

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

**Modulation der Invasionsfähigkeit humaner Prostatakarzinomzelllinien
durch Retinoide**

Petra Limmer

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. U. R. Treiber
2. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 23.02.2006 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.06.2006
angenommen.

Gewidmet in Dankbarkeit
meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Die Prostata	3
2.2.	Das Prostatakarzinom	5
2.2.1.	Inzidenz und Ätiologie des Prostatakarzinoms	5
2.2.2.	Karzinogenese des Prostatakarzinoms	6
2.2.3.	Pathologie	7
2.2.4.	Diagnostik	10
2.2.5.	Therapie	13
2.3.	Retinoide	17
2.3.1.	Isotretinoin (13cRA)	25
2.3.2.	Fenretinid (4-HPR)	26
2.4.	Zellmotilität und Metastasierung	27
2.4.1.	Metastasierungsprozess	28
2.4.2.	Zellmotilität beim Prostatakarzinom	29
2.5.	Zielsetzung	31
3.	Material und Methoden	32
3.1.	Zelllinien	32
3.2.	Zellkultivierung	33
3.3.	Materialien	36
3.4.	Versuchsdurchführung	37
3.4.1.	Vorinkubation der Tumorzellen mit Retinoiden	37
3.4.2.	Modulation der Tumorzellinvasionsfähigkeit	38
3.4.3.	Elektronenmikroskopie	43
3.5.	Statistik	44

4.	Ergebnisse	45
4.1.	Ermittlung der optimalen Zellzahl pro Well und Dauer des Invasionsassays	45
4.2.	Modulation der Invasionsfähigkeit durch Retinoide in den Zelllinien DU145 und PC3	48
4.3.	Fotodokumentation	56
5.	Diskussion	68
6.	Zusammenfassung	72
7.	Tabellenverzeichnis	75
8.	Abbildungsverzeichnis	76
9.	Literaturverzeichnis	79
10.	Danksagung	89

1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

13cRA	13-cis-Retinsäure (Isotretinoin, Roaccutan®)
4-HPR	4-Hydroxyphenylretinamid (Fenretinid)
5-FU	5-Fluorouracil
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
95%-KI-O	Obergrenze des 95%-Konfidenzintervalls
95%-KI-U	Untergrenze des 95%-Konfidenzintervalls
95%-KW	95%-Konfidenzwert
9cRA	9-cis-Retinsäure
A.	Arteria
AP	alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator Protein 1
ATCC	American Type Culture Collection
ATRA	all-trans-Retinsäure (Tretinoin, Vesanoid®)
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CT	Computertomografie
Da	Dalton
DFMO	Difluor-Mehtylornithin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DRU	Digital-rektale Untersuchung
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EIA	Enzym-Immuno-Assay
FKS	Fetales Kälberserum
GOT	Glutamatoxalacetattransaminase
GPT	Glutamatpyruvattransaminase
HRPC	hormonrefraktäres Prostatakarzinom
IC50	Konzentration bei halbmaximaler Hemmung der Invasionsfähigkeit
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1

KG	Körpergewicht
LHRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing-Hormon
MRT	Magnetresonanztomografie
MV	Mittelwert
NSCLC	non small cellular lung cancer
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Polyethylenterephthalat
po	per os
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RAR	Retinsäure-Rezeptor
REM	Raster-Elektronenmikroskop
RPE	radikale Prostatovesikulektomie
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
RXRE	Retinoid-X-Rezeptor response element
sc	subkutan
STH	Somatotrophes Hormon
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
ÜLR	Überlebensrate
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

2. Einleitung

2.1. Die Prostata

Die Prostata ist ein muskel- und bindegewebereicher Drüsenkörper. Sie weist die Form eines Konus auf und ist im jungen Erwachsenenalter etwa 20-25 g schwer. Zwischen Symphyse und Rektum gelegen, ist die Basis prostatae dem Blasen Hals und der Apex prostatae dem Diaphragma urogenitale zugewandt (Brooks 1998). Dabei umgreift sie auf einer Länge von ca. 3,5 cm ringförmig die Harnröhre (Abbildung 1).

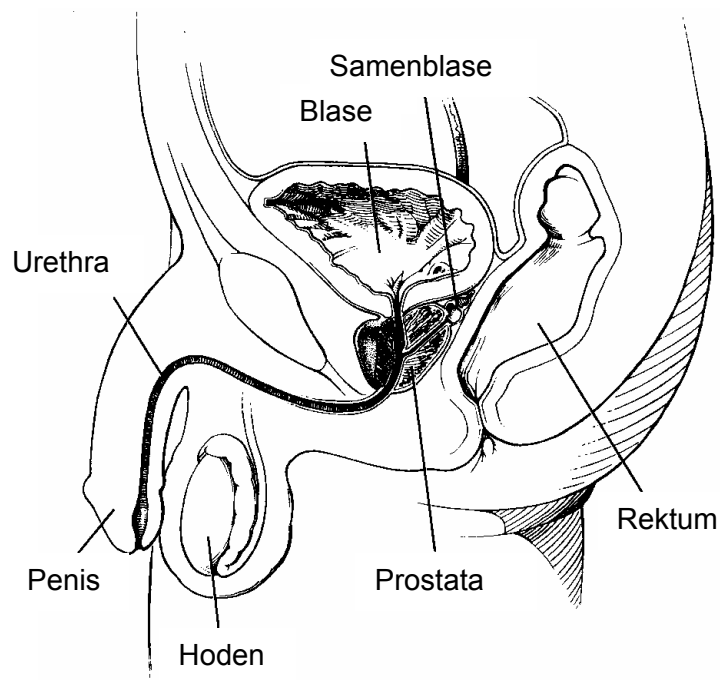


Abbildung 1: Lage der Prostata in anatomischer Darstellung (Salowe 1997)

Die zonale Unterteilung der Prostata nach McNeal (Abbildung 2) bezieht funktionelle und klinische Aspekte mit ein und unterscheidet vier anatomische Regionen (Brooks 1998). Die beiden peripheren Zonen weisen mit 70% den größten Volumenanteil der Drüse auf. Die zentrale Zone, welche die beiden Ductus ejaculatorii umgibt, beinhaltet etwa 25% des Organvolumens. Die transitionale Zone besteht aus Drüsen nahe dem Colliculus seminalis und hat einen Volumenanteil von etwa 5% des

Gesamtgewichtes. Aus diesen Drüsen entwickelt sich die benigne Prostatahyperplasie, das „Prostata-Adenom“.

Das Prostatakarzinom ist in den Zonen sehr unterschiedlich häufig nachweisbar:

- in der peripheren Zone zu 70-90%
- in der zentralen Zone zu 1-5%
- in der Übergangszone (transitionale Zone) zu 20%.

Im ventralen Bereich der Prostata findet sich eine fast drüsenfreie Gewebeschicht, welche als anteriores fibromuskuläres Stroma bezeichnet wird.

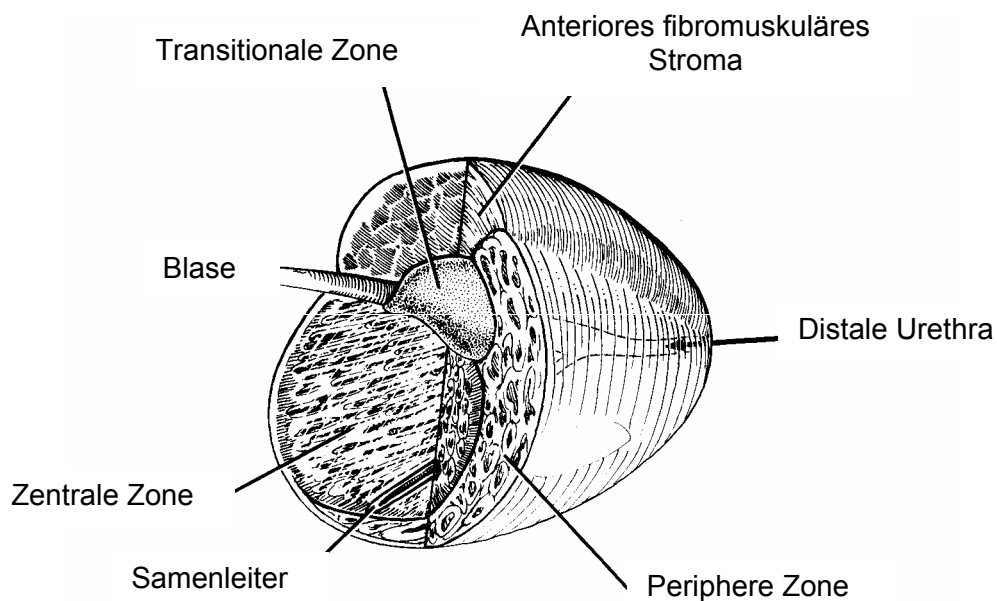


Abbildung 2: Zonale Anatomie der Prostata (Salowe 1997)

Der Drüsenkörper der Prostata besteht aus 30-40 tubuloalveolären Drüsen, die in Bindegewebe und glatte Muskulatur eingelagert sind. Diese Drüsen münden in der Nähe des Samenhügels in die Harnröhre ein. Das von den Drüsenzellen der Prostata produzierte Sekret ist milchig und dünnflüssig. Bei der Ejakulation wird es durch die Prostata Muskulatur über die Drüsenausführungsgänge in die Harnröhre gepresst. Es enthält unter anderem große Mengen an Spermin und Spermidin, was zur Erhöhung der Motilität und Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen beiträgt.

Die Blutversorgung der Prostata erfolgt hauptsächlich über die A. vesicalis inferior und in geringem Umfang über Äste der A. rectalis media. Der Blutabfluss erfolgt über den ausgeprägten Plexus venosus vesicoprostaticus (Santorini). Dieser nimmt

unterhalb der Symphyse die unpaare V. dorsalis penis auf und anastomosiert mit den Vv. obturatoriae und über die Vv. rectales mediae mit dem Plexus venosus rectalis. Der Abfluss erfolgt über die V. iliaca interna in die V. cava inferior und über die V. rectalis superior in die Pfortader.

Der Lymphabfluss erfolgt über die regionären Lymphknoten, hauptsächlich um die V. iliaca interna und des Obturatoriusgebietes, sowie in geringerem Umfang um die V. iliaca externa und dem präsakralen Gebiet. Daher finden sich zunächst tumorbefallene Lymphknoten im Obturatoriusgebiet, dann im Bereich der A. iliaca interna und externa bzw. communis (Walsh 1986). Erst in fortgeschritteneren Stadien des Prostatakarzinoms werden retroperitoneale Lymphknoten-Metastasen gefunden.

2.2. Das Prostatakarzinom

2.2.1. Inzidenz und Ätiologie des Prostatakarzinoms

In Deutschland ist das Prostatakarzinom das zweithäufigste Karzinom sowie die zweithäufigste Krebstodesursache des Mannes (Golz 1999). Die Inzidenz des Prostatakarzinoms stieg in den Jahren 1991-1995 in Deutschland von etwa 16000 auf etwa 20000 neu erkrankte Männer (Altwein 2001a). Zwischen 1990 und 1994 stieg die Mortalitätsrate in Deutschland von 10500 auf 11700 pro Jahr. Aber nur etwa ein Drittel aller an einem Prostatakarzinom erkrankten Patienten sterben daran. Die Prävalenz dieses Karzinoms ist mit durchschnittlich 38% aller Verstorbenen mit vermeintlich unauffälliger Prostata relativ hoch und weist eine positive Korrelation mit dem Lebensalter auf (Altwein 2001a). So finden sich bei der Autopsie in der Altersgruppe 40-44 Jahre nur 3% Prostatakarzinome, während in der Altersgruppe 80-84 Jahre die Prävalenz 59% beträgt und in der Altergruppe > 85 Jahre mit 72% das Maximum erreicht wird.

Für die Entstehung des Prostatakarzinoms werden verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht. Endogene Risikofaktoren sind das hohe Lebensalter des Mannes (Pienta 1998) sowie eine positive Familienanamnese bezüglich des Prostatakarzinoms (Pienta 1998, Altwein 2001a, Breul 2001). Auch die Zugehörigkeit zu bestimmten ethnischen Gruppen erhöht das Karzinomrisiko. So ist die Inzidenz

bei schwarzen Amerikanern 90/100.000, bei weißen Amerikanern und Nordwesteuropäern 40-60/100.000 und bei Asiaten 2-10/100.000 Männern pro Jahr (Golz 1999). Neben diesen endogenen Risikofaktoren für das Prostatakarzinom existieren mögliche exogene Risikofaktoren. So ließ sich in epidemiologischen Studien eine erhöhte Inzidenz von Prostatakarzinomen bei einer fettreichen und faserarmen Kost nachweisen (Pienta 1998, Golz 1999, Altwein 2001a). Neben dem Gesamtfettgehalt der Nahrung erhöht insbesondere ein hoher Anteil an gesättigten Fettsäuren das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken. Umgekehrt senkt faserreiche Kost das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken. Dabei spielt möglicherweise der veränderte Stoffwechsel der Sexualhormone, insbesondere des Testosterons, eine Rolle. Ferner wird eine erhöhte Cadmiumexposition überwiegend mit einem leicht erhöhten Prostatakarzinomrisiko in Verbindung gebracht. Auch finden sich Hinweise auf eine erhöhte Karzinominzidenz bei verminderter Aufnahme von Vitamin A, Retinol und β -Karotin sowie bei einer verminderten Synthese von Vitamin D₃.

2.2.2. Karzinogenese des Prostatakarzinoms

Hinsichtlich Karzinogenese und Progredienz des Prostatakarzinoms wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Die Einzelvorgänge der Tumorentstehung sind derzeit nur teilweise bekannt (Carter 1990, Brewster 1998, Pienta 1998, Breul 2001). Voraussetzung ist jedoch die Änderung der Chromosomenstruktur durch die Mutation der DNS. Dies beinhaltet autosomal dominante Keimzellmutationen und chromosomale Deletionen mit Verlust möglicher Tumor- und Metastasen-Suppressorgene auf den Chromosomen. Der Einfluss von Wachstumsfaktoren hinsichtlich Proliferation, Differenzierung und Invasivität spielt eine Rolle, genauso wie die Hypermethylierung der Promotorregion des Gluthation-S-Transferase- π -Gens (GSTP 1) und die veränderte Expression von Onkogenen. Außerdem kann es zu Veränderungen des Androgenrezeptors kommen oder zu einer Veränderung des Potentials hinsichtlich Apoptose und Angiogenese.

In den normalen glandulären Epithelzellen der Prostata findet ein relativ niedriger Zellumsatz, als Verhältnis von proliferierenden und sterbenden Zellen, statt (Pienta 1998). Die epithelialen Zellen werden dabei alle 500 Tage erneuert. Eine Erhöhung

des Zellumsatzes mit möglichen Transformationen dieser Zellen kann zu einer Vorstufe des Prostatakarzinoms führen. Die Abnahme der Absterberate derartig transformierter Zellen und weitere karzinogenetische Zellveränderungen bewirken ein Netto-Wachstum des entstandenen Karzinoms. Dabei werden Zellverdopplungszeiten von 33-126 Tagen angegeben.

2.2.3. Pathologie

Mit einem Anteil von 90-95% stellen gewöhnliche Adeno-Karzinome den Hauptanteil aller Prostatakarzinome dar. Selten (in 5-10% der Fälle) finden sich ungewöhnliche Karzinome (Golz 1999). Diese Adeno-Karzinome können aus mehr oder weniger stark vom normalen Prostatagewebe abweichenden Zellen bestehen. Ein gut differenziertes Adeno-Karzinom weist deutlich ausgebildete Drüsen auf. Es hat in der Regel eine bessere Prognose als das niedrig differenzierte Karzinom, das nur wenig oder überhaupt keine Drüsenstruktur zeigt.

Grading des Prostatakarzinoms

Die Bestimmung des Malignitätsgrades, das Grading, hat zum Ziel aus der Struktur der Karzinome einen reproduzierbaren prognostischen Parameter zu entwickeln. Das am häufigsten international angewandte System ist die von Gleason 1966 (Gleason 1966, Gleason 1992) entwickelte Einteilung anhand der Wachstumsmuster (Abbildung 3) innerhalb eines Karzinoms. Dabei finden die zytologischen Malignitätskriterien jedoch keine Beachtung. Die beiden vorherrschenden Wachstumsformen (Muster 1-5) werden mit einer Zahl von 1-5 bewertet und nachfolgend addiert. Es entsteht ein Score von 2-10.

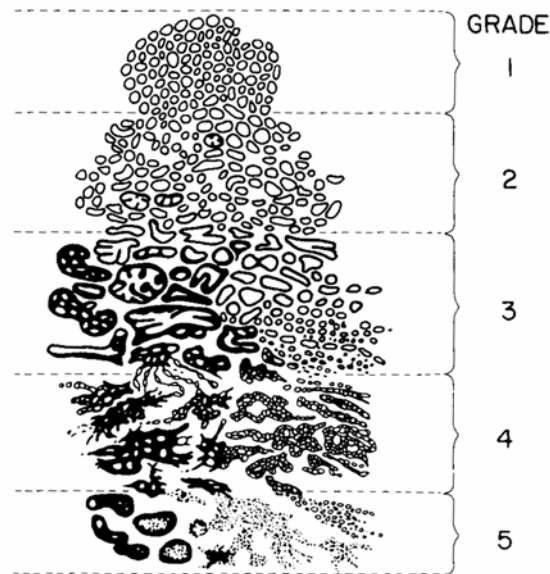


Abbildung 3: Einteilung der Wachstumsmuster beim Gleason-Score (Gleason 1977)

Um dieses Schema statistisch besser anwenden zu können, wurden die Scores zusammengefasst und einem bestimmten Differenzierungsgrad zugeordnet (sog. „komprimiertes Gleason-Grading“ nach Epstein 1996). Der Gleason-Score von 2-4 entspricht demnach einem hoch differenziertem Karzinom Grad 1. Der Score 5-6 wird einem mäßig differenzierten Karzinom des Grades 2 zugeordnet und ein Gleason-Score von 7-10 bezeichnet ein niedrig differenziertes Karzinom (Grad 3) (Sobin 2002).

In Deutschland erfolgt das Grading ferner nach der WHO-Klassifikation oder nach der Einteilung des „Pathologisch-urologischen Arbeitskreis Prostatakarzinom“ (Miller 1999). Dabei werden neben den Wachstumsformen der Karzinome auch Veränderungen des Zellkerns berücksichtigt:

- Grad 1: hochdifferenziertes glanduläres Karzinom mit geringen Kernatypien
- Grad 2: wenig differenziertes glanduläres Karzinom mit mäßiggradigen Kernatypien
- Grad 3: keine Drüsenstruktur mehr, ausgeprägte Kernaplasie

Staging

Neben dem Grading des Tumors sind aber auch dessen Ausbreitung im Organ, die Infiltration der Samenblasen und der metastatische Befall der regionalen Lymphknoten für Therapieentscheidung und Prognose wichtig. In Europa wird für das Staging das TNM-Schema verwendet (Tabelle 1).

T: Primärtumor	
pT0	Kein Primärtumor nachweisbar
pT1	Inzidentes Karzinom
pT1a	Inzidentes Karzinom in ≤ 5 % des Gewebes
pT1b	Inzidentes Karzinom in > 5 % des Gewebes
pT1c	Tumor durch Biopsie nachgewiesen
pT2	Tumor auf die Prostata begrenzt
pT2a	Tumor in ≤ 50 % eines Lappens
pT2b	Tumor in > 50 % eines Lappens
pT2c	Tumor in beiden Lappen
pT3	Tumor dehnt sich über die Prostatakapsel aus
pT3a	uni- oder bilaterale extrakapsuläre Ausdehnung
pT3b	Tumor infiltriert die Samenblase/n
pT4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen außer den Samenblasen
N: regionäre Lymphknoten	
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	regionäre Lymphknotenmetastasen
M: Fernmetastasen	
pM0	keine Fernmetastasen
pM1	Fermetastasen vorhanden
pM1a	nichtregionäre Lymphknotenmetastasen
pM1b	Knochenmetastasen
pM1c	Fernmetastasen anderer Lokalisation

Tabelle 1: Die TNM-Klassifikation des Adenokarzinoms der Prostata (Sobin 2002)

2.2.4. Diagnostik

In den Frühstadien verläuft das klinische Erscheinungsbild des Prostatakarzinoms meist symptomlos. Miktionsstörungen, Hämaturie, sowie Symptome einer Ureterobstruktion mit Harnstauungsniere treten oft erst bei fortschreitendem Tumorwachstum auf (Jurincic-Winkler 1991).

Das Ziel der Diagnoseverfahren sollte sein, Karzinome der Prostata im organbegrenzten Stadium zu erfassen, um dann ein kuratives Therapiekonzept anwenden zu können.

Digital-rektale Untersuchung (DRU)

Die DRU stellt eine Basismaßnahme im Rahmen der Prostatadiagnostik dar. Sie ist ein einfaches, schonendes und kostengünstiges Untersuchungsverfahren, trotzdem kann die Drüse mit erstaunlicher Genauigkeit beurteilt werden. In der Regel sind nur die Karzinome der peripheren Zone der Prostata, in der aber 70-80% aller Karzinome vorkommen, tastbar (Breul 1999, Altwein 2001a). Tumoren in der Prostata sind erst ab einer Größe von 7 mm palpabel (Breul 1999). Die DRU sollte immer zusammen mit der Bestimmung des PSA-Wertes erfolgen, da etwa 25-35% der Patienten mit einem Prostatakarzinom ein unauffälliges PSA (< 4 ng/ml) aufweisen (Carter 1998, Wirth 1999). Um gutartige von bösartigen Erkrankungen der Prostata abzugrenzen ist eine biopsische Klärung bei auffälligem, d.h. suspektem, Tastbefund obligat (Bartels 1992).

Prostata-spezifisches Antigen (PSA)

Beim PSA handelt es sich um ein Glykoprotein, das von den Drüsenzellen der Prostata produziert sowie sezerniert wird. Es dient der Verflüssigung des Ejakulats. PSA ist nicht tumorspezifisch, sondern organspezifischer Bestandteil des Seminalplasmas, der im Serum gemessen werden kann. Die Konzentration im Seminalplasma beträgt 0,3-3 mg/ml, während der Normwert im Serum nicht an Prostatakarzinom erkrankter Männer < 4 ng/ml beträgt (Altwein 2001a).

PSA wird von normalen, hyperplastischen und neoplastischen Prostataepithelien produziert. Tumorzellen produzieren im Vergleich zu normalen Epithelzellen etwa die 10-fache Menge an PSA, so dass bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms > 10-fach höhere Serumwerte erreicht werden (Altwein 2001a).

Das PSA existiert in verschiedenen molekularen Formen (Lein 2000). Etwa 10-30% des gesamten PSA (tPSA) liegen im Serum als freies PSA (fPSA) vor. 70-90% des PSA sind im Serum an α 1-Antichymotrypsin (ACT-PSA), einem Serin-Protease-Inhibitor, gebunden und dadurch enzymatisch inaktiv. Ferner liegt PSA an α 2-Makroglobulin und andere Akute-Phase-Proteine gebunden vor. Der Verteilungsquotient kann Aufschluss über das Vorliegen eines Adenoms oder Karzinoms geben.

Die Karzinomspezifität des PSA kann außerdem durch die Bestimmung der PSA-Density erhöht werden. Dabei wird der PSA-Gehalt des Serums zum sonografisch bestimmten Prostatavolumen ins Verhältnis gesetzt (Babaian 1990, Veneziano 1990). Ein Wert von mehr als 0,15 ng/ml PSA pro cm³ Prostatagewebe weist in Richtung Prostatakarzinom (Benson 1992).

Der Anstieg des PSA-Wertes über einen längeren Zeitraum erfolgt beim Prostatakarzinom schneller als bei der benignen Prostatahyperplasie, da die Wachstumsgeschwindigkeit bei malignem Prostatagewebe in der Regel höher ist. Eine jährliche Zunahme von > 0,75 ng/ml weist auf ein Karzinom hin. Dieses Konzept der Verbesserung der PSA-Spezifität wird als PSA-Velocity bezeichnet und bedeutet die PSA-Erhöhung pro Zeiteinheit, gemessen in ng/ml/Jahr (Carter 1992).

PSA ist der wichtigste Tumormarker in der Diagnostik und der Überwachung des Prostatakarzinoms. Das PSA ist der Parameter in der Verlaufskontrolle nach lokalen Therapiemaßnahmen bzw. nach systemischer Therapie (Polascik 1998).

Zur Bestimmung des PSA-Werts im Serum stehen derzeit in Deutschland über 40 verschiedene Testsysteme zur Verfügung, deren Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar sind (Ebert 1997). Aus diesem Grund ist die Angabe des verwendeten Testsystems bei der Ergebnismitteilung des PSA-Wertes empfohlen (Ebert 1997, Altwein 2001a). Zur Verlaufskontrolle sollte immer dasselbe Testsystem verwendet werden.

Da bei 25-35% der betroffenen Patienten kein PSA-Anstieg zu messen ist, reicht der PSA-Wert als alleiniges Diagnoseverfahren nicht aus.

Transrektaler Ultraschall (TRUS)

Mittels speziell der Anatomie angepassten Ultraschallsonden (5-10 MHz) kann die Prostata einschließlich ihrer oben dargestellten zonalen Anatomie abgebildet werden (Villers 1990, Pflieger 1997, Breul 1999). Der transrektale Ultraschall wird im Rahmen der Diagnostik, bei der Biopsieentnahme und zur Therapie des Prostatakarzinoms bei der Implantation radioaktiver Seeds eingesetzt. Prostatakarzinome stellen sich in etwa 85% der Fälle als echoarme Areale dar (Brawer 1998). Da diese echoärmeren Aussparungen aber nicht karzinomspezifisch sind, kann mit Hilfe von Biopsien die definitive Diagnose gestellt werden. Hierfür gilt als Methode der Wahl die „Sextanten-Biopsie“ wobei aus mindestens sechs Regionen der Prostata Gewebe entnommen wird. Damit kommt von den bildgebenden Verfahren dem transrektalen Ultraschall die wesentliche klinische Bedeutung zu.

Computertomografie und Kernspintomografie

Computertomografie und Kernspintomografie sind auf Grund ungenügender Sensivität und Spezifität weder zur Erfassung bzw. Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms noch der Lymphknoten-Filiae geeignet (Breul 1999). Sie finden nur bei speziellen Fragestellungen (z.B. MRT bei Frage der Samenblaseninfiltration oder CT/MRT im Rahmen der Diagnostik bei Fernmetastasen) Anwendung.

Skelettszintigrafie

Nach den Lymphknoten ist das Skelettsystem der zweithäufigste Metastasierungsort des Prostatakarzinoms. Becken und Wirbelsäule, insbesondere deren lumbosakraler Abschnitt, sind die bevorzugten Metastasierungsorte (Golz 1999). Die Skelettszintigrafie ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Skelettfiliae mit eingeschränkter Spezifität. In bestimmten Fällen bedarf es der zusätzlichen Abklärung eines suspekten Herdes mittels konventioneller Röntgenaufnahmen und gegebenenfalls der Kernspintomografie (Weingärtner 1998, Breul 1999).

2.2.5. Therapie

Die Therapie des Prostatakarzinoms orientiert sich sowohl am Tumorstadium (lokal begrenztes Karzinom oder fortgeschrittene Erkrankung), dem Grading und auch am Allgemeinzustand des Patienten (Walther 1989).

Radikale Prostatovesikulektomie (RPE)

Die RPE stellt als kurative Therapie bei lokal begrenztem Karzinom und einer Lebenserwartung von mindestens 10 Jahren derzeit das operative Standardverfahren dar. Sie umfasst die Entfernung der gesamten Prostata einschließlich ihrer „chirurgischen“ Kapsel und den Samenblasen sowie Ampullen der Ductus deferentes und der pelvinen Lymphknoten. In Tabelle 2 sind die nach radikaler retropubischer Prostatovesikulektomie bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen beobachteten progressionsfreien Überlebensraten (Mittelwerte und Spannweiten) nach 5 bzw. 10 Jahren zusammengefasst (Eastham 1998, Steiner 1999).

Tumorstadium	ÜLR (%) 5 Jahre	ÜLR (%) 10 Jahre
pT1	92 (85-97)	(keine Angaben)
pT1-2	77 (69-83)	60 (47-78)
pT3	65 (60-70)	47 (37-56)

Tabelle 2: Progressionsfreie Überlebensrate (ÜLR) nach radikaler retropubischer Prostatektomie bei lokal begrenztem Prostatakarzinom (Eastham 1998, Steiner 1999)

Die RPE ist bei ausgewählten Patienten auch über einen perinealen Zugang durchführbar. Dieser Zugangsweg bietet gewisse Vorteile, wie einen geringeren Blutverlust, bessere Sicht bei der Naht der vesikourethralen Anastomose, kürzere Katheterliegezeiten und kürzere Hospitalisationszeiten (Steiner 1999).

Auch die laparoskopische Operationstechnik findet zunehmend bei der RPE Anwendung. Erfahrungen an größeren Zentren berichten über eine Reihe von Vorteilen für Patient und Operateur (Guillonneau 2000).

Strahlentherapie

Bei lokal begrenztem Prostatakarzinom kann auf Grund des biologischen Alters, der Begleitmorbidität oder der Ablehnung einer Operation durch den Patienten eine kurative Strahlentherapie als Alternative zur RPE durchgeführt werden. Neben dem Ausschluss von Fernmetastasen ist vor dem Beginn der Radiatio ein exaktes Lymphknotenstaging notwendig. In Abhängigkeit von der Tumorausdehnung kann die kumulative Gesamtdosis 60-72 Gy (Gray) betragen.

Tabelle 3 zeigt die rezidivfreien 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensraten bei konventioneller, perkutaner Bestrahlung (Feldmann 1999):

Tumorstadium	ÜLR (%) 5 Jahre	ÜLR (%) 10 Jahre
T1	80-100	65-95
T2	50-70	40-50
T3	38-70	14-50

Tabelle 3: Rezidivfreie Überlebensrate (ÜLR) nach konventioneller perkutaner Bestrahlung bei lokal begrenztem Prostatakarzinom (Feldmann 1999)

Ferner besteht die Möglichkeit permanente, strahlende „Seeds“ (z.B. 125 Jod) operativ in die Prostata einzubringen. Diese Bestrahlung aus unmittelbarer Nähe des Tumors wird als Brachytherapie bezeichnet. Das intrakavitäre Einbringen von strahlendem Material (z.B. 192 Iridium) nennt man Afterloadingtechnik. Die Hauptnebenwirkungen der Strahlentherapie sind die Impotenz (8%), Harnröhrenstrikturen (4,6%), Erkrankungen des Rektums wie Proktitis, Blutung und Stenosen (3,3%) und die Zystitis (2,6%).

Bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom ist eine palliative Therapie symptomatischer Skelettfiliae mittels lokaler Bestrahlung sowie systemischer Gabe von Radionukliden (Strontium, Rhenium, Samarium) möglich (Porter 1998, Schnorr 1999).

Androgenentzug

Das primär metastasierte und das nach initial kurativer Behandlung progrediente Prostatakarzinom stellen Indikationen zu einer systemischen Therapie dar. Huggins und Mitarbeiter beschrieben 1941 den hemmenden Effekt einer kontrasexuellen

Behandlung auf das Wachstum von Prostatakarzinomen (Huggins 1941). Als palliative Therapieoption findet zunächst der Androgenentzug breite Anwendung. Durch operative Kastration (bilaterale Orchiektomie) bzw. durch medikamentöse Kastration (steroidale und nichtsteroidale Antiandrogene, LHRH-Analoga) kann die Hormontherapie sofort, verzögert oder intermittierend zum Einsatz kommen (Schröder 1998, Schnorr 1999, Altwein 2001b). Nach etwa 2-4 Monaten fällt bei erfolgreicher Behandlung der PSA-Wert auf ein Minimum ab. Dieser Abfall hält jedoch maximal 18-24 Monate an, da auf Grund der Heterogenität des Tumors lediglich die androgenabhängigen Zellklone zum Absterben gebracht werden. Die androgensensitiven Klone werden in ihrer Proliferation gestoppt und die androgenresistenten Zellen werden überhaupt nicht beeinflusst (Isaacs 1987). Ein erneuter Anstieg des PSA geht der symptomatischen Progression um etwa 6 Monate voraus (Eisenberger 1998, Schnorr 1999). Derzeit gibt es keine eindeutigen Daten, ob und inwiefern durch eine Hormontherapie ein relevanter Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens der Patienten in diesem Krankheitsstadium erreicht wird (Schröder 1998, Altwein 2001b).

Bei einem Progress unter Androgenablation besteht als nächste Therapieoption das Absetzen des Antiandrogens und anderer Steroide, um das so genannte „Antiandrogen- (bzw. endokrines) Entzugssyndrom“ zu nutzen. Etwa 35% der Patienten reagieren hierbei nach 4-7 Wochen mit einem PSA-Abfall um 50%, welcher über einen Zeitraum von 3-14 Monaten anhält (Rübben 2001). Bei weiterem Progress kann eine sekundäre Hormonmanipulation bei 34% der Patienten einen PSA-Abfall um 50% über eine mittlere Dauer von etwa 4 Monaten bewirken (Small 1999).

Chemotherapie

Bei Patienten, die nach Hormontherapie einen Progress ihrer Erkrankung aufweisen oder auf eine Hormontherapie nicht ansprechen, kann eine palliative Chemotherapie erfolgen. Allerdings sind die Möglichkeiten der Chemotherapie des Prostatakarzinoms auf Grund der Tumorbiologie sowie alters- und tumorbedingter Einschränkungen der Organfunktionen der Patienten limitiert (Rübben 2001).

