,99%, was eine Steigerung des prozentualen Anteils der Zellen um den Faktor 1,77 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (2,54%) entspricht.

Nach Behandlung mit Topotecan zeigte sich ein Apoptosefaktor von 3,6 mit einem prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen von 8,1%.

Nach der Kombinationbehandlung wurde ein Apoptosefaktor von 4,80 (10,81%) erreicht, was eine statistische Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen jedoch nicht zu den Monotherapien mit Topotecan und Docetaxel bedeutet. Der höchste Apoptosefaktor wurde nach der Behandlung mit Topotecan erzielt.

3.2.2 Messung der subG₀G₁-Population

		unb.	TXT	TPT	TXT + TPT
LNCaP	MV-%	1,77	1,13	1,31	1,46
	Apoptosefaktor	1,00	0,64	0,74	0,82
	Ki-o	1,35	1,82	2,45	3,18
	Ki-u	0,65	0,21	0,51	0,65
DU-145	MV-%	2,12	9,38	7,55	11,57
	Apoptosefaktor	1,00	4,42	3,56	5,46
	Ki-o	1,22	10,40	7,04	16,41
	Ki-u	0,78	2,12	2,22	1,66
PC-3	MV-%	0,76	5,57	5,14	5,88
	Apoptosefaktor	1,00	7,33	6,76	7,74
	Ki-o	1,26	14,53	7,26	11,70
	Ki-u	0,74	4,76	5,55	4,00

Tabelle 30: Induktion von Apoptose durch Docetaxel und Topotecan und deren Kombination bei Messung mittels PI-Markierung

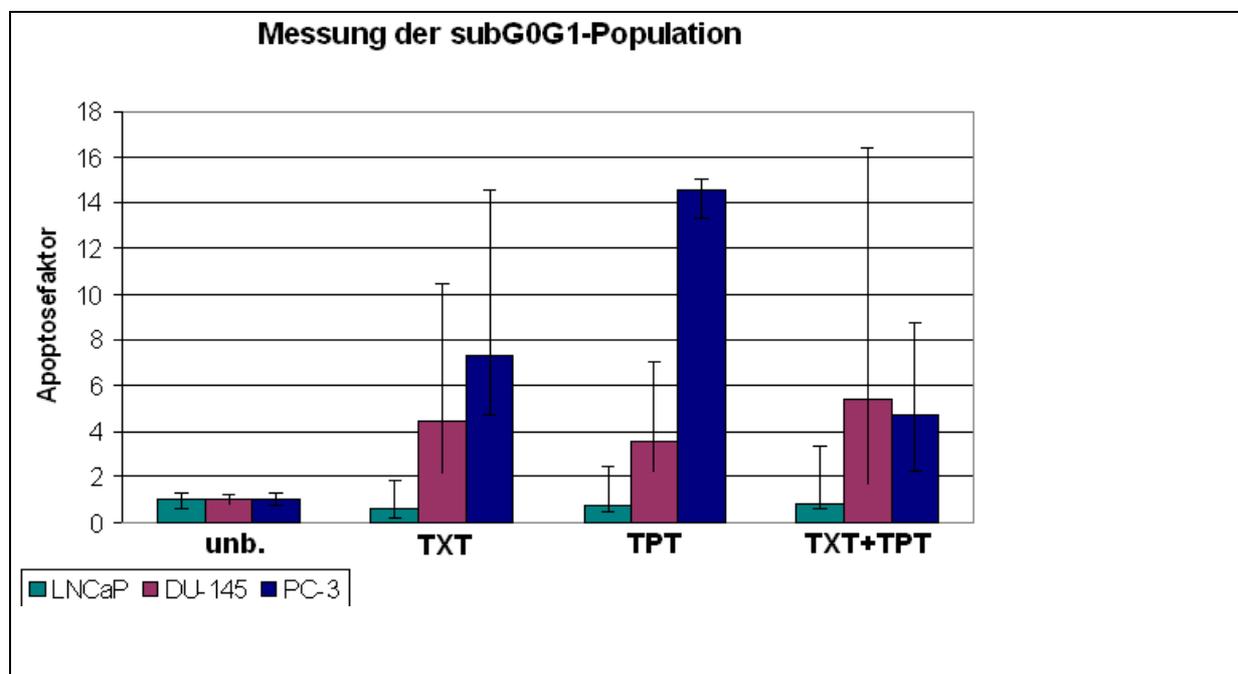


Abbildung 57: Induktion von Apoptose durch Monotherapie und Kombinationstherapie mittels Docetaxel und Topotecan bei Messung mit PI-Markierung

Bei der Zelllinie LNCaP zeigte sich bei der Messung der subG₀G₁-Population kein signifikanter Nachweis von Apoptose sowohl nach Behandlung durch die Monotherapien als auch durch die Kombinationstherapie.

Bei der Zelllinie DU-145 waren nach der Behandlung mit Docetaxel 9,38% der Zellen apoptotisch, was eine Steigerung des prozentualen Anteils der Zellen um den Faktor 4,42 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (2,12%) entspricht.

Nach Behandlung mit Topotecan zeigte sich ein Apoptosefaktor von 3,56 mit einem prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen von 7,55%.

Nach der Kombinationbehandlung wurde ein Apoptosefaktor von 5,46 (11,57%) erreicht, was eine statistische Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen jedoch nicht zu den Monotherapien mit Topotecan und Docetaxel bedeutet.

Auch der Unterschied zwischen der Monotherapie mit Topotecan und den unbehandelten Zellen war statistisch signifikant.

Bei der Zelllinie PC-3 betrug der Anteil an apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit Docetaxel 5,57%, was eine Steigerung des prozentualen Anteils der Zellen um den Faktor 7,33 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (0,76%) entspricht.

Nach Behandlung mit Topotecan zeigte sich ein Apoptosefaktor von 6,76 mit einem prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen von 5,14%.

Nach der Kombinationbehandlung wurde ein Apoptosefaktor von 7,74 (5,88%) erreicht, was eine statistische Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen jedoch nicht zu den Monotherapien mit Topotecan und Docetaxel bedeutet. Der höchste Apoptosefaktor wurde nach der Behandlung mit Docetaxel erzielt.

3.2.3 M30- Testverfahren

		unbehandelt	TXT	TPT	TXT+TPT
LNCaP	MV (U/L)	79,8	76,88	91,6	71,33
	Apoptosefaktor	1	0,96	1,15	0,89
	Ki-o	1,11	1,02	1,32	0,95
	Ki-u	0,89	0,90	0,98	0,83
DU-145	MV (U/L)	14,2	25,7	46,7	42,6
	Apoptosefaktor	1,0	1,8	3,3	3,0
	Ki-o	1,27	2,16	3,98	3,38
	Ki-u	0,73	1,45	2,58	2,59
PC-3	MV (U/L)	236,1	572,5	414,3	377,1
	Apoptosefaktor	1	2,16	2	1,60
	Ki-o	1,07	2,92	2,17	1,66
	Ki-u	0,93	1,40	1,83	1,52

Tabelle 31: Induktion von Apoptose durch Docetaxel und Topotecan und deren Kombination bei Messung mittels M30-Antikörpernachweis

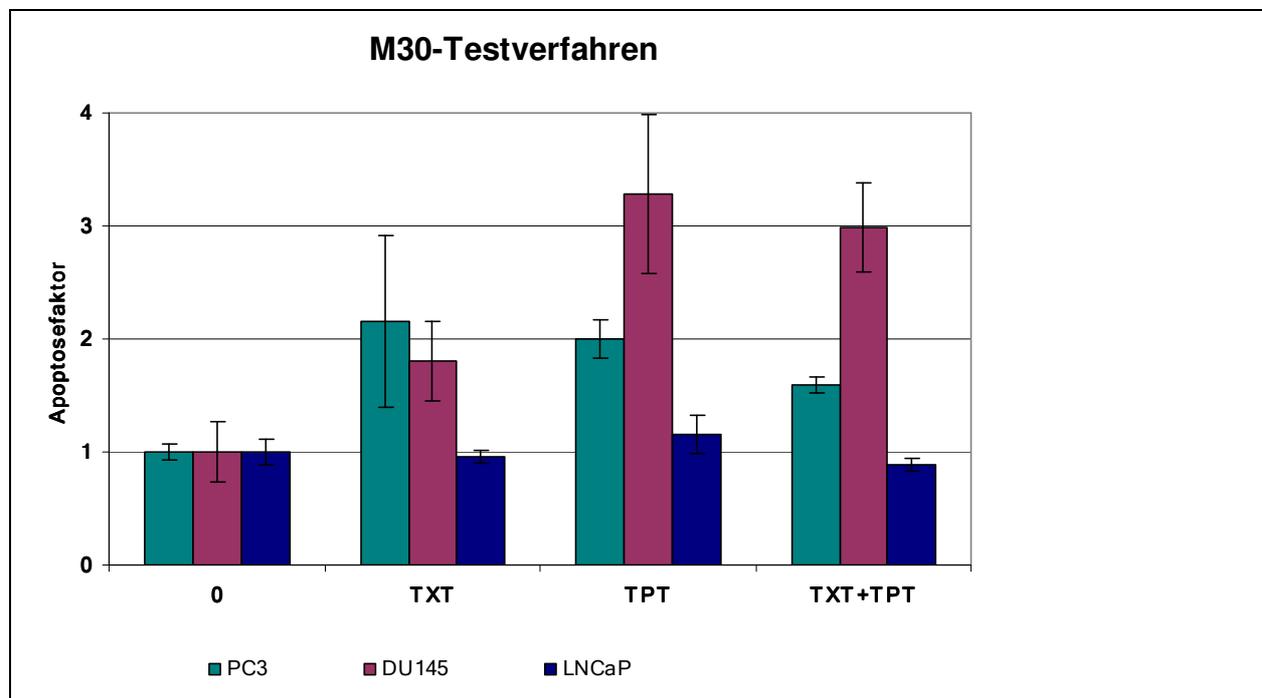


Abbildung 58: Induktion von Apoptose durch Monotherapie und Kombinationstherapie mittels Docetaxel und Topotecan bei Messung mit M30-Antikörpernachweis

Bei der LNCaP-Zelllinie zeigte sich nach Behandlung mit Docetaxel eine Abnahme der M30-Expression im Vergleich zu der von den unbehandelten Kontrollen um den Faktor 0,96. Auch bei der Topotecan-Monotherapie wurde keine signifikante Steigerung der Apoptoserate (Zunahme des prozentualen Anteils der Zellen um den Faktor 1,15 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen) erzielt.

Bei der Kombinationstherapie zeigte sich der niedrigste Apoptosefaktor von 0,89. Ein statistische Signifikanz konnte sowohl zwischen den Monotherapien als auch zwischen Monotherapie und Kombinationstherapie nicht gezeigt werden.

Bei der DU-145-Zelllinie nahm der Anteil der apoptotischen Zellen nach Docetaxel-Behandlung um den Faktor 1,8, nach Topotecanbehandlung um 3,3 zu. Bei der Kombinationsbehandlung stieg der Anteil um den Faktor 3,0 an. Sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zur Docetaxel-Therapie zeigte sich eine statistische Signifikanz. Die Behandlung mit Topotecan erzielte den höchsten Anteil an apoptotischen Zellen, erwies jedoch keine statistische Signifikanz im Hinblick auf die Kombinationstherapie.

Bei der Zelllinie PC-3 zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen sowohl bei beiden Monotherapien als auch bei der Kombinationstherapie eine statistisch signifikante Steigerung der Apoptoserate (TXT: 2,16 TPT: 2 TXT+TPT: 1,59). Bei der TXT-Behandlung zeigte sich der höchste, bei der Kombinationsbehandlung der niedrigste Faktor.

3.2.4 Vergleich der einzelnen Testergebnisse

Um die Ergebnisse der einzelnen Apoptosenachweise miteinander zu vergleichen, wurde ein Diagramm für jede Zelllinie erstellt.