Die Auswertung der Ansprechraten verschiedener Einzelsubstanzen im Rahmen der Chemotherapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms in den Jahren 1961-1986 ergab in 25 nicht randomisierten Studien eine mittlere Ansprechrate (komplette und partielle Remission) von 15,8% (0-37%); während diese in 8 randomisierten Studien bei 8,7% (2-22%) lag (Rübben 2001).

Eine Auswertung der Ansprechraten kombinierter Chemotherapien (2-4 Substanzen, darunter: Cisplatin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Epirubicin, Etoposid, Estramustinphosphat, 5-Fluorouracil, Hydrocortison, Ketoconazol, Suramin, Taxane, Vinblastin) im Rahmen von Studien in den Jahren 1992-2000 ergab ein mittleres Ansprechen (komplette und partielle Remission) von 37,5% (14-52%), einen Abfall des PSA-Werts um $\geq 50\%$ bei im Mittel 43,6% (17-60%) der Patienten und eine mittlere Überlebenszeit von etwa 12 (8-23) Monaten (Heidenreich 2001).

Insgesamt bleibt zu beachten, dass Kombinationstherapien gegenüber den Monotherapien nur in einzelnen Studien höhere Ansprechraten erbrachten. Hinsichtlich der Überlebenszeit fanden sich bislang keine eindeutigen Hinweise auf eine Überlegenheit der Kombinationstherapien (Rübben 2001). Allerdings ergaben Phase I und II-Studien der Kombinationen Estramustinphosphat und Paclitaxel bzw. Docetaxel Hinweise auf verlängerte Überlebenszeiten (Petrylak 1999, Vogelzang 1999). In zwei aktuellen Phase III-Studien konnte erstmals gezeigt werden, dass unter Einsatz von Docetaxel als Monosubstanz bzw. in Kombination mit Estramustinphosphat das Gesamtüberleben der Patienten um 1,9 bzw. 2,4 Monate signifikant verlängert werden konnte (Petrylak 2004, Tannock 2004).

Da die Chemotherapie einen palliativen Charakter hat, sollten folgende Ziele vorrangig angestrebt werden:

- Ambulante Behandlung
- Orale Therapie
- Verbesserung der Lebensqualität durch:
 - Schmerzreduktion
 - Verbesserung des Allgemeinzustandes

2.3. Retinoide

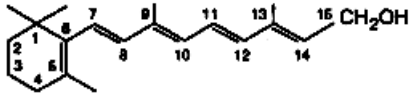
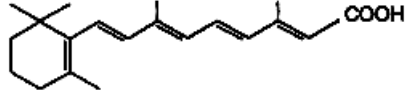
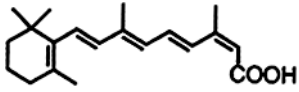
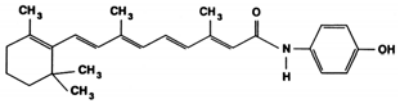
Retinoide sind synthetische und natürliche Derivate des Vitamin A, dem Retinol (Smith 1992, Kiemle-Kallee 1993). Sie stellen essentielle Faktoren für die Wachstumsmodulation und Differenzierung von Zellen *in vitro* und *in vivo* dar (Lotan 1993). In lebenden Organismen regulieren sie eine Vielzahl komplexer biologischer Systeme. Hierzu zählen u. a. die Regulation von Reproduktion, Morphogenese und Hämatopoese sowie der Sehfunktion und des Immunsystems. Bereits 1925 wurde im Tiermodell eine erhöhte Inzidenz von Plattenepithelmetaplasien nachgewiesen, nachdem experimentell ein Vitamin A-Mangel erzeugt wurde (Wollbach 1925). Seither untersuchten eine Vielzahl von Arbeitsgruppen die Effekte von über 2500 synthetischen und natürlichen Retinoiden bei hämatologischen und soliden Tumoren *in vitro*, *in vivo* sowie im Rahmen klinischer Studien (IARC 1999).

Am häufigsten wurden bislang neben dem Vitamin A (all-trans-Retinol) die all-trans-Retinsäure (Tretinoin, ATRA), 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin, 13cRA) und 4-Hydroxyphenylretinamid (4-HPR) untersucht (IARC 1998, IARC 1999). Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung von chemischen Struktur, Substanz- und Handelsnamen dieser Retinoide.

Physiologie des Retinoidstoffwechsels

Retinoide sind in tierischen Quellen in Form von Retinylestern und in vegetarischen Quellen als β -Carotin enthalten (Wolf 1984). Sie werden im Dünndarm resorbiert. Retinylester werden im Darmlumen zu Retinol hydrolysiert während Carotinoide intrazellulär zu Retinol gespalten werden (Blomhoff 1990, Rigrtrup 1992). In den Enterozyten wird Retinol sofort an das zelluläre Retinolbindungsprotein Typ II (CRBP II) gebunden und mit langkettigen Fettsäuren revereestert. Die dadurch entstandenen Retinylester werden in Chylomikronen eingebaut und über den Lymph- und Blutweg zur Leber transportiert (Ong 1987). In der Leber haben Lipozyten (Sternzellen, Ito cells) hinsichtlich des Retinols ausschließlich Speicherfunktion. Hepatozyten haben die Aufgabe der Aufnahme, des Metabolismus und der Wiederabgabe des Retinols an das Blutplasma (Blaner 1985). Die Retinolplasmakonzentration von etwa 2 μ M ist unabhängig von den Schwankungen der täglichen Aufnahme an Vitamin A.

Retinoide werden nach Hydroxilierung und Glucuronierung biliär eliminiert, wobei etwa 30% der biliär ausgeschiedenen Retinoide einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen (Blomhoff 1990, Blaner 1994).

Strukturformel	Substanzname (INN)	Handelsname
	Retinol	Vitamin A
	All-trans-Retinsäure (Tretinoin, ATRA)	Vesanoid®
	13-cis-Retinsäure (Isotretinoin, 13cRA)	Roaccutan®
	N-(4-Hydroxyphenyl)-retinamid (4-HPR)	Fenretinid*

* in Deutschland nicht im Handel

Tabelle 4: Strukturformeln häufig untersuchter Retinoide

Signaltransduktion

Retinoide sind hydrophobe Moleküle und werden durch die Bindung an spezifische Proteine transportiert. Für den Transport im Blut steht für Retinol das Retinolbindungsprotein (RBP) und für ATRA das Albumin zur Verfügung. Auf zellulärer Ebene lassen sich die Proteine in zytoplasmatische und nukleäre Bindungsproteine unterteilen.

An zytoplasmatischen Bindungsproteinen finden sich die „cellular retinol-binding proteins“ (CRBP I und II) sowie „cellular retinoic acid-binding proteins“ (CRABP I und

II). Deren Aufgaben bestehen im Transport von Retinol und dessen Derivaten zum Zellkern sowie in der Sequestrierung, Metabolisierung und damit Inaktivierung von Retinoiden bereits im Zytoplasma (Ong 1994).

Die biologische Wirkung von Retinoiden wird über Rezeptoren vermittelt. Diese gehören zur Superfamilie ligandeninduzierbarer Transkriptionsfaktoren (Pemrick 1994). Sie vermitteln unter anderem die Wirkung von Steroiden, Vitamin D und Thyroidhormonen. Bislang wurden zwei Arten von nukleären Retinoidrezeptoren identifiziert, die Retinsäure-Rezeptoren (RAR) und die Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) (Lotan 1991, Mangelsdorf 1994). Für jede dieser Rezeptorarten wurden drei Subtypen (α , β , γ) definiert (Lotan 1991, De Luca 1991, Pfahl 1993a, Pfahl 1994). In Abhängigkeit vom Entwicklungszustand des jeweiligen Organismus weisen die verschiedenen Isoformen eine gewebespezifische Verteilung auf (Smith 1992).

Die intrazelluläre Konzentration an Liganden (Retinoide) und Rezeptoren (RAR, RXR) bestimmt die Bildung von Rezeptor-Homodimere bzw. Rezeptor-Heterodimere, welche mit unterschiedlicher Affinität an spezifische Regionen der DNS (RARE: retinoid acid response elements oder RXRE) gebunden werden (Pemrick 1994, Pfahl 1994).

Die Fähigkeit von RXR zur Bildung von Heterodimeren mit einer Vielzahl anderer nukleärer Rezeptoren wie z.B. dem Thyroidrezeptor, Vitamin D-Rezeptor und Androgenrezeptor, erlaubt eine Beeinflussung der biologischen Wirkung strukturell völlig unterschiedlicher Liganden durch Retinoide und deren Rezeptorsystem.

Die Interaktion mit dem nukleären Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator Protein 1) stellt den zweiten wichtigen Weg im Rahmen der Signaltransduktion von Retinoiden dar (Pfahl 1993b, Pfahl 1994). Bei AP-1 handelt es sich um einen Proteinkomplex bestehend aus den Proto-Onkogenen c-Fos und c-Jun sowie anderer assoziierter Proteine. AP-1 bindet ebenfalls an spezifische DNS-Bindungsstellen und induziert im Wesentlichen die Zellproliferation. In Gegenwart entsprechender Retinoide wird durch Heterodimerbildung mit diesen Proteinen deren Bindung an die spezifischen DNS-Sequenzen verhindert und deren Wirkung blockiert. Ein Überschuss an aktivierten Retinoidrezeptoren hemmt somit die AP-1 Aktivität, während ein Überschuss an c-Jun und c-Fos zur Hemmung der Retinoidrezeptor vermittelten Effekte führt.

In diesem doppelten System der Wirkungsvermittlung kontrollieren zwei unterschiedliche Klassen von Transkriptionsfaktoren ihre Aktivitäten gegenseitig. Über AP-1 wird überwiegend die Zellproliferation, über nukleäre Rezeptoren auch die Zelldifferenzierung induziert (Gudas 1994, Hoffmann 1995).

Effekte in vitro

In vitro erfolgte die Applikation der sehr häufig untersuchten Retinoide ATRA und 13cRA meist in einem Konzentrationsbereich von 0,01-100 μM . Durch pharmakokinetische Untersuchungen im Rahmen klinischer Studien bei Patienten mit fortgeschrittenen hämatologischen und soliden Malignomen fanden sich Hinweise auf die Konzentrationsbereiche, welche in vivo zumindest im Plasma der Patienten erreichbar waren.

So fanden Conley et al. im Rahmen einer Phase I-Studie bei 49 Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren bei täglich einmaliger oraler Gabe steigender Dosen von ATRA ($45\text{-}309 \text{ mg/m}^2$) 24 Stunden nach Applikation maximale Serumspiegel von 520-1600 ng/ml (Conley 1997). Bei einem Molekulargewicht von etwa 300 Da (ATRA, 13cRA) sind etwa 300 ng/ml in vivo äquivalent zu 1 μM in vitro. Somit werden für ATRA maximale Serumspiegel von 5,3 μM erreicht.

Für 13cRA wurden in Abhängigkeit vom Applikationsmodus bei einmaliger oraler Gabe von 3 bzw. 5 mg/kg KG bei Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen maximale Plasmakonzentrationen von 200-900 ng/ml bzw. 190-1150 ng/ml nach $3,2 \pm 1,1$ Stunden bzw. $4,5 \pm 2,4$ Stunden angegeben (Goodman 1982). Bei kontinuierlicher Gabe von 2 x 40 mg 13cRA täglich betragen die mittleren Plasmakonzentrationen für 13cRA 132-186 ng/ml und für dessen biologisch aktiven Metaboliten 4-oxo-13cRA 610-791 ng/ml (Brazzell 1983). Durch eine maximale Dosis von 8 mg/kg KG 13cRA wurden mittlere maximale Plasmaspiegel von etwa 4 μM beobachtet (Kerr 1982). Die Konzentration aktiver Metaboliten lag etwa um ein Drittel höher.

Retinoide können in vitro abhängig von Dosis und Inkubationsdauer bei entsprechend sensiblen Zelllinien hämatogener und solider Tumoren verschiedene biologische Effekte bewirken (Bollag 1994, Smith 1992). Retinoide führen zu einer Hemmung von Zellproliferation, Angiogenese, Motilität sowie Invasivität der

Tumorzellen. Sie können die Apoptose in Zellen sensibler Zelllinien induzieren. Retinoide modulieren außerdem die Gen-Transkription von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, STH, Osteocalcin, Laminin B1, Transglutaminase und RAR β .

Wachstumshemmung

In vitro zeigte die alleinige Applikation von Retinoiden wie z.B. ATRA, 9cRA, 13cRA, 4-HPR, Acitretin in den meisten der untersuchten Zelllinien verschiedener solider Tumore (z.B. Tumoren von Cervix, Kolon, Kopf/Hals, Lunge (NSCLC), Magen, Mamma, Melanom, Neuroblastom, Oesophagus, Ovar, Pankreas) eine dosis- und konzentrationsabhängige Inhibition des Zellwachstums.

Durch Kombination mit Interferonen und Zytokinen (TNF α , TGF β , EGF, IL-1) fand sich eine zum Teil erhebliche Zunahme der Wachstumsinhibition. Ebenso additiv oder synergistisch antiproliferativ wirksam waren die Kombinationen von Retinoiden mit Chemotherapeutika (z.B. Cisplatin, Etoposid, 5-FU, Herbimycin A, Paclitaxel), mit Bestrahlung oder mit Vitamin D bzw. dessen synthetischem Derivat EB 1089 (Zugmaier 1996, Koga 1991). In Mammakarzinomzelllinien wurde eine Zunahme der antiproliferativen Wirkung durch die Kombination von Retinoiden mit Tamoxifen erreicht (LaCroix 1980, Wetherall 1982, Fontana 1987).

Differenzierungsinduktion

Eine weitere wesentliche Eigenschaft der Retinoide ist deren Fähigkeit zur Differenzierungsinduktion. Durch Kombination von Retinoiden mit verschiedenen Zytokinen, Prostaglandin E, Natrium-Butyrat, DMSO (Dimethylsulfoxid), HMBA (Hexamethylenbisacetonamid) oder Vitamin D₃ wurde eine Zunahme der Differenzierung in Zellen der Promyelozytenleukämiezelllinie HL-60 beobachtet (Peck 1990, Smith 1992, Bollag 1994). Durch Retinoide (ATRA, 13cRA, 4-HPR) alleine oder in Kombination mit Zytokinen (IFN α , IFN γ , TNF α) oder Zytostatika (Herbimycin A) ist auch in Zelllinien solider Tumoren (Neuroblastom, Melanom, Mamma- und Endometriumkarzinom) eine Induktion bzw. Zunahme der Differenzierung in Richtung eines weniger malignen Phänotyps nachweisbar (Preis

1988, Hendrix 1990, Higuchi 1991, Ponzoni 1991, Smith 1992, Carter 1996). Nicht immer geht die Differenzierungsinduktion aber mit einer Inhibition der Zellproliferation einher und umgekehrt. Beide Effekte können bei unterschiedlichen Retinoidkonzentrationen auftreten.

Induktion von Apoptose

Die optimale Form der Differenzierung maligner Zellen stellt die Induktion eines benignen Phänotyps oder die Induktion der Apoptose dar. Es konnte gezeigt werden, dass in Zelllinien solider Tumoren (Mamma, Neuroblastom, Ovar, Zervix, Kopf/Hals, Lunge, Prostata) durch Retinoide (ATRA, 9cRA, 13cRA, 4-HPR) Apoptose induziert wird (Wang 1996, Danforth 1996, Ponzoni 1995, Oridate 1995, Oridate 1996, Oridate 1997, Kalemkerian 1995a, Roberson 1997, Hwang 1995). Insbesondere 4-HPR weist eine hohe Fähigkeit der Apoptoseinduktion auf.

Inhibition von Zellmotilität und Invasivität

Durch Applikation der Retinoide ATRA bzw. 4-HPR fand sich eine Inhibition von Zellmotilität und Invasivität in Zelllinien von Melanom, Keimzelltumoren und Prostatakarzinom (Hendrix 1990, Ross 1991, Weiss 1994, Kim 1995, Webber 1995). Ursächlich hierfür waren Suppression der Aktivität proteolytischer Enzyme wie z.B. Kollagenase IV und uPA, verminderte Expression des Rezeptors gp78 für den autokrinen Motilitätsfaktor, Induktion von Zelldifferenzierung und Lamininsekretion sowie Zunahme der Adhärenz an Oberflächen, wie z.B. Plastik, Gelatin, Laminin und extrazellulärer Matrix.

Effekte in vivo

Der Effekt von Retinoiden wurde bislang hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Modulation der Tumorgenese und Wachstum von Primärtumoren und Metastasen in unterschiedlichen Tiermodellen untersucht. Im Wesentlichen kam hierbei die Tumorinduktion mittels chemischer Karzinogene zum Einsatz. Die Wirksamkeit der

Retinoide zur Inhibition der Karzinogenese (Chemoprävention) war unterschiedlich ausgeprägt. Dabei spielten Faktoren wie Art des Retinoids, Dosis, Applikationsschema, -weg und -zeitpunkt von Karzinogen und Retinoid sowie Zielorgan, Spezies und Versuchsbedingungen des Wirtstieres eine Rolle und führten so zu unterschiedlichen Versuchsergebnissen (Moon 1994). Retinoide zeigten insbesondere in karzinogeninduzierten Tumoren der Haut, Mamma, Zungen- und Wangenschleimhaut deutliche inhibitorische Effekte. Bei Lebertumoren wurde durch verschiedene Retinoide jedoch auch eine Zunahme der Karzinogenese beobachtet. Sowohl hemmende als auch fördernde Effekte auf die Karzinogenese durch Retinoide sind bei Tumoren von Lunge, Pankreas, Ösophagus und Kolon beschrieben. Prinzipiell ist der Einsatz natürlicher Retinoide aufgrund deren Toxizität experimentell und klinisch limitiert. Alternativen stellen der Einsatz synthetischer Retinoide mit deutlich geringerer klinischer Toxizität (z.B. 4-HPR) bei gleichem Anti-Tumoreffekt sowie die Kombination von Retinoiden (13cRA, Retinylacetat, β -Caroten, 4-HPR) mit antikanzerogenen Substanzen (Tamoxifen, Bromocriptin, DFMO, Kalzium-Glucarat, Selen, Oltipraz) als Doppel- oder Trippeltherapie dar. Solche Kombinationen wurden in vivo als effektiv für Mamma-, Lungen- und Harnblasenkarzinome beschrieben.

Verglichen mit den chemopräventiven Effekten sind die chemotherapeutischen Effekte von Retinoiden in transplantierten und karzinogeninduzierten soliden Tumoren in vivo in deutlich geringerem Umfang beobachtet worden (Hill 1982). Unter einigen Retinoiden (ATRA, 13cRA, 4-HPR, Etretinat, Motretinid, Targretin, Temaroten) wurden jedoch auch im chemotherapeutischen Ansatz bei Melanom, Mammakarzinom und Chondrosarkom eine Reduktion von Wachstumsrate, Tumorgewicht, Anzahl und Inzidenz von Lungenmetastasen beschrieben (Moon 1994, Bischoff 1998). Auch im Rahmen der Chemotherapie führte die Kombination von 4-HPR und Kalzium-Glucarat, bzw. Targretin (RXR-Agonist) und Tamoxifen in suboptimaler Dosierung zu einer deutlichen Reduktion von Größe bzw. Anzahl karzinogeninduzierter, etablierter Mammakarzinome (Bischoff 1998).

Klinische Studien

Bei der oralen Leukoplakie (orale Präkanzerose) konnte in Studien ein positiver Einfluss von Retinoiden nachgewiesen werden. So zeigte sich in der placebo-kontrollierten, doppelblinden (Phase II) Studie von Hong, W.K. et al. unter Therapie mit 1-2 mg/kg/d 13-cis-Retinsäure (13cRA) eine klinische Besserungsrate von 67% gegenüber 10% bei Placebo. Die unerwünschten Nebenwirkungen waren hierbei jedoch unakzeptabel hoch (Hong 1986). Bei der durch intensive UVB Strahlung entstehenden aktinischen Keratose (Präkanzerose der Haut), konnte Kligman et al. in ihren placebo-kontrollierten Studien eine komplette Remission in 50% der Fälle durch topische Anwendung von Etretinat demonstrieren (Kligman 1991). Auch die systemische Anwendung von Etretinat führte zu beachtlichen Besserungsraten von 86% im Etretrate-Arm im Gegensatz von nur 4% im Placebo-Arm (Moriarty 1982). Dagegen fielen bei Zweittumoren der Haut nach kurativer Versorgung des Primärtumors die Ergebnisse mit Retinoiden negativ aus. Weder die Verabreichung von Retinol oder Isotretinoin (13cRA) reduzierten die Inzidenz eines Zweittumors (Moon 1983). Bei Präkanzerosen der Lunge (Bronchialmetaplasien mit und ohne Dysplasie) sind sowohl hemmende als auch fördernde Effekte durch Retinoide beschrieben (Misset 1986, Lee 1994). Bei Patienten mit vorbehandelten, inoperablen fortgeschrittenen Plattenepithel-Karzinom der Haut sprachen 68% (19/28) der Patienten auf die Kombinationstherapie aus Isotretinoin (1 mg/kg/d po) und IFN α -2a (3 MIU/d sc) an. Davon erreichten 25% der Patienten eine komplette Remission. Obwohl während der Therapie keine lebensbedrohlichen unerwünschten Nebenwirkungen auftraten war bei 18 Patienten eine Dosisreduktion auf Grund zunehmender Schwäche notwendig (Lippman 1992). Gold und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung von 13cRA bei Patienten mit metastasiertem, nicht seminomatösem Hodentumor (Gold 1984). Alle hier eingeschlossenen Patienten hatten zuvor eine mindestens achtmonatige Chemotherapie ohne Response erhalten. Keiner der Patienten zeigte einen Response auf die Therapie mit 13cRA. Bei Lebertumoren wurde durch verschiedene Retinoide eine Zunahme der Karzinogenese beobachtet. Sowohl hemmende als auch fördernde Effekte auf die Karzinogenese durch Retinoide sind bei Tumoren von Lunge, Pankreas, Ösophagus und Kolon beschrieben.

2.3.1. Isotretinoin (13cRA)

Isotretinoin (13-cis-Retinolsäure, 13cRA) liegt im Plasma fast vollständig an Albumin gebunden vor. Es besitzt ein Molekulargewicht von 300,45 Da. Die mittlere humane Plasmakonzentration beträgt 5,4 nmol/l (IARC 1999). Die Organkonzentrationen liegen etwa 10-fach höher als die Plasmakonzentrationen.

In einer Untersuchung an Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen erfolgte die Gabe von 13cRA in aufsteigenden Dosen von 0,5-8 mg/kg KG. Die hierunter beobachteten Plasmakonzentrationen betragen 3,9 µM (2,8-6,5 µM). 13cRA wird nach 60-72 Stunden in überwiegend unveränderter Form (53-74%) über den Stuhl ausgeschieden; im Urin ist es nur in geringen Mengen nachweisbar. Zunächst erfolgte der klinische Einsatz von 13cRA bei Patienten mit Hauterkrankungen. Innerhalb der onkologischen Forschung wurden die Effekte von 13cRA in vitro und in vivo auch in hämatologischen und soliden Tumoren umfangreich untersucht (Sporn 1994, Hong 1993, IARC 1999). Der klinische Einsatz bei soliden Tumoren erfolgte im Rahmen der Therapie von Präkanzerosen, fortgeschrittener Erkrankungen und zur Chemoprävention. Die klinische Toxizität ist dosisabhängig. Die Nebenwirkungen einer Dauertherapie mit täglichen Gaben von 100 mg 13cRA sind in Tabelle 5 zusammengefasst (Lucek 1985).

Nebenwirkung	Häufigkeit
Cheilitis	90 %
Conjunctivitis	50 %
Erhöhung von BSG	50 %
Mundtrockenheit	30 %
Hautschuppung	30 %
Pruritus	25 %
Epistaxis und Petechien	25 %
Erhöhung von Triglyceriden	25 %
gastrointestinale Beschwerden	20 %
muskuloskelettale Beschwerden	15 %
Haarausfall	10 %
Müdigkeit	10 %
Kopfschmerzen	10 %
Anämie	10 %
Leukozytopenie	10 %
Thrombozytose	10 %
Erhöhung von Leberfunktionsparametern	10 %

Tabelle 5: Klinische Nebenwirkungen der Dauertherapie mit Isotretinoin (100 mg/Tag)

2.3.2. Fenretinid (4-HPR)

Das Retinoid N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid (Fenretinid, 4-HPR) wird synthetisch aus ATRA und 4-Aminophenol hergestellt. 4-HPR besitzt ein Molekulargewicht von 391,55 Da (IARC 1999). Der Einsatz von Fenretinid erfolgte im Rahmen klinischer Studien überwiegend zur Chemoprävention bei Karzinomen der Mamma, Zervix, Ovar, Lunge, Haut und bei oralen Leukoplakien (IARC 1999). Am häufigsten wurde eine tägliche Dosis von 200 mg verabreicht.

Die Resorption des Retinoids ist von der Nahrungszusammensetzung abhängig. Kohlehydratreiche Nahrung senkt die enterale Resorption, fettreiche Nahrung dagegen erhöht sie. Bereits 24 Stunden nach oraler Gabe von 200 mg 4-HPR kommt es dosisabhängig zu einer Senkung der Plasmakonzentration von Retinol um 38% und des Retinol-Bindungsproteins um 26%. Dieser und andere metabolische Effekte bewirken eine reversible Verschlechterung des Nachtsehens. Aus diesem Grunde erfolgt bei der Langzeitgabe am Ende eines jeden Therapiemonats eine dreitägige Einnahmepause. An klinisch beobachteten Toxizitäten fanden sich im Rahmen einer prospektiv randomisierten Studie zur Chemoprävention bei Patientinnen mit Mammakarzinomen (n = 1432) über einen Zeitraum von fünf Jahren folgende in Tabelle 6 zusammengefassten Nebenwirkungen (Camerini 2001):

Nebenwirkung	Häufigkeit
Verschlechterung der Dunkeladaptation	19 %
Hautveränderungen	19 %
gastrointestinale Nebenwirkungen	13 %
Veränderungen an der Augenoberfläche	11 %
Veränderung der Leberenzyme (GOT, GPT, Bilirubin, AP)	7,4 %
Veränderung des Cholesterin- und Triglyceridspiegels	7,1 %
Veränderung des Blutbildes	1,1 %

Tabelle 6: Klinische Nebenwirkungen der Dauertherapie mit Fenretinid (200 mg/Tag)

Die klinischen Nebenwirkungen waren im Behandlungszeitraum insgesamt rückläufig. Aufgrund des günstigen Langzeittoxizitätsprofils kann 4-HPR als eine Substanz mit künftiger Bedeutung im Rahmen von Therapie und Prävention bestimmter solider Malignome gesehen werden.

2.4. Zellmotilität und Metastasierung

Die Eigenschaften der Invasion und Metastasierung sind wichtige biologische Merkmale maligner Zellen und gelten als Hauptursache für Therapieversagen und schlechte Prognose von Tumorpatienten. Differenzierte Zellen verlassen in der Regel ihren Zellverband nicht. Tumorzellen dagegen sind im Rahmen des komplexen Prozesses der Metastasierung durch Motilität und Invasivität in der Lage sich aus dem Primärtumor zu lösen und respektieren Organgrenzen nicht. In vieler Hinsicht verhalten sich Tumorzellen damit wie embryonale Zellen, die bestimmte Enzymsysteme sowie funktionelle und strukturelle Eigenschaften reaktiviert haben (Coffey 1996). Die Tumorzellen haben dabei folgende, für den Metastasierungsprozess relevanten Eigenschaften erlangt:

- Autonome Zellproliferation:
Proliferationsdruck (Sugarbaker 1997)
- Unregulierte Gewebsinvasion:
Amöboide Beweglichkeit, verminderte Kontakt-Inhibition, Freisetzung oder Aktivierung lytischer Enzyme wie z.B. Proteasen, Kollagenasen (Nicolson 1979, Poste 1977)
- Veränderungen an der Zelloberfläche:
Verminderte Zelladhäsion, thromboplastische Aktivität, Rezeptoren-
Alteration, Tumorantigene etc. (Glick 1976, Poste 1977)
- Produktion von Angiogenesefaktor (z.B. VEGF):
Induktion einer Kapillarproliferation im Wirtsorganismus (Johnson 1976)
- Ausschaltung von Abwehrmechanismen:
Neutralisation zytotoxischer Antikörper und mononukleärer Zellen

2.4.1. Metastasierungsprozess

Der Metastasierungsprozess stellt einen multifaktoriellen Prozess dar, der sowohl von den Eigenschaften des jeweiligen Tumors, als auch von denen des Wirtsorganismus bestimmt wird. Während des Prozesses der Metastasierung müssen einzelne Tumorzellen sich aus dem Gewebsverband des Primärtumors lösen und mobil werden. Bei diesem Prozess finden nachfolgende Phasen statt:

- Invasion und Intravasation:

Disseminierung maligner Zellen aus dem Zellverband des Primärtumors mit Proteolyse von Basalmembranen sowie umgebender extrazellulärer Matrix (ECM) mit nachfolgender Migration der Tumorzellen in das Lumen von Blut- oder Lymphgefäßen (Van Roy 1992).

- Bildung von Metastasen:

Die Tumorzellen gelangen, umgeben von Leukozyten und Thrombozyten, einzeln oder in Form von Zellclustern an den Ort der Metastasierung. Dort entsteht in Abhängigkeit von der strukturellen und biochemischen Zusammensetzung des vorhandenen Milieus eine Interaktion zwischen Tumorzelle und Endothelzelle mit erneuter Proteolyse von Basalmembran und ECM sowie nachfolgender Migration der Tumorzelle in das perivaskuläre Stroma des jeweiligen Zielorgans. So werden Metastasen in vom Primärtumor weit entfernten Lokalisationen gebildet (Banyard 1999).

- Neoangiogenese und Tumorzellproliferation:

Durch die Induktion von Neoangiogenese und Tumorzellproliferation wird der Vorgang der Metastasierung abgeschlossen.

Aus den verschiedenen Phasen des Metastasierungsprozesses ergeben sich Möglichkeiten der Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Methoden. Damit könnte eine für jeden Patienten tumorbiologisch individuelle Therapie entwickelt werden.

2.4.2. Zellmotilität beim Prostatakarzinom

Die natürliche Umgebung einer Prostatakarzinomzelle innerhalb eines Karzinoms ist komplex gestaltet. Neben Kontakten zu Tumorzellen des gleichen Klons existieren räumliche Verbindungen zu Tumorzellen anderer Klone sowie zu Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Stromazellen und spezialisierten epithelialen Zellen, wie z.B. Basalzellen, exokrinen sekretorischen Zellen und neuroendokrinen Zellen. Mit der ECM sind die Tumorzellen über spezielle Membran-Rezeptoren, den Integrinen, verbunden. Jede der genannten Zellarten ist in der Lage, Faktoren zu sezernieren, welche das Verhalten der Prostatakarzinomzelle hinsichtlich Proliferation, Differenzierung, Motilität und Invasionsfähigkeit beeinflussen können.

In der nachfolgenden Tabelle 7 sind bislang bekannte Faktoren (Zytokine, Hormone, Membranrezeptoren, Proteasen, Aktin-Bindungsproteine, Tumorsuppressorgene, intrazelluläre Signalproteine), welche Motilität und Invasivität von Prostatakarzinomzelllinien in vitro und in vivo modulieren können, zusammenfassend dargestellt (Banyard 1999, Barrack 1997, Fakih 1995, Geldof 1997, Keer 1991, Murphy 1992, Nishimura 1998, Pienta 1991, Reiland 1999).

Substanzklasse	Substanz	Effekt auf Motilität	Assoziation mit / Effekt auf Metastasierung
Zytokine	EGF	↑	↑
	AMF	↑	↑
	TGFβ	↑	nb
	IGF I, IGF II	↑	nb
	NGF	↑	nb
	HGF/SF	↑	nb
	Bombesin	↑	nb
	TNFα	↓	nb
	IL-1β	↓	nb
	IL-8	↑	↑
	bFGF	↑	nb
	Hormone	DHT	↑
Calcitonin		↑	nb
PTH		↑	nb
PTHrp		nb	↑
Membranrezeptoren	α6	↑	↑
	α4	↑	nb
	αIIbβ3	↑	↑
	CD44	↓	↓
	E-Cadherin	nb	↓
Proteasen	u-PA	↑	↑
	Elastase	nb	↑
	Hyaluronidase	nb	↑
	MMP-9	nb	↑
Aktin-Bindungsproteine	Tβ15	↑	↑
	PTEN	↓	↓
	Tme1	nb	↓
Tumorsuppressorgene	bcl-2	↑	↑
	KAI-1	↓	↓
	Rb	↓	↓
Intrazelluläre Signalproteine	ras	↑	↑
	GAPDH	↑	↑
	PKC-zeta	↓	↓
	Kalzium	↑	nb
Chemotherapeutika	Colchizin	↓	nb
	Suramin	↓	nb
	Pentosan	↓	nb
	Estramustin	↓	nb

↑: Zunahme; ↓: Abnahme; nb: nicht beschrieben

Tabelle 7: Modulation von Motilität und Metastasierung in Prostatakarzinomzelllinien

2.5. Zielsetzung

Mit den derzeit im Rahmen der Chemotherapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms zur Verfügung stehenden Substanzen, ist das hormonrefraktäre Prostatakarzinom (HRPC) klinisch nicht zufriedenstellend zu behandeln. Die Suche nach Substanzen mit anderen Wirkungseigenschaften und deren Einbindung in bestehende Therapiekonzepte kann einen Schritt zur besseren Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms darstellen. Auf Grund der in vitro und in vivo beobachteten antitumor Effekte in anderen Tumorentitäten bieten sich hierfür Substanzen wie die Retinoide an. Dazu ist zunächst eine möglichst exakte Charakterisierung relevanter biologischer Effekte von Retinoiden an humanen Prostatakarzinomzelllinien in vitro notwendig. In vorangegangenen Untersuchungen wurden von unserer Arbeitsgruppe die Effekte des natürlichen Retinoids 13-cis-Retinsäure (13cRA) vergleichend mit dem synthetischen Retinoid 4-Hydroxyphenylretinamid (4-HPR, Fenretinid) in drei humanen Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP, DU145, PC3) hinsichtlich Modulation von Zellproliferation, Induktion von Apoptose und Zellmotilität untersucht (Treiber 2000a, Treiber 2000b). Hierbei fand sich eine dosisabhängige, fast vollständige Hemmung des Zellwachstums mit beiden Retinoiden in allen drei Zelllinien. Dieser Effekt wurde durch Induktion von Apoptose ebenfalls durch beide Retinoide in allen drei Zelllinien bedingt. Hinsichtlich der Modulation der Zellmotilität fand sich in den Linien DU145 und PC3 (nicht androgensensibel) mit beiden Retinoiden eine dosisabhängige, vollständige Hemmung der Zellmotilität.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden an drei humanen Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP, DU145, PC3) vergleichend systematisch die Effekte von zwei Retinoiden, dem „klassischen“ 13cRA und dem synthetischen 4-HPR, mit einem gegenüber 13cRA günstigeren klinischen Nebenwirkungsspektrum, hinsichtlich einer möglichen Modulation der Zell-Invasionsfähigkeit in vitro untersucht und dabei folgende Fragen beantwortet:

- Führen die Retinoide 13cRA bzw. 4-HPR zu einer Modulation der Invasionsfähigkeit der Tumorzellen?
- Welches Retinoid ist hinsichtlich der Modulation der Invasionsfähigkeit der Tumorzellen effektiver?

3. Material und Methoden

3.1. Zelllinien

Eingesetzt wurden die humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3. Diese Zellen stammen aus der Tumorzellbank der American Type Culture Collection (ATCC) und wurden von der Tumorbank der Fa. CLS (Cell Lines Service, Heidelberg) bezogen. Die Kontrolle auf Mykoplasmenbefall erfolgte regelmäßig in allen verwendeten Zelllinien und war in allen beschriebenen Versuchen negativ.

Die Zelllinie LNCaP (ATCC-Nummer: CRL-1740)

Bei der LNCaP Zelllinie handelt es sich um Zellen einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines Patienten mit Prostatakarzinom. Die LNCaP Zellen weisen den Androgenrezeptor auf, produzieren und sezernieren das prostataspezifische Antigen (PSA). Sie wachsen nicht in einfachen Monolayern, sondern zeigen ein Wachstum in Zell-Clustern.

Die Zelllinie DU145 (ATCC-Nummer: HTB-81)

Die DU145 Zelllinie wurde aus der Gehirnmastase eines Patienten mit Prostatakarzinom gewonnen. Sie stellen epitheliale Zellen dar, die als Monolayer wachsen. Ultrastrukturelle Analysen offenbaren Mikrovilli, Tonofilamente und Desmosomen, außerdem viele Mitochondrien, einen gut entwickelten Golgiapparat und heterogene Lysosomen. Die Zellen sind androgenunabhängig, produzieren und sezernieren kein PSA.

Die Zelllinie PC3 (ATCC-Nummer: CRL-1435)

Die Zelllinie PC3 stammt aus einer Knochenmetastase eines Patienten mit Prostatakarzinom. Sie weist keine Androgensensivität auf und es findet sich keine PSA-Produktion und -Sekretion.

3.2. Zellkultivierung

Kulturbedingungen und Subkultivierung

Alle Arbeitsgänge in Zusammenhang mit Zellkultivierung und Zellbehandlung wurden in der Reinluftwerkbank unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Die dabei verwendeten Materialien werden in Tabelle 8 aufgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebekulturgefäßen mit 5 ml oder mit 15 ml Medium, abhängig vom Volumen der Kulturgefäße, im Inkubator bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchte, 95% Luft und 5% CO₂. In Zusammenspiel mit dem Hydrogenkarbonatpuffersystem des Mediums diente die CO₂-Begasung der Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums. Die hohe Luftfeuchtigkeit verhinderte ein Verdampfen des Mediums.

Das Kulturmedium für die Subkultivierung der Zelllinien LNCaP und DU145 setzte sich wie folgt zusammen:

- 500 ml Medium RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
- 50 ml (10%) FKS, hitzeinaktiviert über 30 Minuten bei 56°C
- 5 ml nichtessentielle Aminosäuren
- 5 ml Antibiotic Antimycotic Solution

Für die Subkultivierung der PC3 Zelllinie wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 5 ml Pyruvat (100 mM) versetzt.

Die Kultivierung der Invasionskammern erfolgte unter denselben Bedingungen. Hierbei wurde Versuchsmedium verwendet, welches die gleiche Zusammensetzung wie das Kulturmedium aufweist, jedoch nur 5% FKS enthält.

Eine Subkultivierung der Zelllinien wurde alle 8 Tage vorgenommen. 15 Minuten vor der Subkultivierung wurden die benötigten Medien aus dem Kühlschrank (+7°C) genommen, damit sich ihre Temperatur der Raumtemperatur angleichen konnte. Nach Absaugen des Mediums aus dem Gewebekulturgefäß erfolgte die Zugabe von 5 ml (15 ml) PBS und nochmaliges Absaugen. Mittels dieser Spülung mit PBS wurde eine Inhibierung der Trypsinwirkung durch Medienreste verhindert. Durch Zugabe von 2 ml (5 ml) Trypsin/EDTA-Lösung je Zellkulturgefäß und Inkubation bei 37°C

über 7 Minuten wurden die Zellen proteolytisch abgelöst. Durch seitliches Beklopfen des Gewebekulturgefäßes wurde eine Ablösung der noch am Boden des Zellkulturgefäßes haftenden Zellen sowie eine Separierung der noch vorhandenen Zellagglomerate in eine weitgehende Einzelzellsuspension erreicht. Es erfolgte eine optische Kontrolle der entstandenen Einzelzellsuspension durch Auflichtmikroskopie. Die proteolytische Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe von 8 ml (15 ml) Medium je Zellkulturgefäß gestoppt. Die nun vorliegenden 10 ml (20 ml) Zellsuspension wurden in ein Zentrifugenröhrchen zur Zentrifugation bei 240 g (Erdbeschleunigung) über fünf Minuten überführt. Der zellfreie Überstand wurde abgesaugt und das Sediment in 10 ml Medium resuspendiert. Der gut durchmischten Zellsuspension wurden 20 µl entnommen und mit 20 µl Trypanblau gemischt. Dies entsprach einer 1:2-Verdünnung. Mit dieser Mischung wurde eine Neubauerzählkammer beschickt und jeweils die beiden diagonal gegenüberliegenden Quadrate einer Kammer ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet.

Die Berechnung der Zellzahl einer Probe erfolgte wie nachstehend beschrieben:

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

Z: Mittelwert aus der Zellzahl von zwei gegenüberliegenden Quadraten

$10^4/\text{ml}$: Kammerfaktor (um die Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension zu erhalten)

Beispiel für die Subkultivierung:

Bei einem Mittelwert von 20 gezählten Zellen und 10 ml Zellsuspension ergibt sich eine Zellzahl von $20 \times 2 \times 10^4$ Zellen in 1 ml Zellsuspension, also von 40×10^5 Zellen in 10 ml Suspension. Ausgehend von dieser Zellzahl wurde das notwendige Volumen zur Überführung von 5×10^5 Zellen berechnet. Dieses berechnete Zellsuspensionsvolumen wurde in ein neues Zellkulturgefäß mit bereits vorgelegten 5 ml Medium überführt. Nach 3-tägiger Inkubation der Zellen im Inkubator wurde das

verbrauchte Medium mittels steriler Pasteurpipette abgesaugt und mit 5 ml frischem Medium wieder aufgefüllt.

Alle Versuche erfolgten mit Zellen der drei Zelllinien, wobei die Passagennummern bei 43-90 lagen.

Lagerung von Tumorzellen

Das Aufbewahren der Zellen erfolgte zur Reduzierung der Passagenzahl und zur Bildung von Reserven. Es wurden jeweils 10^7 Zellen mit 1 ml Einfriermedium (20% Dimethylsulfoxid) in ein spezielles Vorratsgefäß (Firma Nunc) gegeben. Diese wurden bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen erfolgte im Inkubator bei 37°C innerhalb von 2 Minuten. Die aufgetaute Zellsuspension wurde sofort mit 9 ml Medium versetzt und bei 240 g (Erdbeschleunigung) 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung wurde, wie bereits in dem Abschnitt „Kulturbedingungen und Subkultivierung“ beschrieben, durchgeführt. Vor Verwendung der neuen Zellen wurden diese zweifach subkultiviert.

3.3. Materialien

Material	Firma
Antibiotic Antimycotic Solution, (100x)	Sigma
BioCoat Matrigel Invasion Chamber (24 well / 12 inserts)	Becton Dickinson Labware
Einfriermedium: 20 % DMSO (Dimethylsulfoxid) getrocknet 15 % Medium 65 % FKS (fetales Kälberserum)	Merck Biochrom Biochrom
Färbelösung: Hemafix	Biomed
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom
Immersionsöl	Merck
Inkubator	Haereus
Lichtmikroskop: Axiovert 135	Zeiss
Medium RPMI 1640 mit stabilem Glutamin	Biochrom
Mykoplasmen-Nachweis (EIA)	Roche
Nichtessentielle Aminosäuren, (100x)	Biochrom
PBS-Lösung: phosphatgepufferte Salzlösung, (1x), pH 7,2-7,4, hergestellt für 1 l: 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O und 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l mit dest. H ₂ O	
Pyruvat (100 mM)	Biochrom
Reinluftwerkbank LaminAir HB 2448	Haereus
Isotretinoin (13-cis-Retinsäure): MG 300 Da, Stammlösung: 10 mM entspricht 100 mg in 33,3 ml EtOH (Ethanol) (96%ig), 1:5 mit Medium verdünnen gibt 2 mM, Lösung portioniert einfrieren (-196°C)	Sigma
N-(4-Hydroxyphenyl)retinamid (4-HPR): MG 391 Da, Stammlösung: 10 mM entspricht 5 mg in 1,28 ml EtOH (96%ig), 1:50 mit Medium verdünnen gibt 200 µM, Lösung portioniert einfrieren (-196°C)	Sigma
Trypanblau (0,5 % in NaCl 0,9 %)	Biochrom
Trypsin mit EDTA (0,05 % / 0,02 % in PBS)	Biochrom
Zellkulturgefäße	Greiner

Tabelle 8: Zur Durchführung der Versuche benötigte Materialien

3.4. Versuchsdurchführung

3.4.1. Vorinkubation der Tumorzellen mit Retinoiden

Die Retinoide wurden in Ethanol gelöst, in Stammlösungen portioniert (13cRA: 10mM in Ethanol 96%, 4-HPR: 200 µM in Ethanol 2% in RPMI Medium) und bei -20°C eingefroren.

Zunächst wurden die Zellen wie unter Abschnitt 2.2. beschrieben kultiviert und nach 5-6 Tagen bei 70-90% Konfluenz aus den Zellkulturgefäßen gelöst. Die Zellen wurden auf die übliche Weise gezählt und das für die Überführung der jeweils vorgegebenen Zellzahl nötige Zellsuspensionsvolumen in ein neues Zellkulturgefäß mit Versuchsmedium überführt.

Die Tumorzellen wurden durch insgesamt drei Gaben von Retinoiden (Retinoidzugabe 1, 2 und 3), beginnend 24 Stunden nach Zellaussaat, vorinkubiert (Abbildung 4). Zu den Zellen der Linie DU145 und PC3 wurden je 24, 72 und 120 Stunden nach Zellaussaat Retinoide in das Zellkulturgefäß gegeben; zu den Zellen der Linie LNCaP 24, 96 und 144 Stunden nach Zellaussaat. Die Konzentrationsbereiche der Retinoide lagen für 13cRA bei 0,1–75 µM und für 4-HPR bei 0,01–10 µM.

Bei den Zellen der Linie DU145 und PC3 erfolgte 144 Stunden nach Zellaussaat die Ernte der Zellen, die Vitalitätsüberprüfung und die Auszählung der Zellzahl. Bei Zellen der Linie LNCaP erfolgte dies 168 Stunden nach Zellaussaat.

Die lebenden Zellen wurden in die Wells mit ECM-beschichteten PET-Membranen eingebracht (je Zelllinie und Retinoidkonzentration 200.000 Zellen/Well; Abbildungen 5-7).

Die Wirkung der Retinoide auf das Invasionsverhalten der Tumorzellen wurde konzentrations- und zeitabhängig untersucht und das nachfolgend dargestellte Versuchsschema etabliert (Abbildung 4):

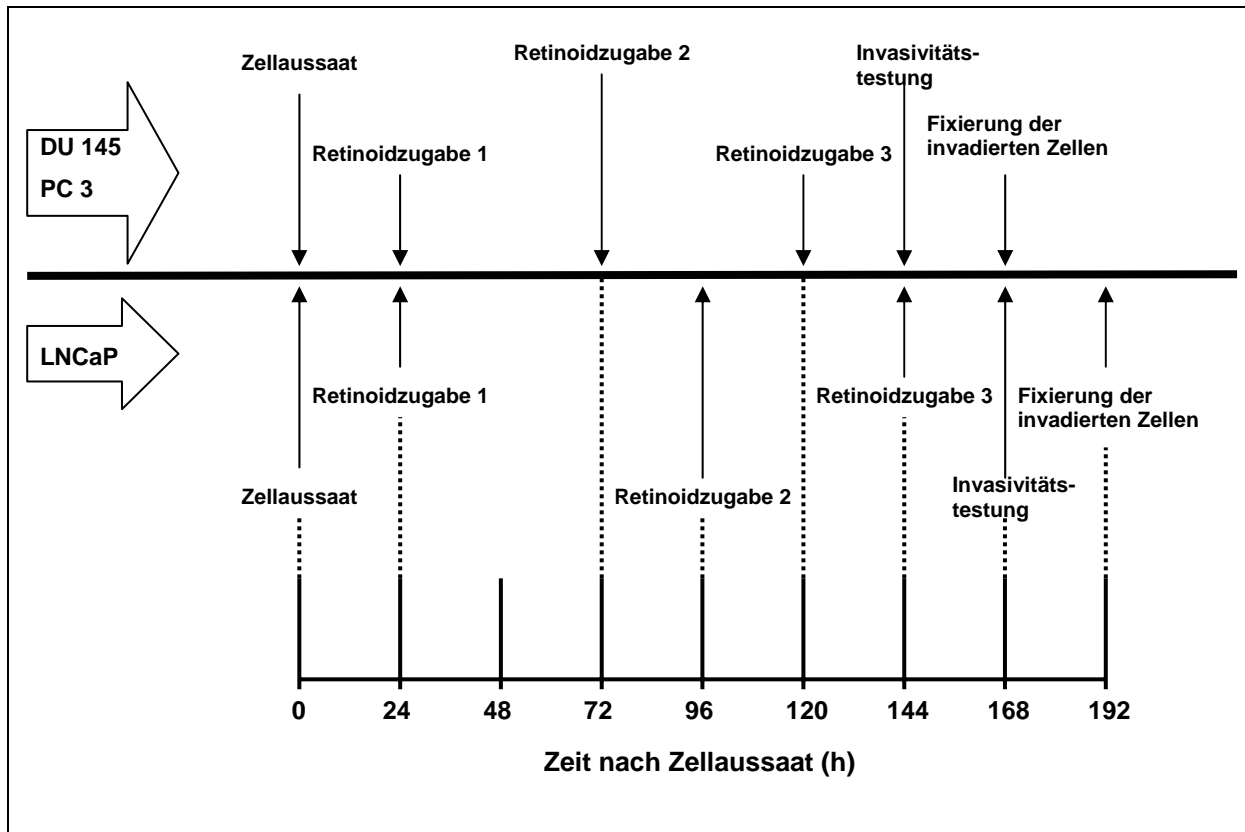


Abbildung 4: Zeitliches Schema der Versuchsansätze

3.4.2. Modulation der Tumorzellinvasionsfähigkeit

Zur Überprüfung der Modulation der Invasionsfähigkeit der Tumorzellen wurden diese, wie unter 2.4.1. beschrieben, mit den Retinoiden 13cRA und 4-HPR vorinkubiert und in Mikrowell-Invasionskammern eingebracht.

Bei der Mikrowell-Invasionskammer (BioCoat Matrigel Invasion Chamber, Becton Dickinson Labware) handelt es sich um eine 24-Well-Platte. Diese enthält 12 Inserts mit einem Durchmesser von je 6,4 mm. Die den Boden bildende PET (Polyethylenterephthalat) Membran hat eine Fläche von $0,3 \text{ cm}^2$, ist mit $8 \mu\text{m}$ großen Poren durchsetzt und mit extrazellulärer Matrix (ECM) beschichtet. Die ECM wurde aus einem Maus-Sarkom (Engelbreth-Holm-Swarm) extrahiert und beinhaltet Laminin, Kollagen Typ IV, Heparansulfatproteoglykan, Entactin und verschiedene Wachstumsfaktoren.

Zur Überprüfung der Modulation der Zellinvasionsfähigkeit mussten zunächst die Invasions-Kammern (Abbildungen 5 und 6) vorbereitet werden. Sie wurden von einer Lagertemperatur von -20°C auf Raumtemperatur gebracht. Nicht benötigte Inserts (Abbildung 7) wurden sofort wieder bei -20°C aufbewahrt. Nach 15 Minuten erfolgte die Befüllung der inneren und äußeren Kammern mit jeweils $500\ \mu\text{l}$ Versuchsmedium. Die ECM konnte so zwei Stunden in einem Inkubator (37°C , $5\% \text{CO}_2$) quellen. Ziel dieser zwei Stunden dauernden Inkubationszeit war das Aufquellen der ECM der Membranen um möglichst natürliche Verhältnisse imitieren zu können.

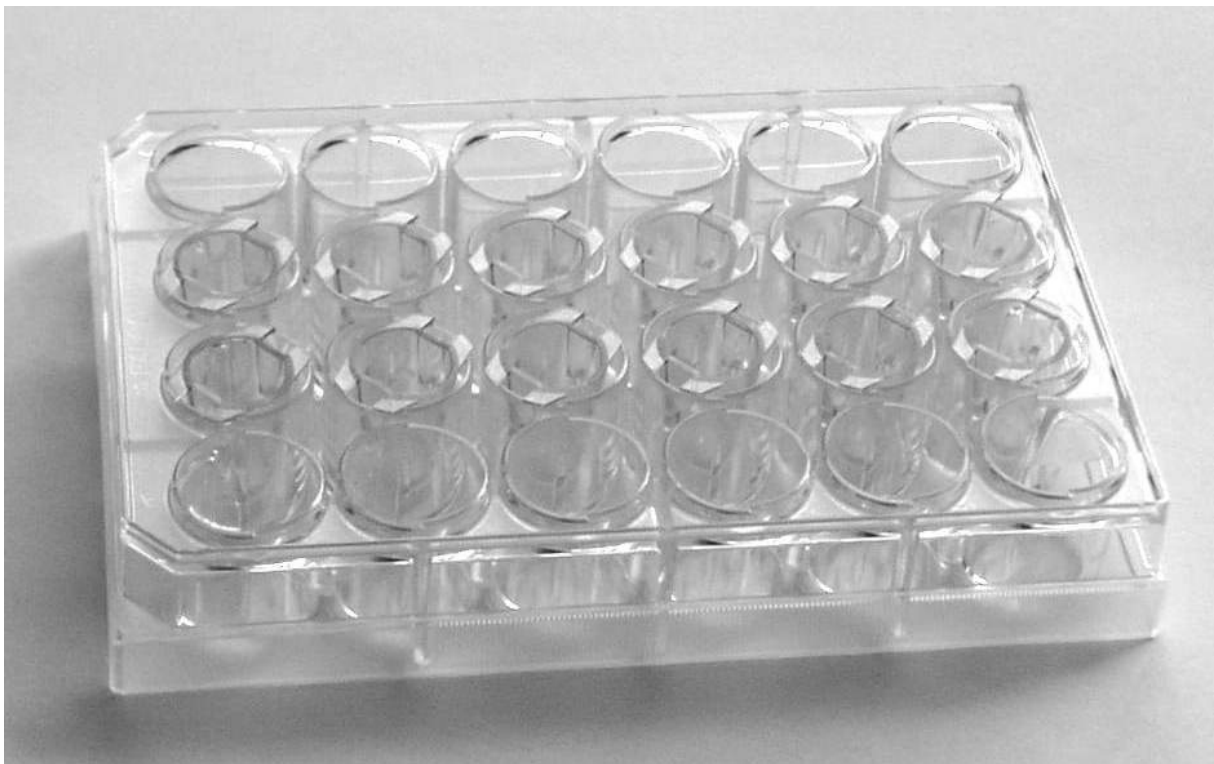


Abbildung 5: 24-Well Invasions-Kammer, Ansicht von oben

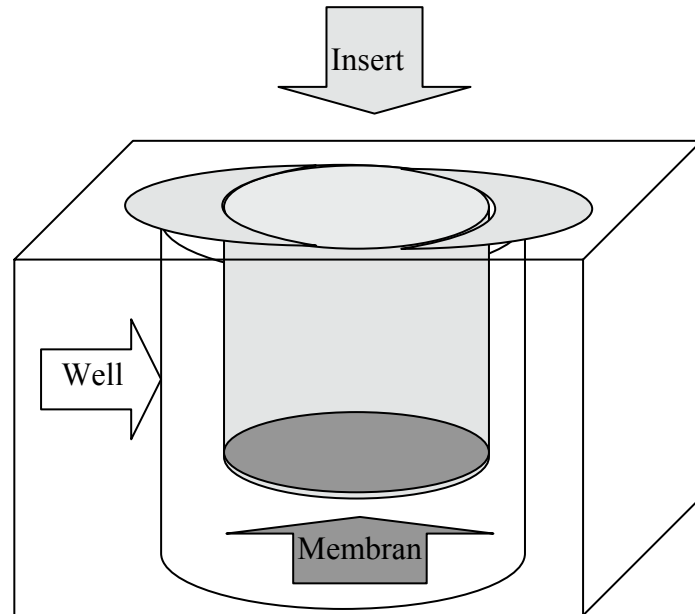


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Inserts zur Messung der Zellinvasion, eingebracht in ein Well der 24-Well Platte



Abbildung 7: Inserts einer Mikrowell-Invasionskammer zur Messung der Zellinvasion

Nach dem Quellen der ECM wurde das Medium aus den Kammern entfernt. Die äußeren Kammern wurden wieder mit 500 µl frischem Versuchsmedium befüllt. Die inneren Kammern wurden zuerst mit einer berechneten Menge Versuchsmedium befüllt, anschließend mit dem berechneten Zellsuspensionsvolumen (200.000 Zellen/Well), so dass sich ebenfalls eine Gesamtmenge von 500 µl ergab. Die Reihenfolge der Befüllung ist von Bedeutung, da die Zellen in den Inserts sonst von dem später zugefügten Medium an den Rand des Inserts gespült worden wären. Außerdem musste bei der Befüllung der Inserts darauf geachtet werden, dass sich an der Membran keine Luftblasen bilden, die den Kontakt der Zellen zur ECM verhindern würden und eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Membranoberfläche nicht mehr zugelassen hätten. Die so befüllte Invasions-Kammer wurde 24 Stunden im Inkubator inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium aus den Inserts entfernt. Mit einem Wattestäbchen wurden die verbliebenen Zellen von der Membran-Oberseite abgeschabt. So erreichte man, dass nur die durch die Membran invadierten Zellen, die sich nun an der Membran-Unterseite befanden, fixiert, gefärbt und anschließend gezählt werden konnten.

Färben der invadierten Zellen

Die sich an der Membran-Unterseite befindlichen Zellen wurden mit Hemafix Färbelösung fixiert und gefärbt. Dabei wurden die Inserts zunächst für zwei Minuten in die farblose Fixierlösung, dann für zwei Minuten in die rote, eosinophile Färbelösung und anschließend für zwei Minuten in die blaue, basophile Färbelösung eingelegt. Danach erfolgte das Einlegen der Inserts in Aqua dest. für vier Minuten. Die Inserts wurden anschließend 15 Minuten an der Luft getrocknet. Danach wurde mit einem Skalpell vorsichtig die Membran aus dem Insert herausgeschnitten. Die Membran wurde mittels einer Pinzette mit der Membran-Unterseite, auf der sich nun die Zellen befanden, nach oben mit einem Tropfen Immersionsöl auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem weiteren Tropfen Immersionsöl mit einem Deckglas eingedeckt.

Auszählen der invadierten Zellen

Die Membranfläche ($0,3 \text{ cm}^2$) entspricht 100 Fotorechtecken (Axioverteinstellung für Fotoaufnahmen). Von jeder Membran eines Inserts wurden jeweils fünf Fotorechtecke von drei Personen unabhängig voneinander ausgezählt (Abbildungen 8 und 9). Die Auszählung erfolgte im Auflichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung.

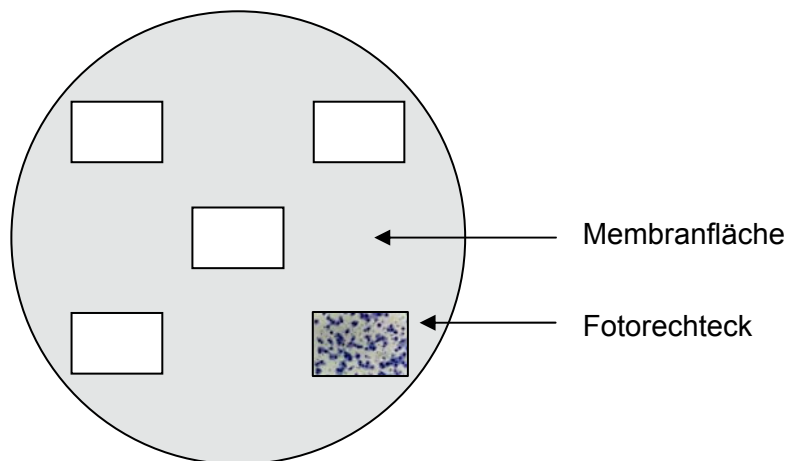


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Membran eines Inserts mit fünf auszählenden Fotorechtecken

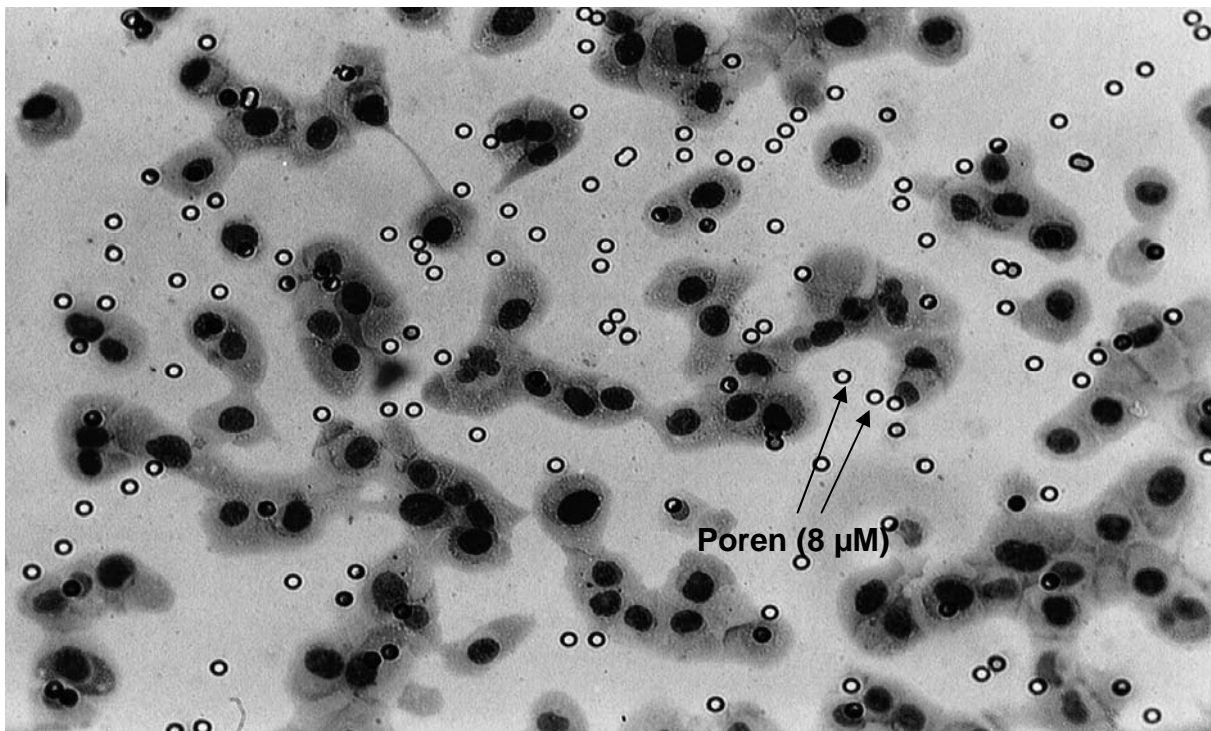


Abbildung 9: Membranunterseite, Zelllinie DU145, Vorinkubation mit $50 \mu\text{M}$ 13cRA für 120 Stunden, Dauer Invasionsassay 24 Stunden, 20-fache Vergrößerung

Von je fünf ausgezählten Rechtecken wurde der Mittelwert gebildet und dieser mit 100 multipliziert. Damit erhielt man die Anzahl der Zellen, welche pro Membran invadiert waren. Diese Anzahl wurde zu der in die Inserts eingesetzten Zellzahl ins Verhältnis gesetzt und man erhielt die prozentuale Angabe der invadierten Zellen.

Für jede Retinoidkonzentration, sowie die jeweiligen Kontrollen, wurden jeweils drei Inserts gleichzeitig angesetzt und jeder Versuch zu drei unabhängigen Zeitpunkten durchgeführt.

3.4.3. Elektronenmikroskopie

Die Untersuchung der Zellen im Rahmen der Invasivitätsversuche mittels Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Heinzmann und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Gesellschaft für Strahlenschutz und Umweltforschung (GSF)/Neuherberg bei München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Höfler).

3.5. Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Stefan Wagenpfeil vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München.

Zur Bearbeitung der Dosis-Wirkungskurven wurden folgende Parameter berechnet: Mittelwert (MV), Standardabweichung (SD), 95%-Konfidenzwert (95%-KW) sowie das 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) mit dessen jeweiligen Ober- und Untergrenzen. Der Vergleich der Ergebnisse mit den korrespondierenden unbehandelten Kontrollen erfolgte zelllinien- und retinoidspezifisch mittels t-Test für unverbundene Stichproben bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mittels des Statistikprogrammes SPSS (Version 10.0).

Ein MATLAB-basiertes Computerprogramm wurde entwickelt, welches mittels einer logistischen 4-Parameter Regression die Bestimmung der X-Werte (Konzentrationen) und deren 95%-Konfidenzintervalle für definierte Y-Werte ermöglicht (Wagenpfeil 2000). Den hierbei wichtigsten Wert stellte der IC50-Wert dar. Dabei handelt es sich um die Konzentration einer Substanz, welche den zu beobachtenden Effekt, hier die Invasionsfähigkeit, auf 50% der unbehandelten Kontrolle senkt.

Der Vergleich der ermittelten IC50-Werte erfolgte zelllinien- und retinoidspezifisch mittels t-Test für unverbundene Stichproben bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, ebenfalls mittels des Statistikprogrammes SPSS (Version 10.0).

4. Ergebnisse

4.1. Ermittlung der optimalen Zellzahl pro Well und Dauer des Invasionsassays

Zunächst erfolgte für jede der Zelllinien die Bestimmung der optimalen Expositionszeit mit den Retinoiden. Diese Vor-Inkubationszeit wurde für die Linie LNCaP mit 144 Stunden (6 Tage) und für die Linie DU145 und PC3 mit 120 Stunden (5 Tage) bestimmt (Treiber 2002).

Als optimale Versuchszeit, d.h. Dauer des Invasionsassays wurden in den Linien DU145 und PC3 24 Stunden bestimmt.

Aufgrund einer möglicherweise unterschiedlichen Invasivität der Zelllinien wurde in separaten Versuchsansätzen die optimale Zellzahl pro Well bei einer Invasionszeit von 24 Stunden bestimmt. Dabei wurden für die Linien DU145 und PC3 200.000 Zellen/Well als optimale Zellzahl/Well ermittelt. In der Linie LNCaP wurden im Mittel 3-17 Zellen pro Zählfeld beobachtet, dies entsprach 0,2-0,4% der eingesetzten Zellen. Trotz höherer Zellzahlen/Well und längerer Dauer des Invasionsassays (bis 72 Stunden) war die Anzahl invadierter Zellen der Linie LNCaP nicht wesentlich erhöht. Auf Grund der nicht möglichen statistischen Auswertbarkeit bei solch geringen Zellzahlen invadierter Zellen waren keine Versuche mit Zellen der Linie LNCaP mit Retinoiden sinnvoll durchführbar. Als Ursache hierfür könnte die ausgeprägte Clusterbildung in der Zellkultur sowie im Vergleich zu den Zelllinien DU145 und PC3 vermehrte Ausbildung von Desmosomen angesehen werden (Abbildung 36).