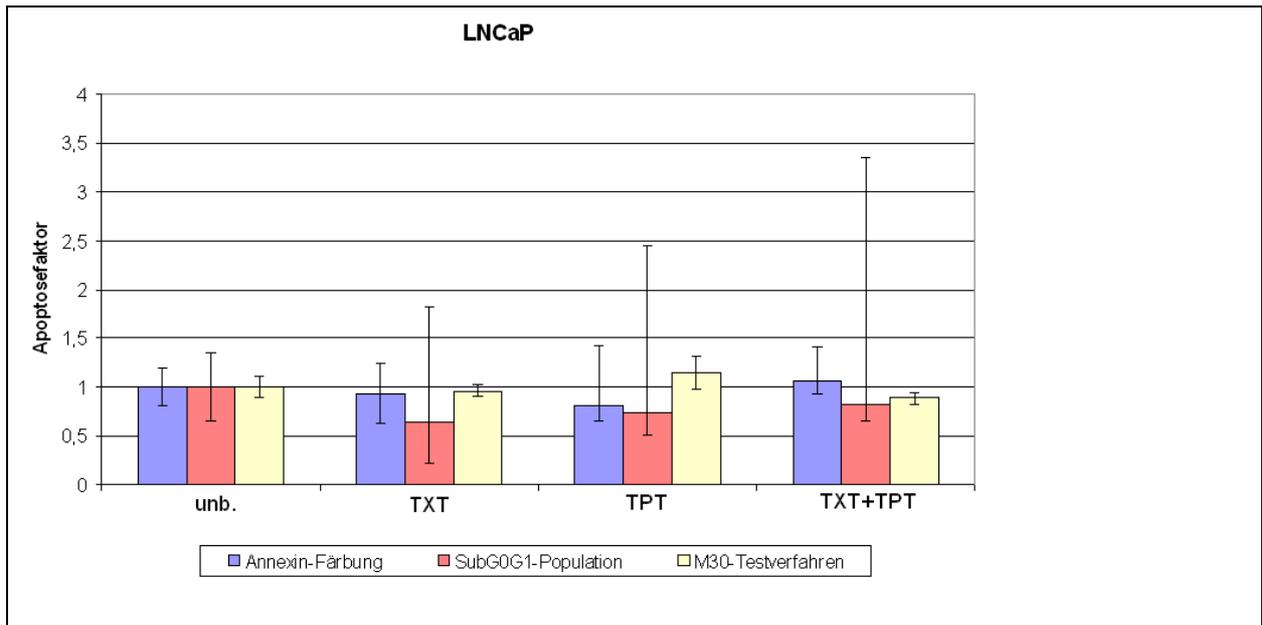


Abbildung 59: Gegenüberstellung der einzelnen Apoptosenachweise bei der Zelllinie LNCaP

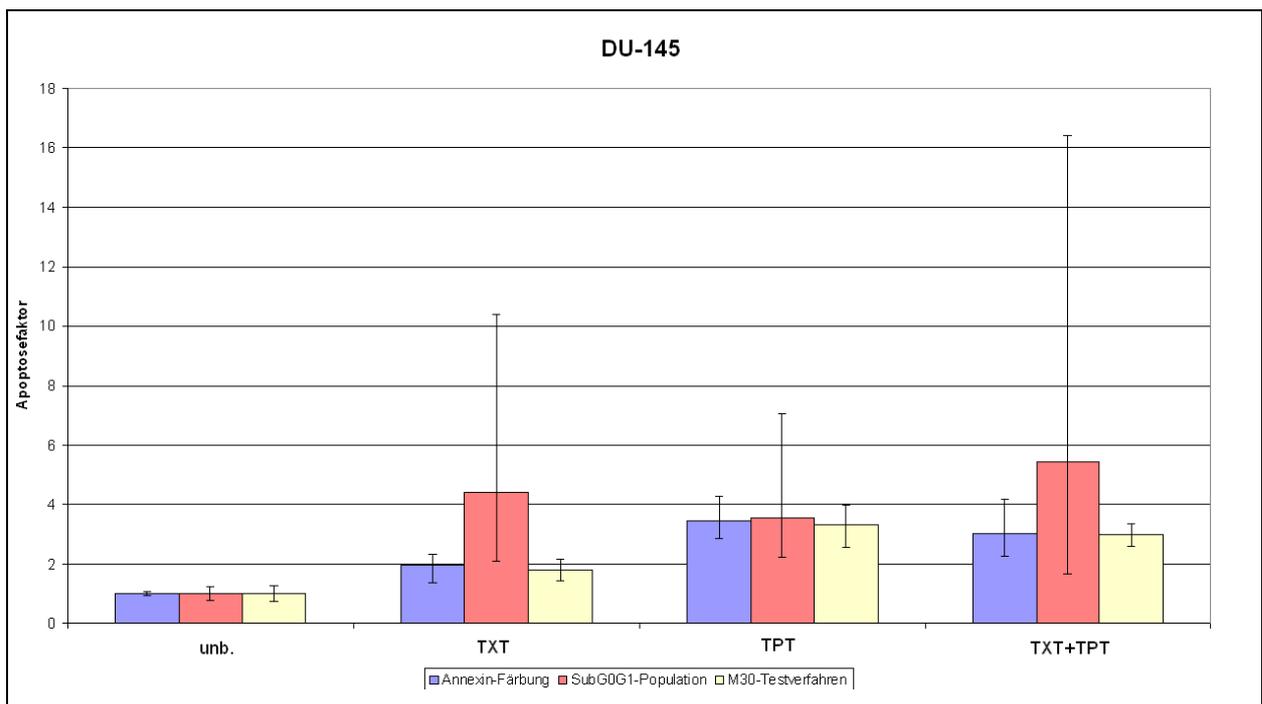


Abbildung 60: Gegenüberstellung der einzelnen Apoptosenachweise bei der Zelllinie DU-145

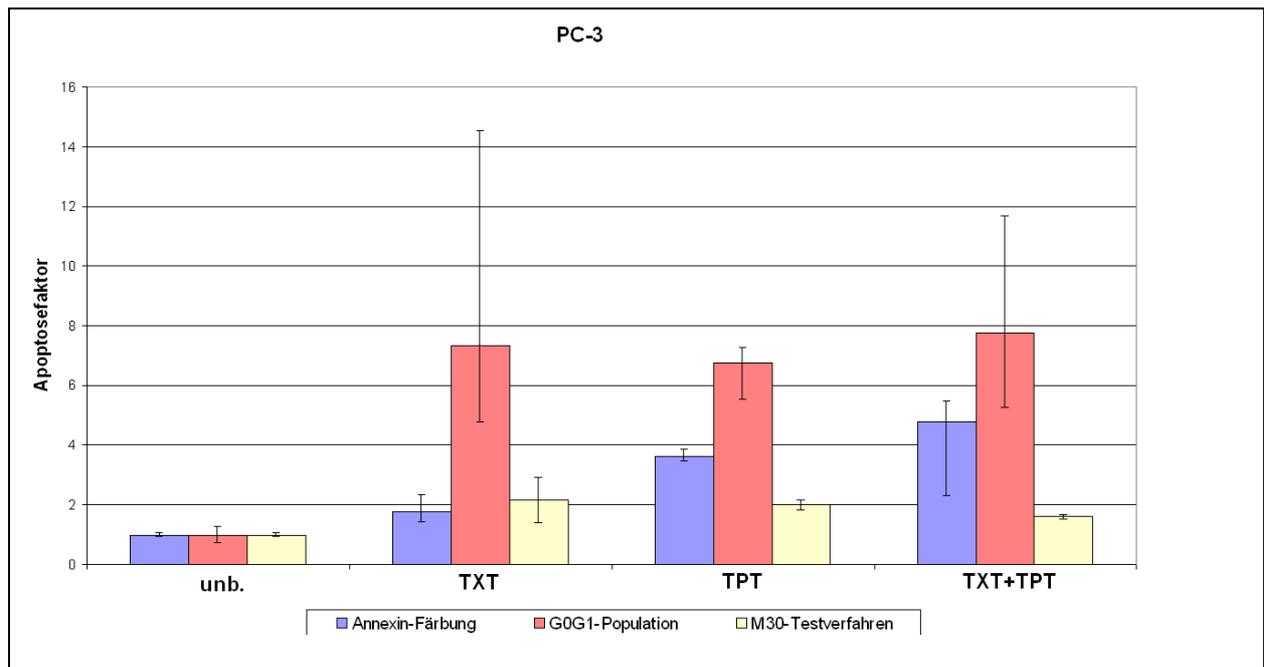


Abbildung 61: Gegenüberstellung der einzelnen Apoptosenachweise bei der Zelllinie PC-3

Bei der Zelllinie LNCaP zeigten sich weder die früheren noch die späteren Apoptoseereignisse erhöht. Hingegen die DU-145- und PC-3-Zelllinien wiesen in allen Apoptosenachweisverfahren in den Monotherapien signifikant erhöhte Apoptoseraten auf während jedoch die Kombinationstherapien keinen erhöhten Effekt erzielten.

4 Diskussion

4.1 Einführung

Die Ursprünge der Chemotherapie liegen bei Paul Ehrlich, der durch die Entwicklung von Salvarsan, das erste spezifisch wirkende Chemotherapeutikum gegen die Syphilis, als Vater der modernen Chemotherapie gilt.

Die Ära der modernen Chemotherapie entwickelte sich aus der chemischen Kriegsindustrie. Es wurde beobachtet, dass Soldaten, die bei einem Einsatz während des 2. Weltkriegs unter Exposition von Senfgas, das im ersten Weltkrieg zum ersten Mal zum Einsatz kam, starke Myelosuppressionen aufwiesen.

1942 rekrutierte das amerikanische Verteidigungsministerium zwei Pharmakologen der Yale University, Louis Goodman und Alfred Gilman, um streng geheim Kampfgase klinisch zu erforschen. Daraus entwickelten sich die ersten Therapiekonzepte für Lymphome (Goodman 1984).

Im Jahr 1965 integrierten James Holland, Emil Freireich und Emil Frei die Erfahrungen bei der antibiotischen Therapie der Tuberkulose in die Tumorchemotherapie. Sie postulierten, dass bei Einsatz mehrerer Zytostatika eine mögliche Reduktion von Resistenzen gegen die einzelnen Substanzen zu erwarten ist (Frei, III 1965). Dies gilt als die Geburtsstunde der Polychemotherapie.

Die Hoffnungen beim Einsatz von mehreren Substanzen liegen in einer Steigerung der Effektivität der Therapie, niedrigere Dosen der einzelnen Substanzen bei gleicher oder höherer Wirksamkeit und eine Minimierung von Resistenzentwicklungen.

Die Chemotherapie beim Prostatakarzinom ist als wichtige Therapieoption im Vergleich zu vielen anderen Karzinomen derzeit nur in der Palliation von Bedeutung. Meist kommt die Chemotherapie beim Patienten erst zum Einsatz, wenn andere Therapien wie Operation, Hormonablation und Bestrahlung ausgeschöpft sind.

Zwei Studien im Jahr 2004 konnten im Vergleich zur Behandlung mit Mitoxantron einen Überlebensvorteil für die Patienten bei einer Behandlung mit Docetaxel zeigen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die Wirksamkeit des Topoisomerase-I-Inhibitors Topotecan in Kombination mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid, dem auf den Mikrotubuliapparat eingreifenden Docetaxel und dem auf den Mikrotubuliapparat der Zelle wirkenden Estramustinphosphat hinsichtlich der Proliferation der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3 zu beurteilen.

Um die Interaktion der Substanzen zu bewerten, wurde die Erstellung von Isobogrammen benutzt, um eine Aussage über Synergismus, Addition oder Antagonismus zu erhalten.

Diese Methode wird seit langem bei in vitro-Versuchen zur Wirksamkeitskontrolle neuer Therapien angewendet. Das Problem liegt jedoch in der Notwendigkeit großer Datenmengen, um Aussagen treffen zu können (Chou 1984). Dennoch ist dieses Verfahren weitaus strenger als viele andere Methoden.

Außerdem wurde zusätzlich der Effekt auf die Apoptose aller drei Zelllinien bei der Kombination Topotecan und Docetaxel beurteilt.

4.2 Proliferation der Monotherapien

Topotecan ist ein semi-synthetisches Derivat des Alkaloids Camptothecin. In Deutschland ist es zur Behandlung des metastasierten Ovarialkarzinom als second-line Therapie und in den USA und Deutschland zur Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms zugelassen.

Die dosislimitierende Toxizität bei der Anwendung von Topotecan ist die Myelosuppression, die am häufigsten in Form einer schweren Neutropenie oder Thrombozytopenie auftritt. Diese Nebenwirkung ist jedoch vorhersehbar, reversibel und lässt sich gut beherrschen. Es liegen keine Hinweise auf eine kumulative hämatologische Toxizität, Anhaltspunkte für Organschädigungen oder eine Veränderung der Organfunktionen vor.

In klinischen Studien bei der Behandlung von Patientinnen mit metastasiertem Ovarialkarzinom nach Versagen einer platinhaltigen Primär- oder nachfolgender platinhaltigen Kombinationstherapie wurde die Wirksamkeit der Substanz beschrieben. Die Ansprechraten lagen hierbei zwischen 14 und 33%, 18 bis 48% der Patienten erreichten eine Stabilisierung der Erkrankung (Herzog 2002). In einer randomisierten Phase III-Studie zeigte sich bei 21% der Patienten ein Ansprechen auf TPT (Ten Bokkel 1997).

Auch beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, beim nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom und beim Kolonkarzinom wird die Substanz eingesetzt. O'Brien et al. zeigten, dass das Überleben bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom von 13,9 Wochen auf 25,9 Wochen und die Lebensqualität gesteigert werden konnte (O'Brien 2006). Aufgrund der besonderen Fähigkeit, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, erzielt man auch bei Tumoren des ZNS und bei Hirnmetastasen eine zytotoxische Aktivität. Beim

Prostatakarzinom existieren in der Literatur dagegen nur wenige Aussagen über die Wirksamkeit. Eine Phase-II-Studie (Klein 2002) zeigte eher schlechte Resultate. So waren neun Patienten Non-Responder, fünf Patienten wiesen keine Veränderungen auf und bei keinem der Patienten war weder eine komplettes noch partielles Ansprechen feststellbar. Auch eine etwas ältere Studie verlief eher enttäuschend und zeigte kaum einen therapeutischen Nutzen (Hudes 1995). Als Monotherapie zeigte sich somit Topotecan eher ineffektiv.

Im Widerspruch stehen hierzu zahlreiche in-vitro-Versuche, die gute Ergebnisse bei der Proliferationshemmung von Topotecan ergaben.

Die IC_{50} -Konzentrationen von Topotecan bei verschiedenen soliden Tumoren wurden von Nagourney et al. untersucht (Nagourney 2003). Die niedrigste IC_{50} von 0,26 μM ergab sich für das nichtkleinzellige Bronchiolalkarzinom, die höchste IC_{50} von 0,63 μM hingegen für das Prostatakarzinom.

Griffith et al. untersuchten die Zelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3 hinsichtlich des antiproliferativen Effekts von Topotecan, indem sie die Zellen mit den Topotecankonzentrationen 2,18 μM , 0,218 μM und 0,0218 μM inkubierten (Griffith 2003). Der Bereich, in dem eine 50% Abtötung erreicht wurde, lag bei ihnen zwischen 0,218 μM und 0,0218 μM . Bei Cacares et al. ergab sich für die DU-145 Zelllinie eine IC_{50} von 0,002 μM für Topotecan (Cacares 2003). Eine weitere Studie zeigte bei der Messung nach 24h eine IC_{50} von 0,0089 μM für PC-3 und 0,011 μM für DU-145 (Perego 2006).