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Ermittlung der optimalen Zellzahl pro Well im Normalmedium (5% FKS) ohne Retinoidzugabe zusammengefasst dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte absolut (MV abs) und in Prozent (MV %) sowie die korrespondierenden 95%-Konfidenzwerte (95%-KW).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10-12 grafisch dargestellt.

		Zellzahl/Well				
		50.000	100.000	200.000	400.000	800.000
LNCaP	MV abs	-	2,47	8,07	13,40	16,93
	MV %	-	0,25	0,40	0,34	0,21
	95%-KW	-	1,55	2,46	4,83	7,84
DU145	MV abs	27,80	27,30	70,93	69,93	-
	MV %	5,56	2,73	3,55	1,75	-
	95%-KW	3,95	5,06	12,44	8,27	-
PC3	MV abs	24,37	66,00	171,43	165,30	-
	MV %	4,87	6,60	8,57	4,13	-
	95%-KW	7,47	14,16	21,06	17,12	-

-: nicht untersucht

Tabelle 9: Invasionsverhalten der Prostatakarzinom-Zelllinien in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl pro Well (95%-KW: 95%-Konfidenzwert)

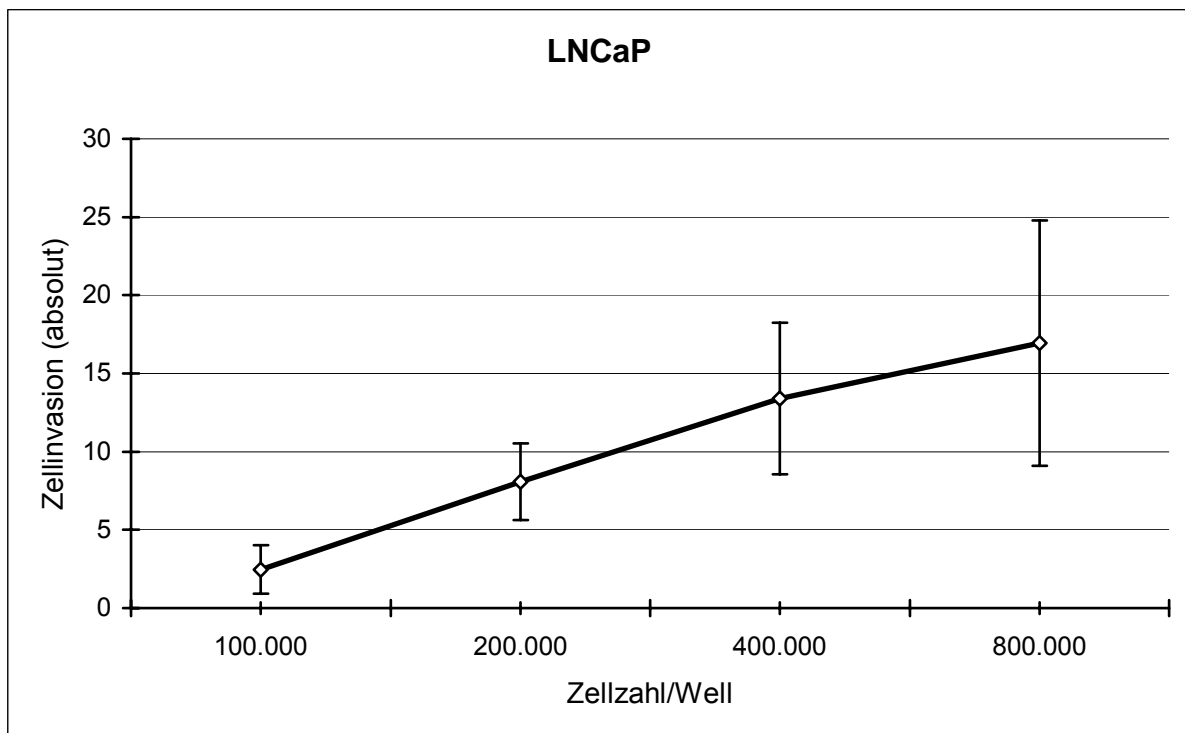


Abbildung 10: Bestimmung der optimalen Zellzahl/Well in der Zelllinie LNCaP

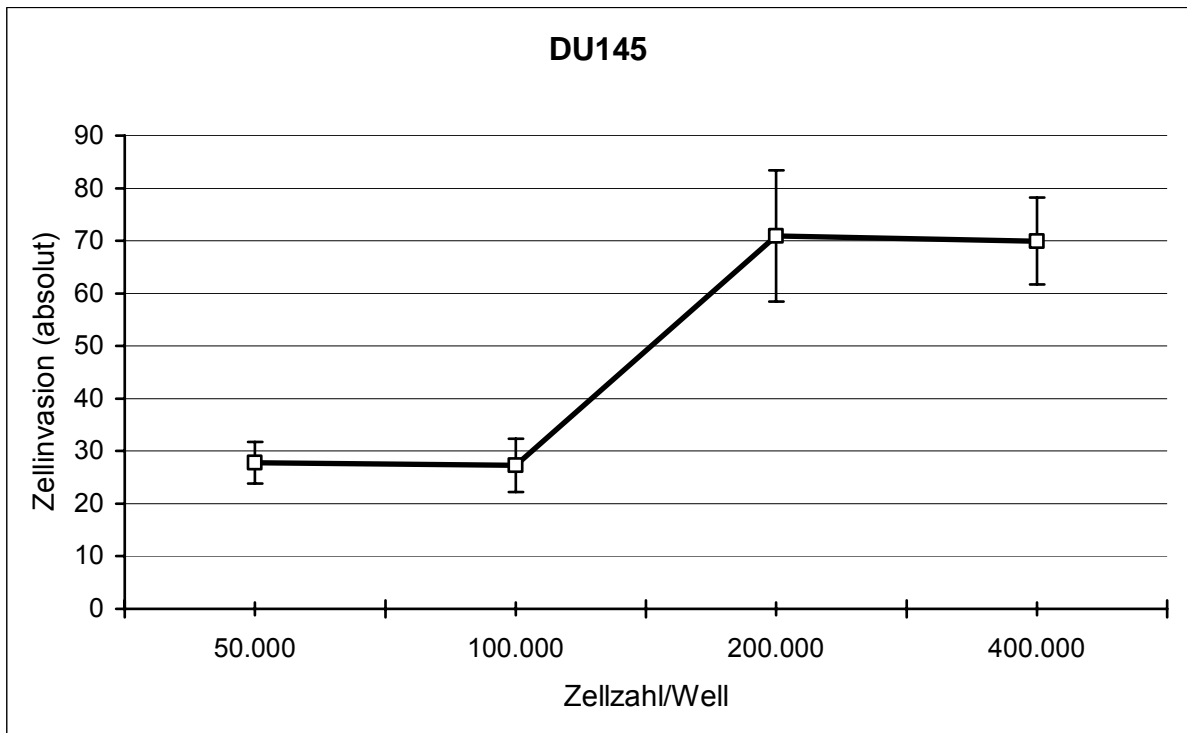


Abbildung 11: Bestimmung der optimalen Zellzahl/Well in der Zelllinie DU145

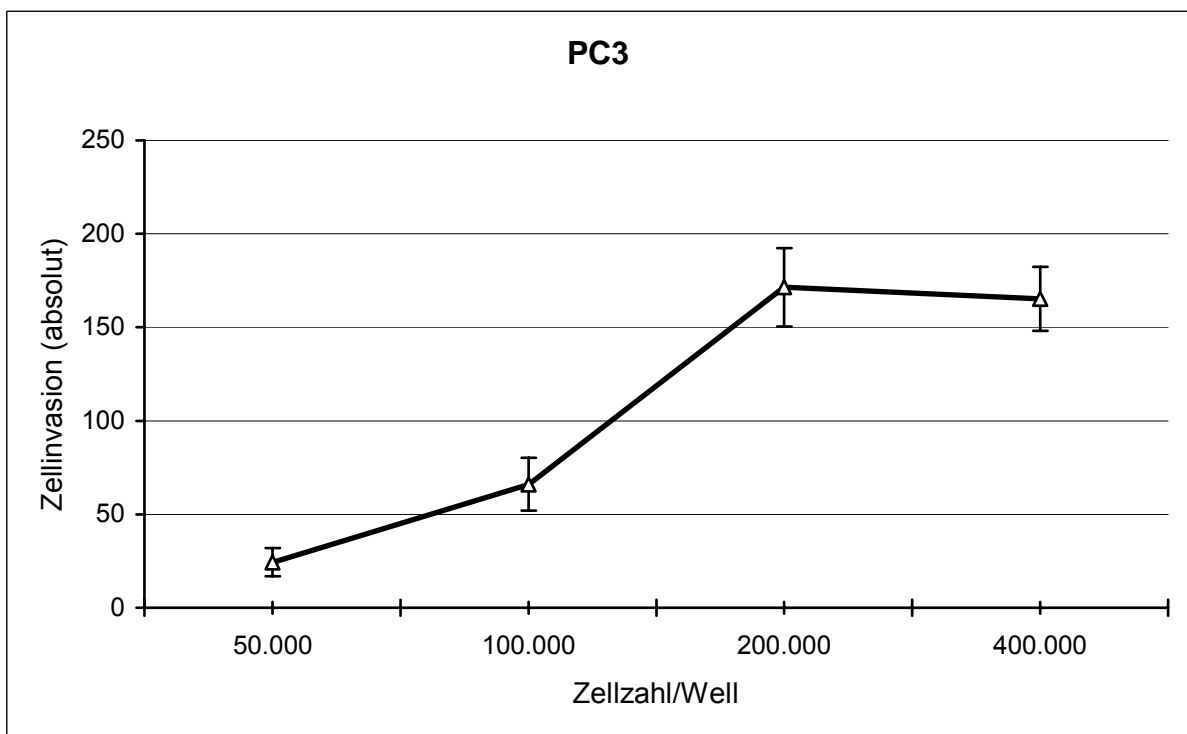


Abbildung 12: Bestimmung der optimalen Zellzahl/Well in der Zelllinie PC3

4.2. Modulation der Invasionsfähigkeit durch Retinoide in den Zelllinien DU145 und PC3

Unter dem Retinoid 13cRA fand sich eine zelllinienspezifisch unterschiedliche Modulation des Invasionsverhaltens.

In der Linie DU145 fand sich im Konzentrationsbereich 20-60 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Stimulation der Zellinvasion (Maximum 190% bei 20 μM) und ab $\geq 65 \mu\text{M}$ deren signifikante Inhibition (Minimum 48% bei 75 μM).

In der Linie PC3 fand sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Stimulation der Zellinvasion ab einer Konzentration von $\geq 5 \mu\text{M}$. Im Konzentrationsbereich von 20-30 μM wurde hierbei ein Maximum von 270-284% erreicht. Im Konzentrationsbereich von 60-75 μM trat im Vergleich zum Maximum wieder eine signifikante Inhibition auf. Allerdings lagen die dabei erreichten Werte signifikant oberhalb der unbehandelten Kontrollen.

Unter dem Retinoid 4-HPR zeigte sich in beiden Linien eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellinvasivität. Dabei nahm die Invasivität mit zunehmender 4-HPR Konzentration kontinuierlich ab. In der Zelllinie DU145 wurde unter 10 μM 4-HPR eine Abnahme der Invasionsfähigkeit auf ein Minimum von 8% beobachtet. Bei Zellen der Linie PC3 betrug unter 10 μM 4-HPR das Minimum der Invasionsfähigkeit ebenfalls 8%.

In den Tabellen 10 und 11 sind die Ergebnisse der Effekte der Retinoide 13cRA und 4-HPR auf die Invasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3 in Normalmedien (5% FKS) zusammengefasst. Angegeben sind Mittelwerte (MV abs und MV %) mit den dazugehörigen 95%-Konfidenzwerten (95%-KW).

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 bis 20 grafisch dargestellt.

13cRA (μ M)	DU145				PC3			
	MV abs	95%-KW	MV %	95%-KW	MV abs	95%-KW	MV %	95%-KW
0	216,57	17,58	100,00	8,12	89,55	11,53	100,00	12,88
0,1	201,70	19,97	93,13	9,22	83,60	10,68	93,35	11,93
1	229,93	19,99	106,17	9,23	86,54	10,72	96,64	11,97
5	212,13	26,89	97,95	12,42	111,78	10,17	124,83	11,35
10	204,90	24,59	94,61	11,36	198,14	14,09	221,26	15,74
20	411,23	44,90	189,88	20,73	241,39	14,24	269,56	15,90
30	338,17	32,79	156,15	15,14	253,98	13,42	283,61	14,99
50	287,23	27,65	132,63	12,77	218,60	13,59	244,11	15,17
60	279,30	23,04	128,97	10,64	139,89	10,67	156,22	11,92
65	169,40	21,67	78,22	10,01	126,80	14,22	141,60	15,88
70	155,47	10,66	71,79	4,92	138,22	17,25	154,35	19,26
75	103,80	10,73	47,93	4,95	124,72	10,49	139,27	11,72

abs: absolute Zellzahl, 95%-KW: 95%-Konfidenzwert

Tabelle 10: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC3 unter dem Retinoid 13cRA

4-HPR (μ M)	DU145				PC3			
	MV abs	95%-KW	MV %	95%-KW	MV abs	95%-KW	MV %	95%-KW
0	116,34	11,93	100,00	10,25	106,53	9,87	100,00	9,26
0,01	115,85	12,85	99,58	11,04	99,87	9,22	93,75	8,66
0,05	110,82	8,52	95,26	7,32	93,68	10,99	87,94	10,32
0,1	99,77	7,70	85,76	6,62	87,25	8,09	81,90	7,59
0,5	53,87	6,20	46,30	5,32	60,52	7,08	56,81	6,64
1	28,66	2,61	24,64	2,24	27,30	5,78	25,63	5,42
2	27,17	1,99	23,35	1,71	26,43	5,81	24,81	5,45
3	27,46	2,77	23,60	2,38	12,03	0,67	11,30	0,63
4	28,30	5,03	24,33	4,32	12,50	0,54	11,73	0,50
5	15,52	2,68	13,34	2,31	9,97	1,09	9,36	1,02
10	9,75	1,72	8,38	1,48	8,29	1,44	7,78	1,35

abs: absolute Zellzahl, 95%-KW: 95%-Konfidenzwert

Tabelle 11: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC3 unter dem Retinoid 4-HPR

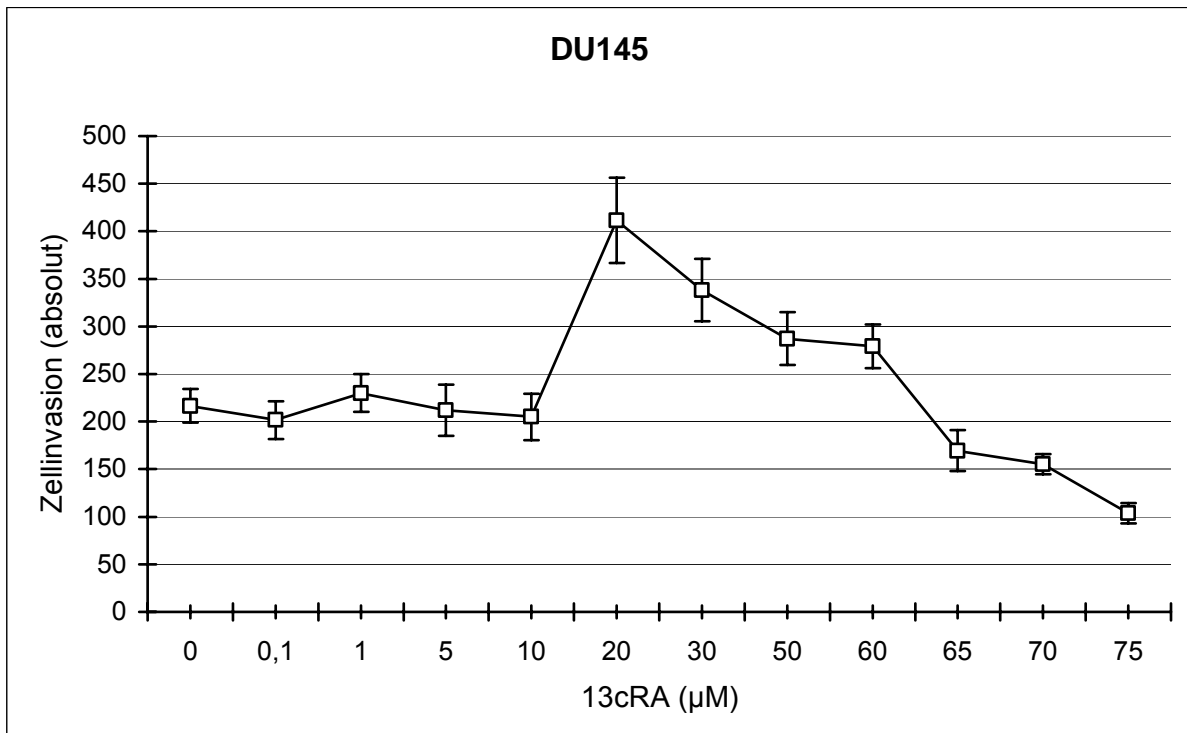


Abbildung 13: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 unter dem Retinoid 13cRA (Mittelwerte absolut und 95%-Konfidenzintervalle)

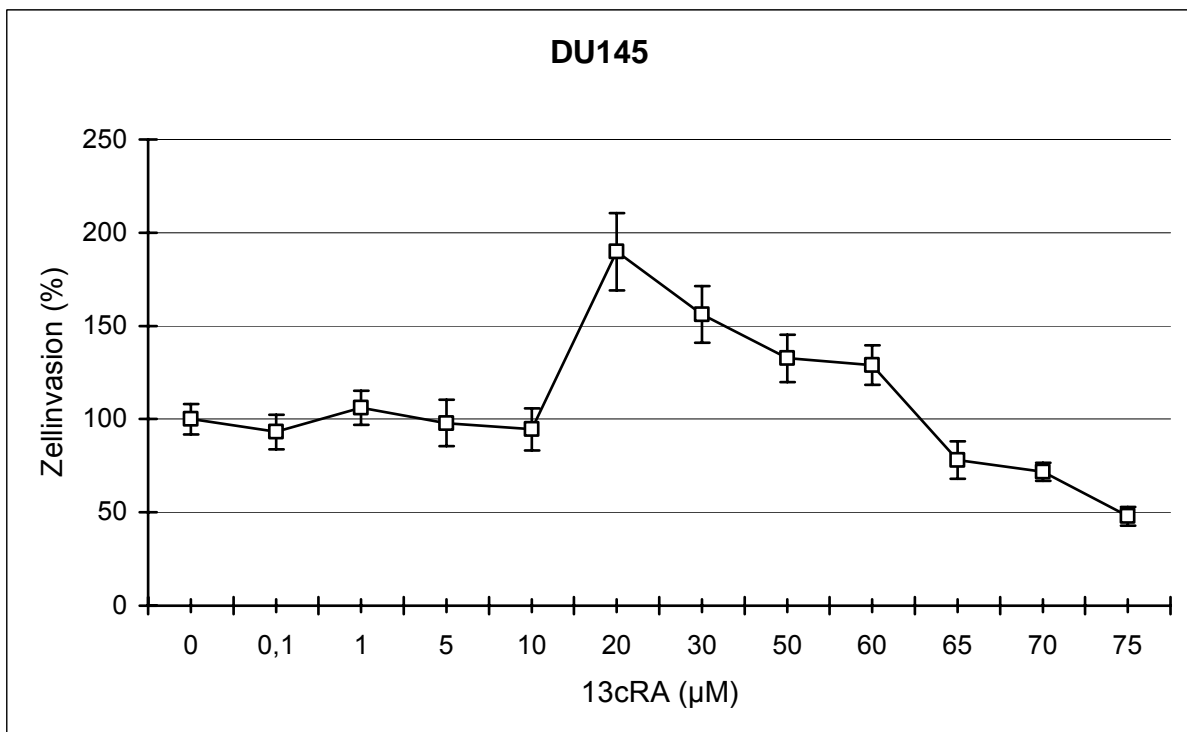


Abbildung 14: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 unter dem Retinoid 13cRA (Mittelwerte in % und 95%-Konfidenzintervalle)

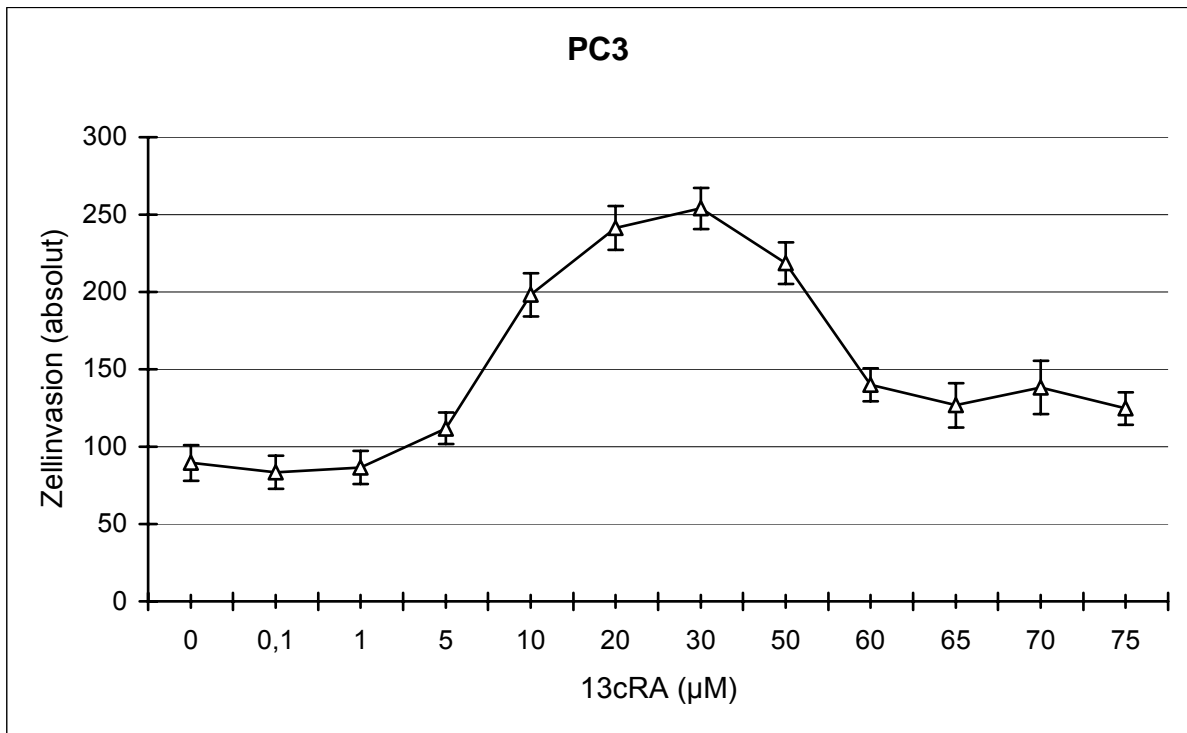


Abbildung 15: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 unter dem Retinoid 13cRA (Mittelwerte absolut und 95%-Konfidenzintervalle)

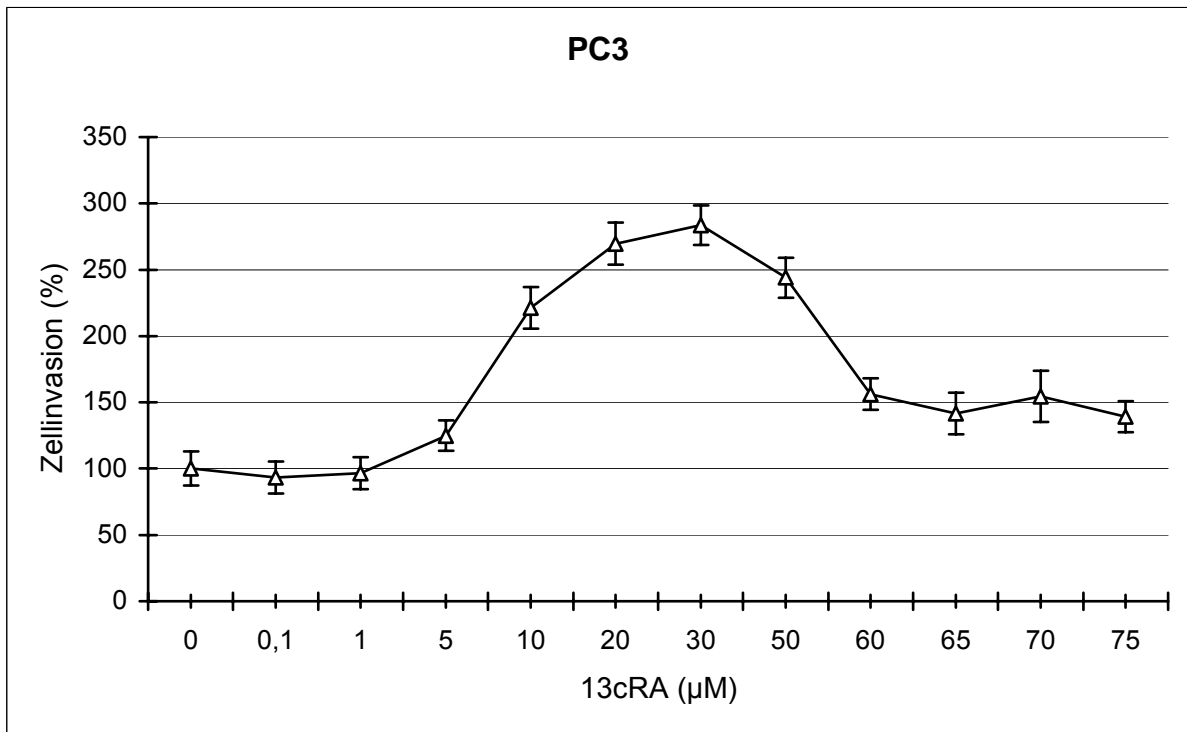


Abbildung 16: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 unter dem Retinoid 13cRA (Mittelwerte in % und 95%-Konfidenzintervalle)

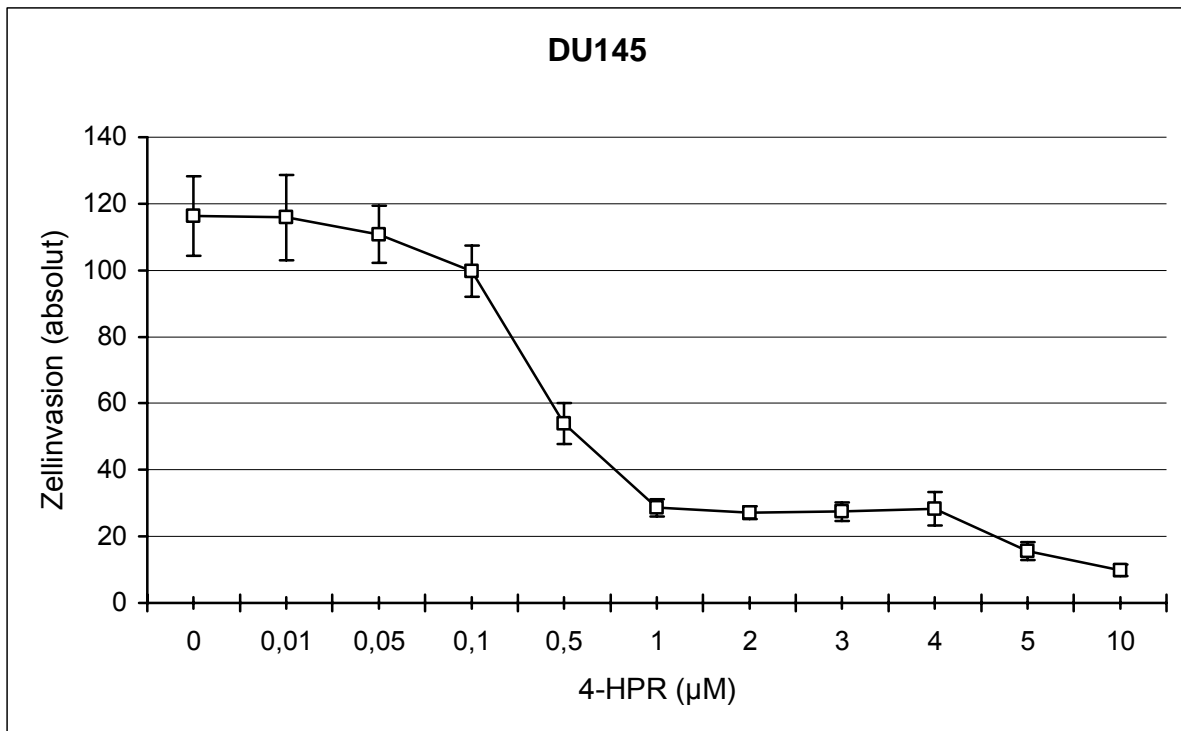


Abbildung 17: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 unter dem Retinoid 4-HPR (Mittelwerte absolut und 95%-Konfidenzintervalle)

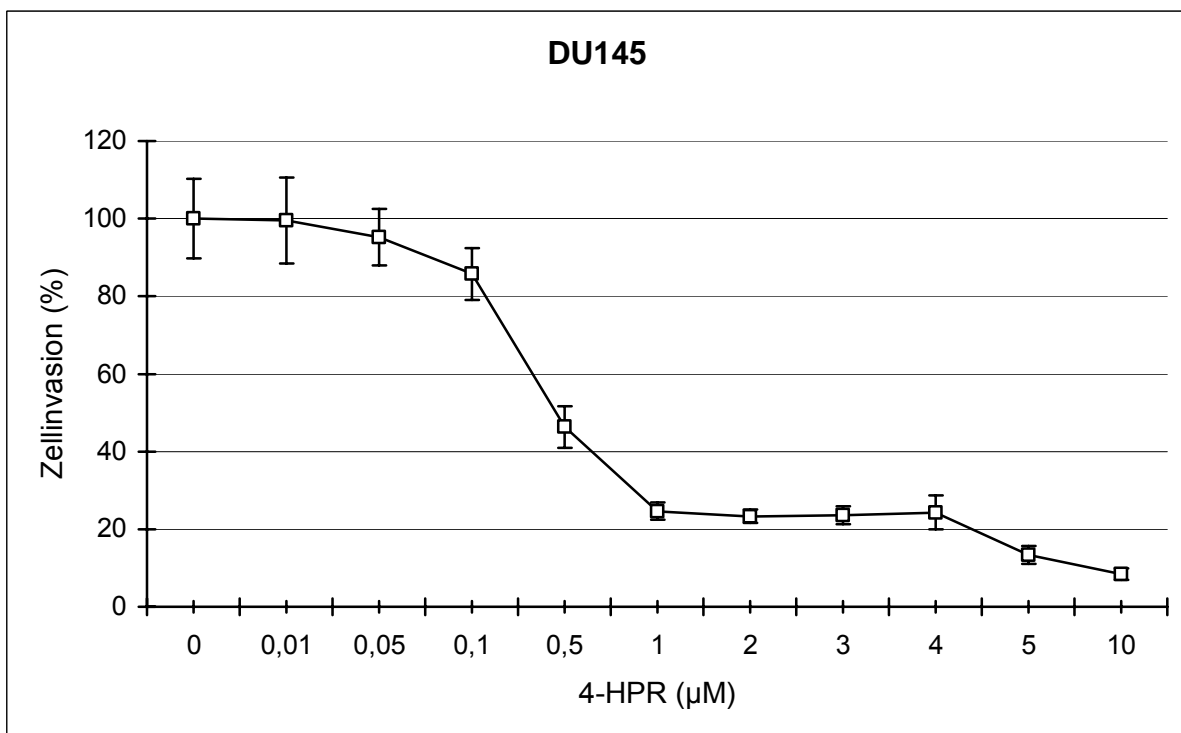


Abbildung 18: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 unter dem Retinoid 4-HPR (Mittelwerte in % und 95%-Konfidenzintervalle)