Die in unseren Untersuchungen gemessenen IC_{50} -Werte für die Hemmung der Zellproliferation der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP (0,0077 μM), DU 145 (0,0137 μM) und PC-3 (0,044 μM) sind in ähnlichen Konzentrationsbereichen wie die in der Literatur beschriebenen. Aufgrund unterschiedlicher Inkubationszeiträume und Proliferationstests ist die Vergleichbarkeit wenig aussagekräftig, da in dieser Arbeit die Proliferation nach 120h, bei Griffith und bei Perego nach 24h, bei Cacares nach 96h gemessen wurde.

Die Monotherapie Etoposid wurde in klinischen Studien am Prostatakarzinom nicht getestet. Hingegen als Kombinationssubstanz wurde es in zahlreichen Studien erprobt. Vor allem in Kombination mit Estramustin zeigte es vielversprechende Ergebnisse. Eine japanische Studie zeigte bei 43% der Patienten einen 50%igen oder höheren PSA-Abfall mit einer Besserung des Überlebens von insgesamt 29,3 Monaten (Numata

2007). Auch in-vitro-Versuche belegen den zytotoxischen Effekt bei Prostatakarzinomzelllinien.

Scher et al. fanden eine 74%ige Inhibition im Konzentrationsbereich von 10 μM bei der PC-3-Zelllinie (Scher 1986).

Demarquay et al. zeigte für die DU-145-Zelllinie eine IC_{50} von 1,3 μM und für PC-3 eine $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ (Demarquay 2004).

Weitere IC_{50} -Werte sind bei van Brussel et al. zu finden (van Brussel 1999). Hier ergaben sich bei Messung nach 72h für die LNCaP-FCG, eine Sublinie von LNCaP, eine IC_{50} von 1,9 μM , für PC-3 6,1 μM und DU-145 3,6 μM .

Auch Kreis et al. testete die Proliferationshemmung von Etoposid nach 72 stündiger Inkubation an den drei Prostatakarzinomzellen, wobei sich IC_{50} von 0,2782 μM für DU-145, 2,4119 μM für LNCaP und 0,1218 μM für PC-3 ergaben (Kreis 1997).

Kübler et al. erhielten als jeweilige IC_{50} für die Zelllinie LNCaP 0,61 μM , für DU-145 0,34 μM und für PC-3 2,94 μM (Kübler 2005).

Die Konzentration mit 50%iger Abtötung (LNCaP 0,81 μM ; DU-145 0,44 μM ; PC-3 1,48 μM) lagen in vorliegender Arbeit in leicht höheren, bei PC-3 in deutlich niedrigeren Konzentrationsbereichen.

Die Substanz Docetaxel ist für die Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms zugelassen, zwei Studien zeigten eine statistisch signifikante Überlebensverlängerung von 2 – 2,5 Monaten.

Kübler et al. (Kübler 2005) erhielten bei LNCaP eine IC_{50} von 0,00174 μM , für DU-145 als auch für PC-3 eine IC_{50} von 0,00149 μM .

Williams et al. stellten für die PC-3 Zelllinie eine IC_{50} von 0,002 μM fest. Auch Kreis et al. beschäftigten sich mit den IC_{50} -Konzentrationen der drei Zelllinien und erhielten als IC_{50} für DU 145 0,47 μM , für LNCaP 0,28 μM und für PC-3 0,25 μM (Kreis 1997). Sie lagen damit weit über den hier (LNCaP 0,0006 μM ; DU-145 0,0008 μM ; PC-3 0,00125 μM) als auch den in der Literatur beschriebenen IC_{50} -Werten. Dies ist möglicherweise aufgrund der niedrigen Inkubationszeit von 72h zu erklären ist.

Als dritte mit Topotecan kombinierte Substanz wurde Estramustinphosphat, eine Kombination aus dem Alkylans Nor-Stickstoff-Lost und Estradiol, verwendet. Dieses Zytostatikum wird bei der Therapie des HRPC seit den 70er Jahren eingesetzt. Es zeigten sich bei der Monotherapie bei 30-35% der Patienten ein Ansprechen (Perry 1995). Mehrere Studien zeigten in vitro eine Hemmung des Zellwachstums von LNCaP,

DU-145 und PC-3 (Hansson 1988, Hartley-Asp 1982, Hartley-Asp 1984, Mareel 1988).

Hong et al. gaben eine IC_{50} zwischen 2 und 4 μM für die Zelllinie an (Hong 2004).

Auch Kreis et al. ermittelten für die drei Zelllinien die jeweiligen IC_{50} -Konzentration (LNCaP 15,7 μM ; PC-3 28,2 μM , DU-145 382,2 μM) bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden (Kreis 1997). Vor allem die Zelllinie LNCaP reagiert aufgrund ihrer Hormonabhängigkeit am sensitivsten auf Estramustinphosphat, da seine Metaboliten als Antagonisten des Androgenrezeptors fungieren (Wang 1998). Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in dieser Arbeit. Während sich für diese Zelllinie LNCaP eine IC_{50} von 8,6 μM ergab, lag bei den hormonunabhängigen Zelllinien DU-145 und PC-3 die jeweilige IC_{50} bei 67,8 μM bzw. 34,34 μM .

4.3 Proliferation der Kombinationstherapien

4.3.1 Etoposid und Topotecan

Die Kombination von Topotecan und Etoposid ist in der Literatur wenig beschrieben.

Vor allem bei gynäkologischen Tumoren und beim SCLC wird die Wirksamkeit untersucht.

Quoix et al. zeigten 2005 bei Patienten mit unbehandeltem SCLC nach Behandlung mit Etoposid und TPT eine Ansprechrate von 61% (Quoix 2005). Reck et al. stellten bei 46,4% der Patienten ein Ansprechen fest, wobei bei 7,7% dieser Patienten eine komplette Remission, bei 92,2% eine partielle Remission erreicht wurde (Reck 2005).

Auch beim Neuroblastom zeigte eine Phase II-Studie bei 11% der Patienten eine komplette, 36% eine partielle Remission (Simon 2007).

Für alle drei Zelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3 zeigten sich gemittelt additive Wirkungen der Kombination Topotecan und Etoposid.

Die Kombination Etoposid und Topotecan tendierte bei den LNCaP-Zellen eher zu Synergismus. Hier konnte eine 66%ige Hemmung der Zellen unter Verwendung der jeweiligen IC_{50} -Konzentrationen erreicht werden. So resultiert bei Gegenüberstellung der Monotherapie eine 61,4%ige Erniedrigung der Konzentration von Etoposid und eine 45,8%ige Abnahme bei Topotecan, wenn der gleiche Effekt erzielt werden soll.

Auch bei der PC-3-Zelllinie waren viele Datenpunkte im synergistischen Bereich gelegen. Die Kombination der IC_{50} -Konzentrationen beider Substanzen ergab ein %Überleben von 21,8-33,2%. Um den gleich Effekt bei der Monotherapie zu erreichen, müssten für TPT eine Konzentration von 0,105 μM – 0,203 μM , für Etoposid Werte von

3,93 μM – 20,11 μM eingesetzt werden. Hierdurch konnte eine Abnahme der einzelnen Zytostatika-Konzentrationen von 58,1% - 78,3% bei Topotecan und von 37,7% - 92,6% bei Etoposid erzielt werden.

Bei der DU-145-Zelllinie wirkten ebenfalls beide Substanzen additiv mit jedoch teils antagonistischem Effekt. Es wurde bei Einsetzen der jeweiligen IC_{50} -Konzentrationen ($\text{IC}_{50}/\text{TPT} = 0,0137 \mu\text{M}$ und $\text{IC}_{50}/\text{Etoposid} = 0,44 \mu\text{M}$) eine Abtötung von 85,2% - 84,4% erreicht. Um die gleiche Hemmung zu erreichen, muss bei der Monotherapie für Etoposid eine Konzentration von 0,97 μM und für Topotecan 0,0229 μM eingesetzt werden, was eine 53,1%ige für Etoposid bzw. 40,2%ige Konzentrationsabnahme für Topotecan bedeutet.

Viele Tumoren entwickeln Resistenzen gegen TOP-I oder TOP-II-Inhibitoren, so dass es zu Therapieversagen kommt.

Außerdem besteht eine wechselseitige Beziehung zwischen TOP-I und TOP II Inhibitoren. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass die sequenzielle Verabreichung dieser Substanzen zu additiven als auch synergistischen Antitumoraktivitäten führt (Eder 1998).

Whitacre testete bei athymischen Mäusen, die Träger von SW 480 humanen Kolonkarzinom Xenografts waren, die Wirkung bei gleichzeitiger, hintereinander geschalteter und in längeren Zeitintervallen gegebenen Topotecan- und Etoposid-Dosen (Whitacre 1997). Hierbei zeigte sich, dass bei gleichzeitiger Gabe eine antagonistische Wirkung erzielt wurde, weil TPT ein Anwachsen vom Isomer-II α der Topoisomerase bewirkte. Erst fünf Tage nach der letzten TPT-Dosis fiel die Topoisomerase-II α auf den Ausgangswert zurück.

Auch bei Leukämiezellen, die mit Topotecan behandelt wurden, kam es zur Zunahme des Isomers II α der Topoisomerase (Crump 2002).

Chen et al. beobachteten, dass bei CML-Zellen der Linie K562 eine Topotecan induzierte TOP II α -Expression zur höheren Sensitivität der Zellen für eine Etoposidbehandlung führt (Chen 2002).

Weitere in vitro-Studien demonstrieren ebenfalls den synergistischen Effekt beider Substanzen bei sequentieller Gabe (Bonner 1996, Chen 2002, Grabowski 1996).

Taron et al. testeten die Kombination Etoposid und Topotecan an nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomzellen der Linie NCI-H23 (Taron 2000). Bei Applikation von Etoposid eine Stunde nach Topotecaninkubation stellte er dabei die gleichen zytotoxischen Effekte wie andere Autoren nach längerem Intervall fest.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden Topotecan und Etoposid in nur sehr kurzen Abständen auf die Zelllinien inkubiert. Trotz fast simultaner Gabe wurden in allen Versuchen additive Effekte beobachtet. Eine statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden.

4.3.2 Docetaxel und Topotecan

2004 konnten zwei unabhängige Phase-II-Studien zeigen, dass Docetaxel, ein halbsynthetisches Taxan, zu einer 20-24%igen Reduktion der Mortalität führt (Petrylak 2004, Tannock 2004).

Trotz der großen Erfolge in der Anwendung von Docetaxel beim Prostatakarzinom ist nur wenig in der Literatur über die Kombination Topotecan und Docetaxel zu finden.

Eine präklinische Studie an der SKBr-3 Zelllinie zeigte, dass die Kombination von Topotecan und Docetaxel bei Applikation von Docetaxel während des größten Anteils von Zellen im Topotecan induzierten G2-Phasen-Zellarrest synergistisch wirkt (Taron 2000).

Jonsson et al. stellten bei humanen Tumorzellkulturen einen Synergismus für die Kombination Topotecan und Paclitaxel bei 22% der Kulturen fest (Jonsson 1998).

Hingegen an der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie A 549 zeigten sich bei in-vitro-Untersuchungen antagonistische Effekte bei der Kombination Topotecan und Paclitaxel, das ebenfalls zur Gruppe der Taxane gehört (Kaufmann 1996).

Haddad et al. untersuchten in einer Phase II-Studie die Kombination Topotecan und Docetaxel bei Patienten mit squamösen Zellkarzinomen des Kopfes und des Halses (Haddad 2003). Dabei konnte bei keinem der Patienten weder ein komplettes noch partielles Ansprechen gezeigt werden.

Eine Untersuchung der Kombination Topotecan und Paclitaxel an Kolonkarzinomzellen wies einen synergistischen Effekt bei kurzer Inkubation der Zellen mit niedrigen Dosen von Paclitaxel vor Inkubation mit Topotecan auf (Bahadori 2001). Die IC_{50} -Konzentration von Topotecan konnte hierbei 10 bis 40fach reduziert werden.

In einer Phase II-Studie wurden Patienten mit einem fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom mit der Kombination Docetaxel und Irinotecan, ebenfalls ein Analogon von Camptothecin, behandelt. Es zeigten sich bei 14,3% der Patienten ein partielles, bei 45,7% stable disease und bei 34,3% ein Fortschreiten der Erkrankung (Hirose 2007). Bei Patienten mit einem vorbehandelten Ovarialkarzinom wurde die

Kombination Topotecan und Paclitaxel gut vertragen und erzielte eine Ansprechrate von 38% (Stathopoulos 2006).

Bei den Proliferationstests ergaben sich bei der Zelllinie LNCaP und PC-3 synergistische Effekte, die jedoch nicht signifikant sind.

Bei Inkubation der LNCaP-Zellen mit den jeweiligen IC_{50} -Konzentrationen von Docetaxel und Topotecan resultierte eine Proliferationshemmung um 74,4 – 72,7%.

Für das gleiche Ergebnis bei den einzelnen Monotherapien müsste für Topotecan die 2,5fache und für Docetaxel die 1,9fache Konzentration eingesetzt werden.

Auch bei der Zelllinie PC-3 ergaben sich gute Resultate. So konnte ebenfalls bei Einsetzen der IC_{50} beider Konzentrationen eine Zellreduktion von 67,9 - 65,6% erreicht werden. Dies bedeutet eine 1,8fache bzw. 2,4fache Reduktion für Docetaxel bzw. Topotecan, um den gleichen Effekt in der Monotherapie zu erzielen.