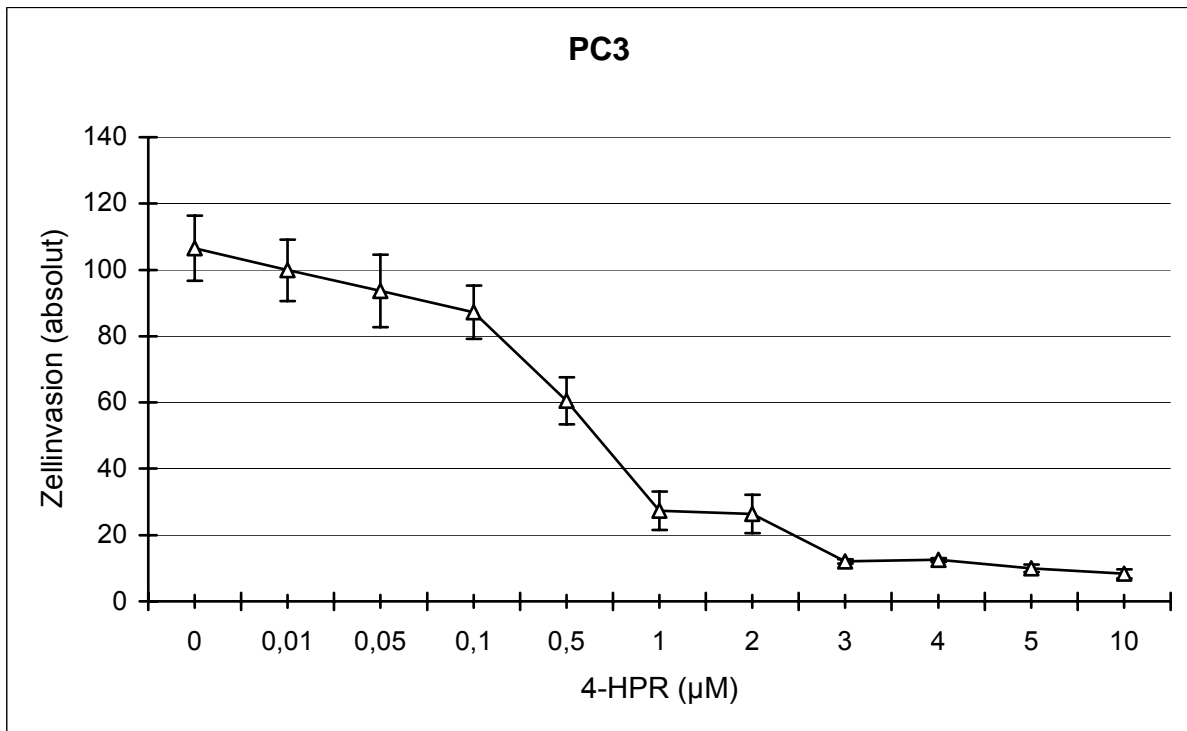


Abbildung 19: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 unter dem Retinoid 4-HPR (Mittelwerte absolut und 95%-Konfidenzintervalle)

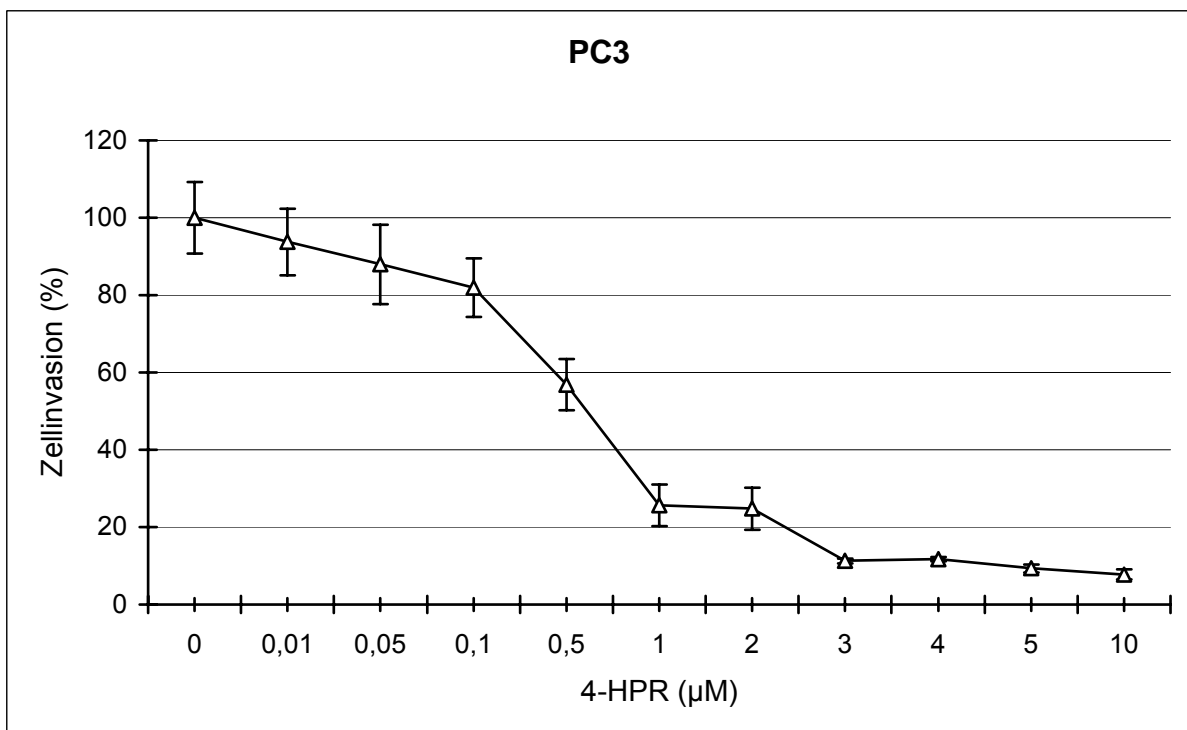


Abbildung 20: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 unter dem Retinoid 4-HPR (Mittelwerte in % und 95%-Konfidenzintervalle)

Aufgrund der ausschließlich hemmenden Wirkung des Retinoids 4-HPR in den Linien DU145 und PC3 und den daraus resultierenden sigmoiden Kurvenverläufen der Dosis-Wirkungs-Kurven war es nur für 4-HPR möglich, IC50-Werte zu berechnen. Hierbei handelte es sich um die Konzentration von 4-HPR, welche eine Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit um 50% bewirkte. Diese Berechnung erfolgte mittels logistischer 4-Parameter Regressionsanalyse (Abbildung 21 und 22). Die dabei bestimmten IC50-Werte betragen für die Linie DU145 0,40 μM (95%-Konfidenzintervall: 0,28-0,54 μM) und für die Linie PC3 0,54 μM (95%-Konfidenzintervall: 0,35-0,75 μM). Ein statistischer signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien DU145 und PC3 unter dem Retinoid 4-HPR fand sich hierbei nicht.

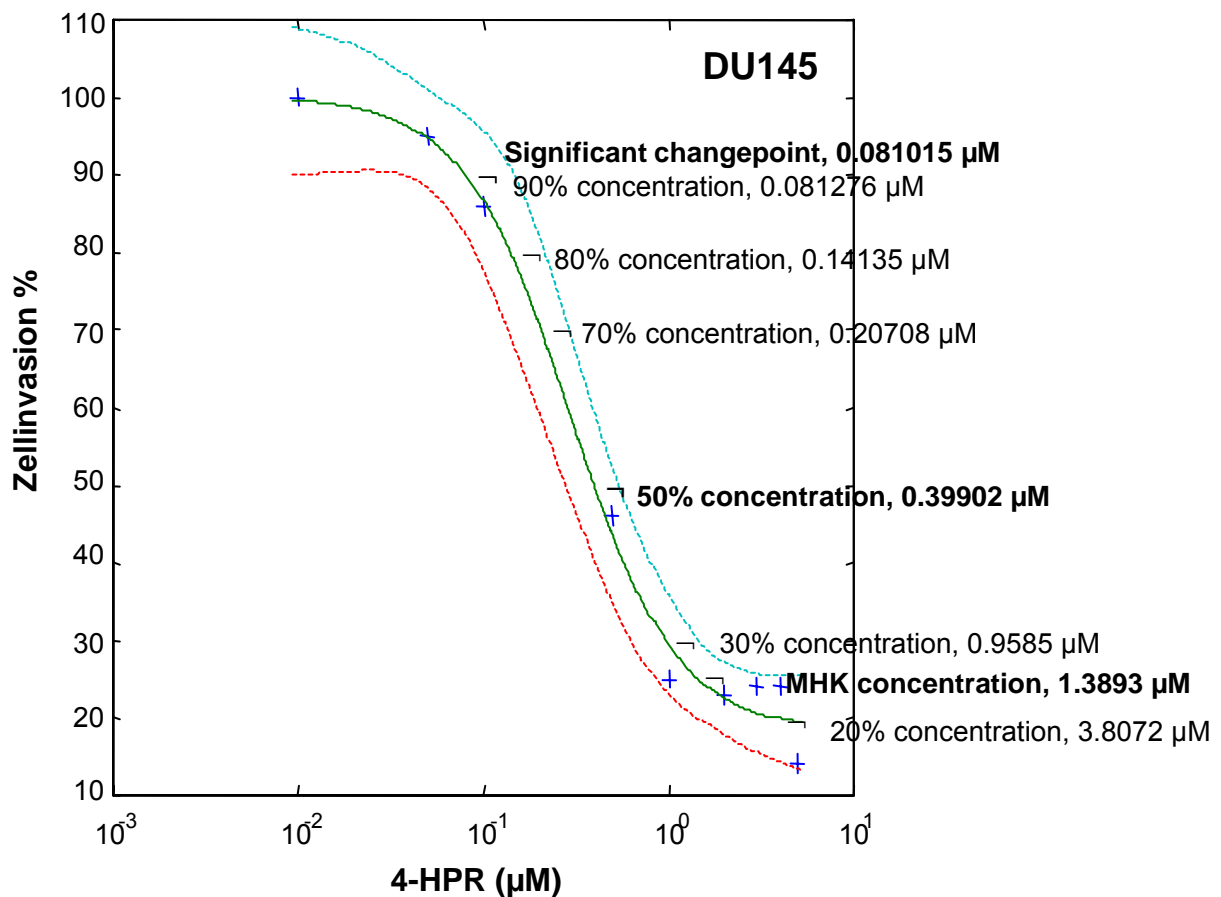


Abbildung 21: Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit der Linie DU145 unter dem Retinoid 4-HPR (Logistische 4-Parameter Regressionsanalyse mit Darstellung der Punktschätzwerte (SW) und 95%-Konfidenzintervalle)

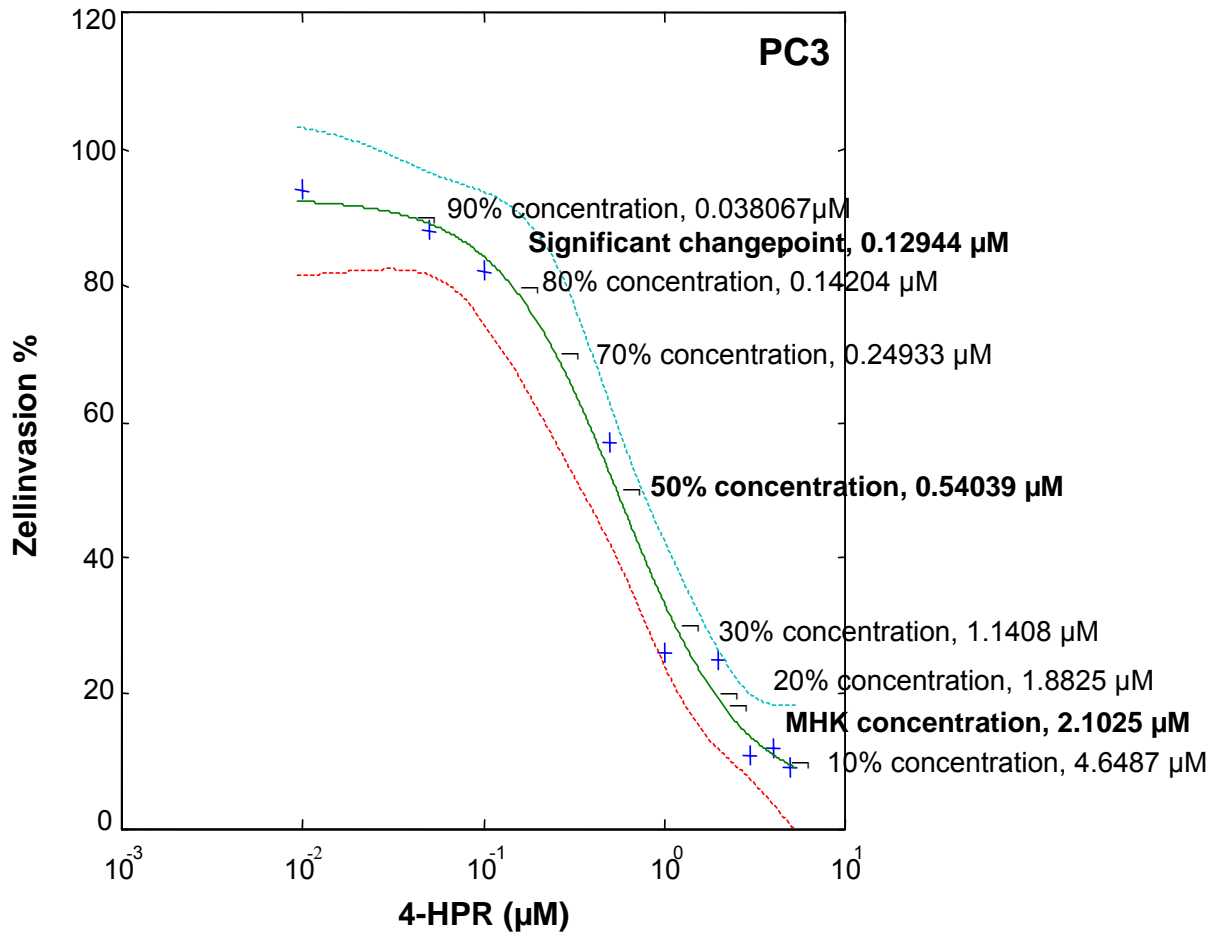


Abbildung 22: Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit der Linie PC3 unter dem Retinoid 4-HPR (Logistische 4-Parameter Regressionsanalyse mit Darstellung der Punktschätzwerte (SW) und 95%-Konfidenzintervalle)

4.3. Fotodokumentation

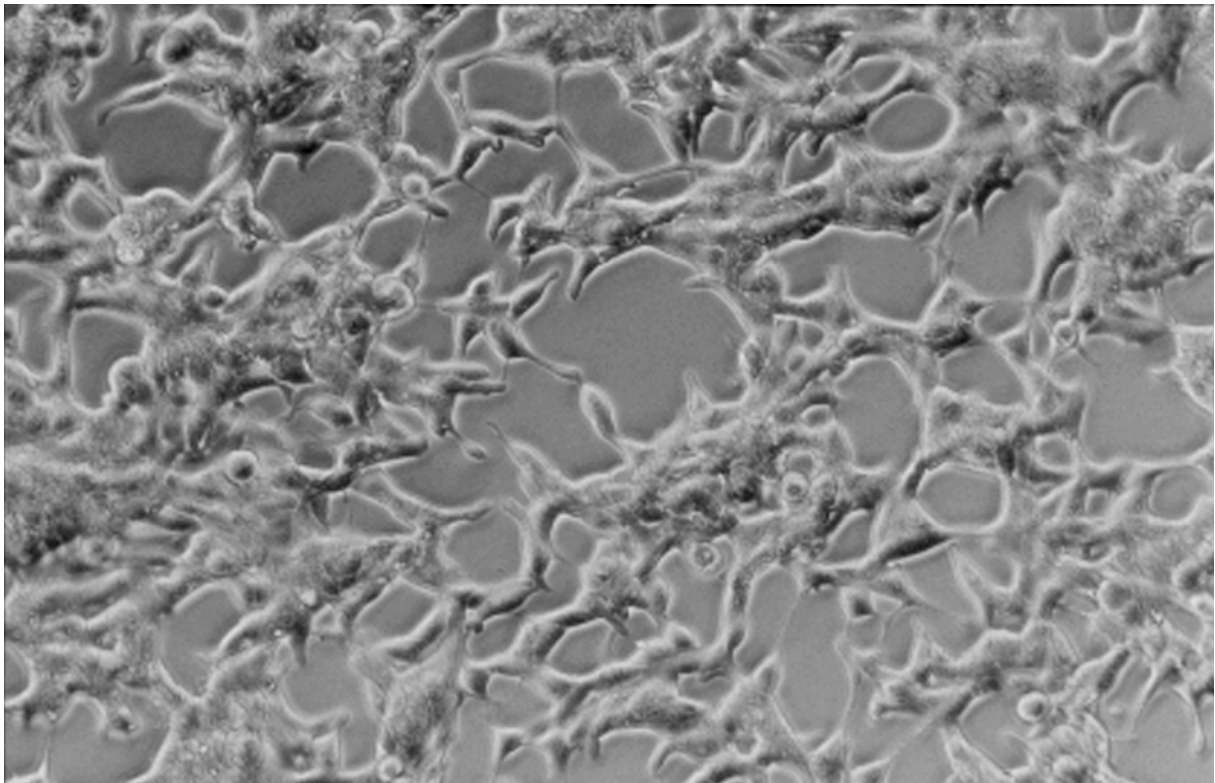


Abbildung 23: Zelllinie LNCaP, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)

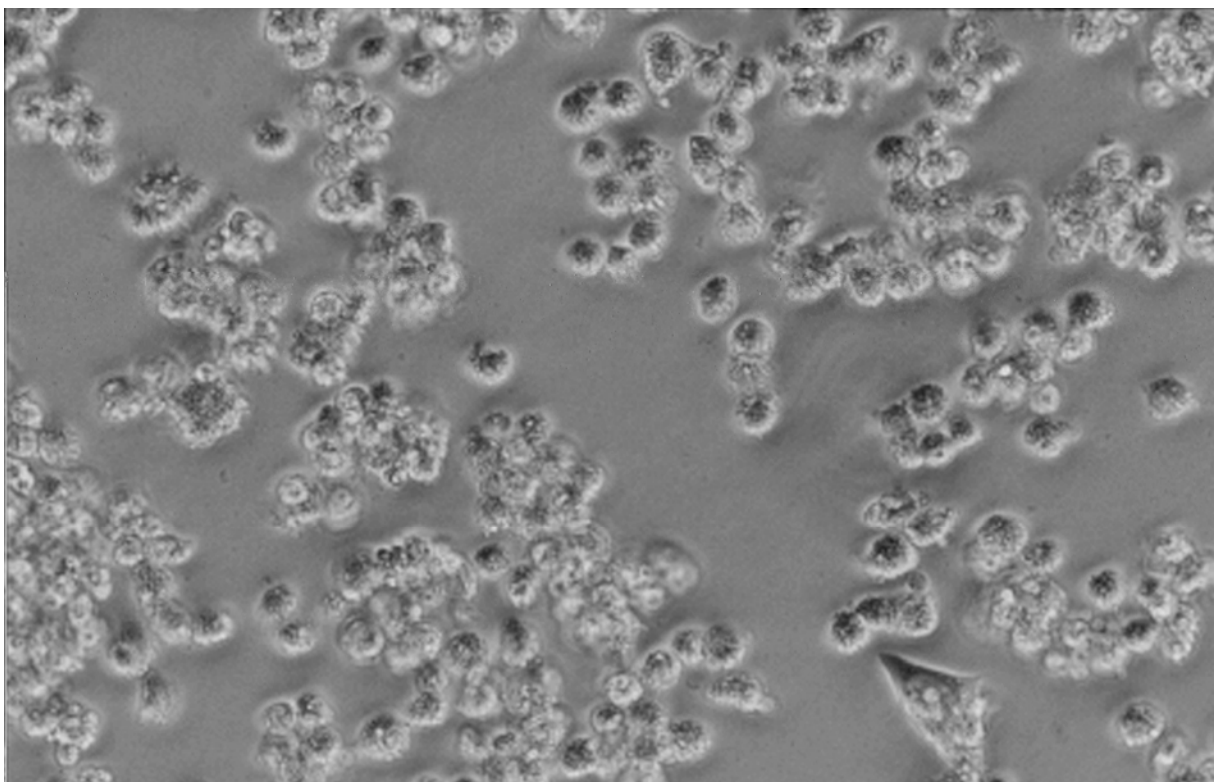


Abbildung 24: Zelllinie LNCaP, 120 Stunden, 5 µM 4-HPR (x320)

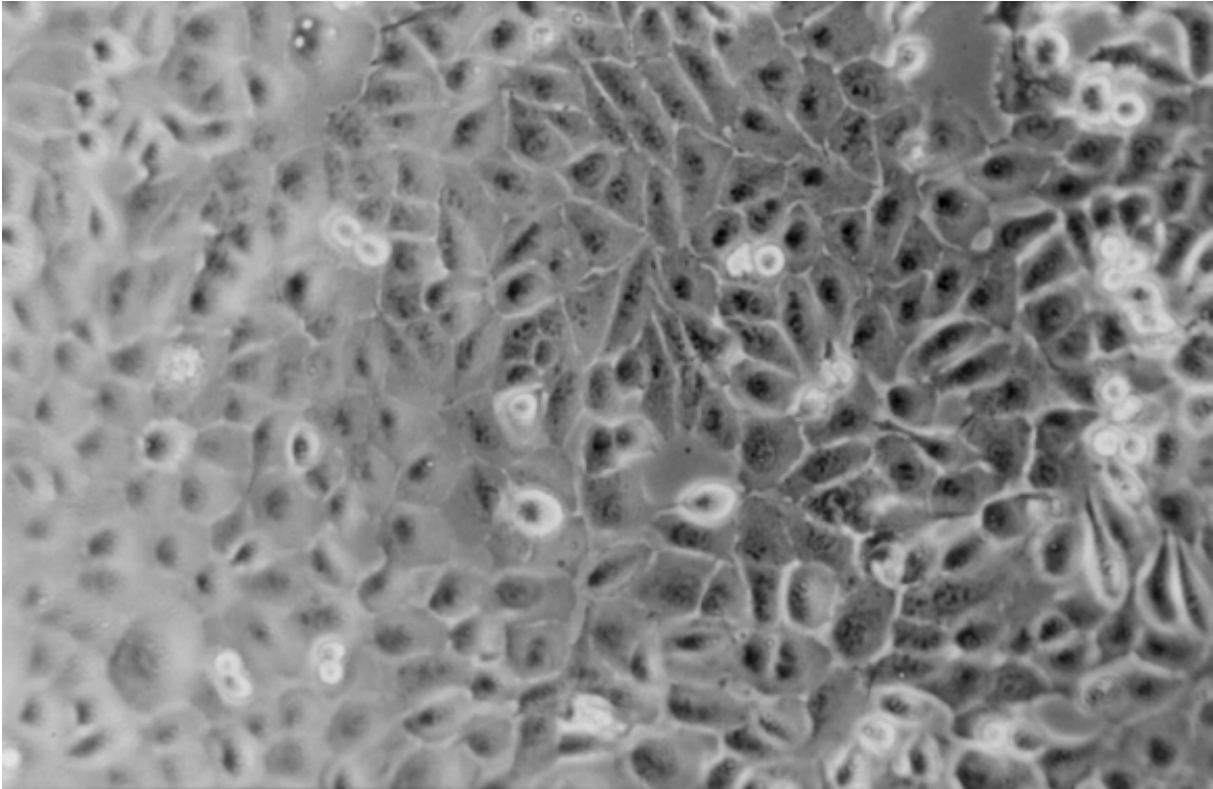


Abbildung 25: Zelllinie DU145, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)

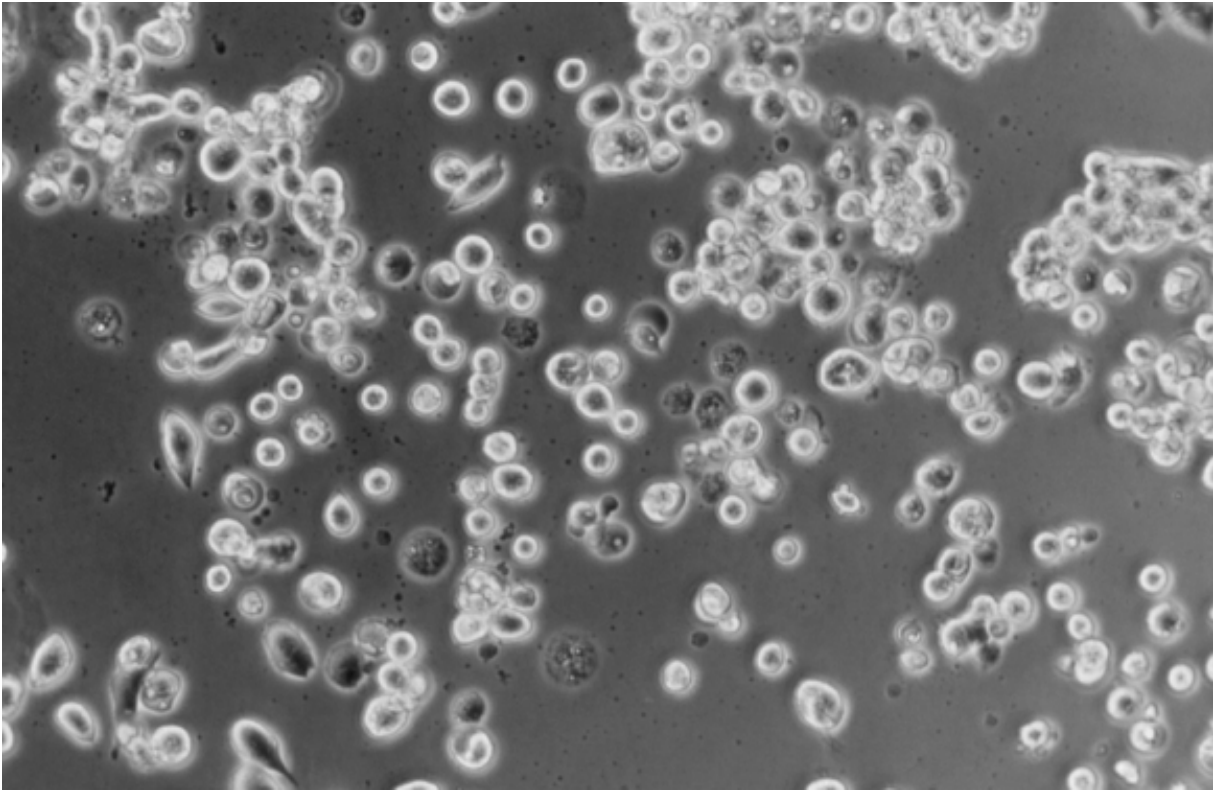


Abbildung 26: Zelllinie DU145, 120 Stunden, 5 μM 4-HPR (x200)

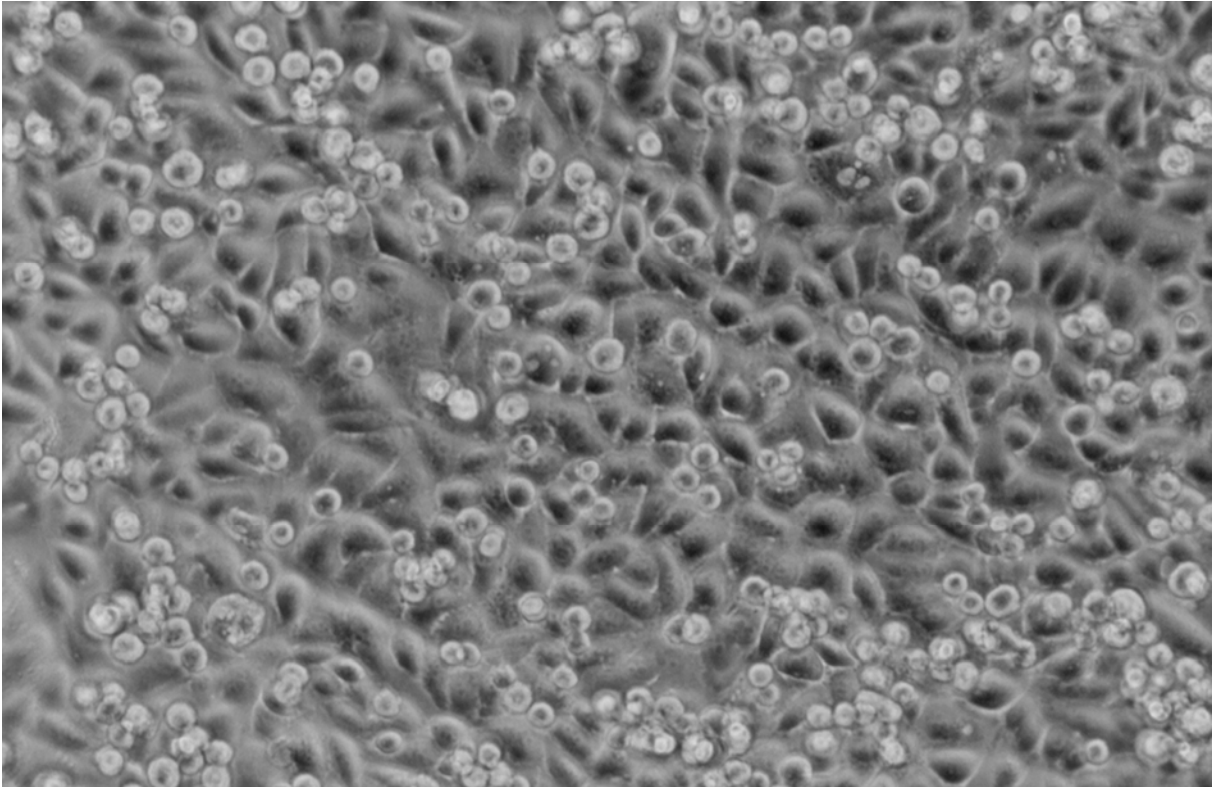


Abbildung 27: Zelllinie PC3, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)

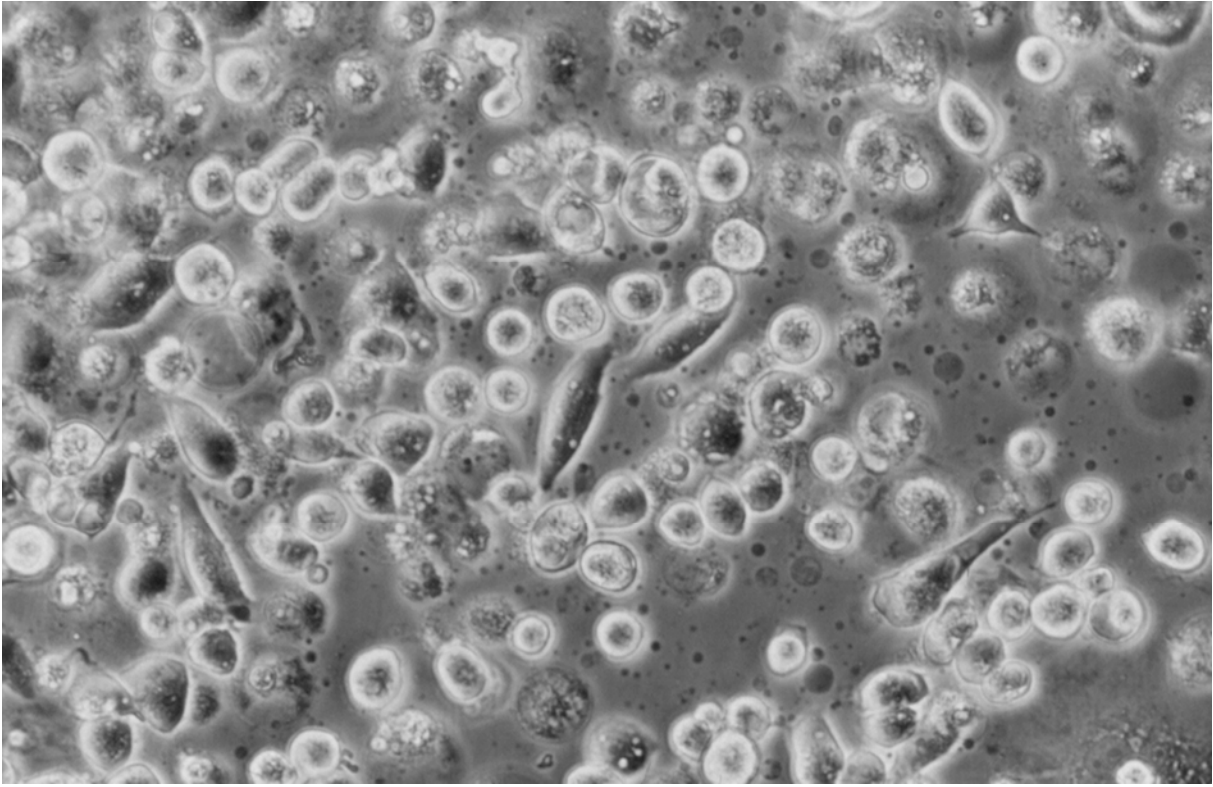


Abbildung 28: Zelllinie PC3, 120 Stunden, 5 µM 4-HPR (x320)