Ein signifikanter Antagonismus hingegen zeigte sich bei den DU-145-Zellen. So konnte erst bei Werten ab 0,15 μ M TPT bei Zellen zusammen mit der IC_{50} -Konzentration von TXT ein Abfall des Überlebens erreicht werden. Diese Konzentrationen für TPT liegen jedoch über der IC_{50} von TPT (0,0137 μ M). Bei Inkubation mit den jeweiligen IC_{50} -Konzentrationen von Docetaxel und Topotecan resultierte eine Proliferationshemmung um 62,6%.

Für das gleiche Ergebnis bei den einzelnen Monotherapien müsste für Topotecan die 1,2fache und für Docetaxel die 1,05fache Konzentration eingesetzt werden.

So konnte kein Vorteil der Kombination gegenüber den Monotherapien ermittelt werden. Ein Grund könnte auch an der fehlenden Expression des antiapoptotischen Proteins bcl-2 der DU-145-Zelllinie und der damit verbundenen niedrigeren Sensitivität gegenüber Docetaxel, das auch über die Phosphorylierung von bcl-2 wirkt, gefunden werden (Haldar 1996). Im Widerspruch steht hier jedoch die Beobachtung bei der Monotherapie, dass nicht die DU-145-Zelllinie die signifikant höchste IC_{50} besitzt, und keine Resistenzen der DU-145-Zellen gegenüber Docetaxel in der Literatur beschrieben sind.

4.3.3 Estramustinphosphat und Topotecan

Obwohl Estramustinphosphat in zahlreichen Kombinationen sowohl in vitro als auch in vivo beim Prostatakarzinom getestet wurde, gibt es nur wenige Daten zur Kombination EMP und Topotecan.

Vor allem die Kombination Estramustinphosphat und Docetaxel wurde in vielen Studien untersucht. So zeigte eine Phase-II-Studie eine signifikante Wirksamkeit mit Überlebensvorteil bei beherrschbarer Toxizität (Nelius 2005). Eine andere vielversprechende Kombination ist Estramustinphosphat mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Etoposid, da mehrere Studien eine Interaktion auf der Ebene der nukleären Matrix und der DNA-Transkription beweisen (Pienta 1993). So wurden eine Sensitivitätssteigerung der Wirkung von Etoposid und eine signifikant höhere Hemmung der DNA-Synthese durch Etoposid gezeigt, indem EMP beim Prozess der DNA-Replikation interagiert. Aufgrund dieser Ergebnisse und mehrerer erfolgreicher klinischen Studien erfolgte die Testung von Estramustinphosphat mit Topotecan, ein Topoisomerase-II-Hemmer, der ebenfalls auf der Ebene der nukleären Matrix agiert. Naik et al. untersuchten an der Zelllinie PC-3 und Zellen der MAT-LyLu-Sublinie des Dunning-R3327-Prostatakarzinoms der Ratte die Kombination EMP und 9-Aminocamptothecin, ebenfalls ein Topoisomerase-I-Inhibitor (Naik 1996a). Es zeigte sich ein signifikantes Anwachsen der Zytotoxizität von 9-AC bei Zugabe von Estramustinphosphat. Die Tumorstadiumshemmung konnte von 30% (bei Monotherapie mit EMP) bzw. von 48% (bei Monotherapie mit 9-AC) auf 95% bei Kombination der beiden Substanzen gesteigert werden. Die in vitro-Versuche der Kombination Topotecan und Estramustinphosphat zeigten bei allen drei Zelllinien antagonistische Effekte, die für DU-145 im signifikanten Bereich lagen. Bei Einsetzen der jeweiligen IC_{50} -Werte wurde zwar eine Proliferationshemmung von 61,5 – 61,9% festgestellt, die aber keiner Reduzierung der entsprechenden Konzentration in der Monotherapie entsprach. So ist nur die 1,2fache Konzentration von Estramustinphosphat bzw. die 1,5fache Konzentration von Topotecan in der Monotherapie nötig, um die gleiche Abtötung zu erzielen. Auch bei den DU-145-Zellen kann die Konzentration der Substanzen nicht erheblich gesenkt werden. Erst in höheren Dosen der Kombinationssubstanzen resultierte eine Zunahme der Proliferationshemmung.

Bei der Zelllinie PC-3 lagen die Datenpunkte ebenfalls im nicht-signifikanten antagonistischen Bereich. Bei Inkubation der Zellen mit den IC_{50} -Konzentrationen beider Substanzen ergab sich eine Proliferationshemmung von 44,9 – 44,2%. Dies bedeutet eine nur 1,3fache bzw. 1,1 fache Reduktion von Topotecan bzw. Estramustinphosphat im Vergleich zur Monotherapie, wenn eine Abtötung um 66% erreicht werden soll. Der Versuch von Naik et al. zeigte bei Konzentration von 0,1 μ M

Estramustinphosphat und 0,001 μM 9-Aminocamptothecin eine 50%ige Proliferationshemmung (Naik 1996b). In den hier vorliegenden Versuchen war bei diesen Konzentrationen erst eine Hemmung von 5,1% vorhanden.

Die Kombination Topotecan und Estramustinphosphat ist wenig vielversprechend. In allen drei Zelllinien resultierte eine antagonistische Wirkbeziehung. Obwohl in-vitro-Studien die Effizienz von Estramustinphosphat als Kombinationspartner mit synergistisch wirkenden Substanzen beim Prostatakarzinom zeigte, konnte keine positive Beeinflussung bewiesen werden (Kreis 1997).

4.4. Apoptose

Husain et al. zeigten im Prostatakarzinom eine 2-10fach höhere Konzentration und eine 4-26fach höhere katalytische Aktivität an Topoisomerase I als Gewebe einer benignen Prostatahyperplasie (Husain 1994). Diese Untersuchung impliziert, dass die Quantität der Expression von Topoisomerase-I die Effektivität von Topoisomerase-Inhibitoren beeinflusst und beim Prostatakarzinom gute Voraussetzungen für die Wirkung dieser Zytostatika herrschen. Diese Überlegung konnte von Coleman et al. bei Untersuchungen an Hodenseminomen nach Behandlung mit Camptothecin bestätigt werden (Coleman 2000).

Bei genauerer Betrachtung des Mechanismus der Apoptoseinduktion müssen alle drei Prostatakarzinomzelllinien gesondert gesehen werden, weil Unterschiede hinsichtlich der Apoptose demonstriert worden sind.

Es konnte demonstriert werden, dass 9-AC bei der Zelllinie DU-145 zum CD95/CD95L-abhängigen Apoptoseweg führt (Chatterjee 2001).

Während bei PC-3-Zellen nach Camptothecin-Inkubation vor allem ein G2/M-Arrest nachweisbar ist, zeigen DU-145-Zellen einen Arrest in der S-Phase, was für die Effizienz des S-Phasen-Checkpoints als Antwort auf die zerstörte DNA spricht (Zuco 2003). Dies führt zu einer früheren Apoptose der DU-145-Zellen.

Bei Shankar et al. wiesen alle drei Zelllinien, 24h nach Inkubation mit 0,1 μM Camptothecin, eine signifikante Steigerung der Apoptoserate (LNCaP $26\pm 1,2$; DU-145 $23\pm 0,6$; PC-3 $29\pm 0,3$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (LNCaP $4\pm 0,2$; DU-145 $3\pm 0,1$; PC-3 $4\pm 0,1$) auf (Shankar 2005). Die Apoptose wurde mittels Annexin-V und PI-Markierung gemessen.

Zuco et al. zeigten, dass für die Zelllinie DU-145, die mit einer IC_{50} -Konzentration von 0,02 μM Camptothecin inkubiert wurden, bereits nach 48h eine Apoptoserate von 20%

(PI-Messung), nach 72h von 50-60% messbar war (Zuco 2003). Bei den PC-3-Zellen (IC_{50} 0,06 μ M) wurde nach 72h eine Rate von $56\% \pm 13$ festgestellt.

Aus meinen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Behandlung mit Topotecan sowohl für die Zelllinie DU-145 als auch PC-3 zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führt. Dies wurde sowohl durch die Annexin-Färbung und Messung der SubG₀G₁-Population als auch durch die M30-Nachweismethode festgestellt. Bei der Zelllinie LNCaP ergab sich hingegen keine signifikante Steigerung der Apoptoserate in allen drei Messversuchen. Zu erwarten wären andere Ergebnisse gewesen. LNCaP-Zellen sind bekannt für ihre Sensitivität auf Camptothecin, während PC-3-Zellen häufig Resistenzen zeigen (Hasegawa 2006). Vor allem die fehlende Expression des proapoptotischen Proteins p53 (Arah 1998) als auch eine Überexpression der zu einer Resistenz führenden Proteine bei der Linie PC-3 werden hierfür verantwortlich gemacht. (Hasegawa 2006)

Zu Docetaxel gibt es mehr vergleichbare Daten in der Literatur.

Auch hier findet man Unterschiede der einzelnen Prostatakarzinomzelllinien bei Behandlung mit Docetaxel. Die Induktion von Apoptose erfolgt bei den androgensensiblen LNCaP- und hormoninsensitiven PC-3-Zellen auf unterschiedlichen Wegen bei Behandlung mit Docetaxel.

Muenchen et al. fanden heraus, dass LNCaP-Zellen über die Kaspase-3, -7 und -9 in die Apoptose gehen, während die Zelllinie PC-3 den Weg über Kaspase-8 beschreitet (Muenchen 2001).

Nehmé et al. untersuchten die Apoptose der Zelllinien DU-145 und LNCaP. Bei Messung der Apoptoserate 48 bzw. 72 Stunden nach einstündiger Inkubation der Zellen mit der jeweiligen IC_{20} -Konzentration von Docetaxel (LNCaP 0,001 μ M; DU-145 0,0015 μ M) wurde für die LNCaP-Zellen eine Rate von 12% bzw. 16% und für DU-145 20% bzw. 26% erreicht (Nehme 2001). Die Apoptoserate ist bei Messung zu einem späteren Zeitpunkt nicht signifikant angestiegen. Der Autor konnte bei beiden Zelllinien bestätigen, dass die Behandlung mit Docetaxel zur Phosphorylierung von bcl-2 führt (Halder 1997, Nehme 2001) und damit die Bindung an das proapoptotischen Onkogen bax verhindert wird. Die Zelle geht in einen G2/M-Arrest. Bei der DU-145 Zelllinie zeigte sich hingegen eine Phosphorylierung von MAPK, das in einer Phosphorylierung von cdc2 und einem G2/M-Arrest der Zelle resultiert.

Auch die hier gemessenen Ergebnisse für Docetaxel hinsichtlich der Induktion von Apoptose waren vergleichbar mit denen zu Topotecan. So führte die Inkubation bei den Zelllinien DU-145 und PC-3 zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate, jedoch bei LNCaP zu keiner Änderung der Zahl apoptotischer Zellen.

Bei Vergleich der Apoptoseraten zwischen den Monotherapien zeigt sich kaum ein signifikanter Unterschied zwischen Topotecan und Docetaxel. Nur bei den DU-145-Zellen wurde bei der Annexinfärbung als auch bei der M30-Nachweismethode eine statistisch signifikante höhere Apoptoserate von Topotecan in Bezug auf Docetaxel erreicht, welches sich bei PC-3 nur in der Annexinfärbung zeigte. In der subG₀G₁-Populationsmessung zeigten sich hingegen Topotecan als auch Docetaxel gleich effektiv.

Zur Kombinationstherapie Docetaxel und Topotecan lassen sich in der Literatur keine Angaben über das Apoptoseverhalten finden.

Der statistische Vergleich der Kombinationstherapie mit den unbehandelten Kontrollen erzielte bei den Zelllinien DU-145 und PC-3 eine statistisch signifikante Steigerung der Apoptose in allen drei Nachweismethoden.

Bei den LNCaP-Zellen konnte in allen Versuchen keine Apoptose nachgewiesen werden.

Die Kombinationstherapie war der Monotherapie mit Docetaxel zwar überlegen, jedoch in Bezug auf die Topotecantherapie war nur die gleiche Effektivität nachweisbar.

5 Zusammenfassung

Krebs zählt neben den Herz-Kreislaufkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung wird die Zahl der onkologischen Erkrankungen in den Industrienationen voraussichtlich weiter zunehmen. Obwohl bei der Behandlung maligner Tumoren in den letzten Jahrzehnten beachtliche Erfolge erzielt wurden, können viele Krebserkrankungen bis heute nicht geheilt werden.

Deshalb ist gerade beim Prostatakarzinom als zweithäufigste Todesursache die Entwicklung neuer Therapiestrategien notwendig.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte des Topoisomerase-I-Inhibitors Topotecan, des Topoisomerase-II-Inhibitors Etoposid, des Taxans Docetaxel und des Mikrotubulusgifts Estramustinphosphat auf die Hemmung der Zellproliferation und die Induktion von Apoptose bei den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3.

Die Ergebnisse der Monotherapien wurden hinsichtlich der Proliferationshemmung mit den Kombinationstherapien

- Topotecan und Etoposid
- Topotecan und Docetaxel
- Topotecan und Estramustinphosphat

verglichen.

Die Induktion der Apoptose wurde bei der Kombination Topotecan und Docetaxel untersucht und die Apoptoseraten mit den Monotherapien von Topotecan und Docetaxel verglichen.

Die Untersuchungen zur Modulation der Zellproliferation und zur Induktion der Apoptose erfolgten in 96-well-Platten als Monolayerkulturen unter optimalen Wachstumsbedingungen.

Die Zellproliferation wurde dosisabhängig mittels des XTT-Tests gemessen und anschließend in sogenannten Dosis-Wirkungskurven graphisch dargestellt.

Aus den daraus ermittelten IC_{50} -Werten der Einzelsubstanzen wurden die Wirkungsbeziehungen von Topotecan mit jeweils Etoposid, Docetaxel und Estramustinphosphat nach Steel and Peckham bestimmt.