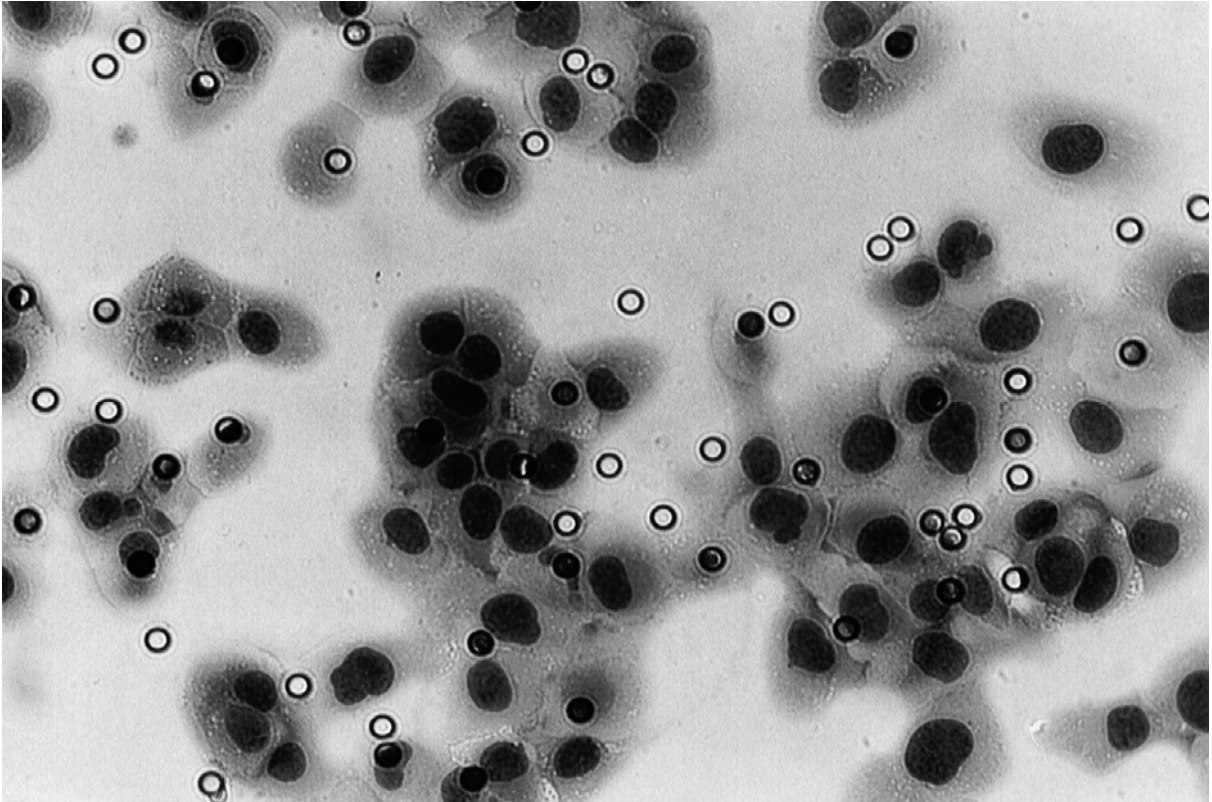


Abbildung 29: Zelllinie DU 145, 24 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide, Unterseite der ECM-Membran, Lichtmikroskopie (x320)

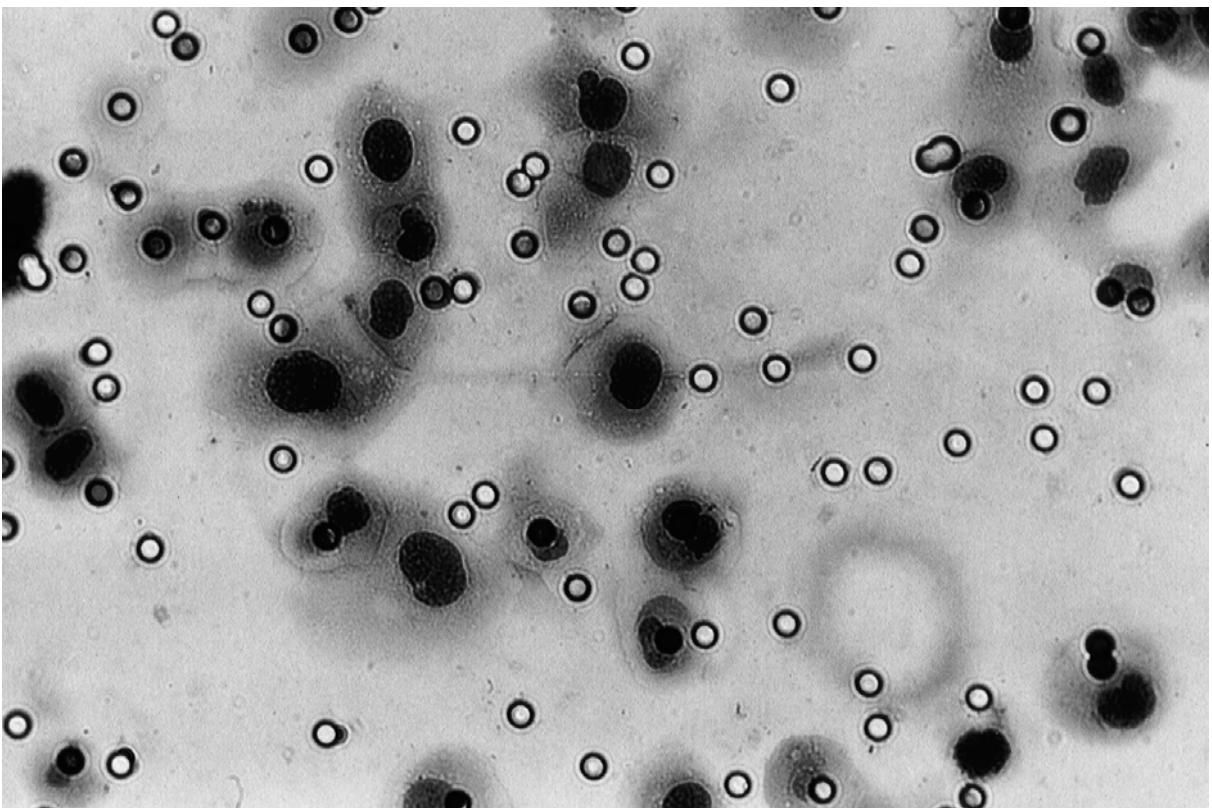


Abbildung 30: Zelllinie PC3, 24 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide, Unterseite der ECM-Membran, Lichtmikroskopie (x320)

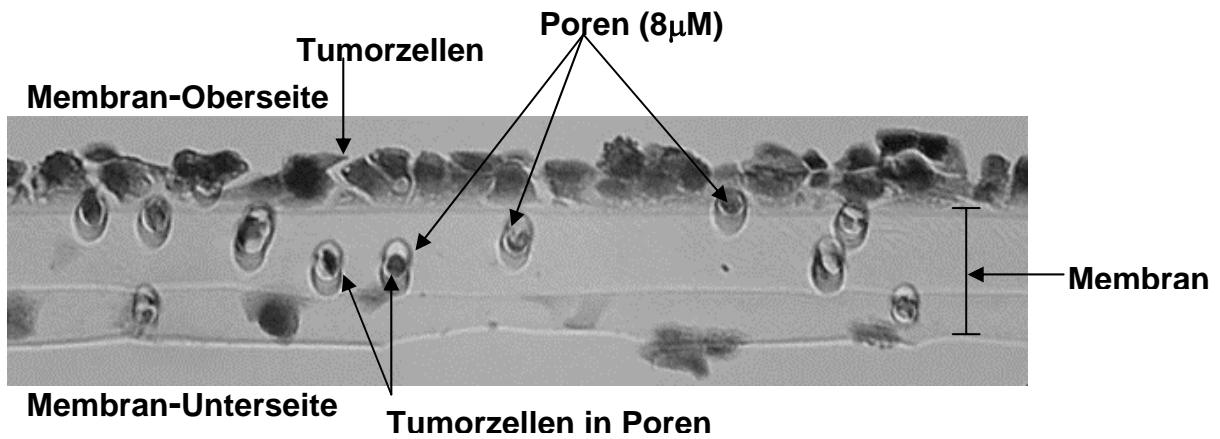


Abbildung 31: Seitenansicht der ECM-Membran, Zelllinie DU145, 24 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x320)

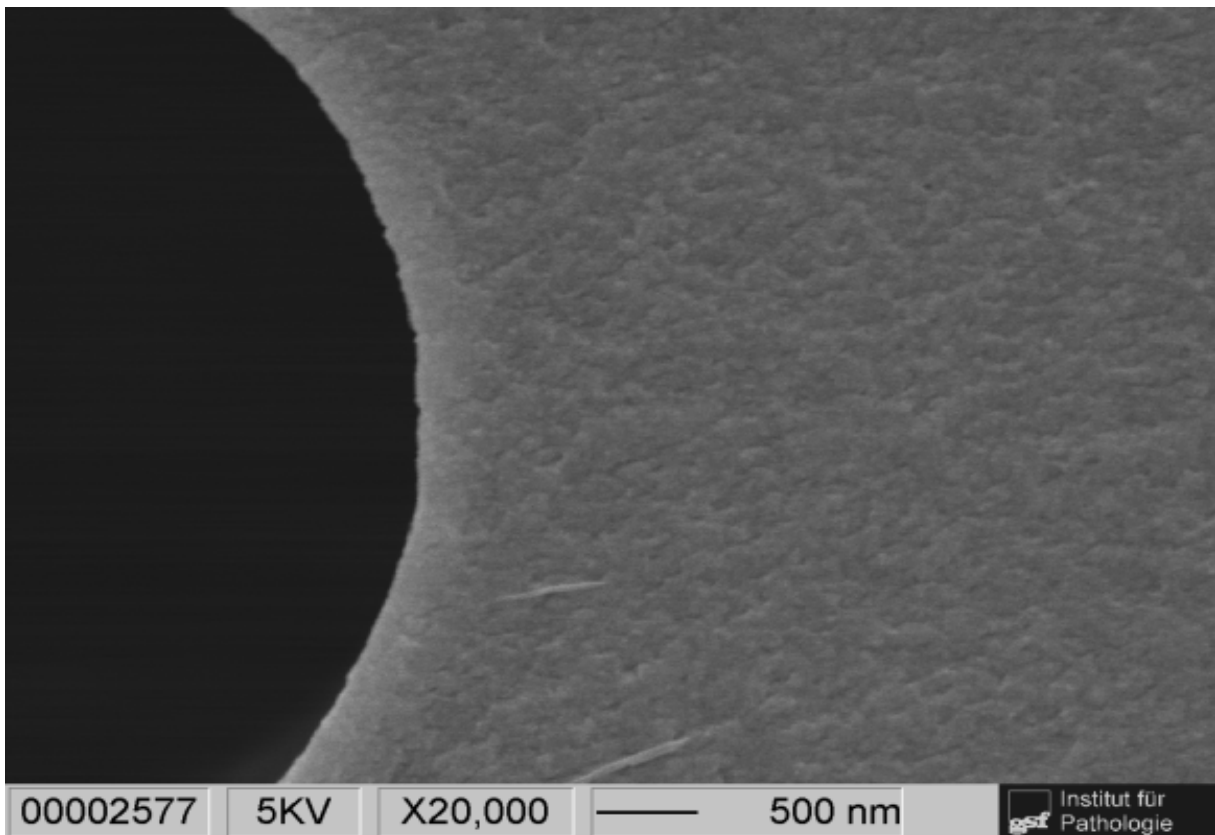


Abbildung 32: PET- Membran ohne ECM und ohne Zellen (REM, x20.000)

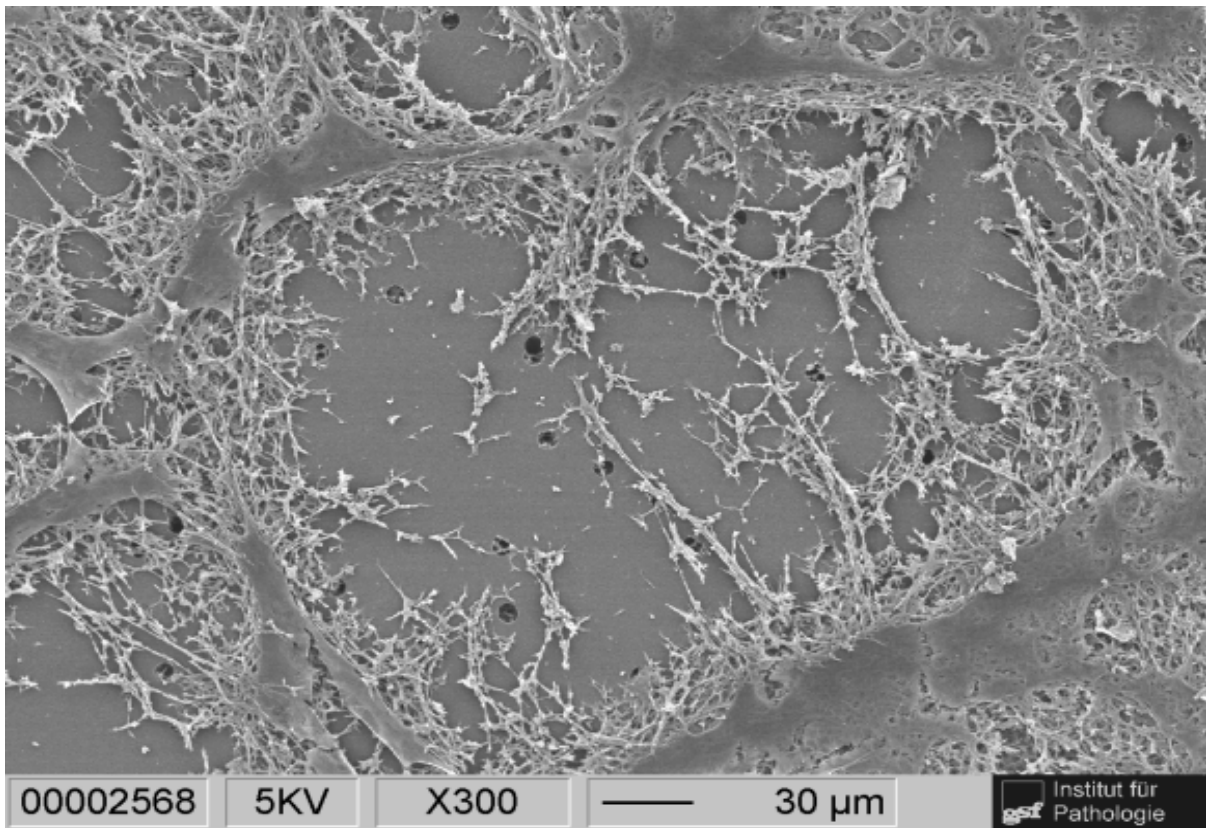


Abbildung 33: PET-Membran mit ECM ohne Medium und ohne Zellen (REM, x300)

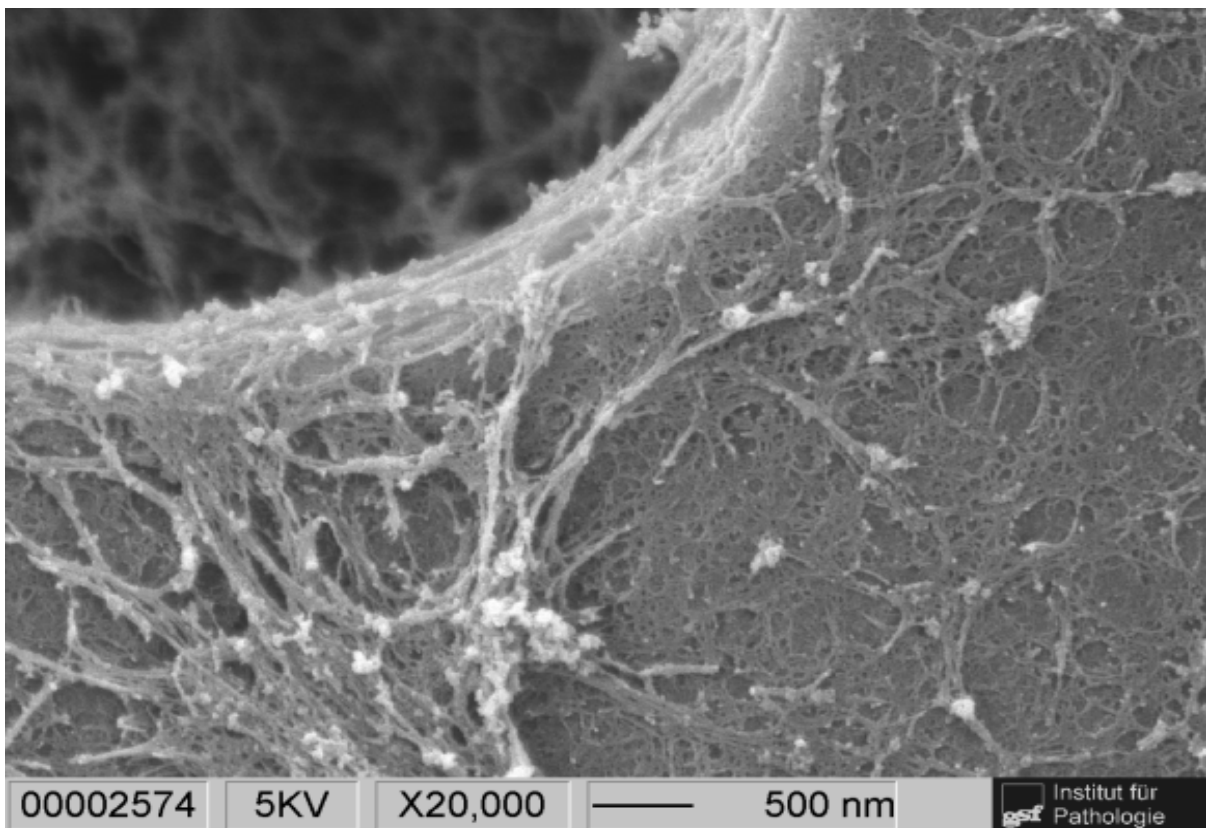


Abbildung 34: PET-Membran mit ECM ohne Medium und ohne Zellen (REM, x20.000)

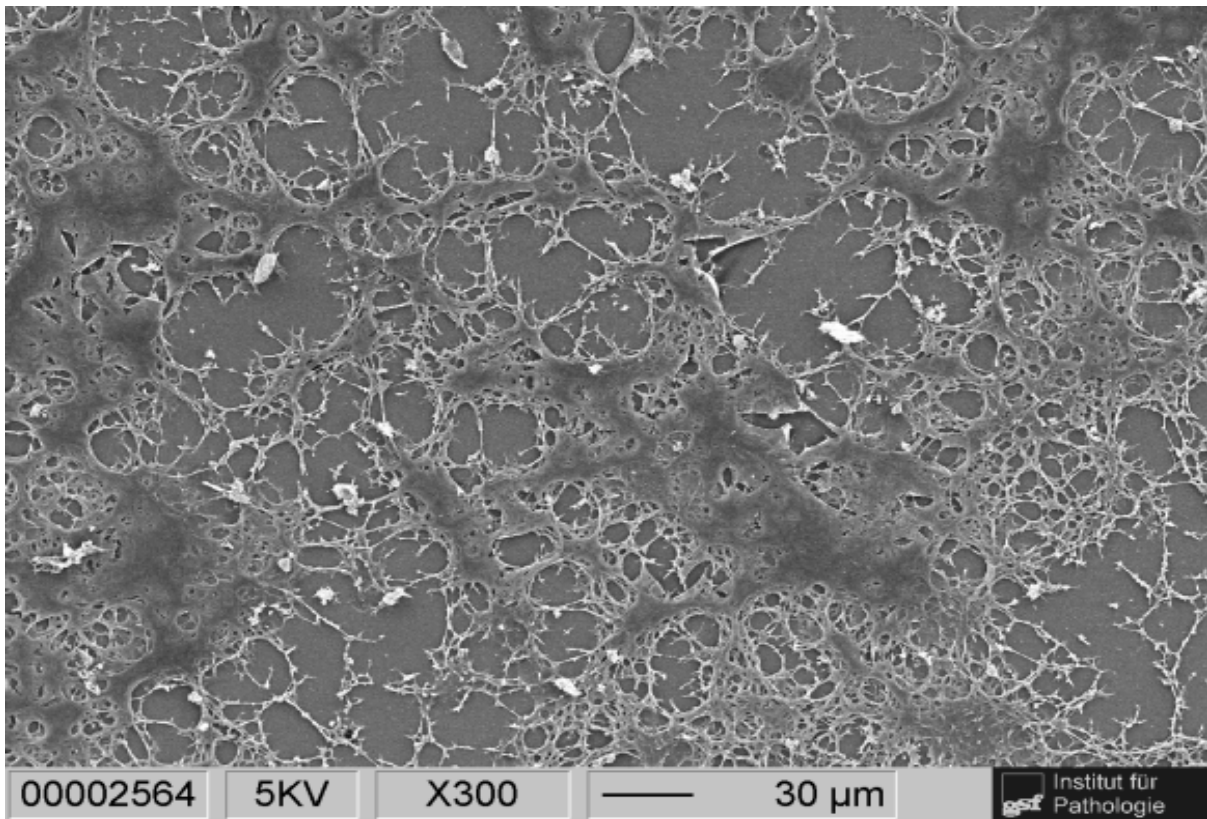


Abbildung 35: PET-Membran mit ECM, mit Medium und ohne Zellen (REM, x300)

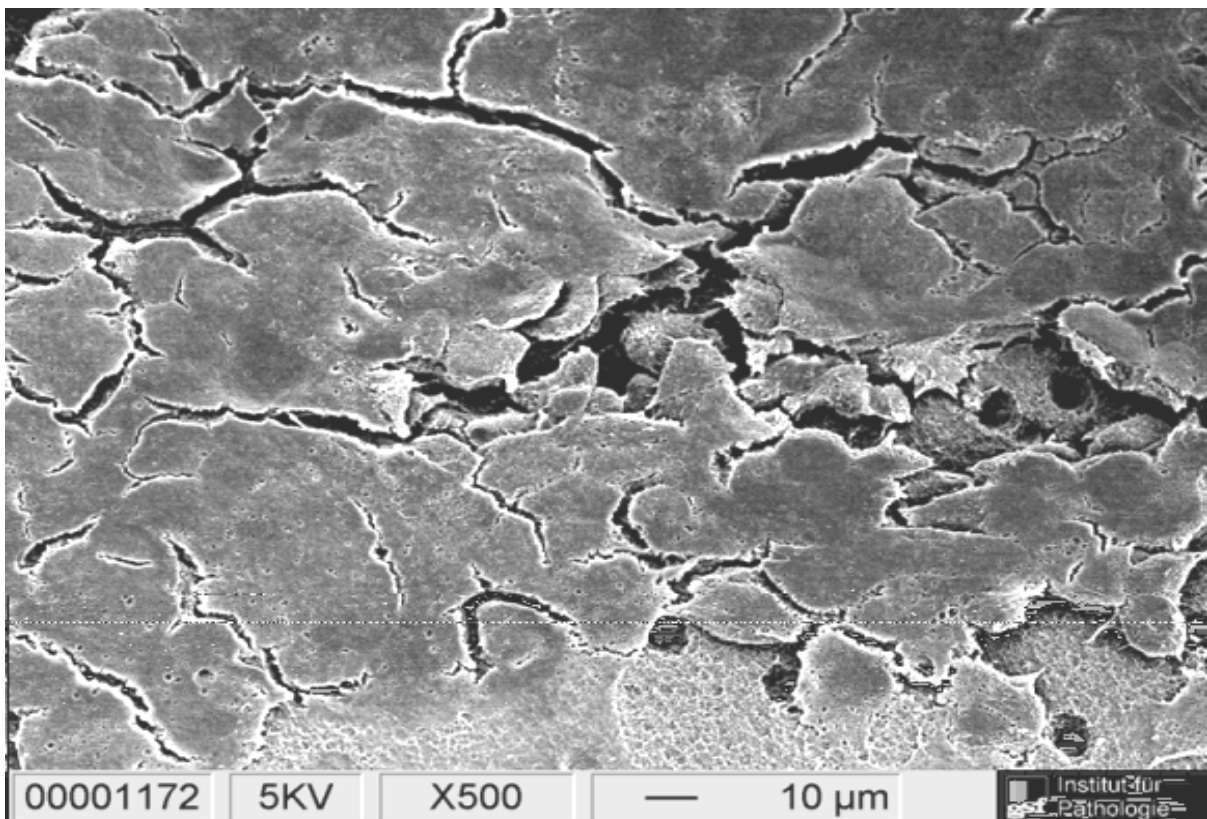


Abbildung 36: Zelllinie LNCaP, 7 Stunden, Membran-Oberseite: Clusterbildung (REM, x500)

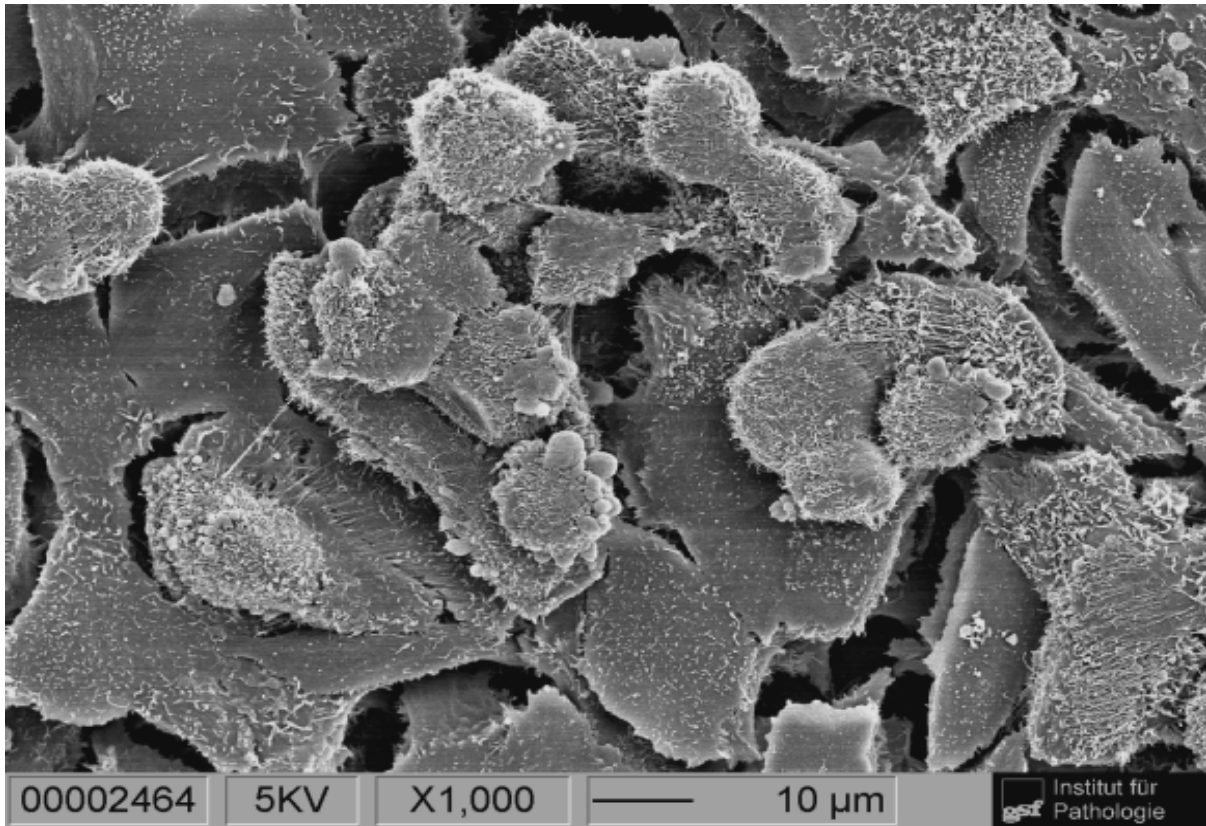


Abbildung 37: Zelllinie DU145, Membran-Oberseite (REM, x1.000)

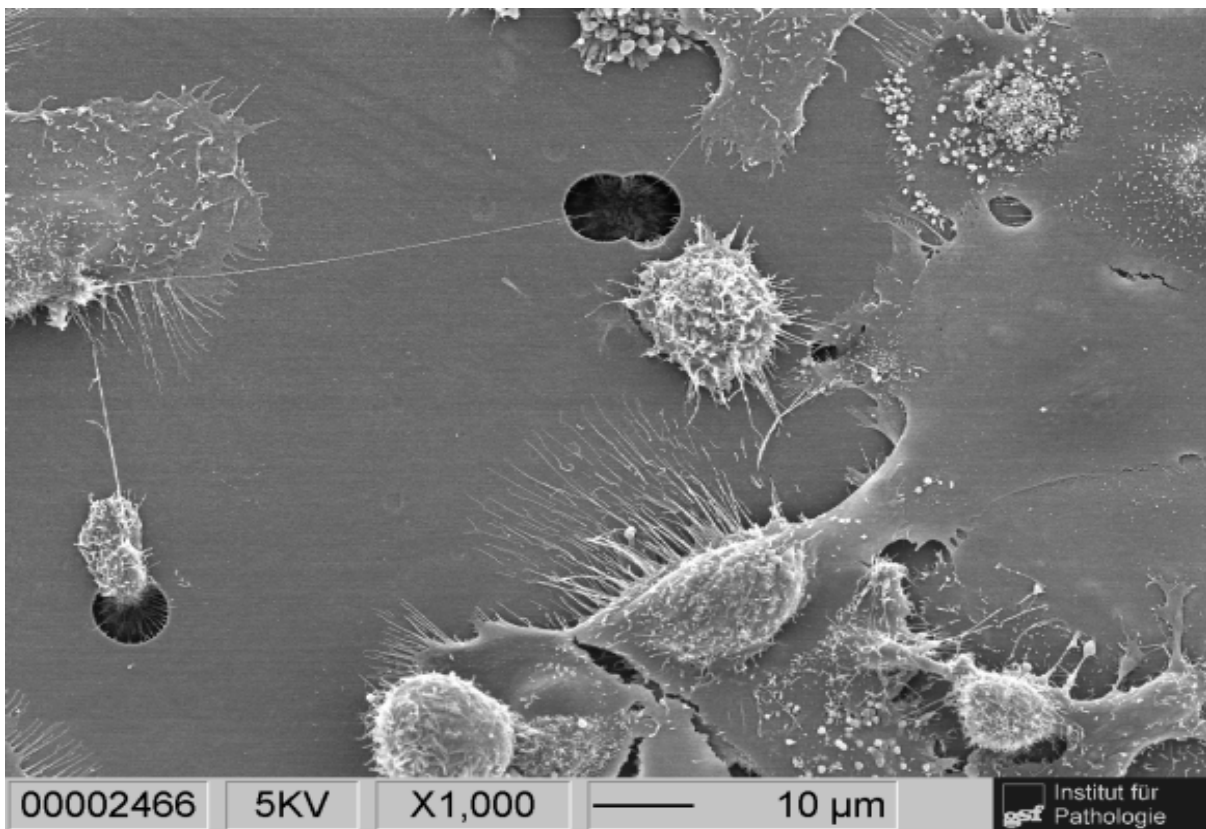


Abbildung 38: Zelllinie DU145, Membran-Oberseite (REM, x1.000)

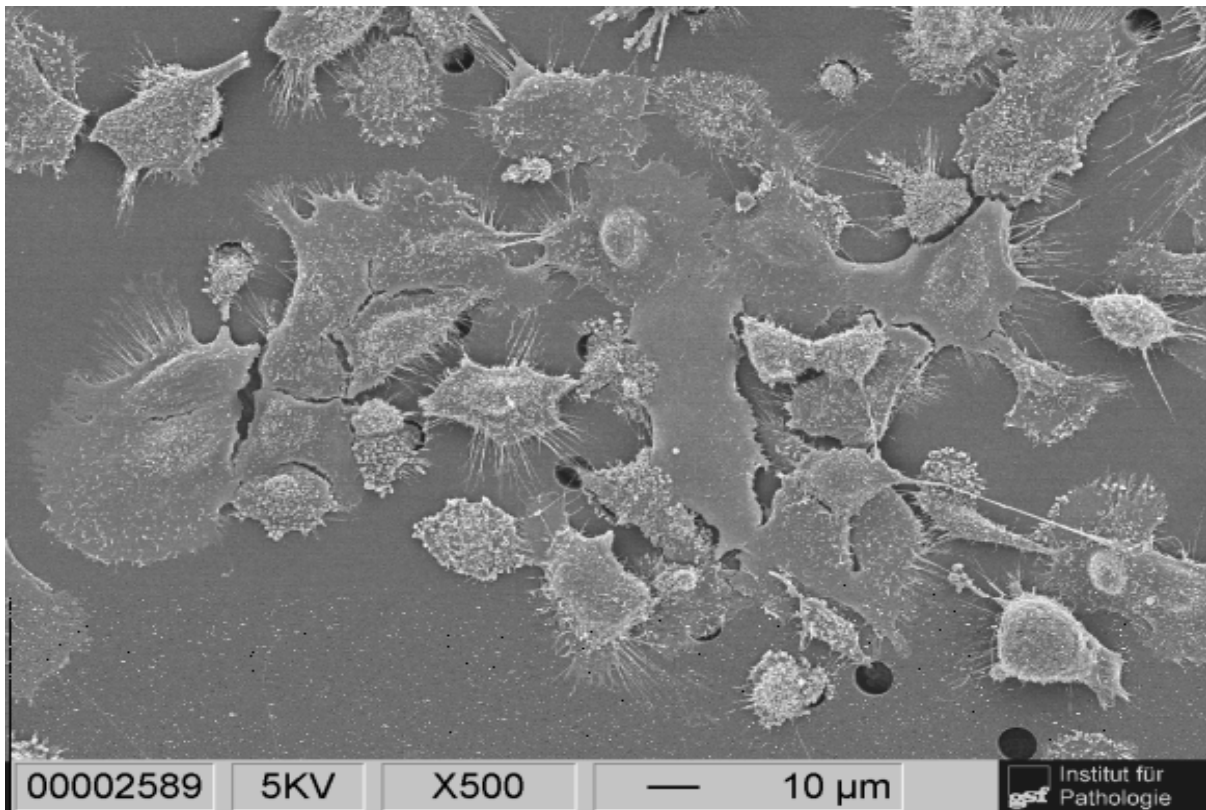


Abbildung 39: Zelllinie DU145, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x500)