Die Zelllinien wurden hierbei 24h nach Aussaat mit den Substanzen inkubiert und nach weiteren 120h im XTT-Essay untersucht.

Der Apoptosenachweis erfolgte bei den Zelllinien LNCaP, DU-145 und PC-3 durch die Annexin-Färbung, PI-Markierung und M30-Antikörpernachweismethode.

In allen drei Zelllinien bewirkte die Behandlung mit den Einzelsubstanzen eine Hemmung der Proliferation. Es zeigte sich für die IC_{50} bei den Monotherapien folgende Reihenfolge bei den einzelnen Zelllinien:

für Topotecan: LNCaP < DU-145 < PC-3

für Etoposid: DU-145 < LNCaP < PC-3

für Docetaxel : LNCaP < DU-145 < PC-3

für Estramustinphosphat: LNCaP < PC-3 < DU-145

Bei der Kombination Topotecan und Etoposid wurden für die Zelllinien LNCaP und PC-3 eine synergistische, für DU-145 eine additive Wirkbeziehung erzielt werden.

Bei Topotecan kombiniert mit Estramustinphosphat hingegen zeigten sich in allen drei Zelllinien antagonistische Effekte.

Für die Zelllinien LNCaP und PC-3 konnten bei Behandlung mit Topotecan und Docetaxel synergistische, für DU-145 antagonistische Wirkbeziehungen beobachtet werden.

Kombination	Zelllinien	Wirkbeziehung	Statistische Signifikanz
Eto	LNCaP	synergistisch	n.s.
+	DU-145	Additiv	n.s.
TPT	PC-3	synergistisch	n.s.
TXT	LNCaP	synergistisch	n.s.
+	DU-145	antagonistisch	s.
TPT	PC-3	synergistisch	n.s.
EMP	LNCaP	antagonistisch	n.s.
+	DU-145	antagonistisch	s.
TPT	PC-3	antagonistisch	n.s.

Bei den Apoptosenachweisverfahren konnte sowohl für Topotecan als auch für Docetaxel eine signifikant höhere Apoptoserate als bei den unbehandelten Zellen für die Linien DU-145 und PC-3 erzielt werden.

Bei den LNCaP-Zellen konnte keine Apoptoseinduktion festgestellt werden.

Im Vergleich der Monotherapien untereinander konnte in der Annexinfärbung und nur bei DU-145 im M30-Nachweisverfahren eine erhöhte Apoptoserate von Topotecan festgestellt werden. In der subG₀G₁-Messung war kein Effektivitätsunterschied zu sehen.

Die Kombination dieser beiden Substanzen war der Monotherapien von Docetaxel hinsichtlich der Apoptoserate überlegen. Beim Vergleich mit der Monotherapie Topotecan konnte jedoch keine erhöhte Effektivität bezüglich der Apoptoseinduktion verzeichnet werden.

Bei den Proliferationsversuchen zeigte sich vor allem die Kombinationstherapie Topotecan und Etoposid als erfolgversprechend, weil in allen drei Zelllinien additive (LNCaP und DU-145) bzw. synergistische (PC-3) Wirkbeziehungen beobachtet wurden.

Auch für die Zelllinien LNCaP und PC-3 wurde bei der Kombination Docetaxel und Topotecan synergistische Wirkungen, hingegen bei der Linie DU-145 eine antagonistische Beziehung gezeigt. Der Synergismus bestätigte sich jedoch nicht bei den Apoptoseversuchen.

Keine Überlegenheit gegenüber den Monotherapien wurde jedoch bei allen drei Zelllinien, die mit Topotecan und Estramustinphosphat behandelt wurden, gezeigt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein Einsatz der Kombinationstherapie Topotecan und Etoposid als auch Topotecan und Docetaxel in in-vitro-Versuchen effektiv ist und eventuell bei Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom in weiteren klinischen Studien getestet werden sollte.

Die Kombination Topotecan und Docetaxel zeigte sich hingegen bei Vergleich der Proliferations- und Apoptosetests widersprüchlich. So konnte die Behandlung zwar eine erhöhte Proliferationshemmung, jedoch keine stärkere Induktion von Apoptose im Vergleich zur Monotherapie bewirken.

6 Literaturverzeichnis

1. Abrahamsson, P. A., J. Anderson, L. Boccon-Gibod, C. Schulman, U. E. Studer, and M. Wirth. 2005. "Risks and benefits of hormonal manipulation as monotherapy or adjuvant treatment in localised prostate cancer." *Eur.Urol.* 48:900-905.
2. Aisner, J., R. Musanti, S. Beers, S. Smith, S. Locsin, and E. H. Rubin. 2003. "Sequencing topotecan and etoposide plus cisplatin to overcome topoisomerase I and II resistance: A pharmacodynamically based phase I trial." *Clinical Cancer Research* 9:2504-2509.
3. Anwar, K., K. Nakakuki, T. Shiraishi, H. Naiki, R. Yatani, and M. Inuzuka. 1992. "Presence of ras oncogene mutations and human papillomavirus DNA in human prostate carcinomas." *Cancer Res.* 52:5991-5996.
4. Arah, I. N., K. Song, P. Seth, K. H. Cowan, and B. K. Sinha. 1998. "Role of wild-type p53 in the enhancement of camptothecin cytotoxicity against human prostate tumor cells." *Anticancer Res.* 18:1845-1849.
5. Bahadori, H. R., M. R. Green, and C. V. Catapano. 2001. "Synergistic interaction between topotecan and microtubule-interfering agents." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 48:188-196.
6. Beer, T. M., Pierce, W. C., Lowe, B. A., Henner, W. D. 2001 Phase II study of weekly docetaxel in symptomatic androgen-independent prostate cancer" *Annals of Oncology.* 12: 1273 - 1279
7. Benson, R. and B. Hartleyasp. 1990. "Mechanisms of Action and Clinical Uses of Estramustine." *Cancer Investigation* 8:375-380.
8. Berges, R. R., J. Vukanovic, J. I. Epstein, M. CarMichel, L. Cisek, D. E. Johnson, R. W. Veltri, P. C. Walsh, and J. T. Isaacs. 1995b. "Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer." *Clin.Cancer Res.* 1:473-480.
9. Berruti, A., L. Dogliotti, R. Bitossi, G. Fasolis, G. Gorzegno, M. Bellina, M. Torta, F. Porphiglia, D. Fontana, and A. Angeli. 2000. "Incidence of skeletal complications in patients with bone metastatic prostate cancer and hormone refractory disease:

- predictive role of bone resorption and formation markers evaluated at baseline." *J.Urol.* 164:1248-1253.
10. Berruti, A., E. Fara, M. Tucci, R. Tarabuzzi, A. Mosca, C. Terrone, G. Gorzegno, G. Fasolis, M. Tampellini, F. Porpiglia, M. De Stefanis, D. Fontana, O. Bertetto, and L. Dogliotti. 2005. "Oral estramustine plus oral etoposide in the treatment of hormone refractory prostate cancer patients: A phase II study with a 15-year follow-up." *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations* 23:1-7.
 11. Berry, W., Dakhil, S., Gregurich, M. A., Asmar, L. 2001 "Phase II trial of single-agent weekly docetaxel in hormone-refractory, symptomatic, metastatic carcinoma of the prostate." *Seminars in Oncology.* (b) **28**: 8 - 15
 12. Bhandari, M. S., D. P. Petrylak, and M. Hussain. 2005. "Clinical trials in metastatic prostate cancer - Has there been real progress in the past decade?" *European Journal of Cancer* 41:941-953.
 13. Bonner, J. A. and T. F. Kozelsky. 1996. "The significance of the sequence of administration of topotecan and etoposide." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 39:109-112.
 14. Bookstein, R., G. S. Bova, D. MacGrogan, A. Levy, and W. B. Isaacs. 1997. "Tumour-suppressor genes in prostatic oncogenesis: A positional approach." *British Journal of Urology* 79:28-36.
 15. Bookstein, R., P. Rio, S. A. Madreperla, F. Hong, C. Allred, W. E. Grizzle, and W. H. Lee. 1990. "Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in human prostate carcinoma." *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:7762-7766.
 16. Bruchovsky, N., P. S. Rennie, A. J. Coldman, S. L. Goldenberg, M. To, and D. Lawson. 1990. "Effects of Androgen Withdrawal on the Stem-Cell Composition of the Shionogi Carcinoma." *Cancer Research* 50:2275-2282.
 17. Bruchovsky, N., Rennie, P. S., To, M. P., Snoek, R., Lefebvre, Y. A., Golsteyn, E. J. 1987 "Chemical Demonstration of Nuclear Androgen Receptor Following Affinity-Chromatography with Immobilized Ligands." *Prostate.* 10: 207 - 222

18. Bubley, G. J., Carducci, M., Dahut, W., Dawson, N., Daliani, D., Eisenberger, M., Figg, W. D., Freidlin, B., Halabi, S., Hudes, G., Hussain, M., Kaplan, R., Myers, C., Oh, W., Petrylak, D. P., Reed, E., Roth, B., Sartor, O., Scher, H., Simons, J., Sinibaldi, V., Small, E. J., Smith, M. R., Trump, D. L., Vollmer, R., Wilding, G. 1999 "Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in androgen-independent prostate cancer: Recommendations from the prostate-specific antigen working group." *Journal of Clinical Oncology*. 17: 3461 - 3467
19. Caceres, G., R. Zankina, X. Zhu, J. A. Jiao, H. Wong, A. Aller, and P. Andreotti. 2003. "Determination of chemotherapeutic activity in vivo by luminescent imaging of luciferase-transfected human tumors." *Anticancer Drugs* 14:569-574.
20. Carter, B. S., Beaty, T. H., Steinberg, G. D., Childs, B., Walsh, P. C. 1992 "Mendelian inheritance of familial prostate cancer." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 3367 - 3371
21. Chatterjee, D., I. Schmitz, A. Krueger, K. Yeung, S. Kirchhoff, P. H. Krammer, M. E. Peter, J. H. Wyche, and P. Pantazis. 2001. "Induction of apoptosis in 9-nitrocamptothecin-treated DU145 human prostate carcinoma cells correlates with de novo synthesis of CD95 and CD95 ligand and down-regulation of c-FLIP(short)." *Cancer Res.* 61:7148-7154.
22. Chen, S., S. P. Gomez, D. McCarley, and M. G. Mainwaring. 2002. "Topotecan-induced topoisomerase IIalpha expression increases the sensitivity of the CML cell line K562 to subsequent etoposide plus mitoxantrone treatment." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 49:347-355.
23. Chou, T. C. and P. Talalay. 1984. "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." *Adv.Enzyme Regul.* 22:27-55.
24. Cohen, G. M., X. M. Sun, H. Fearnhead, M. MacFarlane, D. G. Brown, R. T. Snowden, and D. Dinsdale. 1994. "Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes." *J.Immunol.* 153:507-516.

25. Coleman, L. W., S. L. Perkins, I. B. Bronstein, and J. A. Holden. 2000. "Expression of DNA topoisomerase I and DNA topoisomerase II-alpha in testicular seminomas." *Hum.Pathol.* 31:728-733.
26. Cooney, K. A., J. D. McCarthy, E. Lange, L. Huang, S. Miesfeldt, J. E. Montie, J. E. Oesterling, H. M. Sandler, and K. Lange. 1997. "Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmatory study 1." *J.Natl.Cancer Inst.* 89:955-959.
27. Crump, M., S. Couban, R. Meyer, L. Rudinskas, B. Zanke, S. Gluck, A. Maksymiuk, P. Hoskins, S. Matthews, and E. Eisenhauer. 2002. "Phase II study of sequential topotecan and etoposide in patients with intermediate grade non-Hodgkin's lymphoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study." *Leuk.Lymphoma* 43:1581-1587.
28. Culig, Z., A. Hobisch, M. V. Cronauer, C. Radmayr, J. Trapman, A. Hittmair, G. Bartsch, and H. Klocker. 1994. "Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor." *Cancer Res.* 54:5474-5478.
29. Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, Bino G. Del, W. Gorczyca, M. A. Hotz, P. Lassota, and F. Traganos. 1992. "Features of apoptotic cells measured by flow cytometry." *Cytometry* 13:795-808.
30. Dawson, N. A. 1998 "Apples and oranges: Building a consensus for standardized eligibility criteria and end points in prostate cancer clinical trials. " *Journal of Clinical Oncology.* 16: 3398 - 3405
31. Demarquay, D., M. Huchet, H. Coulomb, L. Lesueur-Ginot, O. Lavergne, J. Camara, P. G. Kasprzyk, G. Prevost, and D. C. Bigg. 2004. "BN80927: a novel homocamptothecin that inhibits proliferation of human tumor cells in vitro and in vivo." *Cancer Res.* 64:4942-4949.
32. Dong, J. T., W. B. Isaacs, and J. T. Isaacs. 1997. "Molecular advances in prostate cancer." *Curr.Opin.Oncol.* 9:101-107.