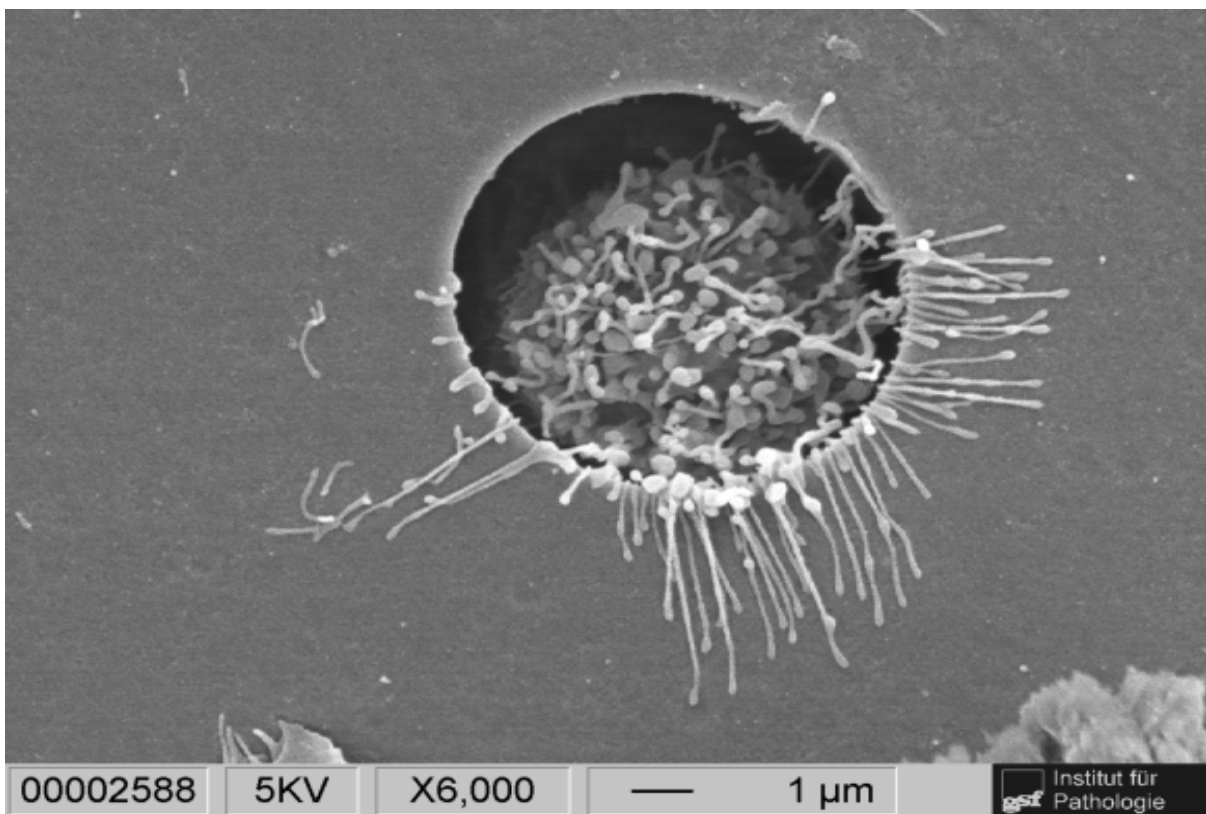


Abbildung 40: Zelllinie DU145, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x6.000)

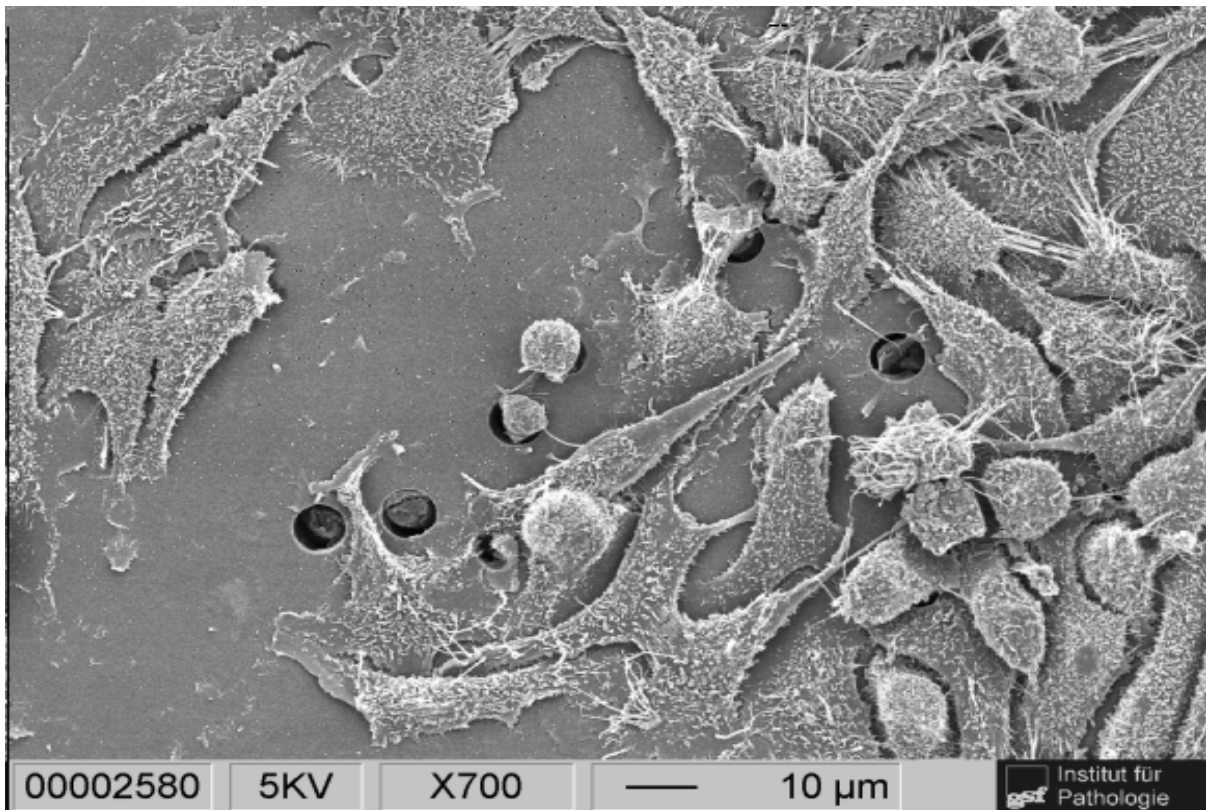


Abbildung 41: Zelllinie PC3, Membran-Oberseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x700)

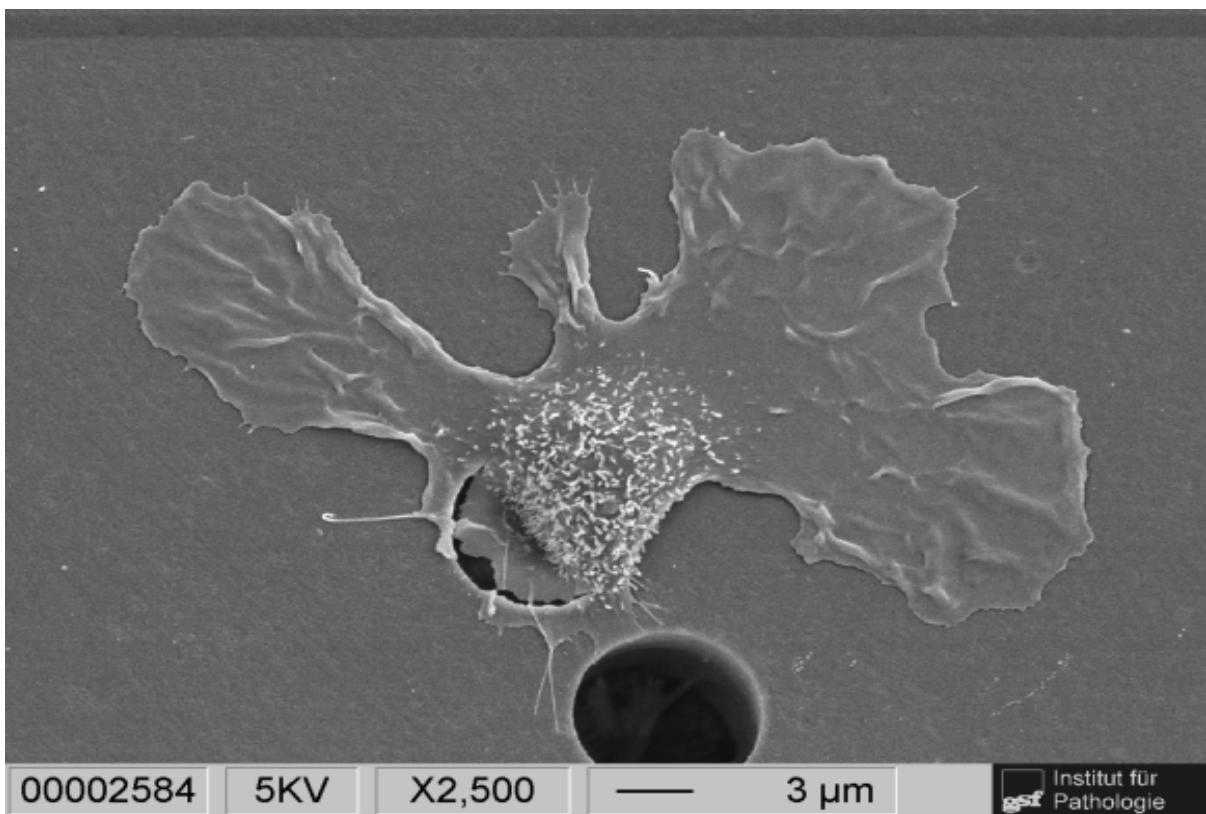


Abbildung 42: Zelllinie PC3, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x2.500)

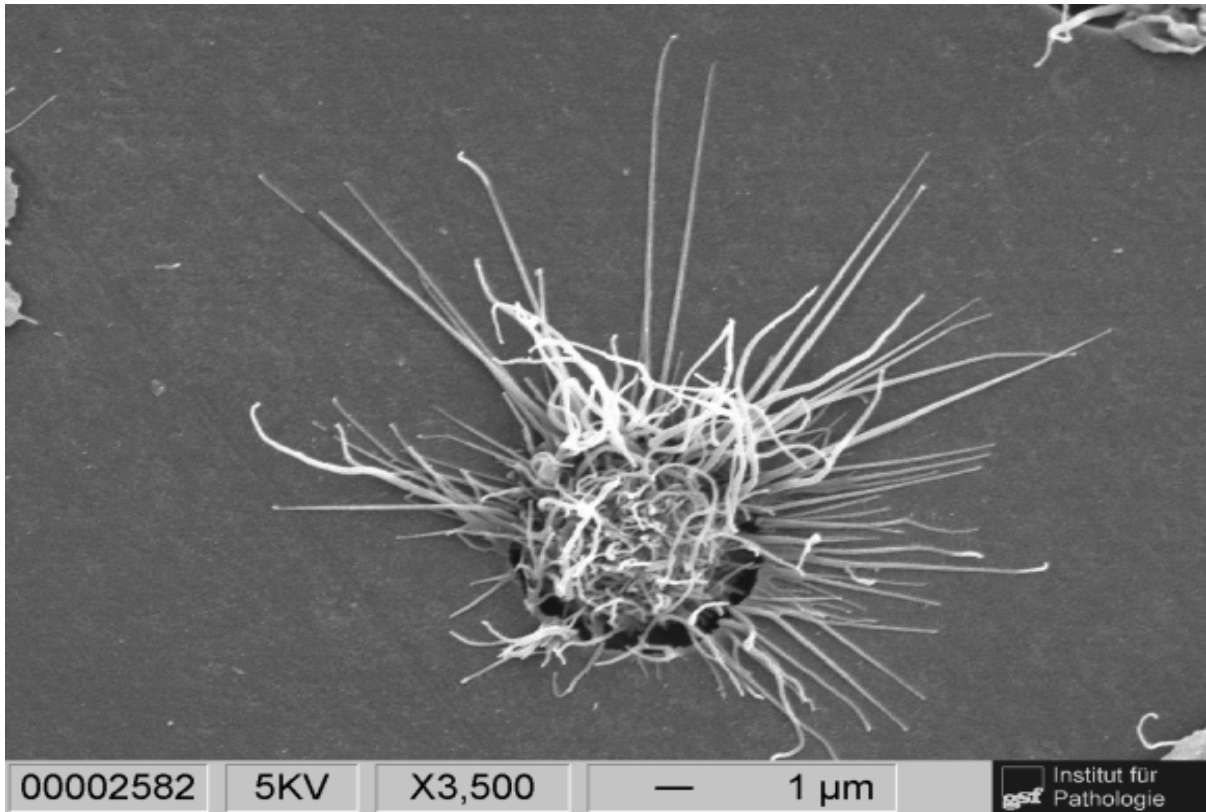


Abbildung 43: Zelllinie PC3, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x3.500)

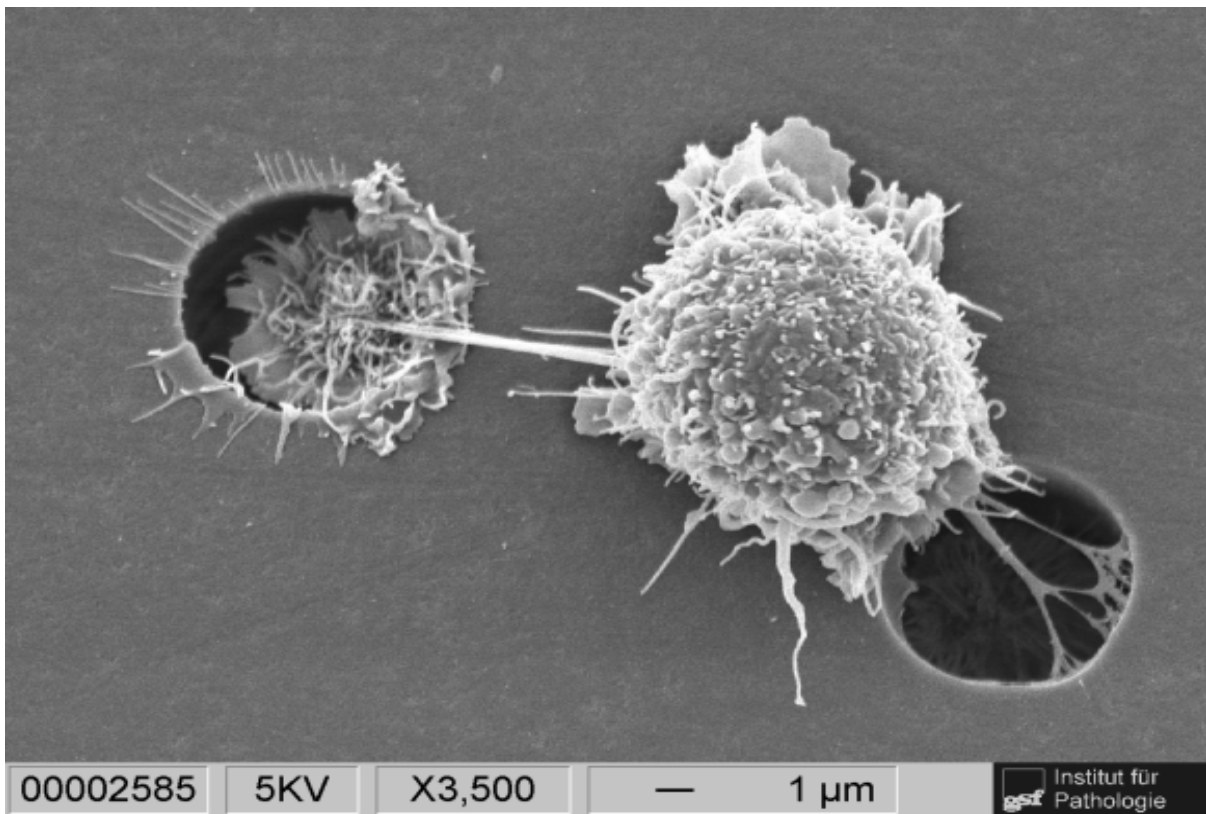


Abbildung 44: Zelllinie PC3, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x3.500)

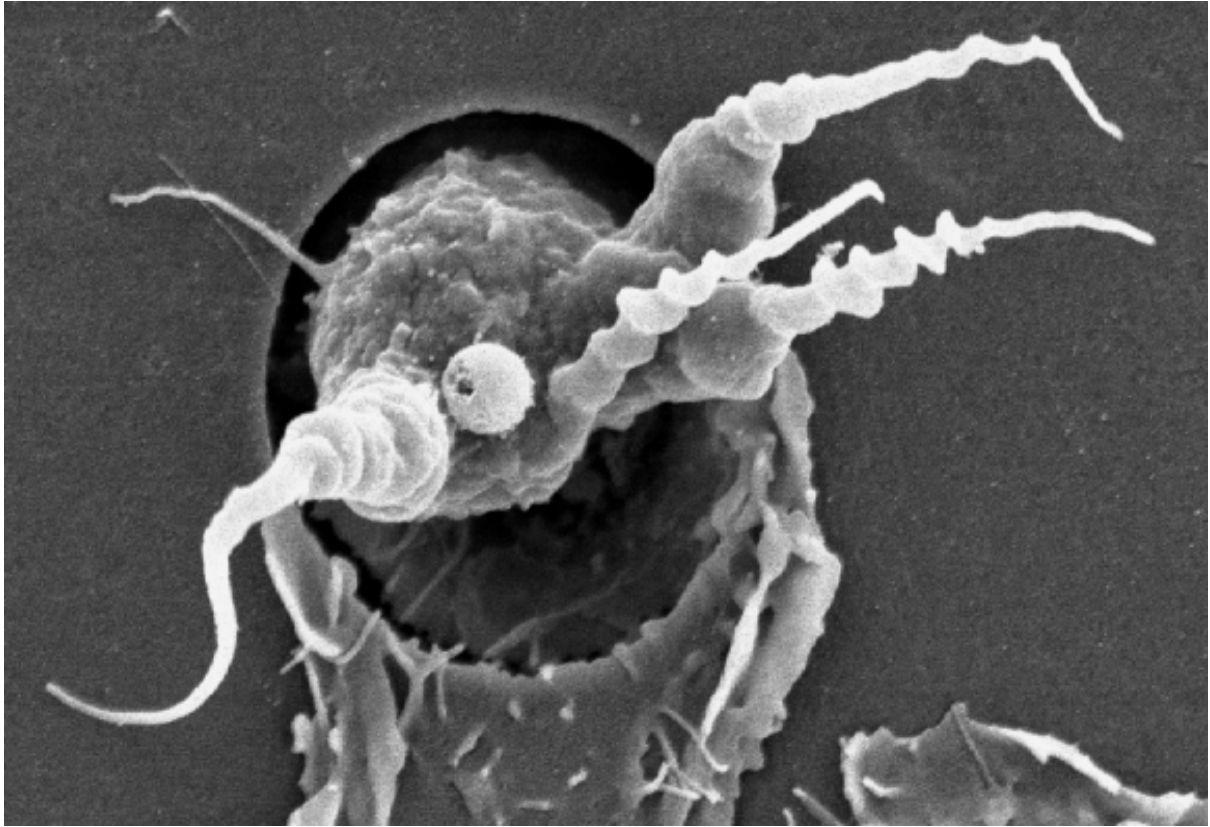


Abbildung 45: Zelllinie PC3, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x3.000)

5. Diskussion

Bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom (HRPC) im fortgeschrittenen Krankheitsstadium ist die Chemotherapie derzeit eine wesentliche Therapieoption. Mit den zurzeit innerhalb der Chemotherapie etablierten Substanzen ist das HRPC klinisch jedoch nicht zufriedenstellend zu behandeln. Die Therapie des HRPC ist primär palliativ und die therapeutische Effektivität muss gegen mögliche Nebenwirkungen abgewogen werden. Durch unterschiedliche Remissionskriterien und Patientenselektionen in Studien finden sich unterschiedliche Remissionsraten. Die unterschiedliche Krankheitsdauer ist durch die Heterogenität der Tumorzellen des HRPC begründet, wobei mediane Überlebenszeiten von 10-52 Wochen angegeben werden (Heidenreich 2001). Das relativ hohe Alter der meisten Patienten sowie eine hohe Multimorbidität verringern die Toleranz gegenüber zytotoxischen Substanzen. Auch das Nebenwirkungsspektrum vieler Chemotherapeutika limitiert deren klinischen Einsatz. Diese Aspekte sind für Auswahl, Applikationsart und Therapieschema der verfügbaren Chemotherapeutika von großer Bedeutung. Bei Durchführung klinischer Studien zur Erprobung neuer Substanzen oder Substanzkombinationen ist dies ebenfalls zu berücksichtigen.

Um die klinische Anwendbarkeit der Chemotherapie zu verbessern und die Nebenwirkungsrate zu senken scheint deren Kombination mit Strahlentherapie oder der Gabe von Antiandrogenen sinnvoll. Auch die Suche nach Substanzen mit anderen Wirkungseigenschaften und deren Einbindung in bestehende Chemotherapiekonzepte kann ein Schritt zur besseren Behandlung des metastasierten Prostatakarzinoms sein. Auf Grund der in vitro und in vivo beobachteten günstigen Effekte in anderen Tumorentitäten bieten sich hierfür Substanzen wie z.B. die Retinoide an. Vor deren Einsatz am Patienten sollten jedoch eingehende Überprüfungen der wesentlichen biologischen Eigenschaften, wie z.B. Modulation von Zellproliferation, Zellmotilität und Invasionsfähigkeit erfolgen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vergleichend der Effekt der Retinoide 13cRA und 4-HPR auf die Invasionsfähigkeit der beiden androgenunabhängigen humanen Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3 in vitro untersucht.

Unter dem Retinoid 13cRA wurde in den beiden Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3 bei niedrigen Retinoidkonzentrationen eine Zunahme der Invasionsfähigkeit beobachtet. Unter höheren Retinoidkonzentrationen fand sich in der Linie DU145 eine Hemmung der Invasionsfähigkeit bis maximal auf etwa 50% der unbehandelten Kontrollen, während in der Linie PC3 auch unter höheren Retinoidkonzentrationen keine signifikante Inhibition der Invasionsfähigkeit beobachtet wurde.

Die Zunahme der Invasionsfähigkeit bei geringen Konzentrationen 13cRA in den Linien DU145 und PC3 ist wahrscheinlich methodisch bedingt. Eine Selektion aggressiverer Tumorzellen ist durch die Präinkubation über fünf Tage mit 13cRA denkbar. Unter 4-HPR fand sich keine Zunahme der Invasivität. Im Vergleich zu 13cRA sind bei 4-HPR möglicherweise zusätzliche oder andere Mechanismen der Hemmung der Invasionsfähigkeit vorhanden.

Aus diesem Grund erfolgt derzeit eine Modifizierung des Assays, wobei das Retinoid 13cRA unmittelbar zum Zeitpunkt der Zellaussaat in aufsteigenden Konzentrationen direkt in die Invasionskammern eingebracht wird. Somit entfällt der Selektionseffekt und es können Retinoide bei höheren Konzentrationen untersucht werden. Das Vorgehen stellt insgesamt auch eine Vereinfachung des Assays dar.

Der Effekt der Zunahme eines biologischen Parameters bei niedrigen Konzentrationen einer zytotoxischen Substanz, der bei höheren Konzentrationen in Inhibition übergeht, wurde unter den Retinoiden 13cRA und 4-HPR in der Linie LNCaP unter den Bedingungen des depletierten Mangelmediums (0,1% FKS) für den Parameter „Zellproliferation“ beobachtet (Treiber 2002). Dieses biphasische Ansprechen zeigt die Abhängigkeit der Ergebnisse von vitro Versuchen von den Versuchsbedingungen und weist auf die Bedeutung der Untersuchung möglichst großer Konzentrationsbereiche hin.

In einem fünf Stunden dauernden Invasionsassay fanden Webber et al. in der Linie DU145 nach einer 48-stündigen Vorinkubation mit dem Retinoid all-trans-Retinsäure (ATRA) in den Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM und 10 μM eine Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit um 34%, 53% bzw. 66% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Webber 1995).

Als Ursache hierfür fanden die Autoren eine durch ATRA vermittelte Hemmung der Sekretion von uPA durch die Tumorzellen und der damit verbundenen Hemmung der Degradation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Laminin, Fibronectin).

Das Retinoid 13cRA der vorliegenden Arbeit ist ein Stereoisomer von ATRA und war im Rahmen des gewählten Versuchsansatzes nur in der Linie DU145 in der Lage eine Inhibition der Zellinvasionsfähigkeit zu bewirken.

Unter dem Retinoid 4-HPR war in den beiden Linien DU145 und PC3 eine konzentrationsabhängige, fast vollständige Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit nachweisbar.

Die dabei bestimmten IC50-Werte für 4-HPR waren im Vergleich zu den IC50-Werten für den Parameter „Hemmung der Zellproliferation“ wesentlich niedriger (Treiber 2002). In der Linie DU145 betrug der IC50-Wert hinsichtlich der Hemmung der Zellproliferation 3,6 μM (Treiber 2002), während zur halbmaximalen Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit dieser Wert bei 0,4 μM lag. Verglichen mit dem Parameter „Hemmung der Zellmotilität“, der in der Linie DU145 einen IC50-Wert von 0,2 μM (0,06-0,39 μM) aufwies, war die halbmaximale Hemmung der Zellinvasivität erst bei der doppelten Retinoidkonzentration zu beobachten.

In der Linie PC3 wurde der IC50-Wert unter 4-HPR für die Hemmung der Zellproliferation mit 4,2 μM bestimmt (Treiber 2002), während die Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit einen IC50-Wert von 0,54 μM (0,35-0,75 μM) ergab. Der IC50-Wert des Parameters „Hemmung der Zellmotilität“ wurde in PC3 mit 0,1 μM (0,03-0,16 μM) bestimmt (Treiber 2002). Damit war die halbmaximale Hemmung der Zellinvasivität erst bei etwa der fünffachen Retinoidkonzentration zu beobachten.

Somit ergibt sich für die IC50-Werte des Retinoids 4-HPR in den Linien DU145 und PC3 eine parameterspezifische Sensitivität mit zunehmender Konzentration:

[Motilität < Invasivität] << Zellwachstum

Die Zellen reagieren unter 4-HPR am empfindlichsten hinsichtlich der Hemmung der Motilität, bei etwas höheren Konzentrationen bezüglich der Invasionsfähigkeit und erst bei deutlich höheren Konzentrationen hinsichtlich der Proliferationshemmung. Zwischen den beiden Linien war nur der IC50-Wert bezüglich Hemmung der Zellproliferation signifikant verschieden. Die IC50-Werte für Hemmung der Zellmotilität und Hemmung der Invasivität unterschieden sich für 4-HPR nicht.

Die einzige Untersuchung, in der die Eigenschaften eines Retinoids hinsichtlich der Modulation von Zellwachstum, Zellmotilität und Invasionsfähigkeit vergleichend untersucht wurden, ist von Webber und Mitarbeiter publiziert (Webber 1999). Die

Autoren beobachteten in der androgenunabhängigen Linie DU145 unter dem Retinoid 4-HPR in Konzentrationen von 0,1 μM bzw. 1 μM eine signifikante Abnahme der Motilität um 13% bzw. 32%, während für die Invasionsfähigkeit eine signifikante Inhibition um 34% bzw. 52% gefunden wurde. Hinsichtlich der Modulation der Zellproliferation wiesen sie eine konzentrationsabhängige, fast vollständige Inhibition unter diesem Retinoid nach. Unter 1 μM 4-HPR wurde eine signifikante Inhibition des Zellwachstums um etwa 30% beobachtet, während unter 0,1 μM keine signifikante Wachstumsinhibition auftrat. Obwohl in dieser Arbeit die Zellen hinsichtlich deren Invasionsfähigkeit sensitiver auf 4-HPR reagierten als bezüglich der Motilität sind, ähnlich zu unseren Ergebnissen, dies weitere Hinweise darauf, dass durch 4-HPR die Hemmung von Motilität und Invasivität im Vergleich zur Hemmung des Zellwachstums bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt.

In den ebenfalls androgenresistenten Prostatakarzinomzelllinien PC3 und TSU-PR1 fanden Kim und Mitarbeiter unter 1 μM 4-HPR eine Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit um 50% bzw. 34%, während die Zellmotilität um 28% bzw. 29% gehemmt wurde (Kim 1995). Als Ursache diskutierten die Autoren die zusätzlich beobachtete Zunahme der Aktivität von uPA und die Zunahme der Sekretion von PAI-1 unter diesem Retinoid.

Von den beiden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Modulation der Zellinvasionsfähigkeit untersuchten Retinoide 13cRA und 4-HPR weist nur das Retinoid 4-HPR in den beiden androgenunabhängigen Zelllinien DU145 und PC3 durch fast vollständige Hemmung der Invasivität, sowie bereits beschriebene vollständige Hemmung von Motilität und Zellproliferation, grundlegende Eigenschaften auf, dieses Retinoid in die Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zu integrieren. Die Kombination von Retinoiden mit Chemotherapeutika, Antiandrogenen oder Bestrahlung zur Minderung von Toxizität oder Steigerung der Effektivität kann ein neues Behandlungskonzept darstellen. Das Retinoid 4-HPR weist auch in Langzeitstudien ein günstigeres klinisches Toxizitätsprofil auf. Derzeit erfolgen im Forschungslabor der Urologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar Untersuchungen zur Zytotoxizität der Kombination von 4-HPR mit dem Taxanderivat Docetaxel bzw. mit Bestrahlung in den drei humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3.

6. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die zweithäufigste zum Tode führende Krebserkrankung des Mannes. Für das hormonrefraktäre Prostatakarzinom (HRPC) im fortgeschrittenen Stadium gibt es bislang keine effektive Therapiemöglichkeit. Die Chemotherapie ist derzeit unverändert eine wesentliche Therapieoption in diesem Stadium. Die Ansprechraten der bislang eingesetzten Chemotherapeutika sind jedoch nicht zufriedenstellend. Ferner sind die Multimorbidität der meist älteren Patienten sowie die hohe Nebenwirkungsrate vieler Chemotherapeutika limitierende Faktoren der Chemotherapie. Aus diesen Gründen ist eine weitere Suche nach effektiveren, besser verträglichen Substanzen oder Substanzkombinationen notwendig.

Retinoide sind natürliche oder synthetische Derivate von Vitamin A. Sie sind effektive Inhibitoren der Karzinogenese epithelialer Tumoren, wirken differenzierungsinduzierend und hemmen sowohl lokales Tumorwachstum als auch Metastasierung *in vitro* und *in vivo*. Aus diesen Gründen eignen sie sich grundsätzlich als potentielle Kombinationspartner in der Therapie des HRPC. Vor deren Einsatz am Patienten ist jedoch eine möglichst exakte Charakterisierung relevanter biologischer Effekte durch Retinoide an humanen Prostatakarzinomzelllinien *in vitro* notwendig.

Hinsichtlich der Modulation von Zellwachstum und Motilität sowie Induktion von Apoptose wurden die beiden Retinoide 13cRA und 4-HPR in drei humanen Prostatakarzinomzelllinien bereits von unserer Arbeitsgruppe vergleichend untersucht.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden die Effekte der Retinoide 13cRA und 4-HPR auf die Modulation der Invasionsfähigkeit in den drei humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP (androgenabhängig), DU145 und PC3 (beide androgenunabhängig) *in vitro* untersucht.

Vor Durchführung des Invasionsassays erfolgte eine Vorinkubation der Tumorzellen mit dem jeweiligen Retinoid, wobei die Konzentrationsbereiche für 13cRA 0,1-75 μM und für 4-HPR 0,01-10 μM umfassten. Die Vorinkubation mit Retinoiden erfolgte in

den Linien DU145 und PC3 über 120 Stunden und in der Linie LNCaP über 144 Stunden.

Zur Durchführung der Invasionsversuche wurden die mit Retinoiden vorinkubierten Tumorzellen in 24-Mikrowell-Invasionskammern eingebracht, in deren Einsätze Polyethylenterephthalat-Membranen (PET-Membranen) eingearbeitet waren, welche mit multiplen Poren (Durchmesser 8 μM) durchsetzt waren. Die PET-Membranen waren mit extrazellulärer Matrix (ECM), welche aus einem Maus-Sarkom (EHS) extrahiert wurde, beschichtet. Die Assaydauer der Invasionsversuche betrug bei allen Versuchen 24 Stunden. Die Zählung der invadierten Zellen auf der Membranunterseite erfolgte mittels eines Auflichtmikroskopes nach mechanischer Entfernung der nicht invadierten Zellen auf der Membranoberseite sowie nach Fixierung und Färbung der gesamten Membran.

Bei Dosis-Wirkungskurven mit sigmoiden Verlauf erfolgte zur Bestimmung der IC50-Werte (Konzentrationen bei halbmaximaler Hemmung der Invasionsfähigkeit) eine logistische 4-Parameter Regressionsanalyse, wobei die IC50-Werte in Form von Punktschätzwerten mit den korrespondierenden 95%-Konfidenzintervallen ermittelt wurden.

Unter dem Retinoid 13cRA fand sich eine zelllinienspezifisch unterschiedliche Modulation des Invasionsverhaltens.

In der Linie DU145 fand sich im Konzentrationsbereich 20-60 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Stimulation der Zellinvasion, wobei die maximale Stimulation unter 20 μM 13cRA 190% betrug. Ab $\geq 65 \mu\text{M}$ 13cRA fand sich eine signifikante Inhibition des Invasionsverhaltens. Die maximale Inhibition um etwa 50% wurde unter 75 μM 13cRA beobachtet.

In der Linie PC3 fand sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle im Konzentrationsbereich von 5-75 μM eine signifikante Stimulation der Zellinvasion. Eine maximale Stimulation der Invasionsfähigkeit von 270-284% trat unter 20-30 μM 13cRA auf. Auch unter hohen Konzentrationen von 13cRA (65-75 μM) fand sich in dieser Linie eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikante Stimulation der Invasionsfähigkeit (139-154%).

Unter dem Retinoid 4-HPR zeigte sich in beiden Linien eine konzentrationsabhängige und fast vollständige Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit. Die unter 4-HPR für beide Linien ermittelten IC50-Werte (DU145: 0,40 μM ; PC3: 0,54 μM) wiesen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf.

Die Zellen der Linie LNCaP zeigten in den unbehandelten Kontrollversuchen (ohne Retinoide) eine sehr geringe Invasionsfähigkeit, so dass deren Untersuchung nach Exposition mit den Retinoiden 13cRA und 4-HPR im gewählten Versuchsansatz nicht durchgeführt werden konnte.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Hemmung der Invasionsfähigkeit in beiden androgenunabhängigen Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3 durch das Retinoid 4-HPR scheint dieses Retinoid, zusammen mit seinen Eigenschaften der Hemmung von Zellproliferation durch Induktion von Apoptose und Hemmung der Zellmotilität, ein grundsätzlich möglicher Partner in Kombinationstherapien bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom zu sein. Das im Vergleich zu 13cRA günstigere klinische Toxizitätsprofil von 4-HPR stellt einen weiteren Vorteil dieser onkologisch interessanten Substanz dar.

Derzeit erfolgen im Forschungslabor der Urologische Klinik des Klinikums rechts der Isar weitere Untersuchungen zur Überprüfung der Effektivität einer kombinierten Applikation von 4-HPR mit geeigneten Chemotherapeutika (z.B. Taxane) und Bestrahlung in den drei humanen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP, DU145 und PC3.

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die TNM-Klassifikation des Adenokarzinoms der Prostata (Sobin 2002)	9
Tabelle 2:	Progressionsfreie Überlebensrate (ÜLR) nach radikaler retropubischer Prostatektomie bei lokal begrenztem Prostatakarzinom (Eastham 1998, Steiner 1999)	13
Tabelle 3:	Rezidivfreie Überlebensrate (ÜLR) nach konventioneller perkutaner Bestrahlung bei lokal begrenztem Prostatakarzinom (Feldman 1999)	14
Tabelle 4:	Strukturformeln häufig untersuchter Retinoide	18
Tabelle 5:	Klinische Nebenwirkungen der Dauertherapie mit Isotretinoin (100 mg/Tag)	25
Tabelle 6:	Klinische Nebenwirkungen der Dauertherapie mit Fenretinid (200 mg/Tag)	26
Tabelle 7:	Modulation von Motilität und Metastasierung in Prostatakarzinomzelllinien	30
Tabelle 8:	Zur Durchführung der Versuche benötigte Materialien	36
Tabelle 9:	Invasionsverhalten der Prostatakarzinom-Zelllinien in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl pro Well (95%-KW: 95%-Konfidenzwert)	46
Tabelle 10:	Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC3 unter dem Retinoid 13cRA	49
Tabelle 11:	Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC3 unter dem Retinoid 4-HPR	49

8. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Lage der Prostata in anatomischer Darstellung (Salowe 1997)	3
Abbildung 2:	Zonale Anatomie der Prostata (Salowe 1997)	4
Abbildung 3:	Einteilung der Wachstumsmuster beim Gleason-Score (Gleason 1977)	8
Abbildung 4:	Zeitliches Schema der Versuchsansätze	38
Abbildung 5:	24-Well Invasions-Kammer, Ansicht von oben	39
Abbildung 6:	Schematische Darstellung eines Inserts zur Messung der Zellinvasion, eingebracht in ein Well der 24-Well Platte	40
Abbildung 7:	Inserts einer Mikrowell-Invasionskammer zur Messung der Zellinvasion	40
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Membran eines Inserts mit fünf auszuzählenden Fotorechtecken	42
Abbildung 9:	Membranunterseite, Zelllinie DU145, Vorinkubation mit 50 μ M 13cRA für 120 Stunden, Dauer Invasionsassay 24 Stunden, 20-fache Vergrößerung	42
Abbildung 10:	Bestimmung der optimalen Zellzahl/Well in der Zelllinie LNCaP	46
Abbildung 11:	Bestimmung der optimalen Zellzahl/Well in der Zelllinie DU145	47
Abbildung 12:	Bestimmung der optimalen Zellzahl/Well in der Zelllinie PC3	47
Abbildung 13:	Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 unter dem Retinoid 13cRA (Mittelwerte absolut und 95%-Konfidenzintervalle)	50
Abbildung 14:	Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 unter dem Retinoid 13cRA (Mittelwerte in % und 95%-Konfidenzintervalle)	50
Abbildung 15:	Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 unter dem Retinoid 13cRA (Mittelwerte absolut und 95%-Konfidenzintervalle)	51
Abbildung 16:	Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 unter dem Retinoid 13cRA (Mittelwerte in % und 95%-Konfidenzintervalle)	51

Abbildung 17: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 unter dem Retinoid 4-HPR (Mittelwerte absolut und 95%-Konfidenzintervalle)	52
Abbildung 18: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 unter dem Retinoid 4-HPR (Mittelwerte in % und 95%-Konfidenzintervalle)	52
Abbildung 19: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 unter dem Retinoid 4-HPR (Mittelwerte absolut und 95%-Konfidenzintervalle)	53
Abbildung 20: Modulation der Zellinvasionsfähigkeit der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie PC3 unter dem Retinoid 4-HPR (Mittelwerte in % und 95%-Konfidenzintervalle)	53
Abbildung 21: Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit der Linie DU145 unter dem Retinoid 4-HPR (Logistische 4-Parameter Regressionsanalyse mit Darstellung der Punktschätzwerte (SW) und 95%-Konfidenzintervalle)	54
Abbildung 22: Hemmung der Zellinvasionsfähigkeit der Linie PC3 unter dem Retinoid 4-HPR (Logistische 4-Parameter Regressionsanalyse mit Darstellung der Punktschätzwerte (SW) und 95%-Konfidenzintervalle)	55
Abbildung 23: Zelllinie LNCaP, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)	56
Abbildung 24: Zelllinie LNCaP, 120 Stunden, 5 μ M 4-HPR (x320)	56
Abbildung 25: Zelllinie DU145, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)	57
Abbildung 26: Zelllinie DU145, 120 Stunden, 5 μ M 4-HPR (x200)	57
Abbildung 27: Zelllinie PC3, 120 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x200)	58
Abbildung 28: Zelllinie PC3, 120 Stunden, 5 μ M 4-HPR (x320)	58
Abbildung 29: Zelllinie DU 145, 24 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide, Unterseite der ECM-Membran, Lichtmikroskopie (x320)	59
Abbildung 30: Zelllinie PC3, 24 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide, Unterseite der ECM-Membran, Lichtmikroskopie (x320)	59
Abbildung 31: Seitenansicht der ECM-Membran, Zelllinie DU145, 24 Stunden, Kontrolle ohne Retinoide (x320)	60
Abbildung 32: PET- Membran ohne ECM und ohne Zellen (REM, x20.000)	60

Abbildung 33: PET-Membran mit ECM ohne Medium und ohne Zellen (REM, x300)	61
Abbildung 34: PET-Membran mit ECM ohne Medium und ohne Zellen (REM, x20.000)	61
Abbildung 35: PET-Membran mit ECM, mit Medium und ohne Zellen (REM. X300)	62
Abbildung 36: Zelllinie LNCaP, 7 Stunden, Membran-Oberseite: Clusterbildung (REM, x500)	62
Abbildung 37: Zelllinie DU145, Membran-Oberseite (REM, x1.000)	63
Abbildung 38: Zelllinie DU145, Membran-Oberseite (REM, x1.000)	63
Abbildung 39: Zelllinie DU145, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x500)	64
Abbildung 40: Zelllinie DU145, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x6.000)	64
Abbildung 41: Zelllinie PC3, Membran-Oberseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x700)	65
Abbildung 42: Zelllinie PC3, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x2.500)	65
Abbildung 43: Zelllinie PC3, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x3.500)	66
Abbildung 44: Zelllinie PC3, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x3.500)	66
Abbildung 45: Zelllinie PC3, Membran-Unterseite, Kontrolle nach 24 Stunden (REM, x3.000)	67

9. Literaturverzeichnis

Altwein JE (2001a) Prostatakarzinom. In: Uro-Onkologie (Hrsg.: Rübber H), Springer-Verlag, 2001, 169-232

Altwein JE (2001b) Therapie des virginellen metastasierten Prostatakarzinoms. In: Uro-Onkologie (Hrsg.: Rübber H), Springer-Verlag, 278-312

Babaian R, Fritsche H (1990) Prostate-specific antigen and gland volume: correlation and clinical application. *J Clin Lab Anal* 4: 135-143

Banyard J, Zetter BR (1999) The role of cell motility in prostate cancer. *Cancer Met Rev* 17: 449-458

Barrack ER (1997) TGF β in prostate cancer: a growth inhibitor that can enhance tumorigenicity. *Prostate* 31: 61-70

Bartels H, Brüggeboes B, Glaser F (1992) Prostatakarzinom. Verbesserte Früherkennung mit ultraschallgezielter Biopsie. *Dtsch. Ärztebl.* 89, 11: 906-912

Benson M, Wang I (1992) Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostatic cancer. *J Urol* 147: 815-816

Bischoff ED, Gottardis MM, Moon TE, Heyman RA, Lamph WW (1998) Beyond tamoxifen: the retinoid X receptor-selective ligand LGD1069 (Targretin) causes complete regression of mammary carcinoma. *Cancer Res* 58: 479-484

Blaner WS, Hendriks HF, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL, Goodman DS (1985) Retinoids, retinoid-binding proteins and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J Lipid Res* 26: 1241-1251

Blaner WS, Olson JA (1994) Hepatic metabolism and storage of retinol. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) *The retinoids*. Raven Press, New York, pp 229-255

Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR (1990) Transport and storage of vitamin A. *Science* 250: 399-403

Bollag W, Peck R (1994) Cancer chemotherapy by combinations of retinoids with cytokines and vitamin D analogs. Experimental and clinical results. *Ann Oncol* 5 (Suppl. 9): 17-22

Brawer MK, Chetner MP (1998) Ultrasonography of the prostate and biopsy. In.: *Campbell's Urology* (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ), 7th edition, W.B. Saunders Company, 2506-2517

Brazzell RK, Vane FM, Ehmann CW, Colburn WA (1983) Pharmacokinetics of isotretinoin during repetitive dosing to patients. *Eur J Clin Pharmacol* 24: 695-702

Breul J, Paul R (1999) Stagingprobleme beim Prostatakarzinom aus urologischer Sicht. In: Prostatakarzinom (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer-Verlag, 1999, 62-71

Breul J, Paul R, Hartung R (2001) Molekularbiologie und Genetik urogenitaler Tumoren-Prostatakarzinom. In: Uro-Onkologie (Hrsg.: Rübber H), Springer-Verlag, 845-864

Brewster SF (1998) Tumor suppressor genes in prostate cancer. In: Molecular biology of prostate cancer (Hrsg.: Wirth M, Altwein JE, Schmitz-Dräger B, Kuptz S), Walter de Gruyter-Verlag, 31-41

Brooks JD (1998) Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: Campbell's Urology (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ), 7th edition, W.B. Saunders Company, 89-128

Camerini T, Mariani L, De Palo G, Marubini E, Di Mauro MG, Decensi A, Costa A, Veronesi U (2001) Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer. *J Clin Oncol* 19: 1664-1670

Carter CA, Pogribny M, Davidson A, Jackson CD, McGarrity LJ, Morris SM (1996) Effects of retinoic acid on cell differentiation and reversion toward normal in human endometrial adenocarcinoma (RL95-2) cells. *Anticancer Res* 16: 17-24

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, Fozard JL, Walsh PC (1992) Longitudinal evaluation of prostatic-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 267: 2215-20

Carter HB, Partin AW (1998) Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Campbell's Urology (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ), 7th edition, W.B. Saunders Company, 2519-2537

Carter HB, Piantadosi S, Isaacs JT (1990) Clinical evidence for and implication of the multistep development of prostate cancer. *J Urol* 143: 742-746

Coffey DS (1996) Prostate cancer metastasis: talking the walk. *Nature Medicine* 2: 1305-1306

Conley BA, Egorin MJ, Sridhara R, Finley R, Hemady R, Wu S, Tait NS, Van Echo DA (1997) Phase I clinical trial of all-trans-retinoic acid with correlation of its pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Cancer Chemother and Pharmacol* 39: 291-299

Danforth DN (1996) All-trans- and 9-cis-retinoic acid act additively with hydroxytamoxifen to stimulate apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Proc AACR* 37: 231

De Luca LM (1991) Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia. *FASEB J* 5: 2924-2933

Eastham JA, Scardino PT (1998) Radical prostatectomy. In.: Campbell's Urology (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ), 7th edition, W.B. Saunders Company, 2547-2564

Ebert T, Bendhack ML (1997) Prostatakarzinom-Diagnostik, hormonelle Therapie, Radio- und Chemotherapie. Urologe A 36: 570-577

Eisenberger MA (1998) Chemotherapy for hormone-resistant prostate cancer. In.: Campbell's Urology (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ), 7th edition, W.B. Saunders Company, 2645-2658

Epstein JI (1996) The diagnosis and reporting of adenocarcinoma of the prostate in core needle biopsy specimens. Cancer 78: 350-356

Fakih M, Yagoda A, Replogle, Lehr JE, Pienta KJ (1995) Inhibition of prostate cancer growth by estramustine and colchicine. Prostate 26: 310-315

Feldmann HJ (1999) Definitive Strahlentherapie des Prostatakarzinoms. In: Prostatakarzinom (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer-Verlag, 121-135

Fontana JA (1987) Interaction of retinoids and tamoxifen on the inhibition of human mammary carcinoma cell proliferation. Expl Cell Biol 55: 136-144

Geldof AA, De Kleijn MAT, Rao BR, Newling WWD (1997) Nerve growth factor stimulates in vitro invasive capacity of DU145 human prostatic cancer cells. J Cancer Res Clin Oncol 123: 107-112

Gleason DF (1977) Histologic grading and clinical staging of carcinoma of the prostate. In: Tannenbaum M, (Ed.): Urologic Pathology: The Prostate, Philadelphia, Lea and Febiger, 171-197

Gleason DF (1966) Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother Rep 50: 125-128

Gleason DF (1992) Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Hum Pathol 23: 273-279

Glick MC (1976) Cell surface changes associated with malignancy. In Weiss L: Fundamental aspects of metastasis. Noth-Holland Publ. Co, Amsterdam-Oxford

Gold EJ, Bosl GJ, Itri LM (1984) Phase II trial of 13-cis-retinoic acid in patients with advanced nonseminomatous germ cell tumors. Cancer Treat Rep 68: 1287-1288

Golz R, Störkel S (1999) Pathologische Anatomie maligner Tumoren der Prostata. In: Prostatakarzinom (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer-Verlag, 1999, 3-46

Goodman GE, Einspahr JG, Alberts DS, Davis TP, Leigh SA, Chen HS, Meyskens FL (1982) Pharmacokinetics of 13-cis-retinoic acid in patients with advanced cancer. Cancer Res 42: 2087-2091

Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB (1994) Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) The retinoids. Raven Press, New York, pp 443-520

Guillonneau B, Vallancien G (2000) Laparoscopic radical prostatectomy: the Montsouris technique. J Urol 163: 1643-1649

Heidenreich A, Knobloch R, Hofmann R (2001) Current status of cytotoxic chemotherapy in hormone refractory prostate cancer. Eur Urol 39: 121-130

Hendrix MJ, Wood WR, Seftor EA, Lotan D, Nakajima M, Misiorowski RL, Seftor RE, Stetler-Stevenson WG, Bevacqua SJ, Liotta LA (1990) Retinoid acid inhibition of human melanoma cell invasion through a reconstituted basement membrane and its relation to decreases in the expression of proteolytic enzymes and motility factor receptor. Cancer Res 50: 4121-4130

Higuchi T, Hannigan GE, Malkin D, Yeger H, Williams BR (1991) Enhancement by retinoic acid and dibutyl cyclic adenosine 3':5'-monophosphate of the differentiation and gene expression of human neuroblastoma cells induced by interferon. Cancer Res 51: 3958-3964

Hill DL, Grubbs CJ (1982) Retinoids as chemopreventive and anticancer agents in intact animals (review) Anticancer Res 2: 111-124

Hoffmann W, Schiller U, Rodemann HP, Bamberg M (1995) Vitamin A in der Tumorthherapie. Strahlenther Onkol 171: 106-112

Hong WK, Endicott J, Itri LM, Doos W, Batsakis JG, Bell R, Fofonoff S, Byers R, Atkinson EN, Vaughan C (1986) 13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leucoplakia. N Engl J Med 315: 1501-1505

Hong WK, Lotan R (1993) Retinoids in Oncology. Marcel Dekker Inc. Verlag, New York

Huggins C, Hodges CF (1941) Studies on prostatic cancer: the effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. Cancer Res 1: 293-297

Hwang MS, Thompson KL, Ahn CH (1995) p-53-independent induction of p21^{WAF1} and apoptosis by all-trans-retinoic acid and 9-cis-retinoic acid in human prostate cancer cell lines. Proc AACR 36: 10, abstract 57

IARC Handbooks of cancer prevention (1998) Volume 3: Vitamin A

IARC Handbooks of cancer prevention (1999) Volume 4: Retinoids

Isaacs JT, Schulze H, Coffey DS (1987) Development of androgen resistance in prostatic cancer. In Murphey, Khoury S, Küss R, Chatelain C; Denis L: Prostate Cancer, part A: Research, endocrine treatment and Histopathology. Liss, New York: 21-31

Johnson R (1976) Notes on the vascular physiology of primary tumors and micrometastases. In Weiss L: Fundamental aspects of metastasis. Noth-Holland Publ. Co, Amsterdam-Oxford

Jurincic-Winkler CD, Klippel KF (1991) Das Prostatakarzinom - eine Übersicht. Uroscop 7,1: 5-12

Kalemkerian GP, Slusher R, Ramalingam S, Gadgeel S, Mabry M (1995) Growth inhibition and induction of apoptosis by fenretinide in small-cell lung cancer cell lines. J Natl Cancer Inst 87: 1674-1680

Keer HN, Gaylis FD, Kozlowski JM, Kwaan HC, Bauer KD, Sinha AA, Wilson MJ (1991) Heterogeneity in plasminogen activator (PA) levels in human prostate cancer cell lines: increased PA activity correlates with biologically aggressive behavior. Prostate 18: 201-214

Kerr IG, Lippman ME, Jenkins J, Myers CE (1982) Pharmacology of 13-cis-retinoic acid in humans. Cancer Res 42: 2069-2073

Kiemle-Kallee, Porzsolt F (1993) Retinoide in der Onkologie. DMW 118: 390-394

Kim JH, Tanabe T, Chodak GW, Rukstalis DB (1995) In vitro anti-invasive effects of N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide on human prostatic adenocarcinoma. Anticancer Res 15: 1429-1434

Kligman AM, Thorne EG (1991) Topical therapy of actinic keratosis with tretinoin, in Marks R (ed) retinoids in cutaneous malignancy. Cambridge MA, Blackwell Scientific, 66-73

Koga M, Sutherland RL (1991) Retinoic acid acts synergistically with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ or antioestrogen to inhibit T-47D human breast cancer cell proliferation. J Steroid Biochem Molec Biol 39: 455-461

LaCroix A, Lippman ME (1980) Binding of retinoids to human breast cancer cell lines and their effects on cell growth. J Clin Invest 65: 586-591

Lee JS, Lippman SM, Benner SE, Lee JJ, Ro JY, Lukeman JM, Morice RC, Peters EJ, Pang AC, Fritsche HA (1994) Randomized Placebo-Controlled Trial of Isotretinoin in Chemoprevention of Bronchial Squamous Metaplasia. J Clin Oncol 12: 937-945

Lein M, Stephan C, Jung K, Schnorr D, Loening SA (2000) Molekulare Formen des prostataspezifischen Antigens und des humanen Kallikreins 2 als mögliche Indikatoren in der Prostatakarzinomdiagnostik. Urologe A 39: 313-323

Lippman SM, Kavanagh JJ, Paredes-Espinoza M, Delgadillo-Madrueno F, Paredes-Casillas P, Hong WK, Holdener E, Krakoff IH (1992) 13-cis retinoic acid plus interferon α -2a: Highly active systemic therapy for squamous cell carcinoma of the cervix. J Natl Cancer Inst 84: 241-245

- Lotan R (1993) Retinoids and squamous cell differentiation. In: Hong WK, Lotan R (eds) Retinoids in Oncology. Dekker Inc., New York Basel Hong Kong, pp 43-72
- Lotan R, Clifford JL (1991) Nuclear receptors for retinoids: mediators of retinoid effects on normal and malignant cells. *Biomed & Pharmacother* 45:145-156
- Lucek RW, Colburn WA (1985) Clinical pharmacokinetics of the retinoids. *Clinical Pharmacokinetics* 10: 38-62
- Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM (1994) The retinoid receptors. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) The retinoids. Raven Press, New York, pp 319-349
- Miller K, Weißbach L (1999) Leitlinien zur Diagnostik von Prostatakarzinomen. *Urologe A* 38: 388-401
- Misset JI, Mathe G, Santelli G, Gouveia J, Homasson JP, Sudre MC, Gaget H (1986) Regression of bronchial epidermoid metaplasia in heavy smokers with etretinate treatment. *Cancer Detect Prev* 9: 167-170
- Moon RC, Mehta RG, Rao KVN (1994) Retinoids and cancer in experimental animals. In: The Retinoids: biology, chemistry and medicine. EDS.: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, Raven Press, New York, 573-596
- Moon TE, Cartmel B, Levine N (1983) The Arizona Skin Cancer Study Group. Chemoprevention and Etiology of Non-melanoma Skin Cancer. Program and Abstracts, 17th Annual Meeting of the American Society of Preventive Oncology, Tuscon AZ, 20-23
- Moriarty M, Dunn J, Darragh A, Lambe R, Brick I (1982) Etretinate in treatment of actinic keratosis: A double blind crossover study. *Lancet* 1: 364-365
- Murphy BC, Pienta KJ, Coffey DS (1992) Effects of extracellular matrix components and dihydrotestosterone on the structure and function of human prostate cancer cells. *Prostate* 20: 29-41
- Nicolson GL (1979) Cancer metastasis. *Scient. Am.* 240: 66
- Nishimura K, Kitamura M, Takada S, Nonomura N, Tsujimura A, Matsumiya K, Miki T, Matsumoto K, Okuyama A (1998) Regulation of invasive potential of human prostate cancer cell lines by hepatocyte growth factor. *Int J Urol* 5: 276-281
- Ong DE, Kakkad B, MacDonald PN (1987) Acyl-CoA independent esterification of retinol bound to cellular retinol binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J Biol Chem* 262: 2729-2763
- Ong DE, Newcomer ME, Chytil F (1994) Cellular retinoid-binding proteins. In: Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds) The retinoids. Raven Press, New York, pp 283-317

Oridate N, Higuchi M, Hong WK, Lotan R (1996) Pro-oxidant activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) may mediate induction of apoptosis in carcinoma cells. Proc AACR 37: 232

Oridate N, Lotan D, Xu XC, Hong WK, Lotan R (1995) Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. Proc AACR 36: 601

Oridate N, Suzuki S, Higuchi M, Mitchell MF, Hong WK, Lotan R (1997) Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. J Natl Cancer Inst 89: 1191-1198

Peck R, Bollag W (1990) Potentiation of retinoid-induced differentiation of HL-60 and U937 cell lines by cytokines. EurJ Cancer 27, No 1: 53-57

Pemrick SM, Lucas DA, Grippo JF (1994) The retinoid receptors. Leukemia Vol 8, Suppl. 3: 1-10

Petrylak DP (1999) Chemotherapy for advanced hormone refractory prostate cancer. Urology 54, supplement 6A, 30-35

Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA, Lara PN, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED (2004) Docetaxel and Estramustine compared with Mitoxantrone and Prednisone for Advanced Refractory Prostate Cancer. N Engl J Med; 351: 1513-20

Pfahl M (1993a) Signal transduction by retinoid receptors. Skin Pharmacol 6: 8-16

Pfahl M (1993b) Nuclear receptor/AP-1 interaction. Endocr Rev 14: 651-658

Pfahl M (1994) The retinoid response: a molecular dissection. Ann Oncol Vol. 5, Suppl. 9: 11-15

Pfleger S, Rassweiler J (1997) Transrektaler Ultraschall. In: Ultraschall in der Urologie (Hrsg.: Rassweiler J, Merkle W), Thieme-Verlag, 76-87

Pienta KJ (1998) Etiology, epidemiology, and prevention of carcinoma of the prostate. In: Campbell's Urology (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED), 7th edition, W.B. Saunders Company, 2489-2496

Pienta KJ, Isaacs WB, Vindivich D, Coffey DS (1991) The effects of basic fibroblast growth factor and suramin on cell motility and growth of rat prostate cancer cells. J Urol 145: 199-202

Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW (1998) Prostate-Specific Antigen 1998: What we have learned and where we are going Part II: Detection, staging, and monitoring of prostate cancer. AUA Update series, Lesson 28, Volume XVII, 217-224

Ponzoni M, Bocca P, Chiesa V, Decensi A, Pistoia V, Raffaghello L, Rozzo C, Montaldo PG (1995) Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer Res* 55: 853-861

Ponzoni M, Casalaro A, Cornaglia-Ferraris P (1991) Interferon gamma synergizes with retinoic acid and tumor necrosis factor in inducing human neuroblastoma cell differentiation. *Proc AACR* 32: 34

Porter AT, Littrup P, Grignon D, Forman J, Montie JE (1998) Radiotherapy and cryotherapy for prostate cancer. In.: *Campbell's Urology* (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ), 7th edition, W.B. Saunders Company, 2605-2626

Poste G (1977) The cell surface and metastasis. In Day SB, Myers WPL, Stansly P, Garattini S, Lewis MG: *Cancer invasion and metastasis: Biologic mechanisms and therapy*. Raven Press, New York

Preis PN, Saya H, Nadasdi L, Hochhaus G, Levin V, Sadee W (1988) Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A. *Cancer Res* 48: 6530-6534

Reiland J, Furcht LT, McCarthy JB (1999) CXC-Chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the CXCR2 receptor. *Prostate* 41: 78-88

Rigtrup KE, Ong DE (1992) A retinyl-ester-hydrolase activity intrinsic to the brush border membrane of rat small intestine. *Biochem* 31: 2920-2926

Roberson KM, Penland SN, Padilla GM, Selvan RS, Kim CS, Fine RL, Robertson CN (1997) Fenretinide: induction of apoptosis and endogenous transforming growth factor β in PC-3 prostate cancer cells. *Cell Growth & Differentiation* 8: 101-111

Ross SA, Ahrens RA, De Luca LM (1991) Retinoid acid enhances attachment of F9 teratocarcinoma cells to laminin. *Proc Am Assoc Cancer Res* 32: 22, abstract 128

Rübben H, Altwein JE (2001) Therapie des hormonrefraktären metastasierten Prostatakarzinoms. In: *Prostatakarzinom* (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer-Verlag, 313-350

Salowe AE, Lessinger LM (1997) *Prostate Cancer: Overcoming Denial with Action: A Guide to Screening, Treatment, and Healing*, Quality Medical: 8, 10

Schnorr D (1999) Palliativtherapie des hämatogen metastasierten Prostatakarzinoms. In: *Prostatakarzinom* (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer-Verlag, 89-104

Schröder FH (1998) Endocrine treatment of prostate cancer. In.: *Campbell's Urology* (Hrsg.: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ), 7th edition, W.B. Saunders Company, 2627-2644

- Small EJ, Reese DM, Vogelzang NJ (1999) Hormone-refractory prostate cancer: an evolving standard of care. *Semin Oncol* 26: 61-67
- Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA (1992) Retinoids in cancer therapy. *J Clin Oncol*, Vol 10, No 5: 839-864
- Sobin LH, Wittekind C (2002) TNM Classification of malignant tumours. Wiley-Liss, sixth Edition, 184-186
- Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (1994) The Retinoids. Biology chemistry, and medicine. Raven Press, New York, Second Edition
- Steiner U, Miller K (1999) Radikale Prostatektomie – Indikationen und Ergebnisse. In: Prostatakarzinom (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer-Verlag, 1999, 72-88
- Sugarbaker EV, Ketcham AS (1997) Mechanisms and prevention of cancer dissemination: an overview. *Seminars in Oncology* 4: 19
- Tannock IF, de Wit R, Berry W (2004) Doxetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *N Engl J Med*; 351: 1502-12
- Treiber U (2002) Habilitationsschrift: Effekte von Retinoiden in humanen Prostatakarzinom-Zelllinien. TU München
- Treiber U, Lehmer A, Ryba P, Kübler H, Hartung R (2000a) Effekte von Retinoiden in humanen Prostatakarzinomzelllinien: Modulation von Zellwachstum und PSA-Sekretion. 14. Symposium Experimentelle Urologie, 10.03.2000, Mannheim
- Treiber U, Lehmer A, Piescha U, Kübler H, Hartung R (2000b) Effekte von Retinoiden in humanen Prostatakarzinomzelllinien: Induktion von Apoptose und Inhibition der Zellmotilität. *Urologe A* 39, Suppl.1: 103
- Van Roy F, Mareel M (1992) Tumor invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends in cell biology* 2: 163-169
- Veneziano S, Pavlica P, Querze R, Nanni G, Lalanne MG, Vecchi F (1990) Correlation between prostate-specific antigen and prostate volume evaluated by transrectal ultrasonography: usefulness in diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 18: 112-116
- Villers A, Terris MK, McNeal JE, Stamey TA (1990) Ultrasound anatomy of the prostate: the normal gland and anatomical variations. *J Urol* 143: 732-738
- Vogelzang NJ (1999) Docetaxel (Taxotere) in hormone-refractory prostate cancer: a new addition to the physicians' toolbox. *Semin Oncol* 26, No 5, suppl. 17, 1-2

- Wagenpfeil S, Treiber U, Lehmer A (2000) A MATLAB-based software tool for changepoint detection and nonlinear regression in dose-response relationships. In: Lecture notes in computer science (Hrsg.: Brause RW, Hanisch E), Springer Verlag, September 2000, 190-197
- Walsh PC (1986) Radical retropubic prostatectomy. In: Walsh PC, Gittes RF, Permuter AD, Stamey TA: *Champell's Textbook of Urology*. Vol. III. Saunders, Philadelphia: 2754-2775
- Walther PJ (1989) The role of radical prostatectomy in the management of prostatic adenocarcinoma. Biologic factors influencing the likelihood of local and systemic control. *Wld J. Urol.* 7: 38-44
- Wang TTY, Phang JM (1996) Effect of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Letters* 107: 65-71
- Webber MM, Bello-DeOcampo D, Quader S, Deocampo ND, Metcalfe WS, Sharp RM (1999) Modulation of the malignant phenotype of human prostate cancer cells by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4HPR). *Clin Exp Metastasis* 17: 255-263
- Webber MM, Waghray A (1995) Urokinase-mediated extracellular matrix degradation by human prostatic carcinoma cells and its inhibition by retinoic acid. *Clin Cancer Res* 1: 755-761
- Weingärtner K, Riedmiller H (1998) Prostatakarzinom-Radikale Prostatektomie, neoadjuvante und adjuvante Therapiemodalitäten. *Urologe B* 38: 186-193
- Wetherall NT, Reiss T, Parmenter M, Halter SA (1982) Morphological effects of natural retinoids on human mammary carcinoma cell lines in monolayer culture. *Scanning Electr Microsc* 4: 1565-1575
- Weiss RE, Cordon-Cardo C, Fair WR (1994) Inhibition of invasion of human testis tumor cell lines by N-retinamide. *J Urol* 151: 412 A
- Wirth M, Froschermaier S, Manseck A (1999) Die Rolle des PSA in der Diagnostik und des Prostatakarzinoms. In: *Prostatakarzinom* (Hrsg.: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T), Springer-Verlag, 105-117
- Wolf G (1984) The intestinal metabolism of vitamin A. *Physiol Rev* 64: 873-878
- Wollbach SB, Howe PR (1925) Tissue changes following deprivation of a fat-soluble a-vitamin. *J Exp Med* 42: 753-758
- Zugmaier G, Jäger R, Grage B, Gottardis MM, Havemann K, Knabbe C (1996) Growth-inhibitory effects of vitamin D analogues and retinoids on human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer* 73: 1341-1346

10. Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rudolf Hartung, Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, gilt mein besonderer Dank für die wohlwollende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. med. Uwe Treiber danke ich für die konstruktive Unterstützung und stete Bereitschaft zur Diskussion bei Planung und Durchführung des Forschungsprojektes.

Frau Dr. rer. nat. Antonie Lehmer und ihren Mitarbeitern, Frau Doris Langer und Frau Stefanie Rämisch, danke ich für die stets sehr freundliche Zusammenarbeit und kompetente Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Dr. Stefan Wagenpfeil, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München, danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuche.

Herrn Prof. Dr. Heinzmann und seinen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Gesellschaft für Strahlenschutz und Umweltforschung (GSF)/Neuherberg bei München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Heinz Höfler) danke ich für die freundliche Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Zellen mittels Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie.

Herrn Dr. Gregor Weirich, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Heinz Höfler), danke ich für die freundliche Zusammenarbeit bei der Anfertigung der lichtmikroskopischen Zellbilder.