33. Dong, J. T., P. W. Lamb, C. W. Rinker-Schaeffer, J. Vukanovic, T. Ichikawa, J. T. Isaacs, and J. C. Barrett. 1995. "KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2." *Science* 268:884-886.
34. Du, C. Y., M. Fang, Y. C. Li, L. Li, and X. D. Wang. 2000. "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell* 102:33-42.
35. Eder, J. P., V. Chan, J. Wong, Y. W. Wong, G. Ara, D. Northey, N. Rizvi, and B. A. Teicher. 1998. "Sequence effect of irinotecan (CPT-11) and topoisomerase II inhibitors in vivo." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 42:327-335.
36. Eisenberger, M. A. and P. C. Walsh. 1999. "Early androgen deprivation for prostate cancer?" *N.Engl.J.Med.* 341:1837-1838.
37. Frei, E., III, M. Karon, R. H. Levin, E. J. Freireich, R. J. Taylor, J. Hananian, O. Selawry, J. F. Holland, B. Hoogstraten, I. J. Wolman, E. Abir, A. Sawitsky, S. Lee, S. D. Mills, E. O. Burgert, Jr., C. L. Spurr, R. B. Patterson, F. G. Ebaugh, G. W. James, III, and J. H. Moon. 1965. "The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia." *Blood* 26:642-656.
38. Friedland, D., Cohen, J., Miller, R., Voloshin, M., Gluckman, R., Lembersky, B., Zidar, B., Keating, M., Reilly, N., Dimitt, B. 1999 "A phase II trial of docetaxel (Taxotere) in hormone-refractory prostate cancer: Correlation of antitumor effect to phosphorylation of Bcl-2." *Seminars in Oncology.* 26: 19 - 23
39. Friedman, H. S., P. J. Houghton, S. C. Schold, S. Keir, and D. D. Bigner. 1994. "Activity of 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin against pediatric and adult central nervous system tumor xenografts." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 34:171-174.
40. Giovannucci, E. 2002. "A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer." *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 227:852-859.

41. Giovannucci, E., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Chute, C. C., Willett, W. C. 1993 "A Prospective-Study of Dietary-Fat and Risk of Prostate-Cancer." *Journal of the National Cancer Institute*. 85: 1571 - 1579
42. Goodman, L. S., M. M. Wintrobe, W. Dameshek, M. J. Goodman, A. Gilman, and M. T. McLennan. 1984. "Landmark article Sept. 21, 1946: Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. By Louis S. Goodman, Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman and Margaret T. McLennan." *JAMA* 251:2255-2261.
43. Grabowski, D. and R. Ganapathi. 1996. "Cytotoxic efficacy with combinations of topoisomerase I and topoisomerase II inhibitors in sensitive and multidrug-resistant L1210 mouse leukemia cells." *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 803:306-307.
44. Green, D. R. and J. C. Reed. 1998. "Mitochondria and apoptosis." *Science* 281:1309-1312.
45. Griffith, T. S. and T. J. Kemp. 2003a. "The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 52:175-184.
46. Griffith, T. S. and T. J. Kemp. 2003b. "The topoisomerase I inhibitor topotecan increases the sensitivity of prostate tumor cells to TRAIL/Apo-2L-induced apoptosis." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 52:175-184.
47. Haddad, R. I. and D. A. Van Echo. 2003. "Phase II study of docetaxel and topotecan combination chemotherapy in patients with advanced head and neck cancer." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 52:303-306.
48. Haldar, S., A. Basu, and C. M. Croce. 1997. "Bcl2 is the guardian of microtubule integrity." *Cancer Res.* 57:229-233.
49. Haldar, S., J. Chintapalli, and C. M. Croce. 1996. "Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells 2." *Cancer Res.* 56:1253-1255.

50. Hansenson, M., B. Lundh, B. Hartley-Asp, and A. Pousette. 1988. "Growth inhibiting effect of estramustine on two prostatic carcinoma cell lines, LNCaP and LNCaP-r." *Urol.Res.* 16:357-361.
51. Hartley-Asp, B. 1984. "Estramustine-induced mitotic arrest in two human prostatic carcinoma cell lines DU 145 and PC-3." *Prostate* 5:93-100.
52. Hartley-Asp, B. and P. O. Gunnarsson. 1982. "Growth and cell survival following treatment with estramustine nor-nitrogen mustard, estradiol and testosterone of a human prostatic cancer cell line (DU 145)." *J.Urol.* 127:818-822.
53. Hasegawa, N., K. Mizutani, T. Suzuki, T. Deguchi, and Y. Nozawa. 2006. "A comparative study of protein profiling by proteomic analysis in camptothecin-resistant PC3 and camptothecin-sensitive LNCaP human prostate cancer cells." *Urol.Int.* 77:347-354.
54. Heidenberg, H. B., I. A. Sesterhenn, J. P. Gaddipati, C. M. Weghorst, G. S. Buzard, J. W. Moul, and S. Srivastava. 1995. "Alteration of the tumor suppressor gene p53 in a high fraction of hormone refractory prostate cancer." *J.Urol.* 154:414-421.
55. Herzog, T. J. 2002. "Update on the role of topotecan in the treatment of recurrent ovarian cancer." *Oncologist.* 7 Suppl 5:3-10.
56. Hirose, T., T. Shirai, H. Ishida, K. Ando, T. Sugiyama, S. Kusumoto, T. Hosaka, M. Nakashima, T. Ohmori, and M. Adachi. 2007. "Phase II study of biweekly administration of docetaxel and irinotecan in patients with refractory or relapsed advanced non-small cell lung cancer." *Cancer Chemother.Pharmacol.*
57. Hong, X., Y. Li, M. Hussain, and F. H. Sarkar. 2004. "Gene expression profiling reveals novel targets of estramustine phosphate in prostate cancer cells." *Cancer Lett.* 209:187-195.
58. Houghton, P. J., P. J. Cheshire, L. Myers, C. F. Stewart, T. W. Synold, and J. A. Houghton. 1992. "Evaluation of 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin against xenografts derived from adult and childhood solid tumors." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 31:229-239.

59. Hudes, G., L. Einhorn, E. Ross, A. Balsham, P. Loehrer, H. Ramsey, J. Sprandio, M. Entmacher, W. Dugan, R. Ansari, F. Monaco, M. Hanna, and B. Roth. 1999. "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." *Journal of Clinical Oncology* 17:3160-3166.
60. Hudes, G. R., R. Greenberg, R. L. Krigel, S. Fox, R. Scher, S. Litwin, P. Watts, L. Speicher, K. Tew, and R. Comis. 1992. "Phase-II Study of Estramustine and Vinblastine, 2 Microtubule Inhibitors, in Hormone-Refractory Prostate-Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 10:1754-1761.
61. Hudes, G. R., R. Kosierowski, R. Greenberg, H. E. Ramsey, S. C. Fox, R. F. Ozols, C. A. McAleer, and B. J. Giantonio. 1995. "Phase II study of topotecan in metastatic hormone-refractory prostate cancer." *Invest New Drugs* 13:235-240.
62. Husain, I., J. L. Mohler, H. F. Seigler, and J. M. Besterman. 1994. "Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy." *Cancer Res.* 54:539-546.
63. Irvine, R. A., Yu, M. C., Ross, R. K., Coetzee, G. A. 1995 "The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer." *Cancer Res.* 55: 1937 - 1940
64. Isaacs, J. T., N. Wake, D. S. Coffey, and A. A. Sandberg. 1982. "Genetic Instability Coupled to Clonal Selection As A Mechanism for Tumor Progression in the Dunning R-3327 Rat Prostatic Adenocarcinoma System." *Cancer Research* 42:2353-2361.
65. Isaacs, W. B., G. S. Bova, R. A. Morton, M. J. Bussemakers, J. D. Brooks, and C. M. Ewing. 1995. "Molecular biology of prostate cancer progression." *Cancer Surv.* 23:19-32.
66. Isaacs, W. B., B. S. Carter, and C. M. Ewing. 1991. "Wild-Type P53 Suppresses Growth of Human Prostate-Cancer Cells Containing Mutant P53 Alleles." *Cancer Research* 51:4716-4720.

67. Itoh, N. and S. Nagata. 1993. "A Novel Protein Domain Required for Apoptosis - Mutational Analysis of Human Fas Antigen." *Journal of Biological Chemistry* 268:10932-10937.
68. Jemal, A., T. Murray, E. Ward, A. Samuels, R. C. Tiwari, A. Ghafoor, E. J. Feuer, and M. J. Thun. 2005. "Cancer statistics, 2005." *CA Cancer J.Clin.* 55:10-30.
69. Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, and M. J. Thun. 2006. "Cancer statistics, 2006." *CA Cancer J.Clin.* 56:106-130.
70. Jenster, G. 1999. "The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer." *Semin.Oncol.* 26:407-421.
71. Jonsson, E., H. Fridborg, P. Nygren, and R. Larsson. 1998. "Synergistic interactions of combinations of topotecan with standard drugs in primary cultures of human tumor cells from patients." *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 54:509-514.
72. Kano, Y., M. Akutsu, S. Tsunoda, H. Mano, Y. Sato, Y. Honma, and Y. Furukawa. 2001. "In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents." *Blood* 97:1999-2007.
73. Kano, Y., M. Akutsu, S. Tsunoda, K. Mori, K. Suzuki, and K. I. Adachi. 1998. "In vitro schedule-dependent interaction between paclitaxel and SN-38 (the active metabolite of irinotecan) in human carcinoma cell lines." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 42:91-98.
74. Kantoff, P. W., S. Halabi, M. Conaway, J. Picus, J. Kirshner, V. Hars, D. Trump, E. P. Winer, and N. J. Vogelzang. 1999. "Hydrocortisone with or without mitoxantrone in men with hormone-refractory prostate cancer: results of the cancer and leukemia group B 9182 study." *J.Clin.Oncol.* 17:2506-2513.
75. Kaufmann, S. H., D. Peereboom, C. A. Buckwalter, P. A. Svingen, L. B. Grochow, R. C. Donehower, and E. K. Rowinsky. 1996. "Cytotoxic effects of topotecan combined with various anticancer agents in human cancer cell lines." *J.Natl.Cancer Inst.* 88:734-741.

76. Kitamura, T., H. Nishimatsu, T. Hamamoto, K. Tomita, T. Takeuchi, and N. Ohta. 2002. "EMP combination chemotherapy and low-dose monotherapy in advanced prostate cancer." *Expert.Rev.Anticancer Ther.* 2:59-71.
77. Klein, C. E., C. M. Tangen, T. J. Braun, M. H. Hussain, D. M. Peereboom, C. R. Nichols, S. E. Rivkin, S. R. Dakhil, and E. D. Crawford. 2002a. "SWOG-9510: evaluation of topotecan in hormone refractory prostate cancer: a Southwest Oncology Group study 2." *Prostate* 52:264-268.
78. Klein, C. E., C. M. Tangen, T. J. Braun, M. H. A. Hussain, D. M. Peereboom, C. R. Nichols, S. E. Rivkin, S. R. Dakhil, and E. D. Crawford. 2002b. "SWOG-9510: Evaluation of topotecan in hormone refractory prostate cancer: A Southwest Oncology Group Study." *Prostate* 52:264-268.
79. Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green, and D. D. Newmeyer. 1997. "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." *Science* 275:1132-1136.
80. Kreis, W., D. R. Budman, and A. Calabro. 1997. "Unique synergism or antagonism of combinations of chemotherapeutic and hormonal agents in human prostate cancer cell lines." *Br.J.Urol.* 79:196-202.
81. Kubler, H. R., Randenborgh H. van, U. Treiber, S. Wutzler, C. Battistel, A. Lehmer, S. Wagenpfeil, R. Hartung, and R. Paul. 2005. "In vitro cytotoxic effects of imatinib in combination with anticancer drugs in human prostate cancer cell lines." *Prostate* 63:385-394.
82. Li, L. H., T. J. Fraser, E. J. Olin, and B. K. Bhuyan. 1972. "Action of camptothecin on mammalian cells in culture." *Cancer Res.* 32:2643-2650.
83. Li, X. and Z. Darzynkiewicz. 2000. "Cleavage of Poly(ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis." *Exp.Cell Res.* 255:125-132.
84. Lichtenstein, P., N. V. Holm, P. K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe, and K. Hemminki. 2000. "Environmental and heritable

- factors in the causation of cancer - Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." *New England Journal of Medicine* 343:78-85.
85. Logothetis, C. J., N. M. Hoosein, and J. T. Hsieh. 1994. "The Clinical and Biological Study of Androgen-Independent Prostate-Cancer (AI Pca)." *Seminars in Oncology* 21:620-629.
86. Los, M., S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff. 1999. "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice." *Immunity* 10:629-639.
87. MacGrogan, D. and R. Bookstein. 1997. "Tumour suppressor genes in prostate cancer." *Seminars in Cancer Biology* 8:11-19.
88. Macoska, J. A., T. M. Trybus, W. A. Sakr, M. C. Wolf, P. D. Benson, I. J. Powell, and J. E. Pontes. 1994. "Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer." *Cancer Res.* 54:3824-3830.
89. Malins, D. C., P. M. Johnson, E. A. Barker, N. L. Polissar, T. M. Wheeler, and K. M. Anderson. 2003. "Cancer-related changes in prostate DNA as men age and early identification of metastasis in primary prostate tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5401-5406.
90. Mareel, M. M., G. A. Storme, C. H. Dragonetti, G. K. De Bruyne, B. Hartley-Asp, J. L. Segers, and M. L. Rabaey. 1988. "Antiinvasive activity of estramustine on malignant MO4 mouse cells and on DU-145 human prostate carcinoma cells in vitro." *Cancer Res.* 48:1842-1849.
91. Morsi, H. M., M. P. Leers, W. Jager, V. Bjorklund, M. Radespiel-Troger, Kabarity H. El, M. Nap, and N. Lang. 2000. "The patterns of expression of an apoptosis-related CK18 neopeptide, the bcl-2 proto-oncogene, and the Ki67 proliferation marker in normal, hyperplastic, and malignant endometrium." *Int.J.Gynecol.Pathol.* 19:118-126.

92. Muenchen, H. J., P. J. Poncza, and K. J. Pienta. 2001. "Different docetaxel-induced apoptotic pathways are present in prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3." *Urology* 57:366-370.
93. Nagourney, R. A., B. L. Sommers, S. M. Harper, S. Radecki, and S. S. Evans. 2003. "Ex vivo analysis of topotecan: advancing the application of laboratory-based clinical therapeutics." *Br.J.Cancer* 89:1789-1795.
94. Naik, H., J. E. Lehr, and K. J. Pienta. 1996a. "Inhibition of prostate cancer growth by 9-aminocamptothecin and estramustine." *Urology* 48:508-511.
95. Naik, H., J. E. Lehr, and K. J. Pienta. 1996b. "Inhibition of prostate cancer growth by 9-aminocamptothecin and estramustine." *Urology* 48:508-511.
96. Navone, N. M., P. Troncoso, L. L. Pisters, T. L. Goodrow, J. L. Palmer, W. W. Nichols, A. C. Voneschenbach, and C. J. Conti. 1993. "P53 Protein Accumulation and Gene Mutation in the Progression of Human Prostate Carcinoma." *Journal of the National Cancer Institute* 85:1657-1669.
97. Nehme, A., P. Varadarajan, G. Sellakumar, M. Gerhold, H. Niedner, Q. Zhang, X. Lin, and R. D. Christen. 2001. "Modulation of docetaxel-induced apoptosis and cell cycle arrest by all- trans retinoic acid in prostate cancer cells." *Br.J.Cancer* 84:1571-1576.
98. Nelius, T., F. Reiher, T. Lindenmeir, T. Klatte, O. Rau, J. Burandt, S. Filleur, and E. P. Allhoff. 2005. "Characterization of prognostic factors and efficacy in a phase-II study with docetaxel and estramustine for advanced hormone refractory prostate cancer." *Onkologie*. 28:573-578.
99. Nelson, W. G., A. M. De Marzo, and W. B. Isaacs. 2003a. "Mechanisms of disease: Prostate cancer." *New England Journal of Medicine* 349:366-381.
100. Nelson, W. G., A. M. De Marzo, and W. B. Isaacs. 2003b. "Prostate cancer." *N.Engl.J.Med.* 349:366-381.
101. Numata, K., N. Miura, K. Azuma, T. Karashima, K. Kasahara, H. Nakatsuzi, K. Hashine, and Y. Sumiyoshi. 2007. "Oral estramustine phosphate and oral

- etoposide for the treatment of hormone-refractory prostate cancer." *Hinyokika Kyo* 53:99-104.
102. O'Brien, M. E., T. E. Ciuleanu, H. Tsekov, Y. Shparyk, B. Cucevia, G. Juhasz, N. Thatcher, G. A. Ross, G. C. Dane, and T. Crofts. 2006. "Phase III trial comparing supportive care alone with supportive care with oral topotecan in patients with relapsed small-cell lung cancer." *J.Clin.Oncol.* 24:5441-5447.
103. Oudard, S., E. Banu, A. Banu, F. Scotte, E. Levy, J. Medioni, E. F. Guillemin, J. Ayllon, N. Arakelyan, and J. M. Andrieu. 2005a. "Docetaxel versus mitoxantrone as first-line chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer (HRPC) patients. A meta-analysis of 3-year overall survival results." *Journal of Clinical Oncology* 23:411S.
104. Oudard, S., E. Banu, P. Beuzeboc, E. Voog, L. M. Dourthe, A. C. Hardy-Bessard, C. Linassier, F. Scotte, A. Banu, Y. Coscas, F. Guinet, and M. F. Poupon. 2005b. "Multicenter randomized phase II study of two schedules of docetaxel, estramustine, and prednisone versus mitoxantrone plus prednisone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer." *Journal of Clinical Oncology* 23:3343-3351.
105. Pan, G., K. O'Rourke, and V. M. Dixit. 1998. "Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex." *J.Biol.Chem.* 273:5841-5845.
106. Perego, P., E. Ciusani, L. Gatti, N. Carenini, E. Corna, and F. Zunino. 2006. "Sensitization to gimatecan-induced apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand in prostate carcinoma cells." *Biochem.Pharmacol.* 71:791-798.
107. Perry, C. M. and D. McTavish. 1995. "Estramustine phosphate sodium. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in prostate cancer." *Drugs Aging* 7:49-74.
108. Petrylak, D. P., C. M. Tangen, M. H. Hussain, P. N. Lara, Jr., J. A. Jones, M. E. Taplin, P. A. Burch, D. Berry, C. Moinpour, M. Kohli, M. C. Benson, E. J. Small, D. Raghavan, and E. D. Crawford. 2004a. "Docetaxel and estramustine compared

- with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer." *N.Engl.J.Med.* 351:1513-1520.
109. Picus, J., Schultz, 1999 "M. Docetaxel (Taxotere) as monotherapy in the treatment of hormone-refractory prostate cancer: Preliminary results." *Seminars in Oncology.* 26: 14 – 18
110. Pienta, K. J. and J. E. Lehr. 1993. "Inhibition of prostate cancer growth by estramustine and etoposide: evidence for interaction at the nuclear matrix." *J.Urol.* 149:1622-1625.
111. Pratesi, G., M. Tortoreto, C. Corti, R. Giardini, and F. Zunino. 1995b. "Successful local regional therapy with topotecan of intraperitoneally growing human ovarian carcinoma xenografts." *Br.J.Cancer* 71:525-528.
112. Price, N. and R. Dreicer. 2004. "Phase I/II trial of bortezomib plus docetaxel in patients with advanced androgen-independent prostate cancer." *Clin.Prostate Cancer* 3:141-143.
113. Quinn, M. and P. Babb. 2002. "Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons." *Bju International* 90:162-173.
114. Quoix, E., J. L. Breton, R. Gervais, J. Wilson, F. Schramel, F. Cardenal, G. Ross, A. Preston, M. Lymboura, and K. Mattson. 2005. "A randomised phase II study of the efficacy and safety of intravenous topotecan in combination with either cisplatin or etoposide in patients with untreated extensive disease small-cell lung cancer." *Lung Cancer* 49:253-261.
115. Reck, M., G. Groth, E. Buchholz, E. Goetz, U. Gatzemeier, and C. Manegold. 2005. "Topotecan and etoposide as first-line therapy for extensive disease small cell lung cancer: a phase II trial of a platinum-free regimen 4." *Lung Cancer* 48:409-413.
116. Roth, B. J., Yeap, B. Y., Wilding, G., Kasimis, B., McLeod, D., Loehrer, P. J. 1993 "Taxol in advanced, hormone-refractory carcinoma of the prostate." A phase II trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer.* 72: 2457 - 2460

117. Rudel, T. and G. M. Bokoch. 1997. "Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2." *Science* 276:1571-1574.
118. Sadar, M. D. 1999. "Androgen-independent induction of prostate-specific antigen gene expression via cross-talk between the androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways." *J.Biol.Chem.* 274:7777-7783.
119. Sadar, M. D., M. Hussain, and N. Bruchovsky. 1999. "Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence." *Endocr.Relat Cancer* 6:487-502.
120. Scher, H. I., C. Sternberg, W. D. Heston, R. C. Watson, D. Niedzwiecki, T. Smart, P. Hollander, and A. Yagoda. 1986. "Etoposide in prostatic cancer: experimental studies and phase II trial in patients with bidimensionally measurable disease." *Cancer Chemother.Pharmacol.* 18:24-26.
121. Scher, H. I., Kelly, W. M., Zhang, Z. F., Ouyang, P., Sun, M., Schwartz, M., Ding, C., Wang, W., Horak, I. D., Kremer, A. B. 1999 "Post-therapy serum prostate-specific antigen level and survival in patients with androgen-independent prostate cancer." *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 244 - 251
122. Scher, H. I., Mazumdar, M., Kelly, W. K. 1996 "Clinical trials in relapsed prostate cancer: Defining the target." *Journal of the National Cancer Institute.* 88: 1623 - 1634
123. Shankar, S., X. Chen, and R. K. Srivastava. 2005. "Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo." *Prostate* 62:165-186.
124. Shimizu, H., R. K. Ross, L. Bernstein, R. Yatani, B. E. Henderson, and T. M. Mack. 1991. "Cancers of the Prostate and Breast Among Japanese and White Immigrants in Los-Angeles-County." *British Journal of Cancer* 63:963-966.
125. Simon, T., A. Langler, F. Berthold, T. Klingebiel, and B. Hero. 2007. "Topotecan and Etoposide in the Treatment of Relapsed High-risk Neuroblastoma: Results of a Phase 2 Trial." *J.Pediatr.Hematol.Oncol.* 29:101-106.

126. Small, E. J., P. F. Schellhammer, C. S. Higano, J. Neumanaitis, F. Valone, and R. Hershberg. 2005. "Phase II prime/boost vaccination using poxviruses expressing PSA in hormone dependent prostate cancer: Follow-up clinical results from ECOG 7897." *Journal of Clinical Oncology* 23:378S.
127. Smith, M. R. and J. B. Nelson. 2005. "Future therapies in hormone-refractory prostate cancer." *Urology* 65:9-16.
128. Stamey, T. A. 1988. "Clinical and morphometric observations on prostate cancer." *Med.Sect.Proc.:*29-42.
129. Stathopoulos, G. P., N. A. Malamos, G. Aravantinos, S. Rigatos, C. Christodoulou, J. Stathopoulos, and D. Skarlos. 2006. "Weekly administration of topotecan-paclitaxel as second-line treatment in ovarian cancer." *Cancer Chemother.Pharmacol.*
130. Steel, G. G. and M. J. Peckham. 1979. "Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity." *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 5:85-91.
131. Stein, C. A. 1999. "Mechanisms of action of taxanes in prostate cancer." *Seminars in Oncology* 26:3-7.
132. Streubel, B., Chott, A., Huber, D., Exner, M., Jager, U., Wagner, O., Schwarzinger, I. 2004 "Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas." *N. Engl. J. Med.* 351: 250 - 259
133. Tang, D. G. and A. T. Porter. 1997. "Target to apoptosis: A hopeful weapon for prostate cancer." *Prostate* 32:284-293.
134. Tannock, I. F., Wit R. de, W. R. Berry, J. Horti, A. Pluzanska, K. N. Chi, S. Oudard, C. Theodore, N. D. James, I. Turesson, M. A. Rosenthal, and M. A. Eisenberger. 2004a. "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer." *N.Engl.J.Med.* 351:1502-1512.
135. Tannock, I. F., D. Osoba, M. R. Stockler, D. S. Ernst, A. J. Neville, M. J. Moore, G. R. Armitage, J. J. Wilson, P. M. Venner, C. M. Coppin, and K. C. Murphy. 1996. "Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for

- symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points." *J.Clin.Oncol.* 14:1756-1764.
136. Taplin, M. E., G. J. Bubley, T. D. Shuster, M. E. Frantz, A. E. Spooner, G. K. Ogata, H. N. Keer, and S. P. Balk. 1995. "Mutation of the Androgen-Receptor Gene in Metastatic Androgen-Independent Prostate-Cancer." *New England Journal of Medicine* 332:1393-1398.
137. Taron, M., C. Plasencia, A. Abad, C. Martin, and M. Guillot. 2000. "Cytotoxic effects of topotecan combined with various active G2/M-phase anticancer drugs in human tumor-derived cell lines." *Invest New Drugs* 18:139-147.
138. Ten Bokkel, Huinink W., M. Gore, J. Carmichael, A. Gordon, J. Malfetano, I. Hudson, C. Broom, C. Scarabelli, N. Davidson, M. Spaczynski, G. Bolis, H. Malmstrom, R. Coleman, S. C. Fields, and J. F. Heron. 1997. "Topotecan versus paclitaxel for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer." *J.Clin.Oncol.* 15:2183-2193.
139. Theodorescu, D., S. R. Broder, J. C. Boyd, S. E. Mills, and H. F. Frierson. 1997. "p53, bcl-2 and retinoblastoma proteins as long-term prognostic markers in localized carcinoma of the prostate." *Journal of Urology* 158:131-137.
140. Umbas, R., W. B. Isaacs, P. P. Bringuier, H. E. Schaafsma, H. F. Karthaus, G. O. Oosterhof, F. M. Debruyne, and J. A. Schalken. 1994. "Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer." *Cancer Res.* 54:3929-3933.
141. van Brussel, J. P., G. J. van Steenbrugge, J. C. Romijn, F. H. Schroder, and G. H. Mickisch. 1999. "Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins." *Eur.J.Cancer* 35:664-671.
142. Vaux, D. L. and A. Strasser. 1996. "The molecular biology of apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2239-2244.
143. Veldscholte, J., C. Ristalpers, G. G. J. M. Kuiper, G. Jenster, C. Berrevoets, E. Claassen, H. C. J. Vanrooij, J. Trapman, A. O. Brinkmann, and E. Mulder. 1990. "A

- Mutation in the Ligand-Binding Domain of the Androgen Receptor of Human Lncap Cells Affects Steroid Binding Characteristics and Response to Anti-Androgens." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173:534-540.
144. Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, and D. L. Vaux. 2000. "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* 102:43-53.
145. Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V." *J.Immunol.Methods* 184:39-51.
146. Visakorpi, T., E. Hyytinen, P. Koivisto, M. Tanner, R. Keinanen, C. Palmberg, A. Palotie, T. Tammela, J. Isola, and O. P. Kallioniemi. 1995. "In-Vivo Amplification of the Androgen Receptor Gene and Progression of Human Prostate-Cancer." *Nature Genetics* 9:401-406.
147. Vogelzang, N. J., J. B. Nelson, C. C. Schulman, D. P. Dearnaley, F. Saad, D. J. Sleep, J. D. Isaacson, and M. A. Carducci. 2005. "Meta-analysis of clinical trials of atrasentan 10 mg in metastatic hormone-refractory prostate cancer." *Journal of Clinical Oncology* 23:393S.
148. Volkmer, H., Hassel, B., Wolff, J. M., Frank, R., Rathjen, F. G. 1992 "Structure of the axonal surface recognition molecule neurofascin and its relationship to a neural subgroup of the immunoglobulin superfamily." *J. Cell Biol.* 118: 149 - 161
149. Wagenpfeil, S., U. Treiber, and A. Lehmer. 2006. "Statistical analysis of combined dose effects for experiments with two agents." *Artif.Intell.Med.* 37:65-71.
150. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. 2003. "Non-apoptotic Fas signaling." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14:53-66.
151. Wang, L. G., X. M. Liu, W. Kreis, and D. R. Budman. 1998. "Androgen antagonistic effect of estramustine phosphate (EMP) metabolites on wild-type and mutated androgen receptor." *Biochem.Pharmacol.* 55:1427-1433.

152. Whitacre, C. M., E. Zborowska, N. H. Gordon, W. Mackay, and N. A. Berger. 1997. "Topotecan increases topoisomerase IIalpha levels and sensitivity to treatment with etoposide in schedule-dependent process." *Cancer Res.* 57:1425-1428.
153. Wirth, M. P. and M. Froehner. 2003. "Value of endocrine therapy for early and locally advanced prostate cancer." *Drugs & Aging* 20:115-124.
154. Wolff, Hans Julius. 1979. <<Das>> *Problem der Konkurrenz von Rechtsordnungen in der Antike teilweise vorgetragen am 30. Juni 1979.* Heidelberg: Carl Winter.
155. Wolff, JM 2005 Das hormonrefraktäre Prostatakarzinom. UNI-MED Science Verlag AG, 2. Auflage
156. Yagoda, A. and D. Petrylak. 1993. "Cytotoxic Chemotherapy for Advanced Hormone-Resistant Prostate-Cancer." *Cancer* 71:1098-1109.
157. Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones, and X. Wang. 1997. "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked." *Science* 275:1129-1132.
158. Yasin, M., A. C. Dalkin, D. J. Haisenleder, J. R. Kerrigan, and J. C. Marshall. 1995. "Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse pattern regulates GnRH receptor gene expression: augmentation by estradiol." *Endocrinology* 136:1559-1564.
159. Zuco, V., R. Supino, Cesare M. De, N. Carenini, P. Perego, L. Gatti, G. Pratesi, C. Pisano, R. Martinelli, F. Bucci, R. Zanier, P. Carminati, and F. Zunino. 2003. "Cellular bases of the antitumor activity of a 7-substituted camptothecin in hormone-refractory human prostate carcinoma models." *Biochem.Pharmacol.* 65:1281-1294.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: hormoneller Regelkreis

Abbildung 2: vereinfachte Darstellung des Apoptosewegs über den Todesrezeptorenweg (Typ 1) und den mitochondrialen Weg (Typ 2), modifiziert nach Los et al. (Los 1999)

Abbildung 3: Strukturformel von Topotecan

Abbildung 4: Strukturformel von Etoposid

Abbildung 5: Strukturformel von Docetaxel

Abbildung 6: Strukturformel von Estramustinphosphat

Abbildung 7: 96well-Platte nach Inkubationen mit A- und B-Konzentration

Abbildung 8: Kulturplatte für den Apoptosenachweis

Abbildung 9: Nachweis der Caspaseaktivität durch M30-Antikörpernachweis

Abbildung 10: Beispiel für eine Dose-Response-Kurve

Abbildung 11: Dose-Responsekurven der Substanz A und der Substanz B

Abbildung 12: Beispiel für den Verlauf eines Isobogramms zur Darstellung der Wirkbeziehung zweier Substanzen A und B

Abbildung 13: Proliferation der LNCaP-Zellen abhängig von Etoposid

Abbildung 14: Proliferation der DU145-Zellen abhängig von Etoposid

Abbildung 15 : Proliferation der PC-3-Zellen abhängig von Etoposid

Abbildung 16: Vergleich der IC_{50} -Werte der Prostatakarzinomzelllinien

Abbildung 17: Proliferation der LNCaP-Zellen abhängig von Topotecan

Abbildung 18: Proliferation der DU-145-Zellen abhängig von Topotecan

Abbildung 19: Proliferation der PC-3-Zellen abhängig von Topotecan

Abbildung 20: Vergleich der IC_{50} -Werte der Prostatakarzinomzelllinien abhängig von Topotecan

Abbildung 21: Proliferation der LNCaP-Zellen abhängig von Docetaxel

Abbildung 22: Proliferation der DU-145-Zellen abhängig von Docetaxel

Abbildung 23: Proliferation der PC-3-Zellen abhängig von Docetaxel

Abbildung 24: Vergleich der IC_{50} -Werte der Prostatakarzinomzelllinien abhängig von Docetaxel

Abbildung 25: Proliferation der LNCaP-Zellen abhängig von Estramustinphosphat

Abbildung 26: Proliferation der DU-145-Zellen abhängig von Estramustinphosphat

Abbildung 27: Proliferation der PC-3-Zellen abhängig von Estramustinphosphat

- Abbildung 28: Vergleich der IC_{50} -Werte der Prostatakarzinomzelllinien abhängig von Estramustinphosphat
- Abbildung 29: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von Etoposid und Topotecan
- Abbildung 30: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz
- Abbildung 31: Isobologramm der LNCaP-Zelllinie für Etoposid und Topotecan
- Abbildung 32: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von Docetaxel und Topotecan
- Abbildung 33: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz
- Abbildung 34: Isobologramm der LNCaP-Zelllinie für Docetaxel und Topotecan
- Abbildung 35: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von EMP und TPT
- Abbildung 36: Wachstum der LNCaP-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz
- Abbildung 37: Isobologramm der LNCaP-Zelllinie für Estramustinphosphat und Topotecan
- Abbildung 38: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von Etoposid und Topotecan
- Abbildung 39: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz
- Abbildung 40: Isobologramm der DU-145-Zelllinie für Etoposid und Topotecan
- Abbildung 41: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von TXT und TPT
- Abbildung 42: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz
- Abbildung 43: Isobologramm der DU-145-Zelllinie für Docetaxel und Topotecan
- Abbildung 44: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von EMP und TPT
- Abbildung 45: Wachstum der DU-145-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz
- Abbildung 46: Isobologramm der DU-145-Zelllinie für Estramustinphosphat und Topotecan
- Abbildung 47: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von Etoposid und Topotecan
- Abbildung 48: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von IC_{50} der einen Substanz mit steigenden Konzentrationen der anderen Substanz
- Abbildung 49: Isobologramm der PC-3-Zelllinie für Etoposid und Topotecan
- Abbildung 50: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von Docetaxel und Topotecan

- Abbildung 51: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz
- Abbildung 52: Isobologramm der PC-3-Zelllinie für Docetaxel und Topotecan
- Abbildung 53: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von EMP und TPT
- Abbildung 54: Wachstum der PC-3-Zellen abhängig von IC_{50} der ersten Substanz mit steigenden Konzentrationen der zweiten Substanz
- Abbildung 55: Isobologramm der PC-3-Zelllinie für Estramustinphosphat und Topotecan
- Abbildung 56: Induktion von Apoptose durch Monotherapie und Kombinationstherapie mittels Docetaxel und Topotecan bei Messung mit Annexin-Färbung
- Abbildung 57: Induktion von Apoptose durch Monotherapie und Kombinationstherapie mittels Docetaxel und Topotecan bei Messung mit PI-Markierung
- Abbildung 58: Induktion von Apoptose durch Monotherapie und Kombinationstherapie mittels Docetaxel und Topotecan bei Messung mit M30-Antikörper-nachweis
- Abbildung 59: Gegenüberstellung der einzelnen Apoptosenachweise bei der Zelllinie LNCaP
- Abbildung 60: Gegenüberstellung der einzelnen Apoptosenachweise bei der Zelllinie DU-145
- Abbildung 61: Gegenüberstellung der einzelnen Apoptosenachweise bei der Zelllinie PC-3

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Studien bei Einsatz von Docetaxel, Paclitaxel, Mitoxantrone, Cyclophosphamid, Estramustine, Doxorubicin und Epirubicin
- Tabelle 2: Zulassungsstudien zum Einsatz von Docetaxel
- Tabelle 3: Studien zur Kombinationstherapie Mitoxantron und Steroide
- Tabelle 4: Studien zum Einsatz von Docetaxel (D), niedrigdosiertem Docetaxel (D_{\downarrow}), Estramustinphosphat (E) und Prednison (P)
- Tabelle 5: Studie zum Einsatz von Etoposid kombiniert mit Estramustinphosphat beim Prostatakarzinom
- Tabelle 6: Unterschiede der Nekrose und Apoptose
- Tabelle 7: Eigenschaften der verwendeten Lösungen
- Tabelle 8: Geräte und Verbrauchsmaterial
- Tabelle 9: %Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Etoposid bzw. Topotecan
- Tabelle 10: gemittelte relative IC_{50} -Werte für TPT bzw. Eto in Abhängigkeit von Eto und TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte
- Tabelle 11: %Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Docetaxel bzw. Topotecan
- Tabelle 12: gemittelte relative IC_{50} -Werte für TPT bzw. TXT in Abhängigkeit von TXT bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte
- Tabelle 13: %Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Estramustinphosphat bzw. Topotecan
- Tabelle 14: gemittelte relative IC_{50} -Werte für TPT bzw. EMP in Abhängigkeit von EMP bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte
- Tabelle 15: %Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Etoposid bzw. Topotecan
- Tabelle 16: gemittelte relative IC_{50} -Werte für TPT bzw. Eto in Abhängigkeit von Etoposid bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte
- Tabelle 17: %Überleben vorgelegter IC_{50} -Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Docetaxel bzw. Topotecan
- Tabelle 18: gemittelte relative IC_{50} -Werte für TPT bzw. TXT in Abhängigkeit von TXT bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte

- Tabelle 19: %Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von EMP bzw. Topotecan
- Tabelle 20: gemittelte relative IC₅₀-Werte für TPT bzw. EMP in Abhängigkeit von EMP bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte
- Tabelle 21: %Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Etoposid bzw. Topotecan
- Tabelle 22: gemittelte relative IC₅₀-Werte für TPT bzw. Eto in Abhängigkeit von Etoposid bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte
- Tabelle 23: %Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Docetaxel bzw. Topotecan
- Tabelle 24: gemittelte relative IC₅₀-Werte für TPT bzw. TXT in Abhängigkeit von TXT bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte
- Tabelle 25: %Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentration der Kombinationssubstanz, abhängig von Estramutinphosphat bzw. Topotecan
- Tabelle 26: gemittelte relative IC₅₀-Werte für TPT bzw. EMP in Abhängigkeit von EMP bzw. TPT und Mittelwerte aller Datenpunkte
- Tabelle 27: %Überleben vorgelegter IC₅₀-Konzentrationen der Kombinationssubstanzen
- Tabelle 28: Zusammenfassung der Kombinationstherapien
- Tabelle 29: Induktion von Apoptose durch Docetaxel und Topotecan und deren Kombination bei Messung mittels Annexin-Färbung
- Tabelle 30: Induktion von Apoptose durch Docetaxel und Topotecan und deren Kombination bei Messung mittels PI-Markierung
- Tabelle 31: Induktion von Apoptose durch Docetaxel und Topotecan und deren Kombination bei Messung mittels M30-Antikörpernachweis

9 Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit zur Promotion möchte ich mich bei Prof. Dr. R. Hartung, Prof. Dr. J. Gschwend, PD Dr. H. van Randenborgh und Dr. H. Kübler bedanken. Insbesondere PD Dr. H. van Randenborgh hat mir bei der Betreuung und Korrektur dieser Arbeit sehr geholfen und mir bei Fragen zur Seite gestanden.

Mein Dank gilt besonders Frau Dr. rer. nat. Lehmer für Ihre ununterbrochene Hilfestellung und freundliche Beratung sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch beim Schreiben dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern des Urologischen Forschungslabors des Klinikums Rechts der Isar, Frau Doris Langer und Frau Stephanie Rämisch, danke ich sehr für die Einarbeitung in die wissenschaftliche Laborarbeit, für Ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und für das freundliche und offene Arbeitsklima.

Schließlich möchte ich noch meiner Familie danken, ohne die das ganze Stadium nie möglich gewesen wäre. Insbesondere mein Bruder Christian und seine Frau Johanna haben die Arbeit Korrektur gelesen und mich bei der Erstellung sehr unterstützt.

10 Lebenslauf

Name: Meike Brigitte Anne-Rose Adam
Geboren: 01.04.1981 in Bamberg
Anschrift: Eppendorfer Landstrasse 111, 20251 Hamburg

Schulbildung

1987 – 1991 Grundschule, Bamberg
1991 – 2000 Kaiser-Heinrich-Gymnasium, Bamberg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

April 2001 – März 2003 Humanmedizin (Vorklinik) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
April 2003 – Oktober 2007 Humanmedizin (Klinik) an der Technischen Universität München
Oktober 2007 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen

September 2003 Juraklinik Scheßlitz
Abteilung für Innere Medizin
August 2004 Klinikum Rechts der Isar, München
Urologische Klinik
März 2004 Southmead Hospital, Bristol
Urologische Klinik
September 2005 Klinikum Rechts der Isar, München
Institut für Allgemeine Pathologie

Praktisches Jahr

Oktober 2006 – Januar 2007 Universitätsspital Zürich
Urologische Klinik
Juni 2006 – Oktober 2006 Centre Hospitalier Universitaire Vaudois Lausanne
Chirurgische Klinik
Mai 2006 – Juni 2006 Klinikum Rechts der Isar, München
III. Medizinische Klinik (Hämato-Onkologie)
April 2006 – Mai 2006 Klinikum Rechts der Isar, München
I. Medizinische Klinik (Kardiologie)

Beruflicher Werdegang

Seit Januar 2008 Assistenzärztin an der Urologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf