

Aus der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie

(Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. C.-F. Hess)

im Zentrum Radiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Valproat und Bestrahlung in Bezug auf klonogenes Überleben, Apoptose, Polyploidie und chromosomale Instabilität in Prostatakarzinom- und Prostatahyperplasie-Zelllinien

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christiane Friedrich

aus

Göttingen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Christiansen

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. November 2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Inzidenz und Therapie des Prostatakarzinoms	1
1.2 Wirkung der Strahlentherapie auf zellulärer Ebene	1
1.3 Histone, Histondeacetylaseinhibitoren (HDAC-Inhibitoren) und deren Wirkung auf Tumorzellen...	10
1.4 Valproat.....	11
1.5 HDAC-Inhibitoren und Strahlensensibilisierung.....	13
1.6 Fragestellung.....	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Verwendete Zelllinien	16
2.2 Verwendete Nährlösungen	18
2.3 Kulturbedingungen	19
2.4 Bestrahlungsaufbau	19
2.5 Klonogenes Überleben (DU-145 und PNT-2)	20
2.6 Apoptose.....	22
2.7 Bestimmung der Polyploidie-Rate und der chromosomalen Instabilität.....	23
2.8 Statistische Auswertung.....	25
3. Ergebnisse	26
3.1 PNT-2.....	26
3.1.1 PNT-2: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation.....	26
3.1.2 PNT2: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung	27
3.1.3 PNT-2: Apoptose.....	29
3.1.4 PNT-2: Polyploidisierungs-Rate	33
3.1.5 PNT-2: Chromosomale Instabilität	35
3.2 BPH-1	38

3.2.1	BPH-1: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation	38
3.2.2	BPH-1: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung	39
3.2.3	BPH-1: Apoptose	41
3.2.4	BPH-1: Polyploidisierungs-Rate	45
3.2.5	BPH-1: Chromosomale Instabilität	47
3.3	PC-3	50
3.3.1	PC-3: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation	50
3.3.2	PC-3: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung	51
3.3.3	PC-3: Apoptose	53
3.3.4	PC-3: Polyploidisierungs-Rate	56
3.3.5	PC-3: Chromosomale Instabilität	59
3.4	DU-145	62
3.4.1	DU-145: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation	62
3.4.2	DU-145: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung	63
3.4.3	DU-145: Apoptose	65
3.4.4	DU-145: Polyploidisierungs-Rate	70
3.4.5	DU-145: Chromosomale Instabilität	72
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	75
4.	Diskussion	80
5.	Zusammenfassung	93
	Anhang	94
	Literaturverzeichnis	128
	Abbildungsverzeichnis	142

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
ARF	apoptotic related factor
ATM	Ataxia Teleangiectasia Mutated
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
Bcl-2	B-cell lymphoma 2-Protein
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d	Tag
d. h.	das heißt
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified EM
DSB	Doppelstrangbruch
ECACC	European collection of cell cultures
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethylene Glycol-bis(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
FKS	Fetales Kälber-Serum
G ₁ -Phase	Gap-1-Zellzyklusphase
G ₂ -Phase	Gap-2-Zellzyklusphase
Gy	Gray (Einheit der Energiedosis)

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfon Säure]
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HR	Homologe Rekombination
MEM	Minimal Essential Medium
mA	Milli-Ampere
MeV	Mega-Elektronenvolt
mM	Milli-Molar
M-Phase	Mitose-Phase
n. d.	not done (nicht durchgeführt)
NHEJ	non-homologous-end-joining
PBS	Phosphat buffered saline
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PUCR	potentially unstable chromosome regions: Potentiell instabile Chromosomregionen
ROS	reaktive oxidative Spezies
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt im Roswell Park Memorial Institute
RT	Radiotherapie
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Sodium Dodecylsulfate
Smac/Diablo	second mitochondria-derived activator of caspases
S-Phase	Synthesephase
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	TNF-abhängiger Apoptose induzierender Ligand
TSA	Trichostatin A
VPA	Valproat
y_{Dic}	dizentrische Chromosomen pro Zelle
y_{Fg}	azentrische Fragmente pro Zelle
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Inzidenz und Therapie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist in Deutschland mit einer Inzidenz von ca. 48.650 Neuerkrankungen pro Jahr der häufigste bösartige Tumor beim Mann. Mit 10,4% steht es bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen, nach Lungen- und Darmkrebs, an dritter Stelle. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei 82% und das mittlere Erkrankungsalter bei ca. 70 Jahren (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2006).

Die Therapie des Prostatakarzinoms ist vom Tumorstadium und vom Allgemeinzustand des Patienten abhängig.

Als Therapieoptionen kommen die allgemeinen Säulen der Krebstherapie, d. h. Operationen, Strahlen- und Chemotherapie in Betracht. In Bezug auf das Prostatakarzinom stehen hier die radikale Prostatektomie, die Strahlentherapie, die Androgenentzugstherapie sowie eine Kombinationsbehandlung im Vordergrund.

Aufgrund der jedoch häufig erst in bereits fortgeschrittenen Tumorstadien gestellten Erstdiagnose und der hohen Rezidivrate nach primärer Therapie erschöpfen sich oftmals die oben genannten Behandlungsmöglichkeiten. So kommt es z. B. bei der palliativ angewandten Hormonentzugstherapie (z. B. nach Rezidiv oder bei metastasiertem Tumorleiden) in der Regel nach 9 – 30 Monaten zu einer erneuten Tumorprogression (Loblaw et al. 2004; Sökeland et al. 2004; Uzgaré und Isaacs 2005).

1.2 Wirkung der Strahlentherapie auf zellulärer Ebene

Ionisierende Strahlung führt entweder über direkte ionisierende Wechselwirkung oder über strahleninduzierte Bildung von reaktiven oxidativen Spezies zu einer Schädigung der DNA der bestrahlten Zelle (Ross 1999). Die schwerwiegendsten DNA-Schäden sind DNA-Doppelstrangbrüche. DNA-Doppelstrangbrüche können

einerseits den intrinsischen Weg zur Apoptose einleiten, andererseits können nicht oder falsch reparierte DNA-Doppelstrangbrüche zum mitotischen Zelltod führen.

Die Wirksamkeit einer Strahlentherapie wird moduliert, wobei vor allem die intrinsische Strahlenempfindlichkeit, die Zellzyklusphase, die Fraktionierung der Strahlendosis und die Anwesenheit von Sauerstoff für das Überleben der Zelle von Bedeutung sind (Herrmann und Baumann 1997).

Der normale Zellzyklus beinhaltet unterschiedliche Checkpoints zur Überwachung der Integrität der DNA. DNA-Schäden können in Form von Basendeletionen, DNA-Einzel- sowie Doppelstrangbrüchen auftreten. Kommt es nun zu einer Schädigung der DNA (z. B. durch ionisierende Strahlen, ultraviolettes Licht, Aktivierung von onkogenen Signalen, Hypoxie oder reaktive oxidative Spezies (ROS)), so kann diese erkannt werden und der Zellzyklus wird arretiert (G_1 -, S- bzw. G_2 -Checkpoint), um eine entsprechende Reparatur einzuleiten (Ford und Pardee 1999; Choudhury et al. 2006).

Maßgeblich hieran beteiligt ist das Tumor-Suppressor-Gen p53. Bei einer DNA-Schädigung kommt es zur vermehrten Expression von p53, welches normalerweise nur in geringem Maße und in inaktiver Form in der Zelle vorliegt. Durch diese Aktivierung von p53 kann der Zellzyklus arretiert und damit das Zellwachstum supprimiert werden (Kuribayashi und El-Deiry 2008).

Nach Arretierung des Zellzyklus wird, wenn möglich, die DNA-Reparatur eingeleitet. Hierbei werden die DNA-Doppelstrangbrüche, welche die schwerwiegendsten DNA-Schäden darstellen, durch zwei unterschiedliche Mechanismen repariert: durch homologe Rekombination (HR) oder durch nicht homologes Zusammenfügen der Enden (non-homologous-end-joining; NHEJ). Siehe hierzu auch Abbildung 1.

Die homologe Rekombination ist ein präziser Reparaturmechanismus und führt in der Regel zu einem fehlerfreien Ergebnis. Hierbei werden die DNA-Bruchenden zunächst durch Endonukleasen prozessiert, im Anschluss folgt eine Stranginvasion eines homologen, nicht beschädigten Doppelhelix-Partners eines Schwesterchromatids. Die Bruchenden werden nun durch das Kopieren des Doppelhelix-Partners durch die DNA-Polymerase verlängert. Ist die Kopie komplett, werden die Überkreuzungen

(„Holiday junctions“) aufgelöst und die korrekten Enden der DNA wieder zusammengefügt. (Khanna und Jackson 2001; Fan et al. 2004; Weterings und Chen 2008).

NHEJ hingegen benötigt weder einen unbeschädigten Partner noch eine sehr große Homologie zwischen den beiden, sich zusammenfügenden Bruchenden, so dass es häufiger zu einer fehlerhaften Reparatur kommt. NHEJ ist der hauptsächliche Reparaturmechanismus für Doppelstrangbrüche in der G₁-Phase des Zellzyklus. Nach geringer Exzision der Bruchenden werden diese durch verschiedene Enzyme direkt zusammengefügt, wobei es fast immer zu einem Basenverlust kommt (Khanna und Jackson 2001; Fan et al. 2004; Weterings und Chen 2008).

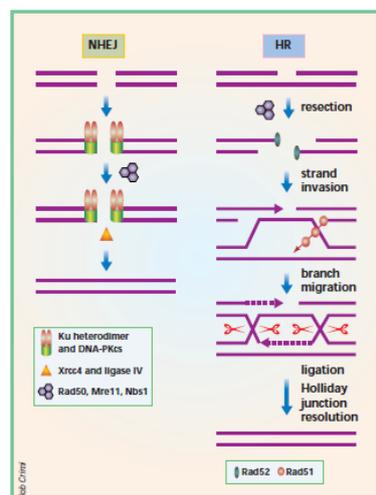


Abbildung 1: Zwei Wege der Doppelstrangbruch-Reparatur. NHEJ verbindet nach einer kleinen Basenexzision direkt die beiden Enden miteinander. HR benötigt einen homologen DNA-Doppelhelix-Strang als Vorlage, von welchem dann die fehlende Basenfolge kopiert wird (aus Khanna und Jackson 2001, S.248).

Ist der DNA-Schaden jedoch irreparabel, so kann die Zelle abhängig von der Art der Schädigung, wie in Abbildung 2 dargestellt, auf unterschiedliche Weise reagieren: Apoptose, mitotischer Zelltod, chromosomale Schäden (Deletionen), chromosomale Instabilität oder Polyploidie/Aneuploidie.

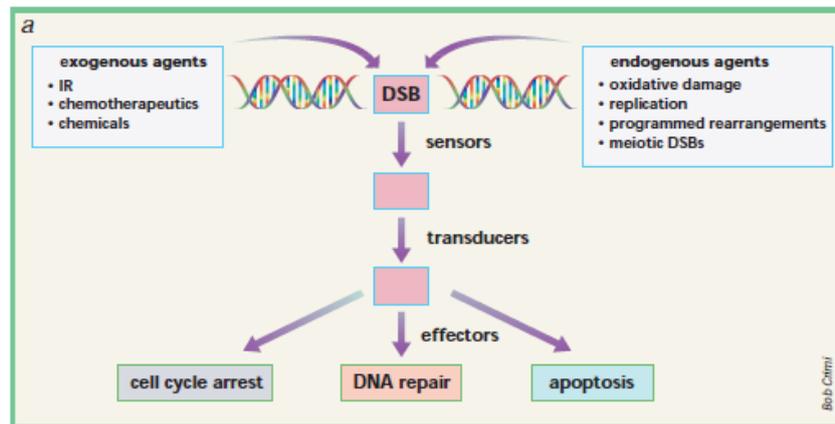


Abbildung 2: Organisation der zellulären Antwort auf einen Doppelstrangbruch. Der DSB wird durch einen Sensor registriert, dieser gibt eine Signalkette über verschiedene Effektormoleküle weiter, welche dann entweder zu einem Zellzyklusarrest, zu DNA-Reparaturmaßnahmen oder zur Einleitung der Apoptose führen (aus Khanna und Jackson 2001, S. 251).

Eine der möglichen Reaktionen besteht darin, dass die Zelle in die Apoptose geht (Weterings und Chen 2008).

Die Apoptose ist generell ein Mechanismus, um selektiv gealterte, geschädigte oder nicht mehr benötigte Zellen zu beseitigen. Die Apoptose ist dadurch ein essentieller Bestandteil vieler physiologischer Prozesse, wie z. B. der Embryogenese, der normalen Gewebsentwicklung, als auch der Immunantwort. Sollte die Apoptose jedoch gestört sein, so kann es zu einer Vielzahl von pathologischen Prozessen, wie z. B. der Kanzerogenese kommen (Chalah und Khosravi-Far 2008).

Die Aktivierung der Apoptose erfolgt entweder über den extrinsischen oder den intrinsischen Weg. Die Mechanismen sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

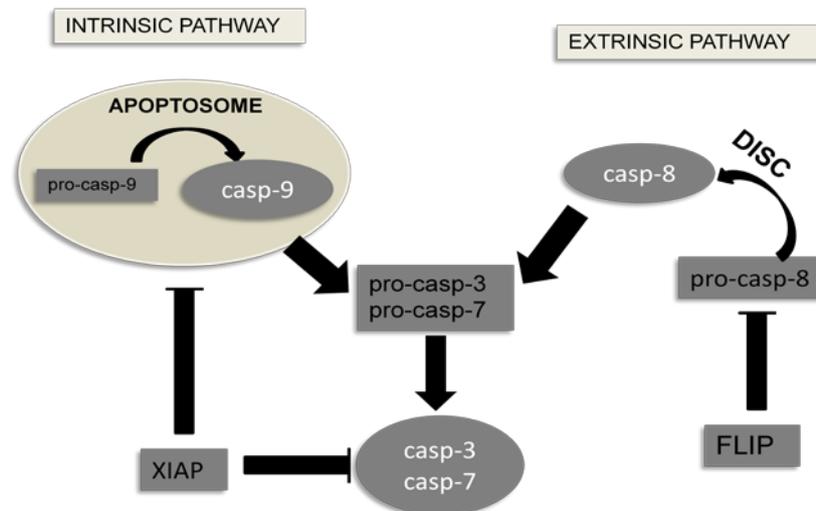


Abbildung 3: Schema des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges (in Anlehnung an Salvesen und Riedl 2008, S.15).

Ein sogenanntes „Todessignal“ in Form einer Bindung eines extrazellulären Liganden (z. B. FasL, TNF oder TRAIL) an einen transmembranösen Rezeptor triggert die Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges. Der hierbei entstehende Komplex aus Ligand und Rezeptor wird auch als DISC (death-inducing signaling complex) bezeichnet. p53 kann durch die Hochregulation der Rezeptoren (z. B. Fas, DR4, DR5) diesen Weg unterstützen (Kuribayashi und El-Deiry 2008; Melet et al. 2008). Nach der Initialisierung der Apoptose durch diesen DISC wird die Caspase 8 aktiviert, welche wiederum zur Aktivierung weiterer Caspasen (z. B. Caspasen 3, 6, 7) und somit zur Einleitung der Apoptose führt (Melet et al. 2008; Salvesen und Riedl 2008). Oft kommt es im Rahmen des extrinsischen Apoptoseweges auch zu einer Aktivierung des intrinsischen Weges, um eine effektivere Auslösung des Zelltods zu bewirken (Chalah und Khosravi-Far 2008).

Der intrinsische Weg der Apoptose kann durch Stressstimuli, wie z. B. UV-Licht, ionisierende Strahlung, Hyperthermie, Hypoxie, DNA-Schäden und generell Viren und viele Chemotherapeutika ausgelöst werden. Das Tumorsuppressorgen p53 ist an der Aktivierung des intrinsischen Apoptosewegs durch Regulation von proapoptotischen (z. B. Bax, Bid, Noxa, Puma) und antiapoptotischen Genen (z. B. Bcl-2, Mcl-1) beteiligt (siehe Abbildung 4). Es kommt dabei zu einer

Permeabilitätssteigerung der äußeren Mitochondrienmembran für Proteine (z. B. Cytochrom c, den Apoptose-indizierenden Faktor, Smac/Diablo, HtrA2/Omi und die Endonuklease G). Dieser Mechanismus der Proteinfreisetzung über die äußere Mitochondrienmembran wird über verschiedene Proteine der Bcl-2-Familie reguliert.

Es kommt zur Bildung eines Apoptosoms durch Bindung des freigesetzten Cytochrom C an Apaf-1 und dadurch zu einer Aktivierung der Caspase 9 und der Caspasen-Kaskade (Chalah und Khosravi-Far 2008; Kuribayashi und El-Deiry 2008; Melet et al. 2008).

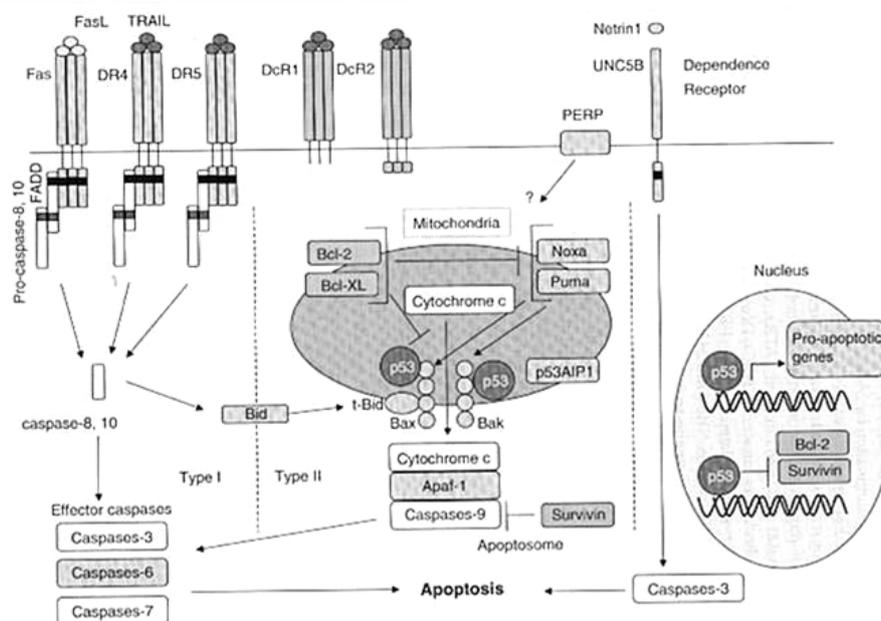


Abbildung 4: Die Regulation der Apoptosewege durch p53

(aus Kuribayashi und El-Deiry 2008, S.203).

Die aktivierte Caspasen-Kaskade führt zu einem Umbau der Zellmembran und zu einer Expression von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche. Des Weiteren kommt es zu zytoskelettalen Umbauvorgängen, zur Zellschrumpfung, zu nukleärer Kondensation und zur DNA-Fragmentierung. Dies führt zur Bildung von Apoptosekörperchen (späte Apoptose), welche dann in der Regel durch Phagozytose entfernt werden (Chalah und Khosravi-Far 2008).

Mutation oder Allelenverlust des p53-Gens, Hochregulation von p53-Inhibitoren (z. B. Mdm2, Mdm4, humanes Papilloma-Virus (HPV)-E6), Co-Aktivatoren-Inaktivierung (z. B. ATM, ARF, p14_{ARF}), Inhibition oder Mutation von p53-Effektoren (z. B. Caspase 9, Apaf-1) oder veränderte Signalwege führen zu einem Verlust der p53-Aktivität. Dies kann zu genomischer Instabilität, Behinderung des Zellzykluses, Behinderung der Reparaturmechanismen und Apoptoseinhibition führen (Zambetti 2007; Melet et al. 2008; Tan und White 2008). Dies wird schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

In Prostatakarzinom-Zellen wird z. B. eine p53-Mutation in ca. 20 bis 50% gefunden (Takahashi et al. 2001).

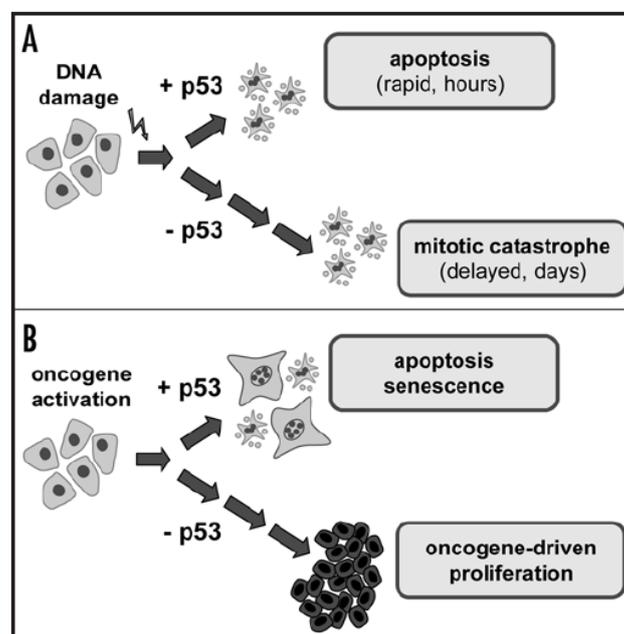


Abbildung 5: Unterschiedliche Effekte von DNA-Schädigung oder onkogenen Signalen in Abhängigkeit vom p53-Status. Zellen mit p53 gehen nach einer DNA-Schädigung in die Apoptose, Zellen ohne p53 durchlaufen aberrante Mitosen und gehen schließlich in den „Mitotischen Zelltod“.

Nach onkogenen Signalen kommt es bei Zellen mit p53 entweder zu Apoptose oder zum permanenten Zellzyklusarrest, bei Zellen ohne p53 jedoch proliferieren diese (aus Efeyan und Serrano 2007, S. 1008).

DNA-Schäden können aber auch unabhängig von p53 zur Apoptose führen, und zwar durch den Transkriptionsfaktor E2F, welcher proapoptotische Gene (z. B. Apaf-1, die Caspasen-Proenzyme, p73) hochreguliert und antiapoptotische Gene (z. B. Mcl-1) unterdrückt.

In bestimmten Zelltypen kann eine alleinige Bestrahlung eine Apoptose induzieren (Kuribayashi und El-Deiry 2008; Melet et al. 2008).

Kommt es jedoch weder zu einer korrekten Reparatur der DNA-Schäden, noch zur Apoptoseinduktion, so können Chromosomenschäden auch dazu führen, dass die Zelle die mitotische Teilung nicht mehr zu Ende führen kann und somit der „mitotische oder klonogene Zelltod“ (Verlust der Koloniebildungsfähigkeit) eintritt. Dieser mitotische oder klonogene Zelltod stellt den Hauptmechanismus der Wirkung der klinischen Strahlentherapie bei soliden Tumoren dar, wohingegen die Apoptose vornehmlich in embryonalen- und hämatopoetischen Zellen induziert wird (Ross 1999).

Chromosomenschäden werden durch DNA-Doppelstrangbrüche verursacht, dabei entstehen chromosomale Brüche bzw. Chromatidbrüche, welche sich mit einer räumlich und zeitlich nahen Bruchstelle desselben, eines anderen oder mehrerer anderer Chromosomen zusammenfügen können und somit zu einfachen und komplexen chromosomalen Aberrationen führen (Natarajan 2002; Levy et al. 2007).

Chromosomenaberrationen können sich als dizentrische oder polyzentrische Chromosomen (wie in Abbildung 6 dargestellt), azentrische Fragmente, Translokationen, zentrische Ringe, Inversionen, komplexe Chromosomenaberrationen wie z. B. Insertionen und Chromatid-Austausch-Figuren darstellen (Savage 1975; Ballarini und Ottolenghi 2004).

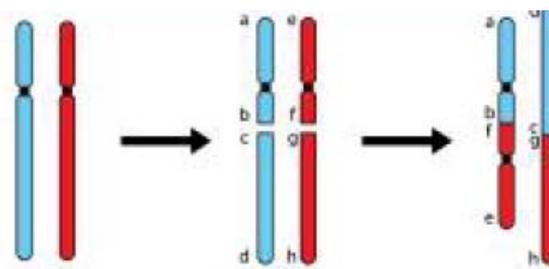


Abbildung 6: Einfache Chromosomenaberration, nachdem in zwei Chromosomen jeweils ein Doppelstrangbruch (DSB) induziert wurde und die jeweiligen freien Enden sich falsch zusammengefügt haben. Hierbei entstehen ein dizentrisches Chromosom und ein azentrisches Fragment (aus Levy et al. 2007, S. 145).

Hierbei kann es entweder zu einem Verlust an genetischem Material (azentrische Fragmente) oder zu einer Arretierung in der Anaphase der Zellteilung (di-, polyzentrische Chromosomen) kommen. Dieser Arrest ist ein wesentlicher Bestandteil des mitotischen Zelltodes (Savage 1975; Castedo et al. 2004).

Nach zellulärem Stress, wie z. B. Bestrahlung, kann eine erhöhte Anzahl an Chromosomen (Polyploidie/Aneuploidie) in den betroffenen Zellen beobachtet werden. Auch eine Vielzahl an Tumorzellen zeigt eine Polyploidie/Aneuploidie, welche hauptsächlich durch einen abortiven Zellzyklus entsteht.

Eine Reihe von Defekten bei der Zellteilung (z. B. bei der DNA-Replikation, der Schwesterchromatid-Trennung, der Funktion des Spindelapparates und der Zytokinese) führen zu einem abortiven Zellzyklus. Hierbei kommt es zu einer Entkoppelung von DNA-Replikation und Zellteilung, d. h. die DNA wird (in manchen Fällen sogar mehrere Male) repliziert, die Zelle teilt sich jedoch nicht (Storchova und Pellman 2004).

Durch die Polyploidisierung kommt es sowohl zu einer Größenzunahme der Zelle, als auch zu einer Zunahme der Zentrosomen-Anzahl, welche zu Störungen bei der Zellteilung führen kann. Besitzt die Zelle einen funktionierenden Tetraploidie-Checkpoint, welcher ähnlich wie der p53-abhängige G₁-Checkpoint verläuft, kann es zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose-Induktion kommen. Funktioniert dieser Checkpoint jedoch nicht, so kann die erhöhte Zentrosomen-Anzahl zu einer multipolaren Mitose führen. Bei dieser multipolaren Mitose kann es zur Aneuploidie, zum Zelltod der Zelle oder, in seltenen Fällen, zu einer gleichmäßigen Zellteilung mit zwei diploiden Tochterzellen (Reduktionsmitose) kommen.

Viele Tumorzellen adaptieren sich jedoch an diesen polyploiden Zustand, indem sie die multiplen Zentrosome bei der Mitose an den Spindelpolen versammeln und damit eine bipolare und normal ablaufende Mitose erlauben (Storchova und Pellman 2004).

In Tumorzellen kann es, zusätzlich zur Veränderung der gesamten Chromosomenzahl, zu einer Vielfalt an strukturellen Chromosomenveränderungen kommen: z. B. Deletionen, dizentrische Chromosomen oder Chromosomen-

Translokationen. Dies wird als chromosomale Instabilität (CIN) bezeichnet und stellt einen Typ der genomischen Instabilität dar (Heng et al. 2006).

Kommt es nach einer Bestrahlung weder zu Zelltod, noch zu sichtbaren chromosomalen Veränderungen, so kann in manchen Zellen eine verspätet auftretende genomische/chromosomale Instabilität induziert werden. Unter genomischer Instabilität versteht man eine Art von Schaden, welcher über mehrere Zellgenerationen weitergegeben wird und welcher sich später in einer erhöhten Rate an de-novo-Mutationen, in einer Mikrosatelliteninstabilität, in Genamplifikation, in einer Poly- bzw. Aneuploidie oder in einer CIN manifestiert. Genomische Instabilität tritt dann in einer signifikanten Anzahl an Zellen auf, welche Nachkommen von ursprünglich bestrahlten und überlebenden Mutterzellen sind. Es wird vermutet, dass dieses spätere Auftreten der chromosomalen Schäden durch strahleninduzierte epigenetische Veränderungen der Chromosomen in sogenannten PUCRs (potentially unstable chromosome regions: Potentiell instabile Chromosomregionen) verursacht wird. Alternativ wird auch vermutet, dass die Induktion genomischer Instabilität auf extrazelluläre Faktoren (wie z. B. das vermehrte Auftreten von ROS) zurückzuführen ist (Hendry 2001; Lorimore et al. 2003; Suzuki et al. 2003).

1.3 Histone, Histondeacetylaseinhibitoren (HDAC-Inhibitoren) und deren Wirkung auf Tumorzellen

Histonproteine bilden zusammen mit eukaryotischer DNA nukleosomale Einheiten, welche wiederum zu höheren Chromatinstrukturen gefaltet sind. Die Nukleosomen bestehen aus einem DNA-Abschnitt von 146 Basenpaaren, welcher um ein Oktamer aus paarigen Histonen (H2A, H2B, H3 und H4) geschlungen ist.

Die Histone sind aber nicht nur Strukturproteine, sondern spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Gen-Transkription. Hierbei ist eine Relaxation der DNA-Struktur essentiell für die Einleitung der Transkription, kondensierte Anschnitte können nicht abgelesen werden. Die Relaxation bzw. Kondensation der DNA-Struktur wird vor allem durch Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung der Histonproteine bewirkt (Strahl und Allis 2000; Göttlicher et al.

2001; Krämer et al. 2003; Gui et al. 2004; Marmorstein 2001; Thelen et al. 2004; Liu et al. 2006; Duenas-Gonzalez et al. 2008).

Eine Acetylierung durch Histonacetyltransferasen (HATs) bewirkt hierbei eine Dekondensation, eine Deacetylierung durch Histondeacetylasen (HDACs) eine Kondensation der Chromatinstruktur (Strahl und Allis 2000; Duenas-Gonzalez et al. 2008). Ein Ungleichgewicht zwischen der Aktivität dieser Enzyme, welches die Histonhypoacetylierung fördert, führt zu einer Mindereexpression von Tumor-Suppressor-Genen. Es wird angenommen, dass diese verminderte Expression einen wichtigen Schritt in der Kanzerogenese darstellt (Liu et al. 2006).

Es konnte durch diverse Studien gezeigt werden, dass Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC-Inhibitoren) zu einer Hyperacetylierung von Histonproteinen führen, wodurch bei diversen Malignomtypen antiproliferative Effekte hervorgerufen werden. Zudem wurde ein Effekt auf den programmierten Zelltod, die Differenzierung, die Angiogenese und damit die Zellmigration, Zellinvasion und Metastasierung *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Göttlicher et al. 2001; Gui et al. 2004; Thelen et al. 2004; Zgouras et al. 2004; Camphausen et al. 2005; Liu et al. 2006; Marchion et al. 2005; Angelucci et al. 2006; Xia et al. 2006; Shabbeer et al. 2007).

Ein erst kürzlich erkannter HDAC-Inhibitor der Klasse I ist Valproat (Göttlicher et al. 2001; Phiel et al. 2001; Krämer et al. 2003). Valproat führt *in vitro* und *in vivo* zu einer Hyperacetylierung der N-terminalen Enden von H3 und H4 und es führt bei einer Konzentration von 0,5 mM direkt zu einer Inhibition der enzymatischen Aktivität der Histon-Deacetylase (Duenas-Gonzalez et al. 2008).

1.4 Valproat

Valproat wird seit Jahren weitläufig sowohl bei generalisierten als auch fokalen epileptischen Anfällen eingesetzt. Außerdem wird es seit einiger Zeit bei Migräne, psychiatrischen Erkrankungen (z. B. Bipolare Störungen, Alkoholentzug, Schizophrenie, Borderline-Persönlichkeitsstörung) sowie bei Trigeminusneuralgie oder postherpetischer Neuralgie verwendet (Bowden 2003; Peterson und Naunton 2005; Terbach und Williams 2009).

Valproat (2-propylpentanoic acid, siehe Abbildung 7) ist als kurze, verzweigt-kettige Fettsäure mäßig in Wasser, gut in organischen Lösungsmitteln löslich und stabil bei Raumtemperatur (Kostrouchova und Kostrouch 2007; Duenas-Gonzalez et al. 2008).

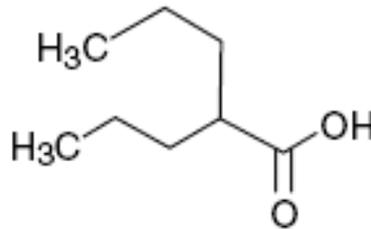


Abbildung 7: Strukturformel von Valproat (aus Peterson und Naunton 2005, S. 417)

Valproat wird fast vollständig hepatisch metabolisiert und über den Urin ausgeschieden. Es hat eine Plasmaproteinbindung bis 95% und bewirkt keine Enzyminduktion. Der therapeutische Serumspiegel bei der antiepileptischen Therapie beträgt 50-100 µg/ml (entspricht 0,33-0,69 mmol/l) bei einer Dosierung von 20 mg/kg/d per os und einer Halbwertszeit von (7)10-16 Stunden (Karow und Lang-Roth 2007; Duenas-Gonzalez et al. 2008).

Als Nebenwirkungen gelten vor allem: Thrombozytopenie, Anstieg der Leberenzyme (transient bei 15 bis 30% und ohne klinische Symptome), selten Leberparenchymnekrose mit Leberversagen (vor allem bei Kindern), Tremor, Teratogenität, gastrointestinale Nebenwirkungen, Gewichtszunahme, Haarausfall. Außerdem kommt es zu einer Substanzinteraktion mit dem Antiepileptikum Lamotrigin (Peterson und Naunton 2005; Duenas-Gonzalez et al. 2008).

Valproat kann den oxidativen Stress in einer Zelle erhöhen, was z. T. für die Nebenwirkungen verantwortlich gemacht wird (Schulpis et al. 2006; Zhang et al. 2010).

In seiner Funktion als HDAC-Inhibitor induziert Valproat bei verschiedenen Tumorzelllinien *in vitro* und *in vivo* eine Histonhyperacetylierung und eine Chromatindekondensation. Dieses führt wiederum zu einem Wachstumsstopp und einer Differenzierung der Tumorzellen. Diese Effekte sind jedoch nach dem

Entfernen von Valproat reversibel (Marchion et al. 2005; Duenas-Gonzales et al. 2007; Ozawa et al. 2009). Des Weiteren kommt es zu einem sowohl radio- als auch chemosensibilisierenden Effekt (Camphausen et al. 2005; Marchion et al. 2005).

In Bezug auf das Prostatakarzinom hemmt Valproat *in vitro* sowohl in androgen-sensitiven als auch in hormonunabhängigen Prostatakarzinom-Zellen die HDAC-Aktivität und kann dadurch sowohl die Zellproliferation hemmen, als auch Apoptose induzieren (Thelen et al. 2004, Angelucci et al. 2006). Entfernt man jedoch das Valproat, so weisen die verbliebenen Prostatakarzinom-Zellen das gleiche proliferative Potential wie unbehandelte Zellen auf (Xia et al. 2006). Der Effekt auf die Tumorzellen ist sowohl von der Valproat-Dosis und Dauer der Therapie als auch von der Zelllinie und dem jeweiligen basalen Genexpressionsmuster der Zellen abhängig (Shabbeer et al. 2007). Auch *in vivo* konnte sowohl eine Proliferationshemmung als auch eine Reduktion des Tumorumfanges gezeigt werden (Xia et al. 2006, Shabbeer et al. 2007).

1.5 HDAC-Inhibitoren und Strahlensensibilisierung

Durch die Inhibition von HDACs wird die Chromatinstruktur relaxiert und die Gen-Expression modifiziert. Jeder dieser Prozesse für sich allein soll an der Regulation der Radiosensitivität beteiligt sein (Camphausen et al. 2005). Daher wurde angenommen, dass der Einsatz von HDAC-Inhibitoren die Wirkung einer Strahlentherapie erhöhen könnte.

Es konnte bereits in Tumorzelllinien von Melanom-, Gliom- und Kolonkarzinom-Patienten gezeigt werden, dass unterschiedliche HDAC-Inhibitoren (und zwar Natriumbutyrat, Phenylbutyrat, Tributyrin, TSA, SAHA und Valproat) einen radiosensibilisierenden Effekt aufweisen (Camphausen et al. 2005; Munshi et al. 2005; Flatmark et al. 2006).

1.6 Fragestellung

In Anlehnung an die einerseits von Camphausen et al. (2005), Munshi et al. (2005) und Flatmark et al. (2006) nachgewiesene Radiosensibilisierung von Tumorzellen durch HDAC-Inhibitoren, sowie andererseits an die von Thelen et al. (2004), Angelucci et al. (2006) und Xia et al. (2006) nachgewiesene wachstumshemmende Wirkung von dem HDAC-Inhibitor Valproat auf Prostatakarzinom-Zellen, ist die Idee entstanden, die synergistische Wirkung von Valproat und Strahlung auf Prostatakarzinom-Zellen zu testen.

Dies konnte K. Golombeck in ihrer Dissertation (Golombeck 2008) an zwei Prostatakarzinom-Zelllinien bereits zeigen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine benigne Prostata-Zelllinie nicht durch Valproat in ihrer Strahlensensitivität beeinflusst wurde (Golombeck 2008).

In der vorliegenden Arbeit sollten die Untersuchungen einer möglichen Strahlensensibilisierung durch Valproat in zwei weiteren Zelllinien (eine maligne und eine benigne) fortgesetzt werden. Das Zellüberleben wurde unter Verwendung des Koloniebildungs-Assays untersucht.

Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, wodurch das reduzierte Überleben der bestrahlten und mit Valproat behandelten Prostatakarzinom-Zellen verursacht werden könnte. Es sollte geklärt werden, ob durch die Valproat-Behandlung eine erhöhte Rate an Apoptose induziert wird. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine zunehmende Polyploidie-Rate, welche letztendlich auch zum Zelltod führen kann, für das verminderte Überleben der Prostatakarzinom-Zellen nach Valproat- und Strahlenbehandlung verantwortlich sein könnte.

Außerdem sollte untersucht werden, ob es bei den verwendeten Zelllinien durch die Behandlung mit Valproat und/oder Bestrahlung zu chromosomaler Instabilität in Form von spät auftretenden chromosomalen Aberrationen kommt.

Die maximale Serumkonzentration von Valproat bei der Behandlung von Epilepsien liegt bei 0,94 mM. Bei höheren Konzentrationen besteht ein signifikantes Risiko an toxischen Nebenwirkungen (z.B. Thrombozytopenie, Somnolenz) (Chen et al. 2006).

Daher wurde für die Versuche in dieser Arbeit die Konzentration von 1mM Valproat gewählt.

Für die Untersuchung der Apoptose-Rate und der chromosomalen Aberrationen wurde bis auf wenige Ausnahmen die in der Strahlentherapie übliche Fraktionsdosis von 2 Gy für die Bestrahlung gewählt, um auch hier die spätere klinische Anwendbarkeit zu verdeutlichen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Zelllinien

BPH-1

Diese Zelllinie wurde durch eine transurethrale Prostataresektion mit anschließender Immortalisierung durch ein T-Antigen gewonnen. BPH-1-Zellen wachsen in Zellkultur als „Pflastersteinartige“ Monolayer und sind nicht krebserzeugend in Mäusen. BPH-1-Zellen exprimieren sowohl das T-Antigen als auch einen erhöhten p53-Level. Es handelt sich um aneuploide Zellen mit der Modalzahl 76 Chromosomen/Zelle. Eigene Zählungen haben eine Modalzahl von 68 Chromosomen/Zelle ergeben. Das exprimierte Zytokeratinprofil entspricht dem einer luminalen Prostata-Epithelzelle. Testosteron hat keinen direkten proliferativen Effekt auf BPH-1-Zellen. Weder Androgen-Rezeptoren noch Prostata-spezifisches Antigen (PSA) noch saure Prostataphosphatase konnten nachgewiesen werden (Hayward et al. 1995).

PNT-2

Bei der PNT-2-Zelllinie handelt es sich laut ECACC (European collection of cell cultures) um eine durch Transfektion mit einem SV40-Plasmid immortalisierte normale Prostataepithelzelllinie, welche post mortem von einem 33-jährigen Mann isoliert wurde. Sie exprimiert das Large-T-Protein und hat die Eigenschaften einer gut differenzierten luminalen Zelle der Prostatadrüsen. Sie ist nicht krebserzeugend in Nacktmäusen. Es wurde eine Modalzahl von 72 Chromosomen/Zelle bestimmt.

DU-145

Die DU-145-Zelllinie wurde durch Stone et al. (1978) aus einer Gehirnmastase eines 69 Jahre alten, männlichen, kaukasischen Patienten isoliert, welcher unter einem metastasierten Prostatakarzinom und außerdem seit drei Jahren unter lymphozytärer Leukämie litt.

Die Zelllinie ist nicht nachweisbar hormonsensitiv, nur wenig positiv für saure Phosphatase und exprimiert kein Prostata-spezifisches Antigen.

Es handelt sich um eine hypotriploide Zelllinie mit der Modalzahl 62 Chromosomen/Zelle. 3% der Zellen zeigen eine höhere Ploidie. Diese Werte konnten durch Pan et al. (1999) bestätigt werden.

In eigenen Untersuchungen wurde eine Modalzahl von 59 Chromosomen/Zelle ermittelt.

PC-3

Die PC-3-Zelllinie wurde durch Kaighn et al. (1979) aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen, kaukasischen Mannes, welcher unter einem metastasierten Prostatakarzinom litt, isoliert.

Die Zellen zeigen eine geringe saure Phosphatase- und 5- α -Testosteron-Reduktase-Aktivität.

Die Zelllinie ist laut ATCC hypotriploid mit einer Modalzahl von 62 Chromosomen/Zelle (ATCC). Pan et al. (1999) identifizierten jedoch sowohl hypotriploide als auch hypotetraploide Subklone mit 58 (57-61) und 113 (112-114) Chromosomen/Zelle, was auf eine während der Zellkultur gewachsene Subpopulation mit Verdopplung des Genoms hindeutet. Durch eigene Zählungen wurde eine Modalzahl von 55 Chromosomen/Zelle ermittelt.

			2.2 Verwendete Nährlösungen
- BPH-1:	RPMI	400 ml	
	FKS	100 ml	
	Glutamin	5 ml	
	Insulin	125 µl	
	Apo-Transferrin	125 µl	
	Sodium Selenite	25 µl	
	Testosteron	10 µl	
- PNT-2:	RPMI	350 ml	
	DMEM (Biochrom)	90 ml	
	FKS	50 ml	
	Glutamin	10 ml	
- DU-145:	RPMI	450 ml	
	FKS	50 ml	
	Glutamin	10 ml	
- PC-3:	RPMI	200 ml	
	HAM's F12	200 ml	
	FKS	50 ml	
	Glutamin	10 ml	

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien und Lösungen befindet sich im Anhang.

2.3 Kulturbedingungen

Die An- und Weiterzucht, sowie das Ausimpfen der Zellen erfolgten unter keimarmen Bedingungen unter einer Sterilbank mit sterilem Zubehör. Die Zellen wurden in sterilen 50-ml- bzw. 250-ml-Gewebekulturflaschen mit 5 ml bzw. 15 ml der jeweiligen Nährlösung ausgeimpft und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Je nach Zellbedarf und Wachstumsfortschritt wurden die Zellen passagiert, wobei zunächst die gebrauchte Nährlösung verworfen wurde. Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen und aus ihrem Verband zu lösen wurden sie zweimal mit PBS gespült um eventuelle Reste der Nährlösung zu entfernen und somit einer Inaktivierung des Trypsins durch FKS vorzubeugen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 bis 2 ml Trypsin/EDTA (10%) versetzt und für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen in ihrer jeweiligen Nährlösung resuspendiert, wenn nötig mit einer 2-ml-Pipette vereinzelt und je nach Zellzahl und Bedarf in neue Flaschen umgesetzt.

Das Medium wurde unter Wahrung der Versuchsbedingungen gewechselt, wenn mehr als fünf Tage zwischen den Passagen lagen.

2.4 Bestrahlungsaufbau

Die Bestrahlung wurde mit einem Linearbeschleuniger der Firma Varian (Palo Alto, USA) durchgeführt. Es wurden 6 MeV-Röntgenstrahlen eingesetzt, bei einer Dosisrate von 2,4 Gy pro Minute. Zum Dosisaufbau wurden die zu bestrahlenden Kulturflaschen auf eine Plexiglasplatte mit 1 cm Durchmesser gestellt und die Gantry in 180° Position gefahren. Die Feldgröße betrug (40 x 25) cm, der Abstand zwischen Fokus und Plexiglasplatte betrug 100 cm. Die Dosimetrie erfolgte durch die Physiker der Klinik für Strahlentherapie, Universität Göttingen.

Die Kulturflaschen wurden direkt vor der Bestrahlung aus dem CO₂-Brutschrank entnommen und direkt nach der Bestrahlung wieder in den Inkubator gestellt. Die

unbestrahlte Kontrolle wurde ebenfalls zum Bestrahlungsgerät transportiert, dort aber außerhalb des Kontrollbereichs für die Zeit der längsten Bestrahlung gelagert.

2.5 Klonogenes Überleben (DU-145 und PNT-2)

Ausimpfen der Zellen

Die Zellen wurden abtrypsiniert, vereinzelt und in ihrer jeweiligen Nährlösung resuspendiert. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde in eine vorbereitete Neubauer Zählkammer getropft. Der Mittelwert der in vier Zählkammern gezählten vitalen Zellen x 10.000 ergab die Zellzahl pro ml Zellsuspension. Aus dieser Zellsuspension wurden dann durch eine entsprechende Verdünnung Lösungen mit 10.000 und 1.000 Zellen/ml hergestellt. Dann wurden definierte Zellzahlen in zuvor mit 5 ml der jeweiligen Nährlösung befüllten 50-ml-Gewebekulturflaschen ausgeimpft.

Versuchsordnung

Die Fähigkeit der Zellen, nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung Kolonien zu bilden, wurde mit einem standardisierten Koloniebildungstest evaluiert.

Hierzu wurden bestimmte Zellzahlen (von 500 bis 6000) zu einem Drittel in normalem Nährmedium, sowie zu zwei Dritteln in Nährmedium mit 1 mmol Valproat in 50-ml-Gewebekulturflaschen ausgeimpft. Diese Zellen wurden 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und dann mit 0 bis 6 Gy bestrahlt, anschließend wurden sie weiter inkubiert. Sowohl die bestrahlten als auch die unbestrahlten Zellen wurden während des Transports zum Bestrahlungsgerät der Raumtemperatur und bewegungsbedingten Erschütterungen ausgesetzt.

24 und 96 Stunden nach der Bestrahlung wurde das Nährmedium gewechselt, so dass ein Drittel der Zellen gar nicht, ein Drittel für 48 Stunden (24 Stunden vor und 24 Stunden nach Bestrahlung) und das letzte Drittel für 120 Stunden (24 Stunden vor und 96 Stunden nach Bestrahlung) mit 1 mmol Valproat inkubiert wurden.

Insgesamt wurden die Zellen für 10 bis 13 Tage nach der Bestrahlung kultiviert.

Anschließend wurden sie mit 70% Alkohol für 20 Minuten fixiert und dann mit Kristallviolett (1 ml Kristallviolett; 160 ml Aqua bidest und 40 ml Ethanol) für 20 Minuten gefärbt.

Auswertung

Die Gewebekulturflaschen mit den fixierten und gefärbten Kolonien wurden bei 16- bis 25-facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop ausgewertet, indem die Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt und als überlebender Klon gewertet wurden.

Der Versuch wurde mehrfach wiederholt, so dass jeder Punkt der Überlebenskurve aus mindestens 12 einzelnen Messpunkten berechnet wurde.

Das normierte klonogene Überleben S/S_0 wurde so berechnet, dass alle Daten auf die Kontrolle (kein Valproat, keine Bestrahlung) bezogen wurden, wobei das relative Überleben S_0 der unbestrahlten Kontrolle hier gleich eins gesetzt wurde.

Zur Anpassung der Überlebenskurven diente das Linear-Quadratische Modell von Kellerer und Rossi (1973).

Die Unterschiede zwischen einzelnen Werten wurden mit dem Student t-Test auf dem 95%-Signifikanzniveau geprüft.

$$S / S_0 = e^{-(\alpha D + \beta D^2)} \quad (1)$$

bzw.

$$\ln S / S_0 = -(\alpha D + \beta D^2) \quad (2)$$

wobei

D = Strahlendosis

α/β = Koeffizienten

2.6 Apoptose

Für die morphologische Auswertung der Apoptose wurden ca. 500.000 Zellen pro Messzeitpunkt benötigt. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Valproat-Inkubation (1 mM) mit 2 Gy bestrahlt und anschließend für weitere 24 bzw. 96 Stunden mit 1 mM Valproat inkubiert. Zum Vergleich wurden Kontrollen ohne Behandlung, mit alleiniger Valproat-Inkubation oder mit alleiniger Bestrahlung hergestellt.

Die Zellreihe DU-145 wurde ebenfalls mit 4 Gy bestrahlt, da in den klonogenen Überlebenskurven ein deutlicher Effekt des Valproats erst bei steigender Strahlendosis zu sehen war.

Zu den Zeitpunkten 24; 48; 72 Stunden (PNT-2, PC-3, BPH-1) sowie 24 und 72 Stunden (DU-145) nach Abschluss der Behandlung wurden die Zellen fixiert. Hierzu wurde der Überstand in einem separaten Röhrchen abzentrifugiert und das Pellet mit 2 ml der jeweiligen Nährlösung resuspendiert. Die an dem Boden der Kulturflasche anhaftenden Zellen wurden mit 1 ml Trypsin für 10 Minuten inkubiert, in Nährlösung resuspendiert, dann abzentrifugiert und in 2 ml der jeweiligen Nährlösung erneut resuspendiert.

Beide Proben wurden nun mit der jeweiligen Nährlösung auf 4 ml aufgefüllt und mit je 1 ml 5% Formaldehyd-Lösung versetzt. Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

Vor der Auswertung wurden die Proben erneut für 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 0,5 ml abgenommen. Die Proben vom Überstand wurden nun zu den eigentlichen Proben vom Flaschenboden hinzugegeben. Nach erneuter Resuspension der Zellen wurden 45 µl der Zellsuspension mit 5 µl der Apoptose-Färbelösung in einem Eppendorf-Hütchen gemischt und auf zwei Objektträger, je 25 µl, aufgetropft. Diese wurden mit Deckgläschen abgedeckt und im Dunkeln für 8 bis 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die späte Apoptose zeichnet sich durch Kernfragmentierungen in Form von

Apoptosekörperchen aus. Die frühe Apoptose zeichnet sich durch kondensierte, hell leuchtende Zellkerne aus, die rund bzw. Halbmond-förmig sind.

Es wurden jeweils 5 mal 100 Zellen ausgewertet und der Anteil an apoptotischen Zellen bestimmt.

2.7 Bestimmung der Polyploidie-Rate und der chromosomalen Instabilität

Die Analyse der strahleninduzierten und spontanen Chromosomen-Aberrationsrate wurde 8 und 15 Tage nach einer Bestrahlung mit und ohne Valproat-Vorbehandlung in allen vier Zelllinien durchgeführt. Es wurden Proben mit alleiniger 48- bzw. 120-stündiger 1 mM Valproat-Inkubation, alleiniger Bestrahlung mit 2 Gy und die Kombination von Valproat-Inkubation (sowohl 48 als auch 120 Stunden) und Bestrahlung mit einer Kontrolle verglichen. Zusätzlich wurden bei den Zelllinien PNT-2 und DU-145 28 Stunden nach der Bestrahlung der Anteil an polyploiden Zellen sowie die Art und Anzahl von chromosomalen Aberrationen bestimmt.

Die Valproat-Inkubation erfolgte 24 Stunden vor und 24 bzw. 96 Stunden nach Bestrahlung. Konfluente Zellmonolayer wurden in der G₁-Phase bestrahlt.

Bei allen Zelllinien erfolgte ein Mediumwechsel 24 und 96 Stunden nach der Bestrahlung, wobei wiederum die Hälfte der Zellen aus einer Gewebekulturflasche verworfen wurde um genügend Platz für erneute Teilungen zu schaffen.

Die BPH-1- und PC-3-Zellen wurden außerdem am Tag 6 und 13, die PNT-2 und DU-145-Zellen am Tag 7 und 14 neu umgesetzt, wobei die Hälfte der Zellen verworfen wurde um Platz für weitere Teilungen zu schaffen.

Herstellung der Chromosomenpräparate

Zunächst wurde Colcemid (40 µl/ml ~~in~~ Lösung) zu den Zellen in die Gewebekulturflaschen gegeben. Colcemid inhibiert die Ausbildung des Mitosespindelapparates und verhindert dadurch die Segregation der Chromosomen auf die Tochterzellen. Die Zellen können die begonnene Mitose nicht beenden, sondern verbleiben in der für die Chromosomenpräparation besonders geeigneten

Metaphase. Das Colcemid musste 4 Stunden einwirken, dann wurden die mitotischen Zellen durch Abklopfen vom Flaschenboden und durch Abstreichen mit einem sterilen Zellschaber in die Nährlösung suspendiert und anschließend bei 1200 Umdrehungen/Minute und bei Raumtemperatur 10 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in hypotoner Lösung¹ aufgenommen und erneut 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurde das Pellet wieder in hypotoner Lösung aufgenommen und nun 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert um die Zellmembranen zu zerstören. Nachdem die Lösung wieder 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen/Minute zentrifugiert wurde, wurde das Pellet in Fixier-Lösung (3 Teile Methanol, 1 Teil Essigsäure) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt und dann wurde das Pellet erneut in ca. 1 ml Fixier-Lösung aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 25 µl auf einen Objektträger aufgetropft.

Die luftgetrockneten Objektträger wurden anschließend mit Giemsa-Färbelösung (4,5 ml Giemsa-Färbelösung mit 25 ml Aqua bidest) für 11 Minuten gefärbt.

Auswertung

Auf den Objektträgern wurden, zunächst bei 10-facher Vergrößerung, ein bis drei mal 100 Zellen nach ihrem Chromosomensatz („diploid“ (Chromosomenzahl entspricht der Modalzahl) oder tetra- bzw. polyploid) beurteilt.

Dann wurden auch die gefärbten Chromosomen der „diploiden“ Zellen bei 100-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop morphologisch beurteilt. Pro Messpunkt wurden hier mindestens 100 Zellen ausgewertet. Durch mehrfaches Auswerten einiger Messpunkte konnte gezeigt werden, dass die Variabilität zwischen mehreren Zählungen gering ist und 100 bzw. 150 ausgewertete Zellen pro Messzeitpunkt ausreichend sind.

¹ siehe Anhang

War der Anteil an höherploiden Zellen größer als 10%, so wurden in 50 von diesen Zellen ebenfalls strukturelle Chromosomenaberrationen ausgewertet.

Chromosombruchstücke (terminale und interstitielle Deletionen) ohne Zentromer und Chromatidbrüche wurden als azentrische Fragmente ausgewertet. Chromosomen mit zwei Zentromeren als Folge eines kompletten interchromosomalen Austausches zwischen zwei fusionierten Chromosomen, begleitet von einem azentrischen Fragment, wurden als dizentrische Chromosomen ausgewertet. Desweiteren wurden komplexe Chromatid-Austauschfiguren als solche gewertet. Es wurde die Summe aller Aberrationen gebildet und die genomische Aberrationshäufigkeit pro Zelle y_{Ab} wie folgend berechnet:

$$y_{Ab} = \frac{N_{Ab}}{N}$$

Anzahl der ausgewerteten Zellen

Gesamtzahl der in der Giemsa-Färbung ausgewerteten Chromosomenaberrationen.

2.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden Student t-Test, F-Test, sowie ANOVA gefolgt von Tukey HSD verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 PNT-2

3.1.1 PNT-2: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation

Die Koloniebildungsfähigkeit nach einer 48- als auch 120-stündigen Inkubation mit 1 mM Valproat zeigte bei den PNT-2-Zellen keinen signifikanten ($P = 95\%$) Unterschied gegenüber der unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 8). Die Werte wurden paarweise mittels Student t-Test geprüft.

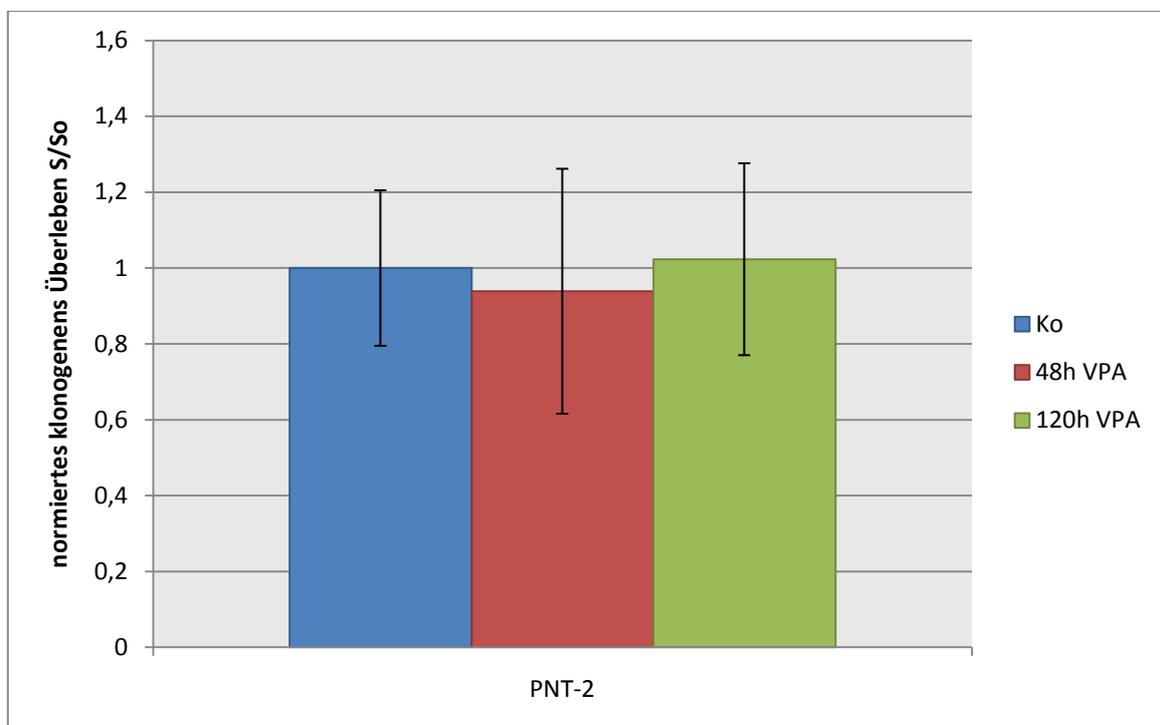


Abbildung 8: Koloniebildung von PNT-2-Zellen nach 48- und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Es wurden Klone >50 Zellen ausgewertet. Jeder Messpunkt repräsentiert mindestens 12 Einzelwerte. Auf der Ordinate wird das relative klonogene Überleben bezogen auf die auf eins normierte unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Mittelwerten wurde auf 95%-Niveau paarweise mittels des Student t-Test geprüft. Sowohl nach 48- als auch nach 120-stündiger Valproat-Inkubation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

3.1.2 PNT-2: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung

Die Koloniebildungsfähigkeit wurde unter 48- bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat und Bestrahlung (0 bis 6 Gy) untersucht.

Tabelle 1: Die Werte der Koeffizienten α und β der linear-quadratischen Anpassung der klonogenen Überlebenskurven für PNT-2-Zellen.

	α	β
Bestrahlung	$0,38 \pm 0,002$	$0,02 \pm 0,001$
48h VPA + Bestrahlung	$0,55 \pm 0,030$	$0,004 \pm 0,01$
120h VPA + Bestrahlung	$0,58 \pm 0,008$	$0,01 \pm 0,003$

Valproat in Kombination mit einer Bestrahlung hatte bei dieser Zelllinie, wie in Abbildung 9 dargestellt, in Bezug auf das klonogene Überleben keinen signifikanten ($P = 95\%$) Einfluss im Vergleich zur allein bestrahlten Kontrolle. Die Werte wurden paarweise mittels Student t-Test auf 95%-Niveau getestet.

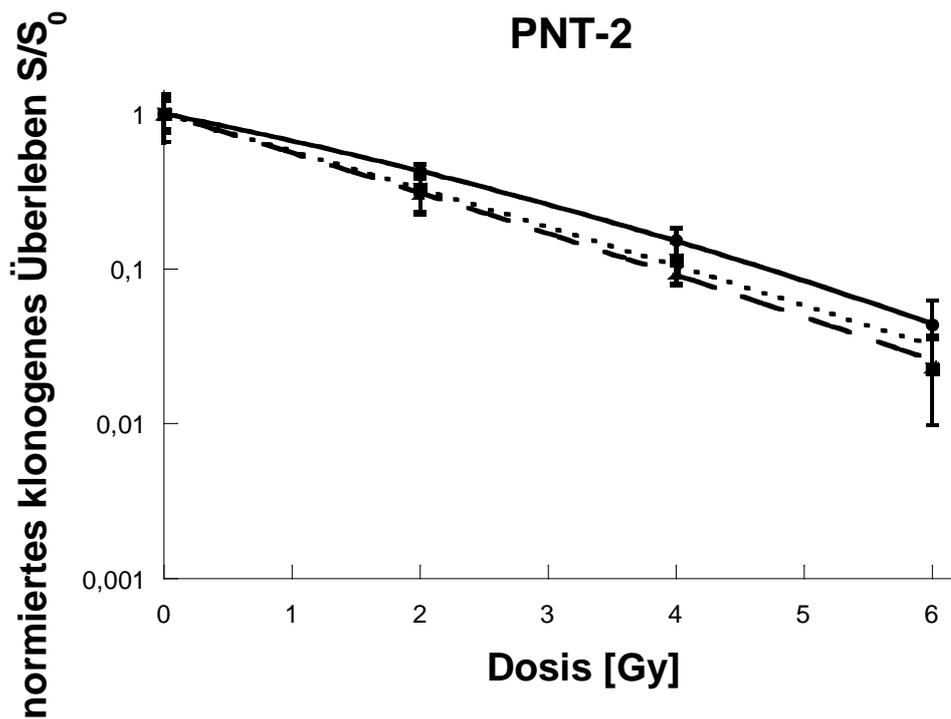


Abbildung 9: Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostata-Zelllinie PNT-2 in Abhängigkeit der Strahlendosis in Kombination mit 48-stündiger Inkubation (■) bzw. 120-stündiger Inkubation (▲) mit 1mM Valproat gegenüber einer nur bestrahlten Kontrolle (●) ohne Valproat -Behandlung. Es wurden nur Klone >50 Zellen ausgewertet. Auf der Ordinate wurde das relative klonogene Überleben S/S_0 bezogen auf die auf Eins normierte unbestrahlte Kontrolle logarithmisch aufgetragen. Auf der Abszisse wurde die zunehmende Strahlendosis linear aufgetragen. Einzelne Punkte repräsentieren Mittelwerte aus mindestens 12 Einzelmessungen. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

Tabelle 2: Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der normalen Prostata-Zelllinie PNT-2 nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen in Kombination mit 48- bzw. 120-stündiger Behandlung mit 1 mM Valproat im Vergleich mit einer alleinig bestrahlten Kontrolle.

Dosis	Kontrolle	48h VPA	120h VPA
0 Gy	1,00 ± 0,20	1,00 ± 0,34	1,00 ± 0,25
2 Gy	0,43 ± 0,05	0,33 ± 0,09	0,31 ± 0,08
4 Gy	0,15 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,02
6 Gy	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01

Die einzelnen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 12 Einzelwerten und die dazugehörigen Standardabweichungen.

3.1.3 PNT-2: Apoptose

Die Apoptose-Rate (d.h. der relative Anteil apoptotischer Zellen in %) wurde nach einer 48- bzw. 120-stündigen Valproat-Inkubation in Kombination mit einer Bestrahlung im Vergleich mit den jeweiligen unbehandelten, bzw. alleinig bestrahlten Kontrollen bestimmt.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, liegt die Apoptose-Rate der PNT-2-Zellen bei ca. 4% und lässt sich weder durch eine 48-stündige Valproat-Inkubation (1 mM), noch durch eine Bestrahlung mit 2 Gy, noch durch eine Kombination aus beidem signifikant ($P = 95\%$) steigern. Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

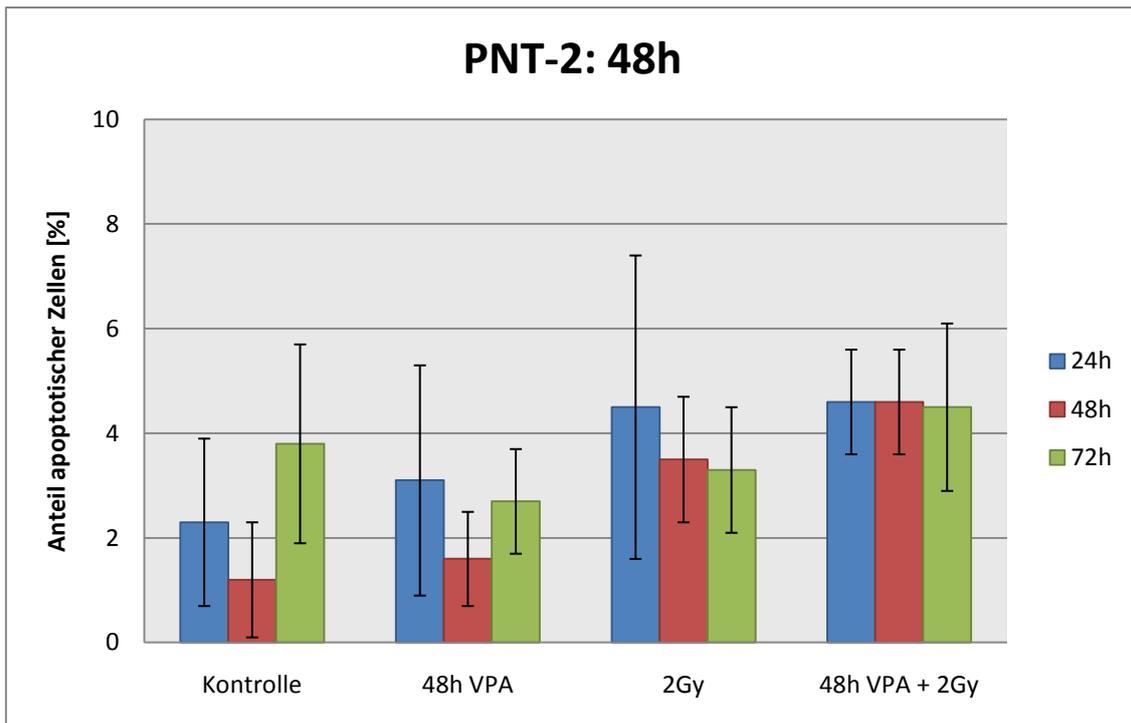


Abbildung 10: Anteil apoptotischer PNT-2-Zellen nach 48-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Abschluss der Behandlung fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Es wurden jeweils 5 mal 50 Zellen ausgewertet und der Mittelwert berechnet. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung wieder.

Die Apoptose-Rate der PNT-2-Zellen hat sich, wie aus der Abbildung 11 ersichtlich, 24 Stunden nach Abschluss der Valproat-Behandlung (1 mM) und Bestrahlung (2 Gy), bei einer Behandlungs-/Kulturdauer von 120 Stunden, gegenüber einer alleinig bestrahlten Kontrolle signifikant ($P = 95\%$) von ca. 4% auf ca. 8% steigern lassen. Die Einzelwerte wurden wiederum mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft. Aber auch in diesem Fall blieb die Apoptose-Rate (ca. 8%) sehr niedrig und somit ohne klinische Relevanz.

Sowohl eine alleinige 120-stündige Behandlung mit 1 mM Valproat als auch deren Kombination mit einer Bestrahlung mit 2 Gy führte zu einem früheren Auftreten des Maximums der Apoptose-Rate schon nach 24 Stunden.

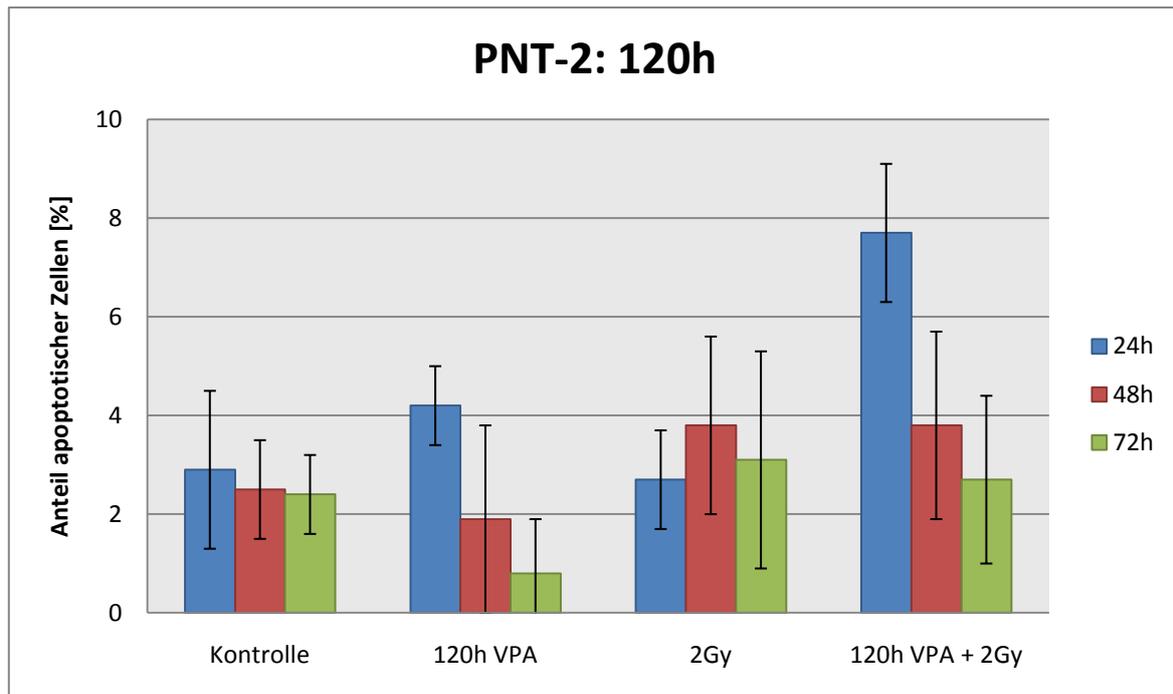


Abbildung 11: Anteil apoptotischer PNT-2-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Abschluss der Behandlung fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Es wurden jeweils 5 mal 50 Zellen ausgewertet und der Mittelwert berechnet. Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung wieder.

Tabelle 3: Anteil apoptotischer PNT-2-Zellen nach 48- bzw. 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Abschluss der Behandlung fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

	Messzeitpunkt	24 h	48 h	72 h
		[%]	[%]	[%]
48 h	Kontrolle	2,3 ± 1,6	1,2 ± 1,1	3,8 ± 1,9
	48h VPA	3,1 ± 2,2	1,6 ± 0,9	2,7 ± 1,0
	2 Gy	4,5 ± 2,9	3,5 ± 1,2	3,3 ± 1,2
	48h VPA + 2 Gy	4,6 ± 1,0	4,6 ± 1,0	4,5 ± 1,6
120 h	Kontrolle	2,9 ± 1,6	2,5 ± 1,0	2,4 ± 0,8
	120h VPA	4,2 ± 0,8	1,9 ± 1,9	0,8 ± 1,1
	2 Gy	2,7 ± 1,0	3,8 ± 1,8	3,1 ± 2,2
	120h VPA + 2 Gy	7,7 ± 1,4	3,8 ± 1,9	2,7 ± 1,7

Anteil apoptotischer Zellen aus 5 mal 50 ausgezählten PNT-2-Zellen und die zugehörigen Standardabweichungen.

3.1.4 PNT-2: Polyploidisierungs-Rate

Der Einfluss einer Behandlung mit 1 mM Valproat (48- oder 120 Stunden) oder einer Bestrahlung mit 2 Gy, sowie deren Kombination auf die Häufigkeit von tetra- und polyploiden Zellen in Kurz- und Langzeitkulturen (28 Stunden bzw. 8 und 15 Tage) wurde in unbehandelten Kontrollen sowie nach einer Behandlung mit Valproat (sowohl mit, als auch ohne Bestrahlung mit 2 Gy) untersucht. Hierbei entsprechen 28 Stunden Kulturdauer der Fixierung zum Zeitpunkt der ersten Mitose.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, wurden bei allen Versuchsanordnungen weniger als 15% tetra- und polyploide Zellen gefunden. Die Rate an tetra- und- polyploiden Zellen war in Kurzzeitkulturen (28 Stunden) deutlich und signifikant ($P = 95\%$) höher als in den Langzeitkulturen. Man kann also davon ausgehen, dass die polyploiden Zellen nach mehreren mitotischen Teilungen bei einer längeren Kulturdauer zunächst in den mitotischen und schließlich in den endgültigen Zelltod gehen. Jedoch haben weder die Valproat-Behandlung, noch die Bestrahlung, noch die Kombination aus beidem einen signifikanten ($P = 95\%$) Effekt auf die Rate der tetra- und polyploiden PNT-2-Zellen gehabt. Getestet wurden die Mittelwerte paarweise mittels F-Test.

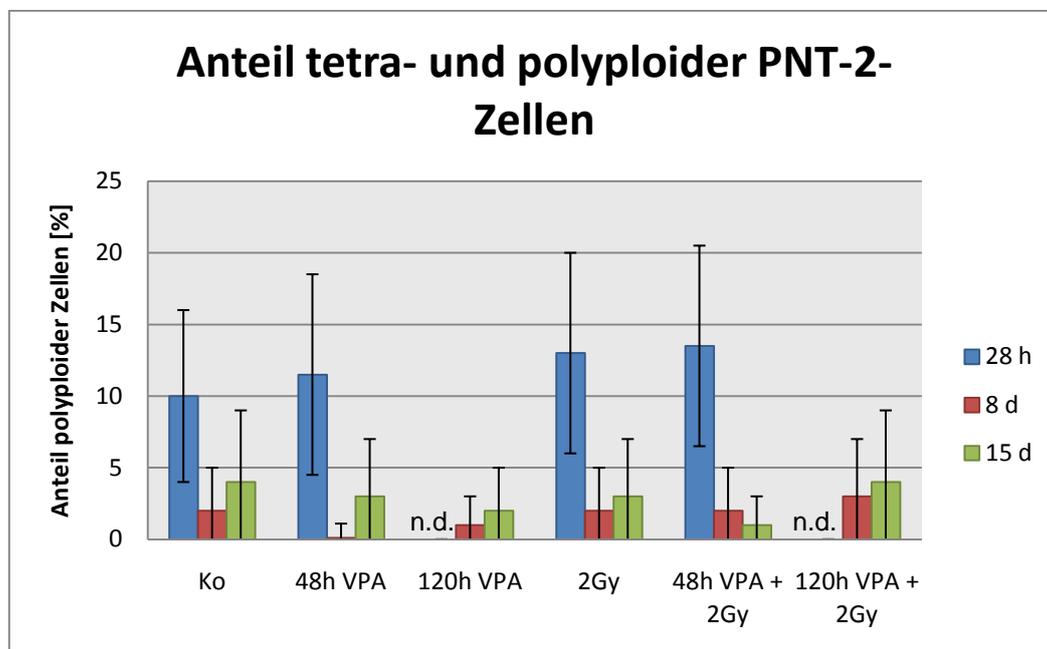


Abbildung 12: Prozentualer Anteil an tetra- (ca. 140 Chromosomen/Zelle) und polyploiden (>160 Chromosomen/Zelle). Die Fehlerbalken geben die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche wieder.

Tabelle 4: Prozentualer Anteil an tetraploiden (ca. 140 Chromosomen/Zelle) und an polyploiden (>160 Chromosomen/Zelle) PNT-2-Zellen.

Anteil an tetra- und polyploiden Zellen			
[%]			
	Kulturzeit: 28 Stunden	Kulturzeit: 8 Tage	Kulturzeit: 15 Tage
Ko	10 ± 6	2 ± 3	4 ± 5
48h-VPA- Inkubation	11,5 ± 7	0 ± 1	3 ± 4
120h-VPA- Inkubation	n. d.	1 ± 2	2 ± 3
2Gy	13 ± 7	2 ± 3	3 ± 4
48h-VPA- Inkubation + 2Gy	13,5 ± 7	2 ± 3	1 ± 2
120h-VPA- Inkubation + 2Gy	n. d.	3 ± 4	4 ± 5

Aufgrund der geringen Anzahl an Mitosen wurden nur einmal 100 Zellen ausgewertet. Da darunter auch sehr wenige tetra- und polyploide Zellen waren, konnte eine Poisson-Verteilung angenommen werden und somit erfolgte die Fehlerschätzung anhand der 95%-Poisson-Vertrauensbereiche.

3.1.5 PNT-2: Chromosomale Instabilität

Der Einfluss der Behandlung mit 1 mM Valproat und der Bestrahlung mit $D = 2$ Gy, sowie deren Kombination auf die Häufigkeit von chromosomalen Aberrationen wurde 28 Stunden (zum Zeitpunkt der ersten Mitose), bzw. 8 und 15 Tage nach Bestrahlung untersucht. Dafür wurden alle strukturellen Chromosomenaberrationen zusammengefasst und die Aberrationsrate der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle subtrahiert. Im Endeffekt erhält man so den Nettoeffekt auf die zusätzlich durch die jeweilige Behandlung entstehenden Chromosomenaberrationen.

In Abbildung 13 und Tabelle 5 sind diese chromosomalen Aberrationsraten dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter ($P = 95\%$) Unterschied zwischen den Raten an chromosomalen Aberrationen nach 28 Stunden Kulturzeit. Die Mittelwerte wurden paarweise mittels F-Test verglichen. So ist nach einer Bestrahlung mit 2 Gy die Rate an Aberrationen signifikant höher als nach alleiniger Valproat-Behandlung. Die Kombination von beidem erhöht die Aberrationsrate zusätzlich. Der Tabelle 21 im Anhang kann man jedoch entnehmen, dass es sich bei der Masse der Aberrationen um Fragmentbildung handelt. Da diese bekanntermaßen nicht letal für die Zellen sind, spiegelt sich dieses Ergebnis nicht in den Überlebenskurven (S/S_0) wider.

Nach einer längeren Kulturzeit ist die Rate der chromosomalen Aberrationen signifikant ($P = 95\%$, F-Test) geringer, was darauf hin deutet, dass diese Fragmente und zum Teil auch dizentrische Chromosomen durch mitotische Teilung verloren gehen können. Daher stellen sie sich in den Langzeitkulturen (8 und 15 Tage) nicht mehr dar.

Nach 8 Tagen Kulturzeit ist der Effekt von Valproat verlorengegangen und die chromosomalen Aberrationsraten unterscheiden sich unter den jeweiligen Versuchsbedingungen nicht signifikant ($P = 95\%$, F-Test) voneinander.

Nach einer Kulturzeit von 15 Tagen zeigt sich ein kleiner, aber signifikanter ($P = 95\%$, F-Test) Anstieg der chromosomalen Aberrationsrate nach der Kombinationsbehandlung mit 120 Stunden Valproat und 2 Gy Bestrahlung gegenüber den unbehandelten bzw. unbestrahlten Kontrollen. Alle anderen Versuchsbedingungen zeigten hier keine signifikanten Unterschiede in der

chromosomalen Aberrationsrate. Dies deutet auf eine leichte Induktion der chromosomalen Instabilität durch die Kombinationsbehandlung, 120 Stunden Valproat und 2 Gy Bestrahlung, hin.

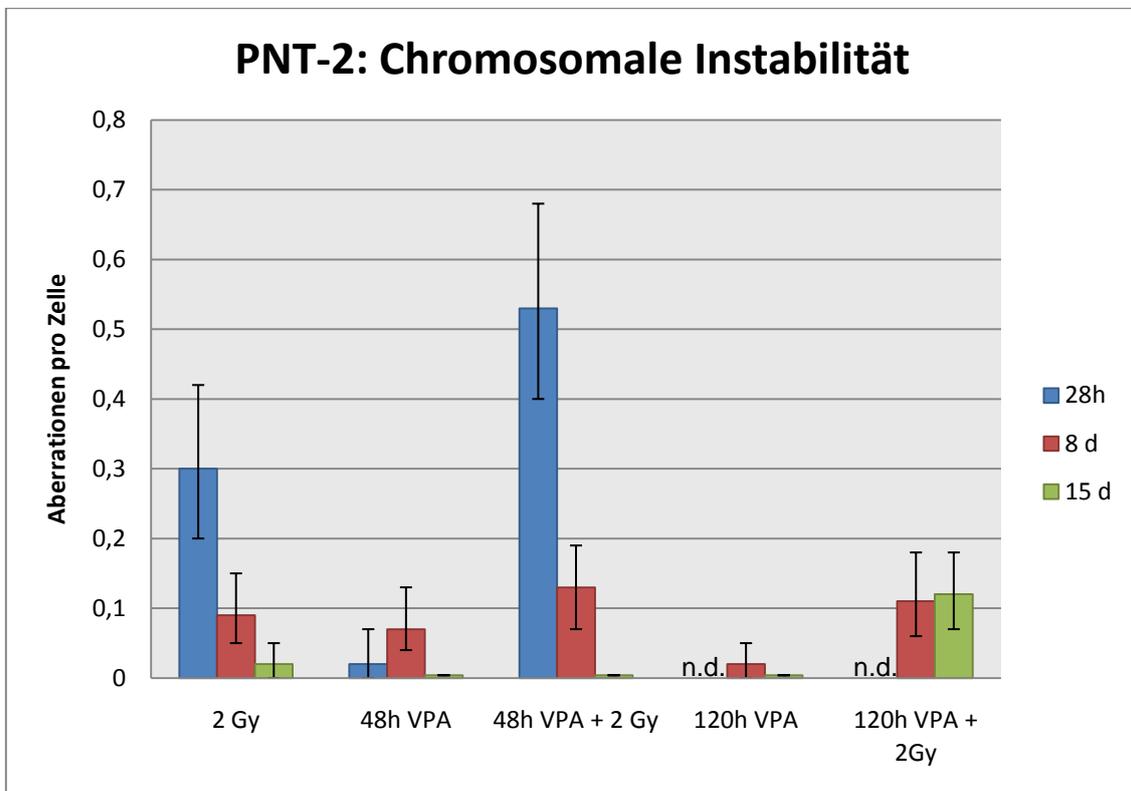


Abbildung 13: Chromosomale Instabilität der PNT-2-Zellen. Alle in der Giemsa-Färbung erkennbaren Chromosomenaberrationen aus jeweils 150 (28h: 100-200) ausgezählten Zellen. Die dargestellten Werte zeigen den Nettoeffekt der durch Valproatbehandlung, durch Bestrahlung, bzw. durch eine Kombination aus beidem induzierten chromosomalen Instabilität. Diese Werte wurden durch die Subtraktion der in der Kontrolle aufgetretenen Raten an Aberrationen gewonnen und stellen somit die durch die jeweilige Behandlung zusätzlich aufgetretenen Chromosomenaberrationen dar. Die Fehlerbalken geben die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche wieder.

Tabelle 5: Chromosomale Instabilität der PNT-2-Zellen. Alle in der GIEMSA-Färbung erkennbare Chromosomenaberrationen aus jeweils 150 (28h: 100-200) ausgezählten Zellen. Die Werte der Kontrolle wurden abgezogen, um den Nettoeffekt der chromosomalen Instabilität darzustellen.

	28h <95%PVB>	8d <95%PVB>	15d <95%PVB>
2 Gy	0,3 <0,20;0,42>	0,09 <0,05;0,15>	0,02 <0;0,05>
48h VPA	0,02 <0;0,07>	0,07 <0,04;0,13>	0 <0;0,02>
48h VPA + 2 Gy	0,53 <0,40;0,68>	0,13 <0,07;0,19>	0 <0;0,02>
120h VPA	n. d.	0,02 <0;0,05>	-0,04 <-0,09;-0,02>
120h VPA + 2 Gy	n. d.	0,11 <0,06;0,18>	0,12 <0,07;0,18>

3.2 BPH-1

Da diese Arbeit als eine Weiterführung einer früheren Dissertation (Golombeck 2008) entstanden ist, wurden die bereits von ihr durchgeführten Experimente nicht wiederholt, sondern nur erweitert. Um aber eine vollständige Darstellung der Ergebnisse zu ermöglichen sind hier die Ergebnisse aus der Dissertation von Kristin Golombeck (2008) in Punkt 3.21 und 3.22 übernommen worden.

3.2.1 BPH-1: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation

Die Koloniebildungsfähigkeit nach einer 48- als auch 120-stündigen Inkubation mit 1 mM Valproat zeigte bei den BPH-1-Zellen keinen signifikanten ($P = 95\%$) Unterschied gegenüber der unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 14). Die Mittelwerte wurden paarweise mittels Student t-Test geprüft.

BPH-1

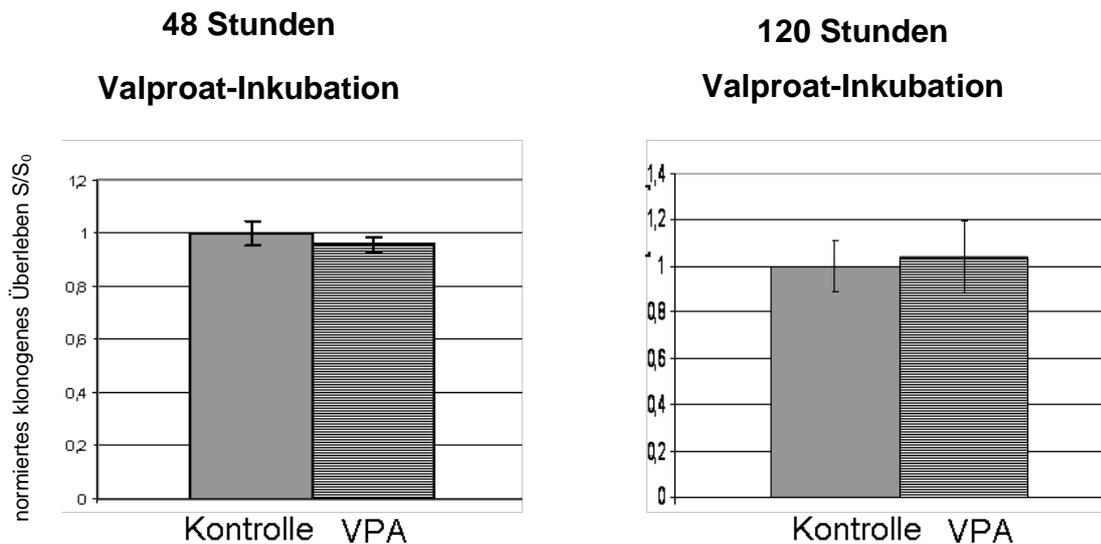


Abbildung 14: (aus Golombeck 2008, S. 34): Koloniebildung von BPH-1-Zellen nach 48- und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Es wurden Klone >50 Zellen ausgewertet. Jeder Messpunkt repräsentiert mindestens 8 Einzelwerte. Auf der Ordinate wird das relative klonogene Überleben bezogen auf die auf Eins normierte unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Mittelwerten wurde auf 95%-Niveau paarweise mittels Student t-Test geprüft. Sowohl nach 48- als auch nach 120-stündiger Valproat-Inkubation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

3.2.2 BPH-1: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung

Die Koloniebildungsfähigkeit wurde unter 48- bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1mM Valproat und Bestrahlung (0 bis 6 Gy) untersucht.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, hatten weder eine 48-, noch eine 120-stündige Valproat-Inkubation einen signifikanten ($P = 95\%$) Einfluss auf Radiosensibilität der BPH-1-Zellen bei einer Bestrahlung mit einer Dosis von 0-6 Gy. Die Rohdaten entnehmen Sie bitte dem Anhang. Die Mittelwerte wurden paarweise mittels Student t-Test geprüft.

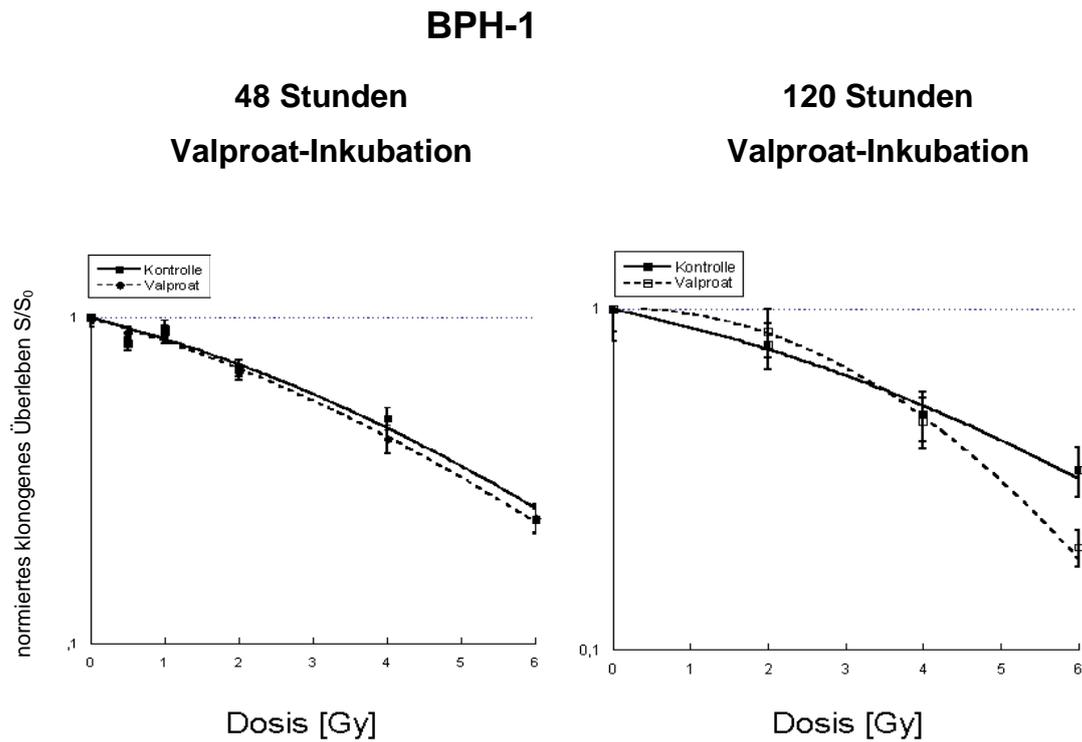


Abbildung 15: (aus Golombeck 2008, S. 35): Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostata-Zelllinie BPH-1 in Abhängigkeit der Strahlendosis in Kombination mit 48-stündiger bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat gegenüber einer nur bestrahlten Kontrolle ohne Valproat-Behandlung. Es wurden nur Klone >50 Zellen ausgewertet. Auf der Ordinate wurde das relative klonogene Überleben S/S_0 bezogen auf die auf Eins normierte unbestrahlte Kontrolle logarithmisch und auf der Abszisse die zunehmende Strahlendosis linear aufgetragen. Einzelne Punkte repräsentieren Mittelwerte aus mindestens 8 Einzelmessungen. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

3.2.3 BPH-1: Apoptose

Die Apoptose-Rate (d.h. der relative Anteil apoptotischer Zellen in %) wurde nach einer 48- bzw. 120-stündigen Valproat-Inkubation in Kombination mit einer Bestrahlung im Vergleich mit den jeweiligen unbehandelten, bzw. alleinig bestrahlten Kontrollen bestimmt.

Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, so liegt die Apoptose-Rate der BPH-1-Zellen nach einer 48-stündigen Valproat-Behandlung bei ca. 20 - 25%. Im Hinblick auf die Apoptose-Rate zeigt sich hier weder ein signifikanter ($P = 95\%$) Effekt der 48-stündigen Valproat-Behandlung, noch einer Bestrahlung, noch einer Kombination aus beidem im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

Valproat hat allerdings einen Effekt auf die Kinetik der Apoptose, so tritt die Apoptose bei den BPH-1-Zellen, welche 48 Stunden mit Valproat behandelt wurden, schon früher auf, als bei den unbehandelten Zellen. Dies gilt sowohl für die bestrahlten, als auch für die unbestrahlten BPH-1-Zellen.

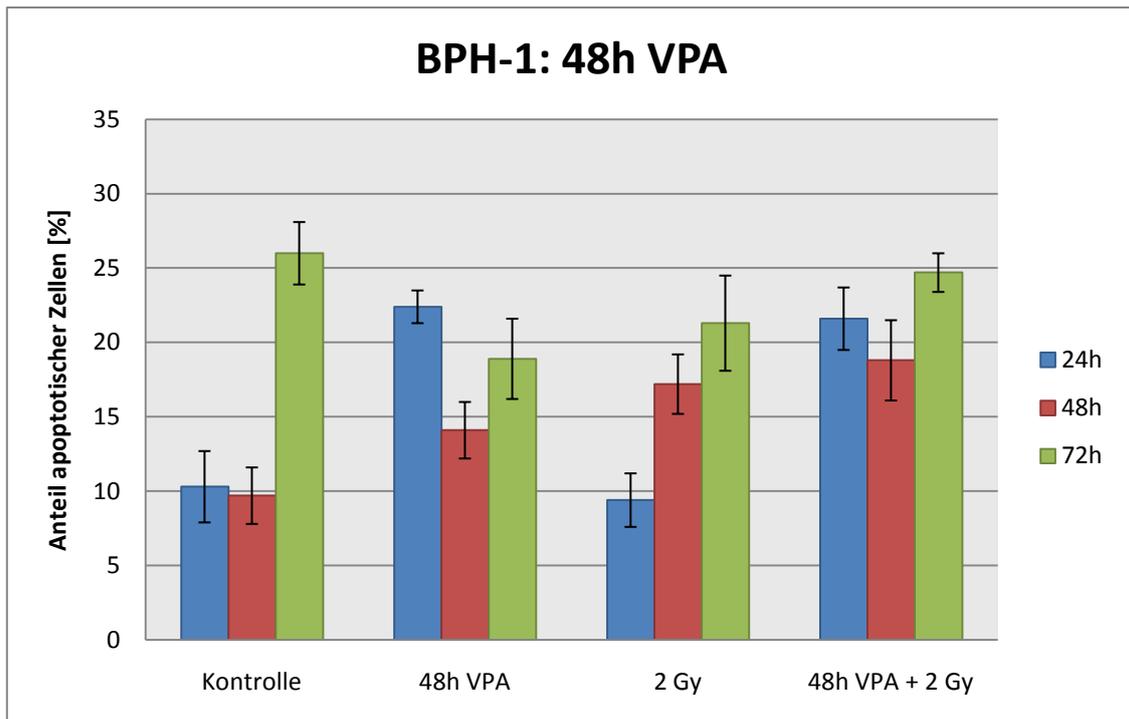


Abbildung 16: Anteil apoptotischer BPH-1-Zellen nach 48-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung fixiert und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Aus jeweils 5 mal 50 ausgewerteten Zellen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

Die alleinige 120-stündige Behandlung mit Valproat hatte gegenüber der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle keinen Effekt, beide Apoptose-Raten lagen bei ca. 15%, wie in Abbildung 17 dargestellt ist. Die Bestrahlung mit 2 Gy erhöhte die Apoptose-Rate signifikant ($P = 95\%$) auf ca. 30%. In Kombination mit der 120-stündigen Valproat-Behandlung bewirkte die Bestrahlung auch eine signifikante Erhöhung der Apoptose-Rate gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf ca. 20%, diese ist jedoch signifikant niedriger als die Apoptose-Rate nach alleiniger Bestrahlung. Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

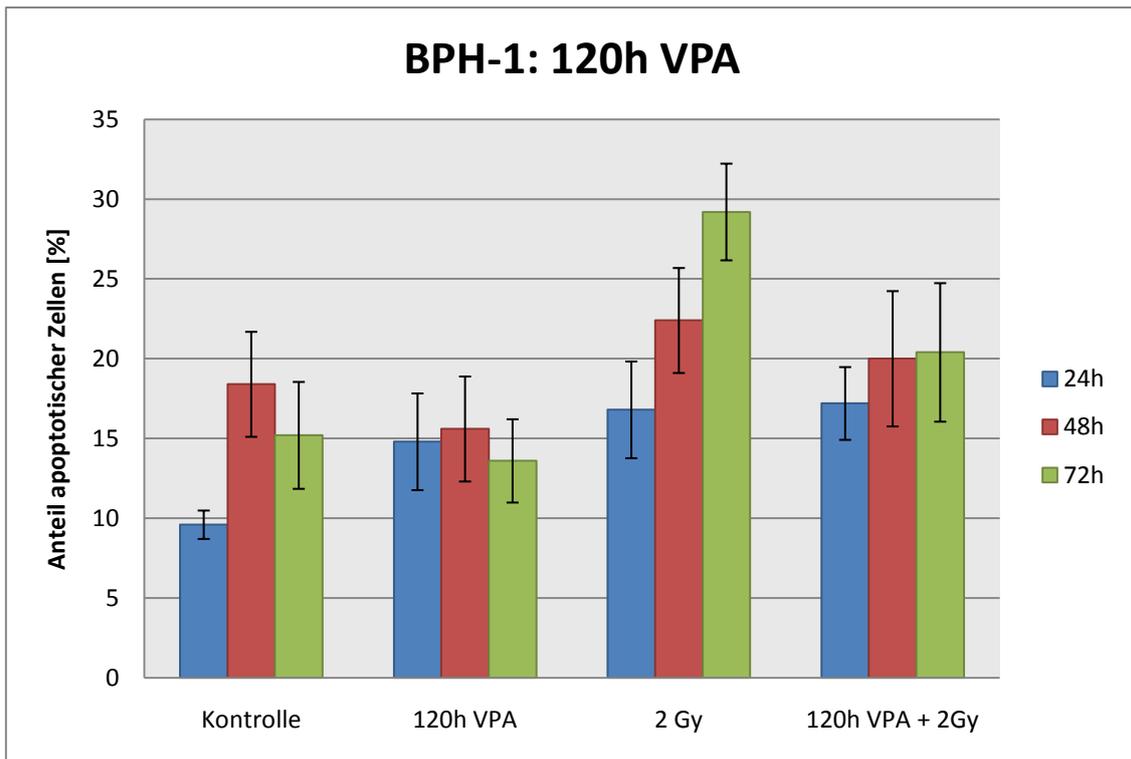


Abbildung 17: Anteil apoptotischer BPH-1-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung fixiert und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Aus jeweils 5 mal 100 ausgewerteten Zellen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

Tabelle 6: Anteil apoptotischer BPH-1-Zellen nach 48- und 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach Abschluss der Behandlung fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

	Messzeitpunkt	24 h	48 h	72 h
		[%]	[%]	[%]
48 h	Kontrolle	10,3 ± 2,4	9,7 ± 1,9	26,0 ± 2,1
	48h VPA	22,4 ± 1,1	14,1 ± 1,9	18,9 ± 2,7
	2 Gy	9,4 ± 1,8	17,2 ± 2,0	21,3 ± 3,2
	48h VPA + 2 Gy	21,6 ± 2,1	18,8 ± 2,7	24,7 ± 1,3
120 h	Kontrolle	9,6 ± 0,89	18,4 ± 3,29	15,2 ± 3,35
	120h VPA	14,8 ± 3,03	15,6 ± 3,29	13,6 ± 2,61
	2 Gy	16,8 ± 3,03	22,4 ± 3,29	29,2 ± 3,03
	120h VPA + 2 Gy	17,2 ± 2,28	20,0 ± 4,24	20,4 ± 4,34

Anteil an Apoptosen aus 5 mal 50 bzw. 100 ausgezählten BPH-1-Zellen und die zugehörigen Standardabweichungen.

3.2.4 BPH-1: Polyploidisierungs-Rate

Der Einfluss einer Behandlung mit 1 mM Valproat (48- oder 120 Stunden) oder einer Bestrahlung mit 2 Gy, sowie deren Kombination auf die Häufigkeit von tetra- und polyploiden Zellen wurde in Langzeitkulturen (8 und 15 Tage) in unbehandelten Kontrollen sowie nach einer Behandlung mit 1 mM Valproat (sowohl mit, als auch ohne Bestrahlung mit 2 Gy) untersucht.

In Abbildung 18 ist der Anteil an tetra- und polyploiden BPH-1-Zellen dargestellt, wobei zu sehen ist, dass dieser bei allen Versuchsanordnungen unter 5% geblieben ist. Des Weiteren kann gezeigt werden, dass weder die Bestrahlung, noch die Valproat-Behandlung, noch die Kombination aus beidem einen signifikanten ($P = 95\%$) Einfluss auf die Rate der tetra- und polyploiden BPH-1-Zellen hat. Getestet wurden die Mittelwerte paarweise mittels F-Test.

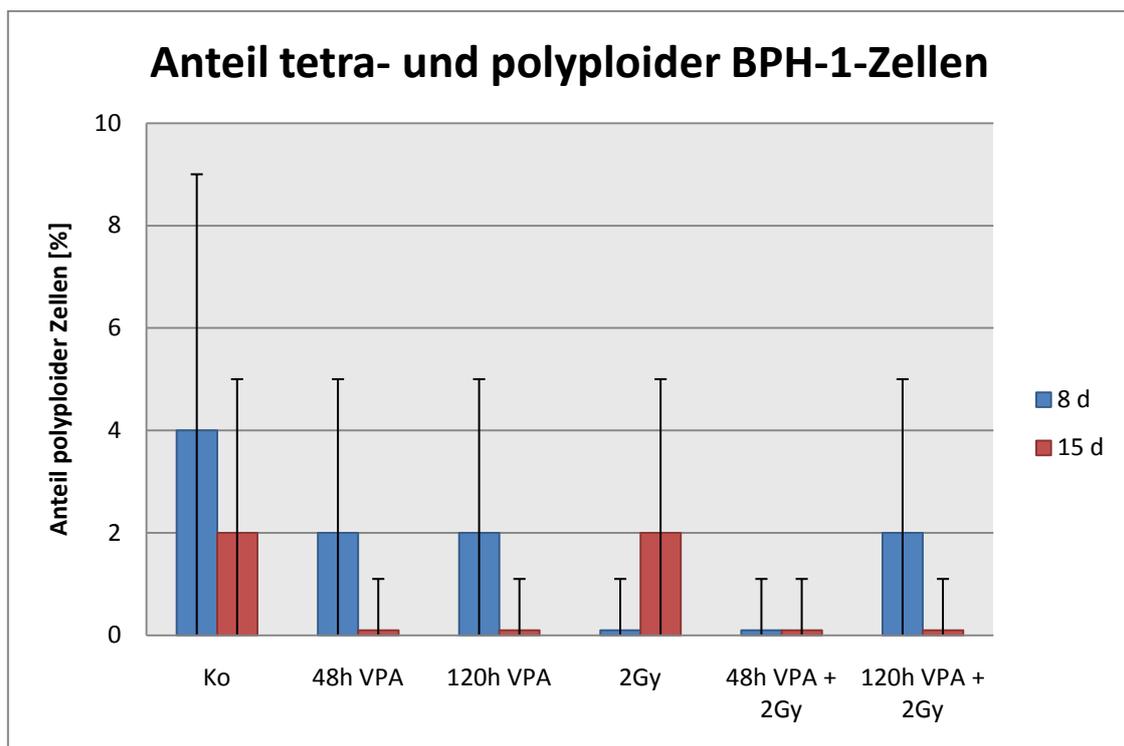


Abbildung 18: Prozentualer Anteil an tetraploiden (ca. 140 Chromosomen/Zelle) und an polyploiden (>160 Chromosomen/Zelle) BPH-1-Zellen und der zugehörigen 95%-Poisson-Vertrauensbereiche.

Tabelle 7: Prozentualer Anteil an tetraploiden (ca. 140 Chromosomen/Zelle) und an polyploiden (>160 Chromosomen/Zelle) BPH-1-Zellen.

	Kulturzeit: 8 Tage N_{poly} [%]	Kulturzeit: 15 Tage N_{poly} [%]
Kontrolle	4 ± 5	2 ± 3
48h-VPA- Inkubation	2 ± 3	0 ± 1
120h-VPA- Inkubation	2 ± 3	0 ± 1
2Gy	0 ± 1	2 ± 3
48h-VPA- Inkubation + 2Gy	0 ± 1	0 ± 1
120h-VPA- Inkubation + 2Gy	2 ± 3	0 ± 1

Aufgrund der geringen Anzahl an Mitosen wurden nur einmal 100 Zellen ausgewertet. Da die Rate an tetra- und polyploide Zellen relativ niedrig war, konnte eine Poisson-Verteilung angenommen werden und somit erfolgte die Fehlerschätzung anhand der 95%-Poisson-Vertrauensbereiche.

3.2.5 BPH-1: Chromosomale Instabilität

Der Einfluss der Behandlung mit 1 mM Valproat und der Bestrahlung mit 2 Gy, sowie deren Kombination auf die Häufigkeit von chromosomalen Aberrationen wurde 28 Stunden (zum Zeitpunkt der ersten Mitose), bzw. 8 und 15 Tage nach Bestrahlung untersucht. Dafür wurden alle strukturellen Chromosomenaberrationen zusammengefasst und die Aberrationsrate der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle subtrahiert. Im Endeffekt erhält man so den Nettoeffekt auf die zusätzlich durch die jeweilige Behandlung entstehenden Chromosomenaberrationen.

Wie in Abbildung 19 und Tabelle 8 dargestellt, ist die Rate an chromosomalen Aberrationen zum Zeitpunkt der ersten Mitose nach einer Bestrahlung mit 2 Gy erheblich und signifikant ($P = 95\%$) höher als zu späteren Zeitpunkten (nach 8 und 15 Tagen). Die Mittelwerte wurden paarweise mittels F-Test geprüft. Dies spiegelt den sofortigen Effekt der Bestrahlung auf die Rate an chromosomalen Aberrationen wieder, welcher sich, aufgrund des Ausstoßens von Fragmenten bei der Zellteilung, zu den späteren Zeitpunkten nicht mehr darstellen lässt. Die zusätzliche oder alleinige Behandlung mit Valproat hatte hier allerdings keinen signifikanten ($P = 95\%$, F-Test) Effekt.

Nach einer Langzeitinkubation (8 und 15 Tage) zeigen sich insgesamt weniger chromosomale Aberrationen, was darauf hindeutet, dass sich bei den BPH-1-Zellen durch keine der Behandlungsformen eine chromosomale Instabilität induzieren lässt.

Des Weiteren zeigt sich hier kein signifikanter ($P = 95\%$, F-Test) Unterschied zwischen der Rate an chromosomalen Aberrationen bei mit Valproat behandelten gegenüber unbehandelten Zellen (weder mit noch ohne zusätzliche Bestrahlung mit 2 Gy).

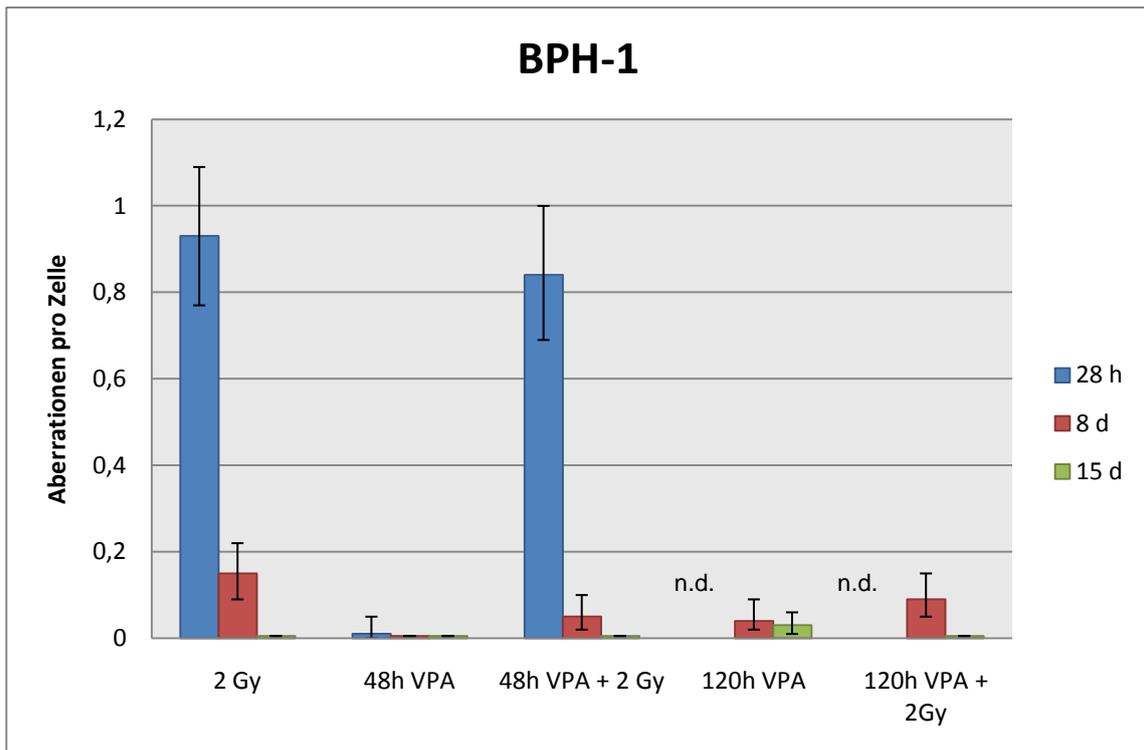


Abbildung 19: Chromosomale Instabilität der BPH-1-Zellen. Alle in der Giemsa-Färbung erkennbaren Chromosomenaberrationen aus jeweils 100-150 ausgezählten Zellen. Die Werte der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle wurden subtrahiert um den Nettoeffekt der Behandlung auf die chromosomale Instabilität darzustellen. Die Fehlerbalken geben die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche wieder.

Tabelle 8: Chromosomale Instabilität der BPH-1-Zellen. Alle in der Giemsa-Färbung erkennbaren Chromosomenaberrationen aus jeweils 100-150 ausgezählten Zellen. Die Werte der Kontrolle wurden abgezogen, um den Nettoeffekt der chromosomalen Instabilität darzustellen.

	28 h <95%PVB>	8d <95%PVB>	15d <95%PVB>
2 Gy	0,93 <0,77;1,09>	0,15 <0,09;0,22>	0 <0;0,02>
48h VPA	0,01 <0;0,05>	0 <0;0,02>	-0,03 <-0,07;-0,01>
48h VPA + 2 Gy	0,84 <0,69;1,00>	0,05 <0,02;0,10>	-0,03 <-0,06;-0,01>
120h VPA	n. d.	0,04 <0,02;0,09>	0,03 <0,01;0,06>
120h VPA + 2 Gy	n. d.	0,09 <0,05;0,15>	-0,01 <-0,04;0>

3.3 PC-3

Da diese Arbeit auf einer früheren Dissertation von Kristin Golombeck (Golombeck 2008) aufbaut, wurden die bereits von ihr durchgeführten Experimente nicht wiederholt, sondern nur erweitert. Um aber eine vollständige Darstellung der Ergebnisse zu ermöglichen, sind hier die Ergebnisse aus der Dissertation von Kristin Golombeck (2008) in Punkt 3.3.1 und 3.3.2 übernommen worden.

3.3.1 PC-3: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation

Die Koloniebildungsfähigkeit nach einer 48-stündigen Inkubation mit 1 mM Valproat zeigte bei den PC-3-Zellen keinen signifikanten ($P = 95\%$) Unterschied gegenüber der unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 20). Die 120-stündige Valproat-Inkubation hingegen führte zu einer signifikanten ($P = 95\%$) Reduktion des klonogenen Überlebens der PC-3-Zellen. Die Mittelwerte wurden paarweise mittels Student t-Test geprüft.

PC-3

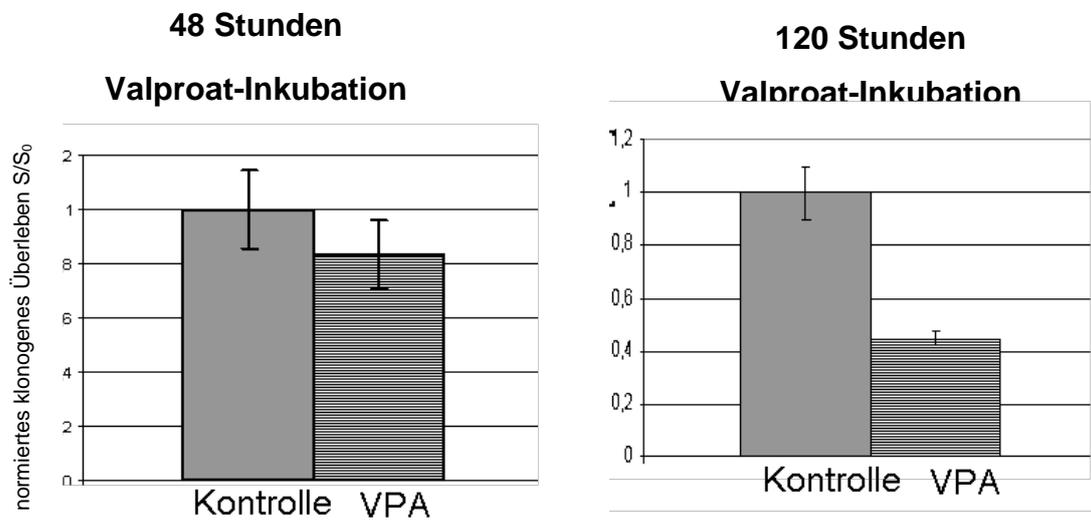


Abbildung 20: (aus Golombeck 2008, S. 34): Koloniebildung von PC-3-Zellen nach 48- und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle.

Es wurden Klone >50 Zellen ausgewertet. Jeder Messpunkt repräsentiert mindestens 12 Einzelwerte. Auf der Ordinate wird das relative klonogene Überleben bezogen auf die auf Eins normierte unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Mittelwerten wurde auf 95%-Niveau paarweise mittels Student t-Test geprüft.

3.3.2 PC-3: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung

Die Koloniebildungsfähigkeit wurde unter 48- bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1mM Valproat und Bestrahlung (0 bis 6 Gy) untersucht.

Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, führte eine 48-stündige Valproat-Inkubation in Kombination mit einer Bestrahlung von 0 bis 6 Gy zu keiner signifikanten ($P = 95\%$) Änderung der klonogenen Überlebens-Rate der PC-3-Zellen.

Eine 120-stündige Inkubation mit 1 mM Valproat hingegen führte zu einer signifikanten ($P = 95\%$) Reduktion des klonogenen Überlebens gegenüber den alleinig bestrahlten Kontrollen im Sinne einer Radiosensibilisierung.

Die Mittelwerte wurden paarweise mittels Student t-Test geprüft.

Die Rohdaten entnehmen Sie bitte dem Anhang.

PC-3

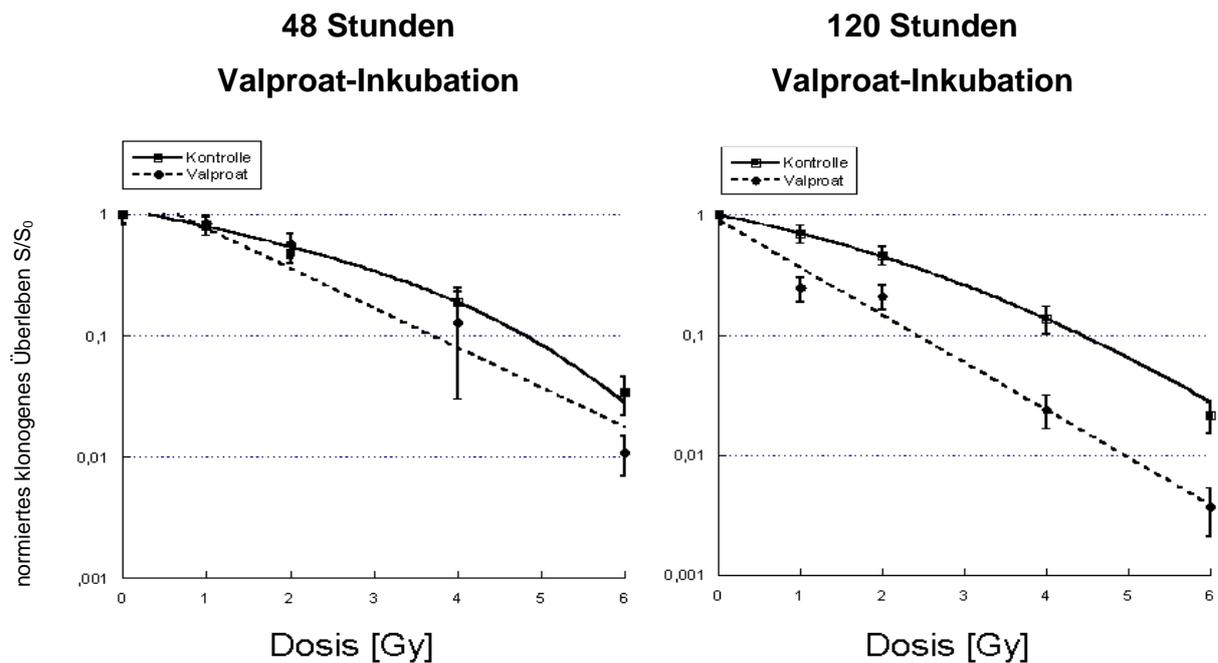


Abbildung 21: (aus Golombeck 2008, S. 35): Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 in Abhängigkeit der Strahlendosis in Kombination mit 48-stündiger bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1mM Valproat gegenüber einer nur bestrahlten Kontrolle ohne Valproat-Behandlung.

Es wurden nur Klone >50 Zellen ausgewertet. Auf der Ordinate wurde das relative klonogene Überleben S/S_0 bezogen auf die auf Eins normierte unbestrahlte Kontrolle logarithmisch und auf der Abszisse die zunehmende Strahlendosis linear aufgetragen. Einzelne Punkte repräsentieren Mittelwerte aus mindestens 12 Einzelmessungen. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

3.3.3 PC-3: Apoptose

Die Apoptose-Rate (d.h. der relative Anteil apoptotischer Zellen in %) wurde nach einer 48- bzw. 120-stündigen Valproat-Inkubation in Kombination mit einer Bestrahlung im Vergleich mit den jeweiligen unbehandelten, bzw. alleinig bestrahlten Kontrollen bestimmt.

Die Apoptose-Rate der PC-3-Zellen liegt bei der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle, sowie bei der allein für 48 Stunden mit Valproat behandelten Kontrolle bei ca. 3%. Dies ist in Abbildung 22 dargestellt. Durch Bestrahlung mit 2 Gy lässt sich die Apoptose-Rate zwar signifikant ($P=90\%$), aber nur sehr wenig, auf ca. 6% erhöhen. Eine Kombinationsbehandlung mit Bestrahlung und 48 Stunden Valproatinkubation hat keinen weiteren Effekt auf die Apoptose-Rate der PC-3-Zellen.

Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

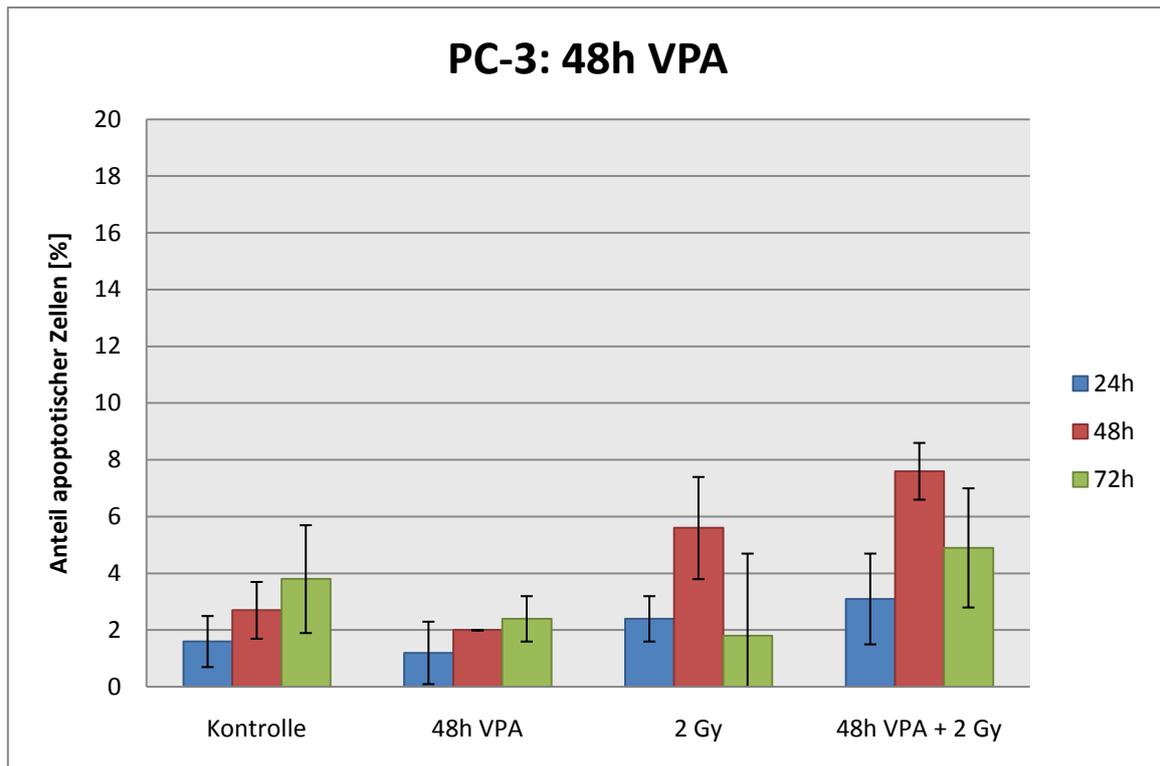


Abbildung 22: Anteil apoptotischer PC-3-Zellen nach 48-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24-, 48- und 72 Stunden nach der Behandlung fixiert und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Aus jeweils 5 mal 50 ausgewerteten Zellen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

In Abbildung 23 ist die Apoptose-Rate nach einer 120-stündigen Valproat-Inkubation mit und ohne Bestrahlung dargestellt. Nach 120-stündiger Valproat-Inkubation liegt die Apoptose-Rate der PC-3-Zellen mit ca. 8% nicht signifikant ($P = 95\%$) höher als die der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle (ca. 6%). Eine signifikante Steigerung der Apoptose-Rate lässt sich durch die alleinige Bestrahlung oder die Kombination von Valproat mit Bestrahlung auf ca. 10-14% steigern. Valproat zeigt aber auch hier keinen alleinigen oder synergistischen Effekt auf die Apoptose-Rate der PC-3-Zellen.

Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

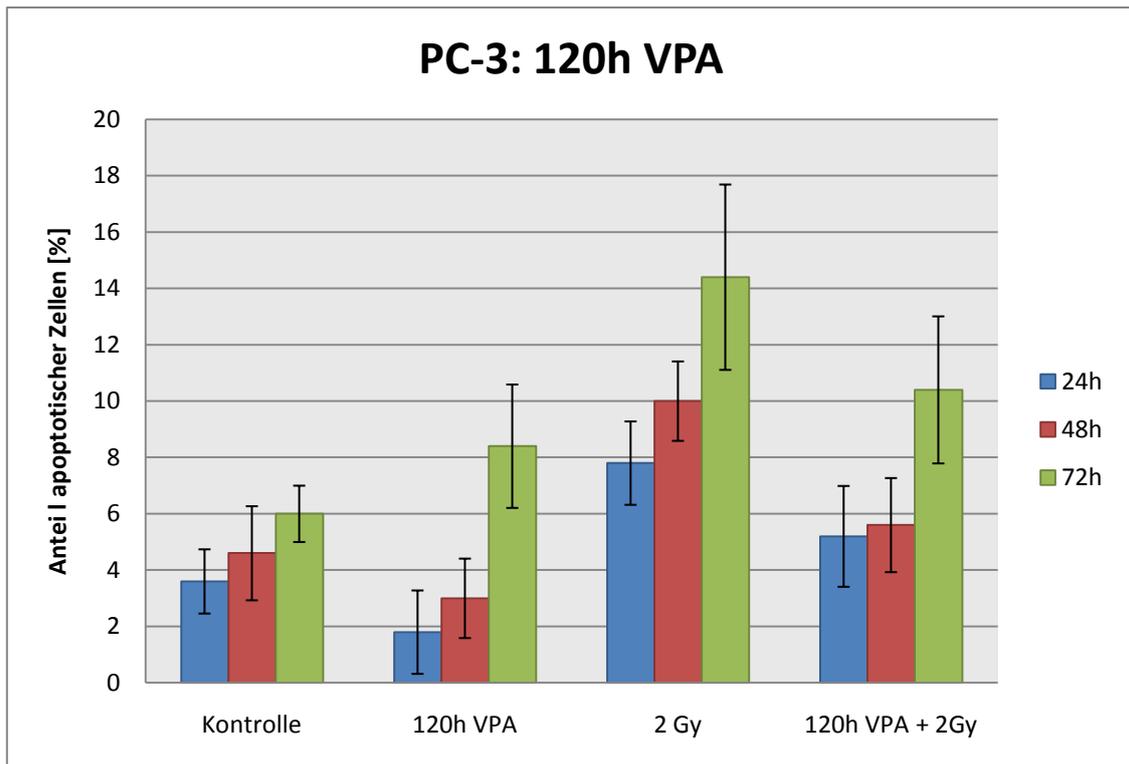


Abbildung 23: Anteil apoptotischer PC-3-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24-, 48- und 72 Stunden nach der Behandlung fixiert und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Aus jeweils 5 mal 100 ausgewerteten Zellen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

Tabelle 9: Anteil apoptotischer PC-3-Zellen nach 48- bzw. 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24-, 48- und 72 Stunden nach Abschluss der Behandlung fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

	Messzeitpunkt	24 h	48 h	72 h
		[%]	[%]	[%]
48 h	Kontrolle	1,6 ± 0,9	2,7 ± 1,0	3,8 ± 1,9
	48h VPA	1,2 ± 1,1	2,0 ± 0,0	2,4 ± 0,8
	2 Gy	2,4 ± 0,8	5,6 ± 1,8	5,9 ± 2,9
	48h VPA + 2 Gy	3,1 ± 1,6	7,6 ± 1,0	4,9 ± 2,1
120 h	Kontrolle	3,6 ± 1,14	4,6 ± 1,67	6,0 ± 1,00
	120h VPA	1,8 ± 1,48	3,0 ± 1,41	8,4 ± 2,19
	2 Gy	7,8 ± 1,48	10,0 ± 1,41	14,4 ± 3,29
	120h VPA + 2 Gy	5,2 ± 1,79	5,6 ± 1,67	10,4 ± 2,61

Anteil an Apoptosen aus 5 mal 50 bzw. 100 ausgezählten DU-145-Zellen und die zugehörigen Standardabweichungen.

3.3.4 PC-3: Polyploidisierungs-Rate

Der Einfluss einer Behandlung mit 1 mM Valproat (48- oder 120 Stunden lang) oder einer Bestrahlung mit 2 Gy, sowie deren Kombination auf die Häufigkeit von tetra- und polyploiden Zellen in Kurz- und Langzeitkulturen (28 Stunden bzw. 8 und 15 Tage) wurde in unbehandelten Kontrollen sowie nach einer Behandlung mit Valproat

(sowohl mit, als auch ohne Bestrahlung mit 2 Gy) untersucht. Hierbei entsprechen 28 Stunden Kulturdauer der Fixierung zum Zeitpunkt der ersten Mitose.

Wie in Abbildung 24 dargestellt nimmt der Anteil an tetra- und polyploiden PC-3-Zellen mit zunehmender Kulturzeit zu und erreicht bis zu 70%. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Kulturdauer auch der Anteil der tetra- und polyploiden PC-3-Zellen zunahm. Wenn man die Zellen nun auch mit 2 Gy bestrahlt hat, dann nahm die Polyploidisierungs-Rate nach 15 Tagen Kulturzeit gegenüber der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle signifikant ($P = 95\%$) zu. Eine Valproat-Behandlung hatte hier keinen synergistischen Effekt.

Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt von Tukey HSD-Test geprüft.

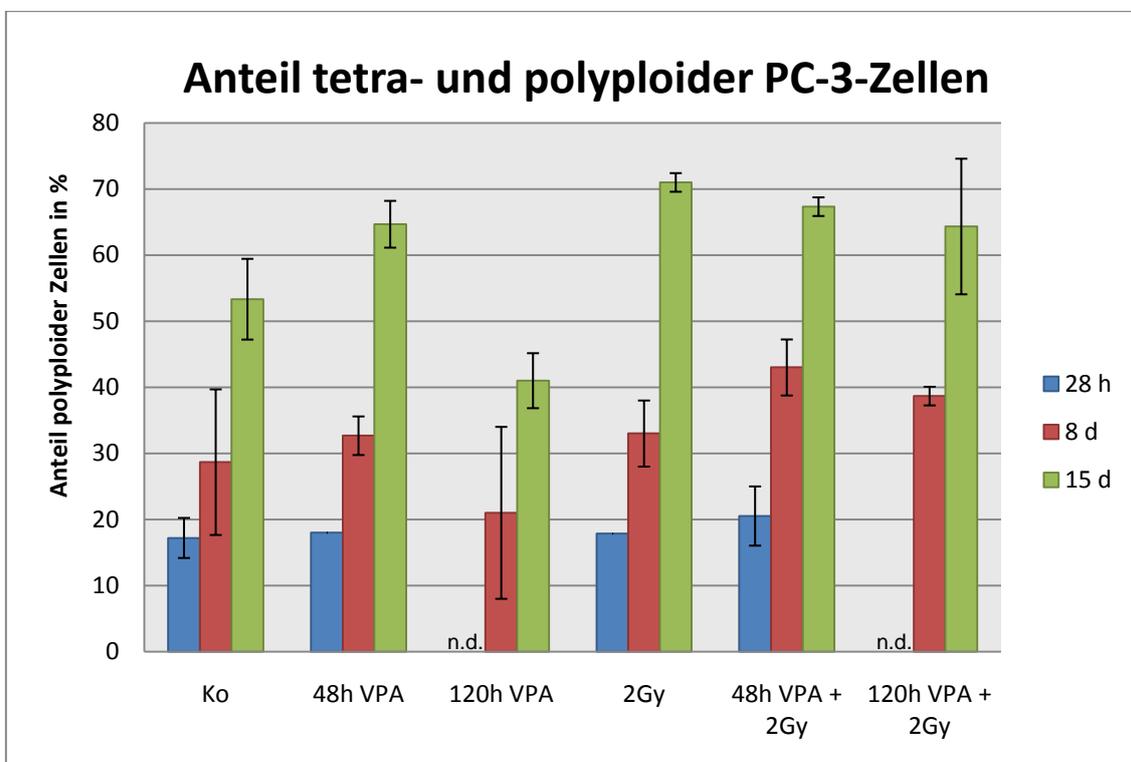


Abbildung 24: Anteil polyploider PC-3-Zellen nach einer Kulturzeit von 28 Stunden, 8 und 15 Tagen. Die Zellen wurden mit 1 mM Valproat (48 und 120 Stunden Inkubationszeit) und einer Strahlendosis von 2 Gy behandelt und mit den jeweiligen Kontrollen verglichen.

Tabelle 10: Prozentualer Anteil an tetraploiden (110-120 Chromosomen/Zelle) und an polyploiden (>120Chromosomen/Zelle) PC-3-Zellen mit und ohne Valproat-Behandlung (1 mM; 48 und 120 Stunden).

	28 h N_{poly} [%]	8 d N_{poly} [%]	15 d N_{poly} [%]
Kontrolle	17,2 ± 3,03	28,67 ± 11,02	53,33 ± 6,11
48h VPA	18 ± 2,1	32,67 ± 13,01	64,67 ± 4,16
120h VPA	n. d.	21 ± 5	41 ± 1,41
2 Gy	17,84 ± 4,48	33 ± 4,24	71 ± 1,41
48h VPA + 2 Gy	20,52 ± 3,68	43 ± 1,41	67,33 ± 10,26
120h VPA + 2 Gy	n. d.	38,67 ± 3,06	64,33 ± 6,66

Die Einzelwerte sind Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Jeweils 3 bis 5 Einzelwerte wurden als Anteile an jeweils 100 ausgezählten Zellen bestimmt.

3.3.5 PC-3: Chromosomale Instabilität

Der Einfluss der Behandlung mit 1 mM Valproat und der Bestrahlung mit 2 Gy, sowie deren Kombination auf die Häufigkeit von chromosomalen Aberrationen wurde 28 Stunden (zum Zeitpunkt der ersten Mitose), bzw. 8 und 15 Tage nach Bestrahlung untersucht. Dafür wurden alle strukturellen Chromosomenaberrationen zusammengefasst und die Aberrationsrate der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle subtrahiert. Als Resultat erhält man so den Nettoeffekt auf die zusätzlich, durch die jeweilige Behandlung entstehenden Chromosomenaberrationen.

Die PC-3-Zellen zeigen, wie in Abbildung 25 und Tabelle 11 dargestellt, eine hohe Rate von, durch eine Bestrahlung mit $D = 2$ Gy induzierten, chromosomalen Aberrationen in der ersten Mitose. Diese Rate wurde allerdings weder durch die alleinige, noch durch die zusätzliche Behandlung mit Valproat signifikant ($P = 95\%$) beeinflusst.

Die Mittelwerte wurden paarweise mittels F-Test geprüft.

Diese Rate nahm nach einer Kulturzeit von acht bzw. 15 Tagen signifikant ($P = 95\%$, F-Test) ab, was auf ein Absterben der abberanten Zellen oder eine Verlorengehen der Aberrationen hindeutet.

Bei den Langzeitkulturen (8 und 15 Tage) war auch eine signifikante ($P = 95\%$, F-Test) Erhöhung der chromosomalen Aberrationsrate nach einer Bestrahlung mit 2 Gy gegenüber unbestrahlten Kontrollen nachzuweisen. Die Valproat-Behandlung hatte auch hier weder allein, noch in Kombination mit der Bestrahlung einen signifikanten Einfluss auf die chromosomale Aberrationsrate der PC-3-Zellen.

Man kann also annehmen, dass sich eine chromosomale Instabilität bei den PC-3-Zellen durch eine Bestrahlung induzieren lässt. Eine zusätzliche Behandlung mit Valproat hat jedoch keinen synergistischen Effekt.

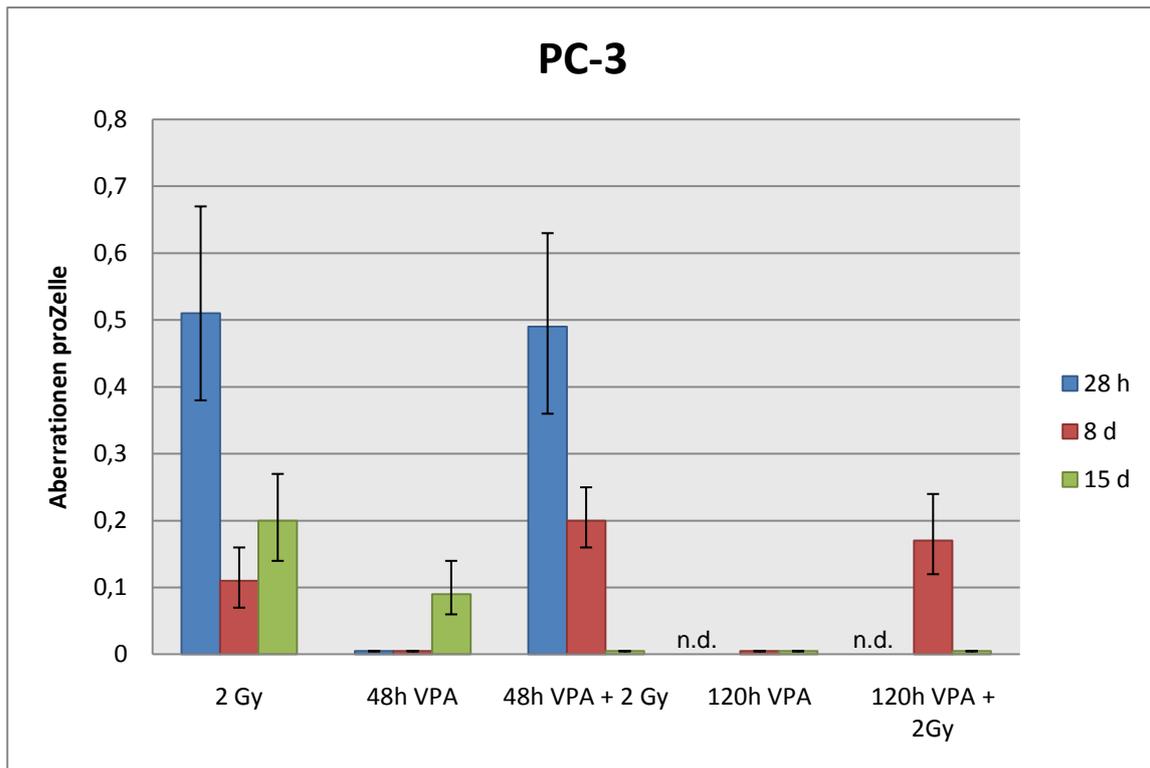


Abbildung 25: Chromosomale Instabilität der PC-3-Zellen. Dargestellt ist die Summe aller in der Giemsa-Färbung mikroskopisch erkennbaren Chromosomenaberrationen, wobei die Werte der jeweiligen Kontrolle zur Darstellung des Nettoeffektes der chromosomalen Instabilität abgezogen wurden. Die Fehlerbalken stellen die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche dar.

Tabelle 11: Chromosomale Instabilität der PC-3-Zellen. Alle in der Giemsa-Färbung erkennbaren Chromosomenaberrationen aus jeweils 200-300 ausgezählten Zellen. Die Werte der Kontrolle wurden abgezogen um den Nettoeffekt der chromosomalen Instabilität darzustellen. Die Fehlerbalken geben die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche wieder.

	28h <95%PVB>	8d <95%PVB>	15d <95%PVB>
2 Gy	0,51 <0,38;0,67>	0,11 <0,07;0,16>	0,20 <0,14;0,27>
48h VPA	0 <0;0,03>	-0,02 <-0,05;-0,01>	0,09 <0,06;0,14>
48h VPA + 2 Gy	0,49 <0,36;0,63>	0,10 <0,06;0,15>	-0,04 <-0,07;-0,02>
120h VPA	n. d.	-0,04 <-0,07;-0,02>	-0,08 <-0,13;-0,05>
120h VPA + 2 Gy	n. d.	0,17 <0,12;0,24>	-0,01 <-0,03;0>

3.4 DU-145

3.4.1 DU-145: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation

Die Koloniebildungsfähigkeit nach einer 48-stündigen als auch 120-stündigen Inkubation mit 1 mM Valproat zeigte bei den DU-145-Zellen keinen signifikanten ($P = 95\%$) Unterschied gegenüber der unbehandelten Kontrolle (siehe Abbildung 26). Die Werte wurden paarweise mittels Student t-Test geprüft.

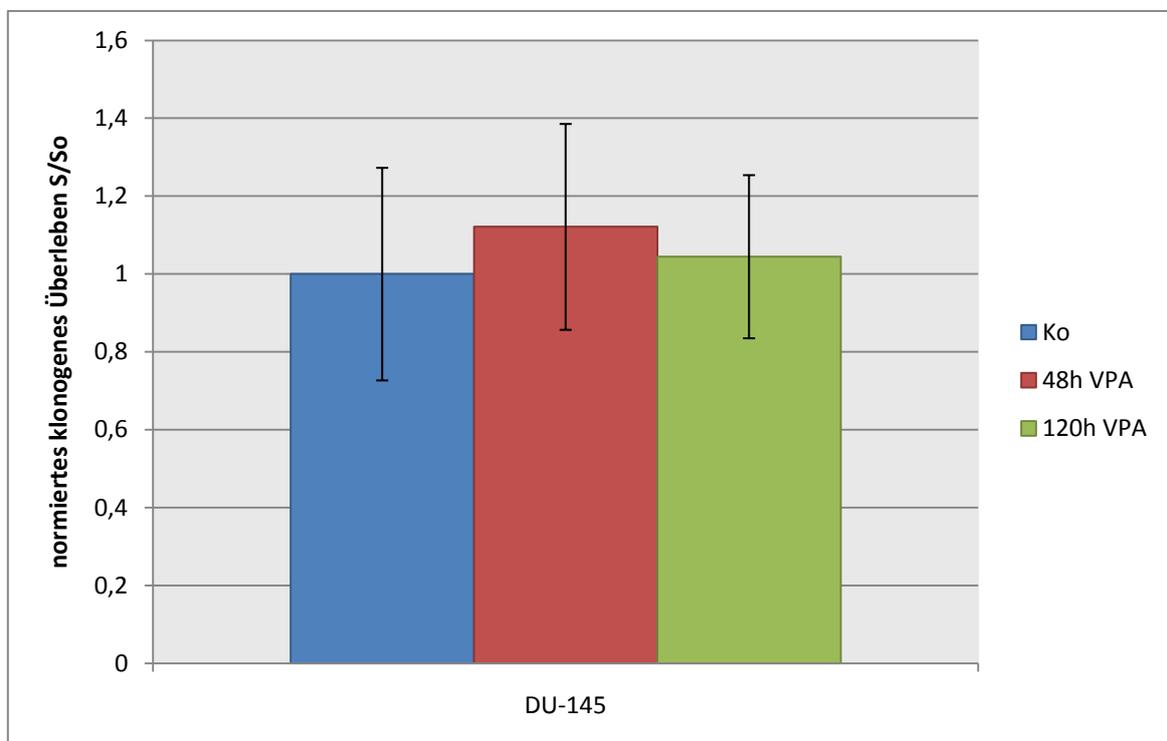


Abbildung 26: Koloniebildung von DU-145-Zellen nach 48- und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Es wurden Klone >50 Zellen ausgewertet. Jeder Messpunkt repräsentiert mindestens 12 Einzelwerte. Auf der Ordinate wird das relative klonogene Überleben bezogen auf die auf Eins normierte unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Mittelwerten wurde auf 95%-Niveau paarweise mittels Student t-Test geprüft. Sowohl nach 48- als auch nach 120-stündiger Valproat-Inkubation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

3.4.2 DU-145: Klonogenes Überleben nach Valproat-Inkubation und Bestrahlung

Die Koloniebildungsfähigkeit wurde unter 48- bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat und Bestrahlung (0 bis 6 Gy) untersucht.

Abbildung 27 zeigt das klonogene Überleben von DU-145-Zellen. Die Überlebenskurven sind entsprechend dem linear-quadratischen Modell $S/S_0 = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ bzw. $\ln S/S_0 = -(\alpha D + \beta D^2)$ angepasst.

Tabelle 12: Die Werte der Koeffizienten α und β des linear-quadratischen Modells für die klonogenen Überlebenskurven der PNT-2-Zellen.

	α	β
Bestrahlung	0,23 ± 0,004	0,02 ± 0,001
48h VPA + Bestrahlung	0,29 ± 0,016	0,04 ± 0,005
120h VPA + Bestrahlung	0,36 ± 0,014	0,03 ± 0,005

Bei den DU-145-Zellen konnte, unabhängig von der Inkubationsdauer (48h bzw. 120h) ein radiosensibilisierender Effekt von Valproat nachgewiesen werden. So war das klonogene Überleben nach einer Valproat-Behandlung und nach einer Bestrahlung signifikant ($P = 95\%$) geringer im Vergleich zu einer Kontrolle mit alleiniger Bestrahlung mit gleicher Dosis. Die Werte wurden paarweise mittels Student t-Test geprüft. Dieser Effekt nahm mit steigender Strahlendosis zu, war jedoch erst ab einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy sicher nachzuweisen.

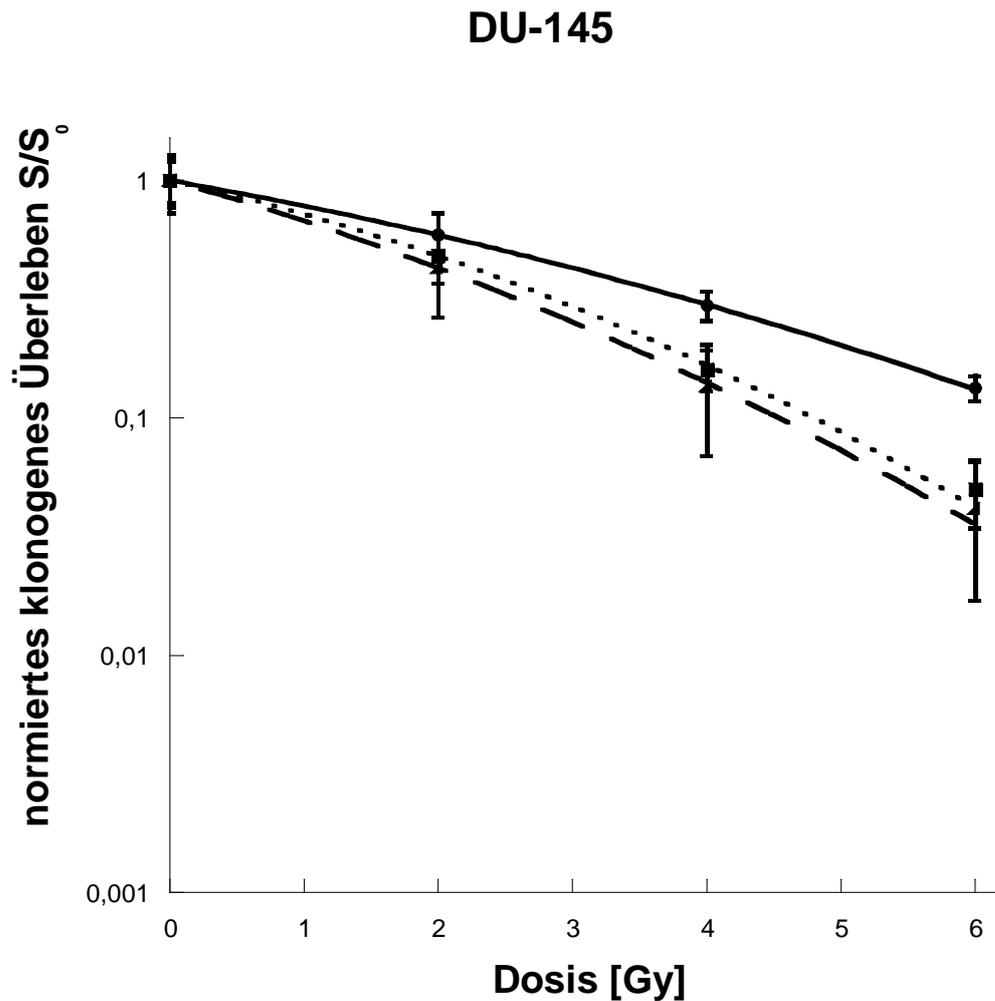


Abbildung 27: Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostata-Zelllinie DU-145 in Abhängigkeit der Strahlendosis in Kombination mit 48-stündiger Inkubation (■) bzw. 120-stündiger Inkubation (▲) mit 1 mM Valproat im Vergleich mit einer alleinigen Bestrahlung ohne Valproat-Behandlung (●).

Es wurden nur Klone >50 Zellen ausgewertet. Auf der Ordinate wurde das relative klonogene Überleben S/S_0 bezogen auf die auf Eins normierte unbestrahlte Kontrolle logarithmisch aufgetragen. Auf der Abszisse wurde die zunehmende Strahlendosis linear aufgetragen. Einzelne Punkte repräsentieren Mittelwerte aus mindestens 12 Einzelmessungen. Vertikale Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

Tabelle 13: Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen in Kombination mit 48- bzw. 120-stündiger Valproat-Behandlung (1mM) im Vergleich mit alleinig bestrahlten Zellen.

Dosis [Gy]	Kontrolle	48h VPA	120h VPA
0	1,00 ± 0,27	1,00 ± 0,24	1,00 ± 0,20
2	0,59 ± 0,13	0,48 ± 0,11	0,43 ± 0,16
4	0,30 ± 0,04	0,16 ± 0,03	0,12 ± 0,07
6	0,13 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02

Die einzelnen Werte sind Mittelwerte aus jeweils 12 Einzelwerten und die dazugehörigen Standardabweichungen.

3.4.3 DU-145: Apoptose

Die Apoptose-Rate (d.h. der relative Anteil apoptotischer Zellen in %) wurde nach einer 120-stündigen Valproat-Inkubation in Kombination mit einer Bestrahlung, sowohl mit 2 Gy als auch mit 4 Gy, im Vergleich mit den jeweiligen unbehandelten, bzw. alleinig mit Valproat behandelten Kontrollen bestimmt.

Die gesamte Apoptose-Rate, wie in Abbildung 28 dargestellt, wird durch die Behandlung mit Valproat allein im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht. In Kombination mit einer Bestrahlung, sowohl mit 2 Gy als auch mit 4 Gy Bestrahlungsdosis, steigert sich die Apoptose-Rate signifikant im Vergleich zur alleinig bestrahlten Kontrolle. Hierbei zeigt sich, dass eine zusätzliche Bestrahlung mit 4 Gy die Apoptose-Rate signifikant mehr steigert als die Kombination mit der geringeren Bestrahlungsdosis von 2 Gy. Dies spiegelt sich in den Überlebenskurven S/S_0 wieder, wo sich der synergistische Effekt der Bestrahlung mit steigender

Bestrahlungsdosis ebenfalls steigern ließ und sich erst ab einer Dosis von 4 Gy signifikant bemerkbar machte.

Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

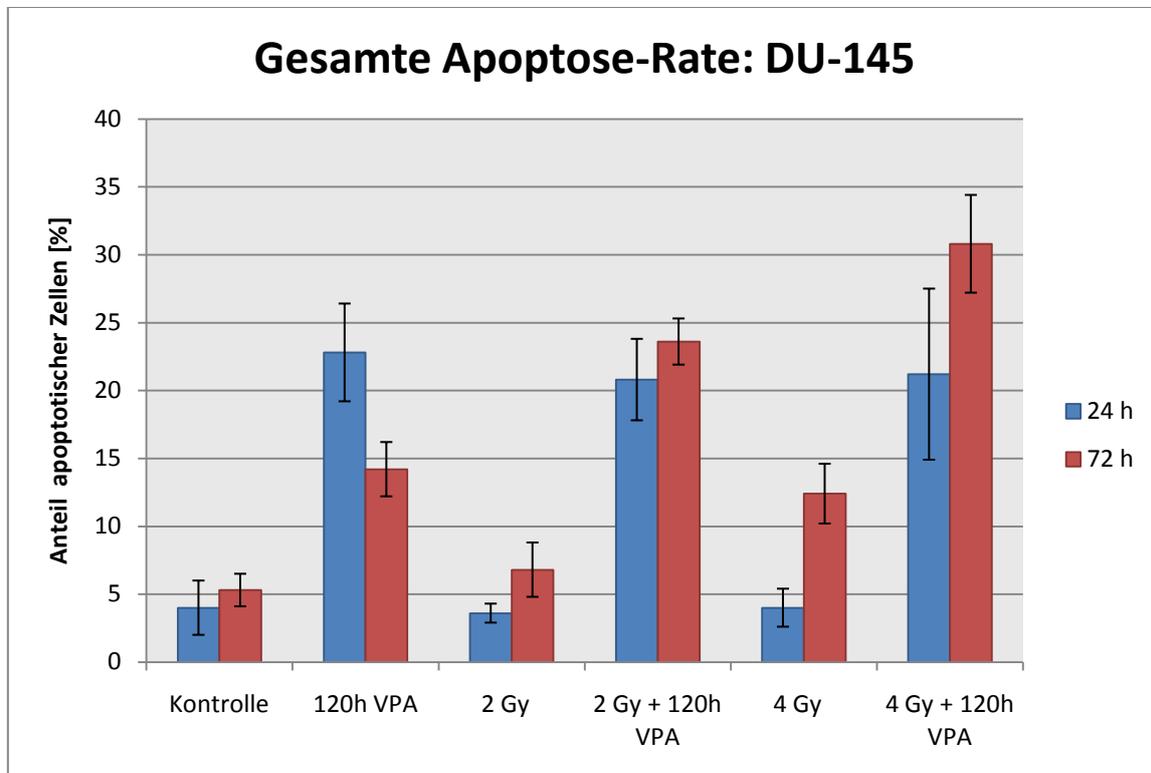


Abbildung 28: Anteil apoptotischer DU-145-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24- und 72 Stunden nach der Behandlung fixiert und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Aus jeweils 5 mal 50 ausgewerteten Zellen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

Die Rate an späten Apoptosen (dargestellt in Abbildung 29) spiegelt den oben genannten Effekt von Valproat ebenfalls wieder, so zeigte sich eine signifikante ($P = 95\%$) Erhöhung sowohl der alleinig mit Valproat, als auch der in Kombination mit Bestrahlung behandelten DU-145-Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle, bzw. der alleinig bestrahlten Kontrollen.

Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

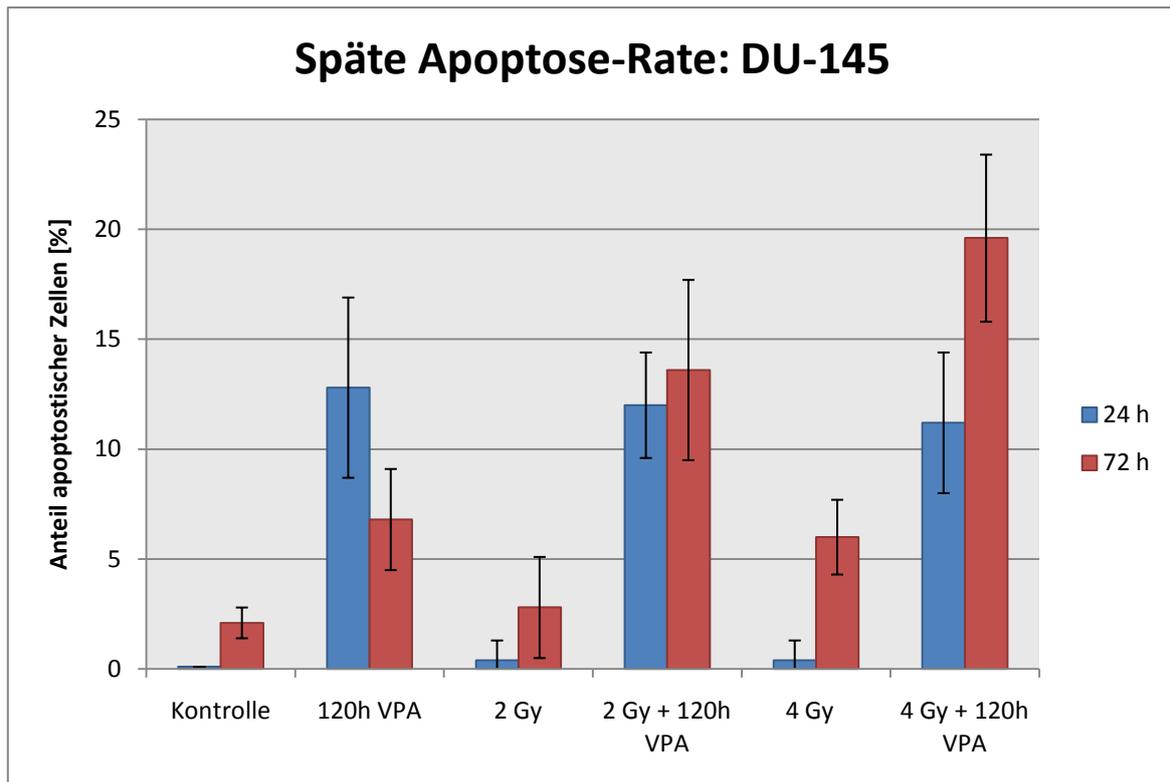


Abbildung 29: Anteil später Apoptosen der DU-145-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24 und 72 Stunden nach der Behandlung fixiert und dann unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Aus jeweils 5 mal 50 ausgewerteten Zellen wurden die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die jeweiligen Standardabweichungen dar.

Tabelle 14: Anteil apoptotischer DU-145-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy, bzw. 4 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24- und 72 Stunden nach Abschluss der Behandlung fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Messzeitpunkt	24 h [%]	72 h [%]
Kontrolle	4,0 ± 2,0	5,3 ± 1,2
120h VPA	22,8 ± 3,6	14,2 ± 2,0
2 Gy	3,6 ± 0,7	6,8 ± 2,0
2 Gy + 120h VPA	20,8 ± 3,0	23,6 ± 1,7
4 Gy	4,0 ± 1,4	12,4 ± 2,2
4 Gy + 120h VPA	21,2 ± 6,3	30,8 ± 3,6

Tabelle 15: Anteil später apoptotischer DU-145-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy, bzw. 4 Gy. Die Zellen wurden jeweils 24- und 72 Stunden nach Abschluss der Behandlung fixiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Messzeitpunkt	24 h [%]	72 h [%]
Kontrolle	0	2,1 ± 0,7
120h VPA	12,8 ± 4,1	6,8 ± 2,3
2 Gy	0,4 ± 0,9	2,8 ± 2,3
2 Gy + 120h VPA	12,0 ± 2,4	13,6 ± 4,1
4 Gy	0,4 ± 0,9	6,0 ± 1,7
4 Gy + 120h VPA	11,2 ± 3,2	19,6 ± 3,8

3.4.4 DU-145: Polyploidisierungs-Rate

Der Einfluss einer Behandlung mit 1 mM Valproat (48- oder 120 Stunden) oder einer Bestrahlung mit $D = 2$ Gy, sowie deren Kombination auf die Häufigkeit von tetra- und polyploiden Zellen in Kurz- und Langzeitkulturen (28 Stunden bzw. 8 und 15 Tage) wurde in unbehandelten Kontrollen sowie nach einer Behandlung mit Valproat (sowohl mit, als auch ohne Bestrahlung mit $D = 2$ Gy) untersucht. Hierbei entsprechen 28 Stunden Kulturdauer der Fixierung zum Zeitpunkt der ersten Mitose.

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, bleibt die Rate der tetra- und polyploiden DU-145-Zellen bei allen Versuchsanordnungen unter 5 %. Die Behandlung mit Valproat hat gegenüber einer unbehandelten Kontrolle (ob mit oder ohne Bestrahlung mit 2 Gy) keinen signifikanten ($P = 95\%$) Einfluss auf die Rate an tetra- und polyploiden DU-145-Zellen.

Die Mittelwerte wurden paarweise mittels Student t-Test ausgewertet.

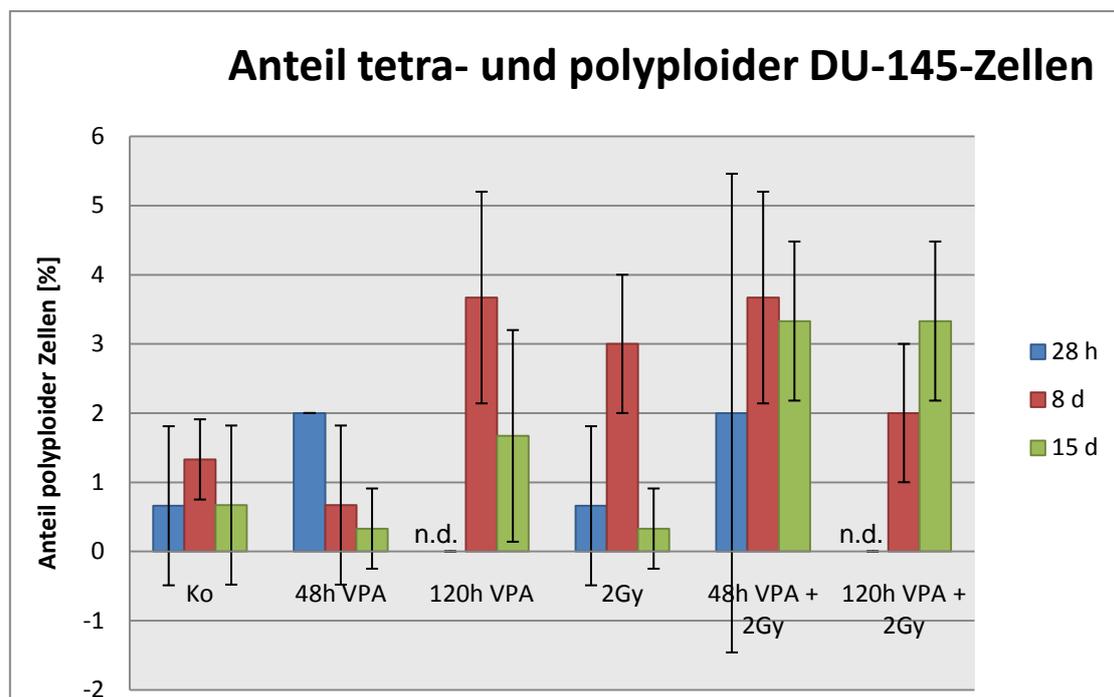


Abbildung 30: Prozentualer Anteil an tetraploiden (ca. 120 Chromosomen/Zelle) und an polyploiden (>140 Chromosomen/Zelle) DU-145-Zellen und die zugehörigen Standardabweichungen. Die einzelnen Werte sind Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen. Jeweils drei Einzelwerte wurden als Anteile an jeweils 100 ausgezählten Zellen bestimmt.

Tabelle 16: Prozentualer Anteil an tetraploiden (ca. 120 Chromosomen/Zelle) und an polyploiden (>140 Chromosomen/Zelle) DU-145-Zellen.

Anteil an tetra- und polyploiden Zellen			
	Kulturzeit: 28 Stunden N _{poly} [%]	Kulturzeit: 8 Tage N _{poly} [%]	Kulturzeit: 15 Tage N _{poly} [%]
Ko	0,66 ± 1,15	1,33 ± 0,58	0,67 ± 1,15
48h-VPA- Inkubation	2,0 ± 0	0,67 ± 1,15	0,33 ± 0,58
120h-VPA- Inkubation	n. d.	3,67 ± 1,53	1,67 ± 1,53
2Gy	0,66 ± 1,15	3,00 ± 1,00	0,33 ± 0,58
48h-VPA- Inkubation + 2Gy	2,0 ± 3,46	3,67 ± 1,53	3,33 ± 1,15
120h-VPA- Inkubation + 2Gy	n. d.	2,00 ± 1,00	3,33 ± 1,15

Die einzelnen Werte sind Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen. Jeweils drei Einzelwerte wurden als Anteile an jeweils 100 ausgezählten Zellen bestimmt.

3.4.5 DU-145: Chromosomale Instabilität

Der Einfluss der Behandlung mit 1 mM Valproat und der Bestrahlung mit $D = 2$ Gy, sowie deren Kombination auf die Häufigkeit von chromosomalen Aberrationen wurde 28 Stunden (zum Zeitpunkt der ersten Mitose), bzw. 8 und 15 Tage nach Bestrahlung untersucht. Dafür wurden alle strukturellen Chromosomenaberrationen zusammengefasst und die Aberrationsrate der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle subtrahiert. Als Resultat erhält man so den Nettoeffekt auf die zusätzlich, durch die jeweilige Behandlung entstehenden Chromosomenaberrationen.

Wie in Abbildung 31 dargestellt, zeigt sich zum Zeitpunkt der ersten Mitose (28 Stunden) ein signifikanter ($P = 95\%$) Anstieg der Rate der chromosomalen Aberrationen hervorgerufen durch die Bestrahlung. Die alleinige oder kombinierte Behandlung mit Valproat hatte keinen signifikanten ($P = 95\%$) Einfluss auf die Aberrationsrate.

Die Mittelwerte wurden paarweise mittels F-Test geprüft.

Nach 8 bzw. 15 Tagen zeigt sich die Rate der chromosomalen Aberrationen signifikant ($P = 95\%$, F-Test) geringer als bei der ersten Mitose. Dies ist auf das Ausstoßen von Fragmenten aus den Zellen bei der Mitose zurückzuführen. Eine chromosomale Instabilität lässt sich durch keine der hier gewählten Behandlungsformen induzieren.

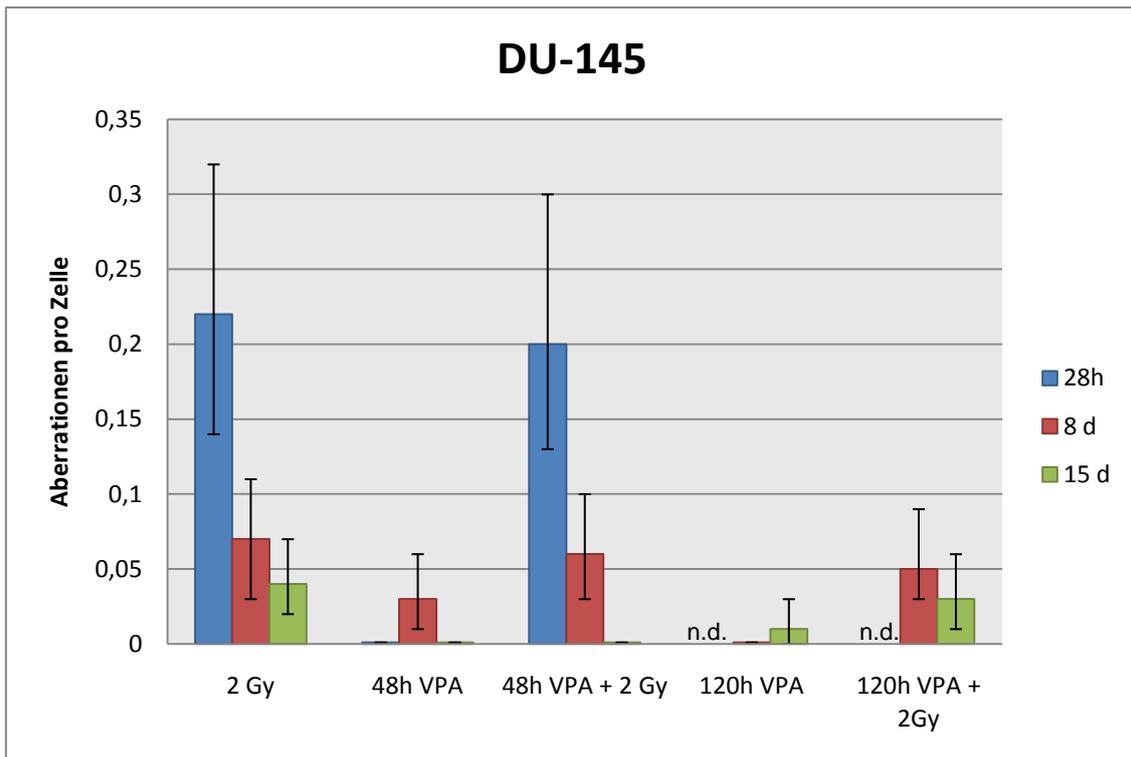


Abbildung 31: Chromosomale Instabilität der DU-145-Zellen. Alle in der Giemsa-Färbung erkennbaren Chromosomenaberrationen aus jeweils 200 (28h: 100-200) ausgezählten Zellen. Die Werte der Kontrolle wurden subtrahiert um den Nettoeffekt der chromosomalen Instabilität darzustellen. Die Fehlerbalken geben die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche wieder.

Tabelle 17: Chromosomale Instabilität der DU-145-Zellen. Alle in der Giemsa-Färbung erkennbare Chromosomenaberrationen aus jeweils 200 (28h: 100-200) ausgezählten Zellen. Die Werte der Kontrolle wurden abgezogen um den Nettoeffekt der chromosomalen Instabilität darzustellen. Die Fehlerbalken geben die 95%-Poisson-Vertrauensbereiche wieder.

	28h <95%PVB>	8d <95%PVB>	15d <95%PVB>
2 Gy	0,22 <0,14;0,32>	0,07 <0,03;0,11>	0,04 <0,02;0,07>
48h VPA	-0,14 <-0,23;-0,08>	0,03 <0,01;0,06>	-0,03 <-0,06;-0,01>
48h VPA + 2 Gy	0,20 <0,13;0,30>	0,06 <0,03;0,10>	-0,01 <-0,03;0>
120h VPA	n. d.	-0,01 <-0,03;0>	0,01 <0;0,03>
120h VPA + 2 Gy	n. d.	0,05 <0,03;0,09>	0,03 <0,01;0,06>

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

PNT-2:

In Bezug auf die PNT-2-Zellen, als nicht maligne Prostataepithelzellen, können die Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden.

In den Koloniebildungs-Assays konnte gezeigt werden, dass bei jeder Strahlendosis von 2 bis 6 Gy keine signifikante ($P = 95\%$) Reduktion des klonogenen Überlebens durch die Kombination von Valproat und Bestrahlung hervorgerufen wurde im Vergleich zu den alleinig bestrahlten Kontrollen. Dies galt sowohl für die kurze (48 Stunden), als auch für die lange (120 Stunden) Behandlungsdauer mit Valproat. Die Valproat-Inkubation allein hatte ebenfalls keinen Effekt auf das klonogene Überleben dieser Zellen.

Die Mittelwerte wurden paarweise mittels Student t-Test verglichen.

Die Apoptose-Rate lag bei fast allen Versuchsanordnungen bei ca. 4%. Allein nach der Kombinationsbehandlung von 2 Gy mit einer 120-stündigen Valproat-Inkubation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Apoptose-Rate auf ca. 8%. Die praktische Bedeutung dieser Erhöhung ist, bei einer Apoptose-Rate unterhalb von 10%, als nicht relevant zu beurteilen.

Die Rate an tetra- und polyploiden PNT-2-Zellen lag bei allen Versuchsbedingungen unterhalb von 15%. Keine der Behandlungen hatte einen Effekt auf die Polyploidisierungs-Rate.

Die Untersuchung der chromosomalen Aberrationsrate in den ersten Mitosen post radiatio ergab einen signifikanten ($P = 95\%$) Anstieg nach einer Kombinationsbehandlung mit Valproat und Bestrahlung. Wenn man nun jedoch die Art der Aberration in Betracht zieht, so ist in Tabelle 22 im Anhang dargestellt, dass es sich in diesem Fall hauptsächlich um die Bildung von Fragmenten handelte. Da nur 5% der DNA kodierend ist, ist ein Fragmentverlust meistens nicht letal für eine Zelle.

Nach 15 Tagen Kulturzeit und einer Kombinationsbehandlung aus 120 Stunden Valproat-Inkubation und einer Bestrahlung mit $D = 2$ Gy konnte ein geringer, jedoch signifikanter Anstieg der chromosomalen Aberrationen nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine leichte Induktion der chromosomalen Instabilität durch diese Kombinationsbehandlung hin.

Die Mittelwerte wurden paarweise mittels Student t-Test verglichen.

BPH-1:

Das klonogene Überleben der BPH-1-Zellen wurde im Rahmen einer Dissertation durch K. Golombeck (2008) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass weder eine 48-, noch eine 144-stündige Valproat-Behandlung einen radiosensibilisierenden Effekt auf die BPH-1-Zellen hatten.

Die Untersuchung der Apoptose-Rate der BPH-1-Zellen zeigte, dass diese nach einer Behandlungsdauer von 48 Stunden bei ca. 20 - 25% lag und die Behandlung mit Valproat zu einem früheren Auftreten der Apoptose führte, also die Kinetik, nicht jedoch die Apoptose-Rate an sich veränderte. Die Kombination von Valproat mit einer Bestrahlung bewirkte keine Änderung gegenüber einer alleinigen Valproat-Behandlung.

Nach einer 120-stündigen Kulturdauer lag die Apoptose-Rate bei ca. 15%. Hier erhöhte sich die Apoptose-Rate auf ca. 30% nach einer Bestrahlung. Die Kombination von Valproat mit Bestrahlung jedoch führte nur zu einer geringeren Steigerung der Apoptose-Rate auf ca. 20%. Dies lässt einen schützenden Effekt einer Langzeitbehandlung mit Valproat gegenüber einer Bestrahlung bei den BPH-1-Zellen vermuten.

Auf die Rate an tetra- und polyploiden Zellen, welche unter 5 % lag, hatte weder die Behandlung mit Valproat, noch die Bestrahlung, noch eine Kombination aus beidem einen Einfluss.

Die Rate an chromosomalen Aberrationen zum Zeitpunkt der ersten Mitosen ist nach einer Bestrahlung mit 2 Gy erheblich höher als zu späteren Zeitpunkten (nach 8 und 15 Tagen). Dies spiegelt den sofortigen Effekt der Bestrahlung auf die Rate an

chromosomalen Aberrationen wieder, welcher sich, aufgrund des Absterbens (zunächst mitotischer, dann endgültiger Zelltod) der aberranten Zellen oder des Ausstoßens (z.B. von Fragmenten während der nächsten Mitosen), zu den späteren Zeitpunkten nicht mehr darstellen lässt. Die zusätzliche oder alleinige Behandlung mit Valproat hatte hier allerdings keinen Effekt.

Nach einer Langzeitinkubation (8 und 15 Tage) zeigen sich insgesamt weniger chromosomale Aberrationen, was darauf hindeutet, dass sich bei den BPH-1-Zellen durch keine der Behandlungsformen eine chromosomale Instabilität induzieren lässt.

PC-3:

Das klonogene Überleben der PC-3-Zellen wurde im Rahmen einer Dissertation durch K. Golombeck (2008) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass schon die alleinige 120-stündige Valproat-Inkubation einen signifikanten, verminderten ($P = 95\%$) Effekt auf das klonogene Überleben hatte. Die Kombination einer 120-stündigen Valproat-Behandlung mit Bestrahlung zeigte einen synergistischen Effekt auf das klonogene Überleben, wohingegen eine 48-stündige Valproat-Behandlung nicht ausreichte um einen Effekt auf das klonogene Überleben zu erzielen.

Die Mittelwerte wurden paarweise mittels Student t-Test geprüft.

Die Apoptose-Rate der PC-3-Zellen ließ sich durch eine Bestrahlung mit $D = 2$ Gy leicht steigern ($P = 90\%$). Eine zusätzliche oder alleinige Behandlung mit Valproat (48-stündige bzw. 120-stündige Valproat-Inkubation) hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Apoptose-Rate.

Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

Die PC-3-Zellen zeigen von sich aus eine hohe Polyploidisierungsrate (bis zu 70%), welche mit zunehmender Kulturzeit zunimmt. Nach einer Bestrahlung mit 2 Gy nahm die Polyploidisierungs-Rate nach 15 Tagen Kulturzeit gegenüber der unbehandelten und unbestrahlten Kontrolle signifikant ($P = 95\%$) zu. Eine Valproat-Behandlung hatte hier keinen synergistischen Effekt, eine alleinige 120-stündige Valproat Inkubation konnte sogar eine signifikante Reduktion der Polyploidisierungs-Rate gegenüber

einer unbehandelten Kontrolle bewirken, sowohl nach einer Kulturzeit von 8, als auch von 15 Tagen.

Die PC-3-Zellen zeigen eine hohe Rate an chromosomalen Aberrationen in den ersten Mitosen, welche durch eine Bestrahlung mit $D = 2$ Gy induziert wurden. Diese Rate wurde allerdings weder durch die alleinige, noch durch die zusätzliche Behandlung mit Valproat signifikant ($P = 95\%$) beeinflusst.

Die Mittelwerte wurden paarweise mittels F-Test geprüft.

Diese Rate nahm nach einer Kulturzeit von 8 bzw. 15 Tagen signifikant ($P = 95\%$, F-Test) ab, was auf ein Absterben der aberranten Zellen hindeutet.

Bei den Langzeitkulturen (8 und 15 Tage) war auch eine signifikante ($P = 95\%$, F-Test) Erhöhung der chromosomalen Aberrationsrate nach einer Bestrahlung mit $D = 2$ Gy gegenüber unbestrahlten Kontrollen nachzuweisen. Die Valproat-Behandlung hatte auch hier weder allein, noch in Kombination mit der Bestrahlung einen signifikanten Einfluss auf die chromosomale Aberrationsrate der PC-3-Zellen.

Man kann also annehmen, dass sich eine chromosomale Instabilität bei den PC-3-Zellen durch eine Bestrahlung induzieren lässt. Eine zusätzliche Behandlung mit Valproat hat jedoch keinen synergistischen Effekt.

DU-145

Bei den DU-145-Zellen konnte, unabhängig von der Inkubationsdauer (48 Stunden bzw. 120 Stunden) ein radiosensibilisierender Effekt von Valproat nachgewiesen werden. So war das klonogene Überleben nach einer Valproat-Behandlung und einer Bestrahlung signifikant ($P = 95\%$) geringer im Vergleich zu einer Kontrolle mit alleiniger Bestrahlung mit gleicher Dosis. Dieser Effekt nahm mit steigender Bestrahlungsdosis zu und war erst ab einer Dosis von 4 Gy sicher signifikant unterschiedlich.

Die Werte wurden paarweise mittels Student t-Test verglichen.

Auf die Apoptose-Rate hatte die alleinige Valproat-Inkubation einen signifikant ($P = 95\%$) steigernden Effekt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In Kombination

mit einer Bestrahlung sowohl mit $D = 2$ Gy als auch mit $D = 4$ Gy Bestrahlungsdosis steigert die Apoptose-Rate signifikant im Vergleich zur alleinig bestrahlten Kontrolle. Hierbei zeigt sich, dass eine zusätzliche Bestrahlung mit $D = 4$ Gy die Apoptose-Rate signifikant mehr steigert als die Kombination mit der geringeren Bestrahlungsdosis von $D = 2$ Gy. Dies spiegelt sich in den Überlebenskurven S/S_0 wieder, bei welchen sich der synergistische Effekt der Bestrahlung mit steigender Bestrahlungsdosis ebenfalls steigern ließ und sich erst ab einer Dosis von $D = 4$ Gy signifikant bemerkbar machte. Lediglich die alleinige Valproat-Inkubation hatte hier keinen Effekt auf das klonogene Überleben S/S_0 .

Die Einzelwerte wurden mit ANOVA, gefolgt vom Tukey HSD-Test geprüft.

Die Rate an tetra- und polyploiden DU-145-Zellen lag bei allen Versuchsanordnungen bei ca. 5% und damit unterhalb der klinischen Relevanz. Die Behandlung mit Valproat hatte hier weder in Kombination mit Bestrahlung, noch allein einen Einfluss auf die Polyploidisierungs-Rate.

Eine chromosomale Instabilität konnte weder nach einer Kulturzeit von 8 noch von 15 Tagen nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Valproat hatte keinen Einfluss auf die Rate an chromosomalen Aberrationen, weder in Kombination mit Bestrahlung, noch als Monotherapie.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die radiosensibilisierende Wirkung von 1 mM Valproat auf Prostata-Karzinom-Zelllinien sowie auf „normale“ Prostata-Zelllinien aus Hyperplasien *in vitro* untersucht. Des Weiteren wurde die Apoptose-Rate, sowie die Induktion von Polyploidie und chromosomaler Instabilität durch diese Kombinationsbehandlung als mögliche Mechanismen der erhöhten Radiosensitivität untersucht.

Valproat wirkt als HDAC-Inhibitor (Thelen et al. 2004; Marchion et al. 2005) und hat, aufgrund der langjährigen klinischen Erfahrung in der Behandlung von z. B. Epilepsie und seinem moderaten Nebenwirkungsprofil, einen Vorteil in der Anwendbarkeit und Sicherheit der Applikation gegenüber anderen HDAC-Inhibitoren (Bowden 2003; Peterson und Naunton 2005).

Munshi et al. (2005), sowie Flatmark et al. (2006) haben gezeigt, dass HDAC-Inhibitoren (z.B.: Natriumbutyrat, Trichostatin A, Suberoylanilid-Hydroxamid-Säure, MS-275) einen radiosensibilisierenden Effekt auf z. B. Melanom-Zelllinien und Zelllinien aus kolorektalen Karzinomen haben, nicht jedoch auf gesunde Fibroblasten.

In seiner Funktion als HDAC-Inhibitor kann Valproat bei verschiedenen Tumorzelllinien (z. B.: Mamma-Karzinom-Zelllinien, Gliom-Zellen, Prostata-Karzinom-Zelllinien, ect.) *in vitro* und *in vivo*, durch die Modulation von verschiedenen Wegen (wie z. B. Zellzyklusarrest, Apoptose, Angiogenese, Metastasierung, Differenzierung und der dahinterliegenden genetischen Veränderungen) einen starken Antitumoreffekt auslösen. Dieser Effekt ist allerdings nach der Entfernung von Valproat reversibel (Munshi et al. 2005; Duenas-Gonzalez et al. 2008; Ozawa et al. 2009). Außerdem kommt es sowohl zu einem radio- als auch chemosensibilisierenden Effekt (Camphausen et al. 2005, Munshi et al. 2005; Harikrishnan et al. 2008).

Für die Prostata-Karzinom-Zelllinien konnte eine, von der applizierten Konzentration des Valproats (1 – 25 mM) und Dauer der Applikation abhängige Apoptose-Induktion

und eine Zellproliferations-Hemmung nachgewiesen werden. Die Valproat-Effekte waren von der jeweiligen Zelllinie und deren basalen Genexpressionsmusters, sowie dem Ort der Histonhyperacetylierung in Bezug auf die dort befindlichen Gene abhängig. *In vivo* wurde ebenfalls eine Proliferationshemmung nachgewiesen (Thelen et al. 2004; Angelucci et al. 2006; Xia et al. 2006; Shabbeer et al. 2007).

In dieser Arbeit wurde der radiosensibilisierende Effekt von Valproat auf Prostata-Karzinom-Zelllinien untersucht.

Die maximale Serumkonzentration von Valproat bei der Behandlung von Epilepsien liegt bei 0,94 mM. Bei höheren Konzentrationen besteht ein signifikantes Risiko an toxischen Nebenwirkungen (z.B. Thrombozytopenie, Somnolenz) (Chen et al 2006). Daher wurde für die Versuche in dieser Arbeit die Konzentration von 1 mM Valproat gewählt.

Eine Bestrahlung wird derzeit in Fraktionsdosen von 2 Gy verabreicht. Daher wurde diese Dosis für die Mehrzahl der durchgeführten Versuche gewählt.

Die radiosensibilisierende Wirkung von 1 mM Valproat auf das klonogene Überleben der Zellen PNT-2 und DU-145 mit einer Bestrahlungsdosis von 0 – 6 Gy wurde untersucht. Die Überlebenskurven (S/S_0) der Zelllinien BPH-1 und PC-3 wurden, nach einer Behandlung mit 1 mM Valproat und einer Bestrahlungsdosis von $D = 2 - 6$ Gy, bereits in einer früheren Arbeit (Golombeck 2008) erstellt. Diese Daten wurden hier zur weiteren Auswertung einbezogen.

Die Apoptose-Rate aller oben genannten Zelllinien (PNT-2, BPH-1, PC-3, DU-145) wurde nach einer Behandlung mit 1 mM Valproat und einer Bestrahlungsdosis von $D = 2$ Gy (bzw. 4 Gy bei DU-145) bestimmt.

Die Polyploidisierungsrate und die Induktion chromosomaler Instabilitäten wurde bei den Zelllinien PNT-2, BPH-1, PC-3 und DU-145 nach einer Behandlung mit 1 mM Valproat und einer Bestrahlung mit $D = 2$ Gy untersucht.

Der radiosensibilisierende Effekt von 1 mM Valproat auf Prostata-Karzinom-Zellen gemessen anhand des klonogenen Überlebens (S/S_0)

In den „normalen“ Prostata-Hyperplasie-Zelllinien PTN-2 und BPH-1 konnte keine radiosensibilisierende Wirkung von 1 mM Valproat beobachtet werden, unabhängig von der Inkubationsdauer bis hin zu 120 Stunden.

Im Gegensatz zu den „normalen“ Zelllinien konnte in den Prostata-Karzinom-Zelllinien PC-3 und DU-145 eine radiosensibilisierende Wirkung von Valproat in Bezug auf das klonogenen Überleben nachgewiesen werden.

Die radiosensibilisierende Wirkung war in den PC-3-Zellen stärker, trat jedoch erst bei einer längeren Valproat-Inkubationsdauer von 120 Stunden auf. So wurden bei den PC-3-Zellen bereits bei 2,4 Gy in Kombination mit Valproat 90% der Zellen in den klonogenen Zelltod geschickt, bei den DU-145-Zellen hingegen erst bei 4,6 Gy (Faktor 2). Bei 6 Gy liegt das klonogene Überleben in Kombination mit einer Valproat-Behandlung bei den PC-3-Zellen lediglich bei 0,006, bei den DU-145-Zellen jedoch noch bei 0,06 (Faktor 10).

Die Valproat-Wirkung auf die DU-145-Zellen war hingegen unabhängig von der Inkubationsdauer, allerdings war sie erst ab einer Bestrahlungsdosis von $D = 4$ Gy signifikant.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen, welche bei der Verwendung von anderen HDAC-Inhibitoren bei anderen Zelllinien in Kombination mit Bestrahlung beobachtet wurden. So konnten Munshi et al. (2005) einen radiosensibilisierenden Effekt des HDAC-Inhibitors Natriumbutyrat auf zwei Melanom-Zelllinien, nicht aber auf normale Lungenfibroblasten nachweisen. Sie führten diesen Effekt auf die reduzierte Expression von verschiedenen Reparatur-Genen (z.B. Ku70, Ku86 und katalytische Untereinheiten von DNA-abhängigen-Proteinkinasen) in den Melanom-Zelllinien zurück. Diese konnten nun das erhöhte Aufkommen von DNA-Schädigungen durch die Kombinationsbehandlung nicht mehr ausreichend reparieren und gingen dann im Gegensatz zu den normalen Fibroblasten in den mitotischen Zelltod.

Valproat führt ebenfalls zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses (Schulpis et al. 2006; Zhang et al. 2010). Der Grund für den radiosensibilisierenden Effekt von Valproat wird daher in der Akkumulation von DNA-Schäden durch ein akutes gleichzeitiges Auftreten von sehr vielen reaktiven oxidativen Spezies (ROS), bedingt durch die Valproat-Behandlung und die Bestrahlung, vermutet.

So ist bereits durch andere Arbeiten ein erhöhter ROS-Level in vielen malignen Tumoren, wie auch dem Prostata-Karzinom nachgewiesen worden (Klein et al. 2006; Wittgen und van Kempen 2007; Coleman et al. 2008). In diesen Arbeiten wurde die Hypothese vertreten, dass eine chronische moderate Erhöhung der ROS zu einer Malignitätsbildung und Proliferationssteigerung führen kann, z. B. konnte in lokalisierten Prostata-Karzinomen, im Gegensatz zu metastasierten Prostata-Karzinomen, keine Erhöhung des ROS-Levels nachgewiesen werden (Yossepowitch et al. 2007).

Akute hohe ROS-Level können jedoch sowohl die zelluläre Abwehr als auch das Reparaturvermögen der Zellen überfordern und somit zu Apoptose und mitotischem Zelltod führen. Sehr hohe ROS-Level können darüber hinaus auch zu Nekrose führen (Ozben 2007; Khandrika et al. 2009).

Sowohl Bestrahlung mit ionisierender Strahlung, als auch eine Behandlung mit HDAC-Inhibitoren führen zu ROS-Entstehung, welche von den „normalen“ Zellen noch durch den Einsatz von antioxidativen Systemen und letztendlich DNA-Reparaturmechanismen kompensiert werden können (Ungerstedt et al. 2005; Ozben 2007; Pinthus et al. 2007).

Der, sowohl durch die ionisierende Strahlung (Wasser-Radiolyse), als auch durch Valproat erhöhte oxidative Stress, wirkt dann synergistisch, zusammen mit der Fähigkeit der HDAC-Inhibitoren, über eine Histonhyperacetylierung eine Chromatindekondensation zu bewirken.

Da der basale Level an ROS bei den malignen Prostata-Karzinom-Zellen schon erhöht ist, führt hier die akute hohe Belastung mit ROS zu einer Überlastung der antioxidativen Systeme (Antioxidanzien, Redox-Puffer-Systeme), welche in Karzinom-Zellen ohnehin eine verminderte Kapazität haben (Khandrika et al. 2009;

Ozben 2007). Dies könnte dann zu einem erhöhten Auftreten an DNA-Schäden und über verschiedene Wege zum klonogenen Zelltod führen.

Der molekulare Mechanismus, welcher dieser Radiosensibilisierung zugrunde liegt, ist jedoch noch nicht endgültig aufgeklärt. So bewirken HDAC-Inhibitoren, wie auch Valproat, eine Vielzahl an epigenetischen Effekten. Es konnte nachgewiesen werden, dass Valproat z. B. die Hochregulation von hunderten von Genen bewirkt. Unter diesen Genen sind auch einige, welche unter anderem auch an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose sowie an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Duenas-Gonzalez et al. 2008; De Schutter und Nuyts 2009)

Erhöht Valproat in Kombination mit Bestrahlung die Apoptose-Rate?

Die Kombinationsbehandlung der „normalen“ Zelllinien (PNT-2; BPH-1) mit Valproat (1 mM) und Bestrahlung (2 Gy) hatte keinen signifikanten Effekt auf die Apoptose-Rate. Insgesamt zeigte sich also bei diesen Zelllinien (PNT-2 und BPH-1) kein verstärkter Zelltod durch die Kombinationsbehandlung mit 1 mM Valproat und einer Bestrahlung mit $D = 2$ Gy, weder durch mitotischen Zelltod, noch durch Apoptose.

In PC-3-Zellen, bei welchen in Bezug auf das klonogene Überleben die größte strahlensensibilisierende Wirkung von Valproat beobachtet wurde, zeigte sich keine solche Wirkung bezüglich der Apoptose-Rate.

In diesem Zusammenhang muss jedoch auf den Versuchsablauf eingegangen werden. Es ist möglich, dass eine früh nach der Bestrahlung auftretende Apoptose im Zuge des Versuchsablaufs verpasst wurde. Da die PC-3-Zellen ja auch nur nach einer 120-stündigen Valproat-Behandlung ein vermindertes klonogenes Überleben zeigten, wäre zunächst hier eine gesteigerte Apoptose-Rate zu erwarten gewesen, falls sie für das verminderte klonogene Überleben verantwortlich gewesen wäre. Im Versuchsaufbau erfolgte die Bestrahlung nach einer 24-stündigen Valproat-Inkubation, welche dann für weitere 96 Stunden nach der Bestrahlung fortgeführt wurde. So sind die Zeitpunkte der Ermittlung der Apoptose-Rate also eigentlich 120 bis 168 Stunden nach der Bestrahlung erfolgt. Sollte in den ersten Stunden bis Tagen nach der Bestrahlung hier eine Apoptose aufgetreten sein, so ist diese eventuell in den späteren Zeitpunkten nicht mehr nachzuweisen gewesen. Dies

genau zu klären würde weitere Versuche mit einem veränderten Versuchsaufbau erfordern. Hier müsste zunächst untersucht werden, ob eine längere Vorbehandlung mit Valproat vor der Bestrahlung ebenfalls das klonogene Überleben verringern würde. Dann könnte man die Erfassung der Apoptose-Raten zeitlich näher an den Bestrahlungszeitpunkt rücken, wie es bei der Kurzzeitinkubation (48 Stunden) der Fall gewesen ist. Da nach der kurzen Inkubationszeit allerdings auch in den Überlebenskurven kein Effekt nachgewiesen wurde, kann man über den eventuellen Anstieg der Apoptose-Rate als Ursache des verminderten klonogenen Überlebens nach einer Inkubationszeit von 120 Stunden derzeit keine verlässliche Aussage treffen.

Die Apoptose-Rate der DU-145-Zellen stieg nach einer Inkubation mit Valproat im Vergleich zur alleinig bestrahlten Kontrolle signifikant an.

Da die DU-145-Zellen in den Überlebenskurven S/S_0 erst ab 4 Gy einen signifikanten Effekt aufwiesen, wurde hier ebenfalls die Bestrahlungsdosis $D = 4$ Gy gewählt.

Diese Erhöhung der Apoptose-Rate war, wie erwartet, abhängig von der Bestrahlungsdosis. So konnte eine zusätzliche Bestrahlung mit 4 Gy die Apoptose-Rate signifikant mehr steigern als die Kombination mit 2 Gy Bestrahlungsdosis. Dies spiegelt sich in den Überlebenskurven S/S_0 , wo sich der synergistische Effekt von Valproat und Bestrahlung mit steigender Bestrahlungsdosis ebenfalls steigern ließ und sich erst ab einer Dosis von 4 Gy als signifikant darstellte.

Die Ursache für diese Effekte kann wieder in der Erhöhung des oxidativen Stresses vermutet werden. So führt eine höhere Bestrahlungsdosis natürlich zu einer höheren ROS-Bildung. Wenn die zellulären antioxidativen Kapazitäten, durch die Kombination mit einer Valproat-Behandlung ausgeschöpft sind, häufen sich die DNA-Schäden und die Zelle geht mangels Reparaturmöglichkeiten in die Apoptose.

Die Apoptose-Rate der DU-145-Zellen wurde ebenfalls durch die alleinige Behandlung mit Valproat signifikant erhöht. Dieser Effekt wird in den Überlebenskurven S/S_0 nicht wiedergegeben, und wird vermutlich ebenfalls durch einen erhöhten oxidativen Stress in Kombination mit epigenetischen Modifikationen verursacht.

In früheren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass Valproat allein die Apoptose-Rate von verschiedenen Prostata-Karzinom-Zelllinien steigert (Thelen et al. 2004; Angelucci et al. 2006). In diesen Studien wurden Valproat-Konzentrationen von 1 – 5 mM genutzt, um diese Effekte zu erreichen. Der Effekt ist, wie schon durch Shabbeer et al. 2007 formuliert, von der jeweiligen Zelllinie abhängig. So zeigten hier die DU-145-Zellen schon einen signifikanten Anstieg der Apoptose-Rate nach einer 120-stündigen Valproat-Inkubation mit 1 mM. Die PC-3-Zellen jedoch nicht, obwohl diese nach dieser Inkubationszeit bereits ein vermindertes klonogenes Überleben zeigten.

Um die Mechanismen der Radiosensibilisierung von Valproat endgültig aufzudecken sind weitere Versuche, gegebenenfalls mit erhöhten Valproatkonzentrationen, anderen zeitlichen Schemata und auch höheren Bestrahlungsdosen notwendig.

Polyploidisierung durch die Kombination von Valproat mit Bestrahlung

Bei den „normalen“ Prostatahyperplasie-Zelllinien PNT-2 und BPH-1 zeigten sich kaum polyploide Zellen, weder vor noch nach Behandlung mit Valproat und Bestrahlung.

Die PC-3-Zellen zeigten schon in den Kontrollen sehr hohe Raten an polyploiden Zellen. Diese wurden mit steigender Kulturdauer weiter erhöht. Eine Behandlung mit Valproat hatte auf die Rate an polyploiden Zellen keinen Einfluss. Eine Bestrahlung erhöhte jedoch diese Rate signifikant. Eine Erklärung für das verminderte klonogene Überleben dieser Zellen ist in diesem Zusammenhang also nicht direkt ersichtlich und bedarf gegebenenfalls weiterer Untersuchungen.

Polyploide Riesenzellen können unter manchen Bedingungen (z. B. Abwesenheit von p53) einen Überlebensvorteil für die mutierte Zelle bieten. So stellt die Polyploidie einen gewissen Schutz gegenüber genomische Schäden dar, da die DNA ja in mehreren Kopien vorliegt und kann so in manchen Fällen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung führen (Ivanov et al. 2003; Storchova und Pellman 2004; Castedo et al. 2006).

Da die Polyploidisierung allerdings auch mit einer Bildung von mehreren Zentromeren einhergeht, kann dies dann auch zur Störung der weiteren Zellteilung führen. So könnte es zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose-Induktion bei der Triggerung des Tetraploidie-Checkpoints kommen, sollte p53 noch intakt sein. Fehlt jedoch p53, so kommt es zu einer multipolaren Mitose, welche zu Aneuploidie oder Zelltod führen kann. In seltenen Fällen kommt es zu einer gleichmäßigen Teilung mit zwei diploiden Tochterzellen. Viele Tumorzellen adaptieren sich jedoch an diesen Zustand, indem sie die multiplen Zentromere an den Spindelpolen versammeln. Dies erlaubt dann eine bipolare, normal ablaufende Mitose mit polyploiden Tochterzellen (Storchova und Pellman 2004).

Manche Autoren vermuten in der Entstehung einer Polyploidie eine treibende Kraft der Kanzerogenese. So konnten Roh et al. (2008), durch Induktion einer Überexpression der Pim-1-Kinase in humanen immortalisierten Prostata- und Mamma-Epithelzellen, eine Polyploidie erzeugen, welche mit einer chromosomalen Instabilität und einer Tumorgenese einherging.

In manchen Fällen führt allerdings die Polyploidisierung zu einem Verlust der Proliferationsfähigkeit. So konnten Xu et al. (2005) durch die Verwendung des HDAC-Inhibitors SAHA bei Kolon-Karzinom- und Mamma-Karzinom-Zellen eine Polyploidie hervorrufen, welche zu einer Seneszenz führte. Die Zellen amplifizierten die DNA, teilten sich jedoch im Anschluss nicht, wurden polyploid, verloren die Fähigkeit zur Proliferation und hatten daher auch eine niedrige Klonogenität. Dieser Effekt war ausgeprägter bei p21^{WAF} und p53 mutierten Zellen. Normale humane Fibroblasten waren von diesem Effekt nicht betroffen. Als Ursache wurde eine aberrante Acetylierung der Histone in der Domäne des Zentromers vermutet, welche dann zu einer Dysfunktion des Kinetochores mit mitotischen Defekten führte. Ein Anteil der Zellen war jedoch gegenüber diesem Effekt immun. SAHA induzierte in diesen Zellen ebenfalls eine erhöhte ROS-Bildung, was die Theorie des synergistischen Effektes von HDAC-Inhibitoren und Radiatio durch erhöhte ROS-Bildung stützt.

Auf die Rate an polyploiden DU-145-Zellen hatten weder eine Valproat-Behandlung, noch eine Bestrahlung, als auch die Kombination aus beidem einen Einfluss.

Die Rate an chromosomalen Aberrationen sowie Induktion chromosomaler Instabilität nach einer Kombinationsbehandlung mit 1 mM Valproat und Bestrahlung mit D = 2 Gy

Bei der Zelllinie PNT-2 konnte durch die Kombinationsbehandlung mit Valproat und Bestrahlung die Rate an chromosomalen Aberrationen im Vergleich zur alleinig bestrahlten Kontrolle, gemessen 28 Stunden nach der Bestrahlung, signifikant gesteigert werden.

Dass diese Zelllinie keine Radiosensibilisierung durch Valproat in den Überlebenskurven (S/S_0) zeigte, kann dadurch erklärt werden, dass die Mehrzahl an induzierten Aberrationen azentrische Fragmente waren. Diese sind für die Zellen meist nicht letal, da die meisten Fragmente keine Gene enthalten (nur 5% der DNA ist kodierend). Diese Fragmente werden meist als Mikrokerne ausgestoßen.

In der Zelllinie PNT-2 ließ sich durch eine 120-stündige Valproat-Inkubation in Kombination mit einer Bestrahlung von D = 2 Gy eine leichte, gegenüber der alleinig bestrahlten Kontrolle aber signifikante, chromosomale Instabilität induzieren, welche sich nach 15 Tagen nachweisen ließ.

Da es sich bei der Zelllinie PNT-2 zwar um sogenannte „normale“ Prostata-Zellen handeln soll, dies allerdings schon durch die Immortalisierung und den aneuploiden Chromosomensatz (Modalzahl: 72 Chromosomen/Zelle) nicht sicher gegeben ist, sollte in Erwägung gezogen werden, inwieweit diese Zellen als Beispiel für Normalgewebe angesehen werden können.

In Ermangelung an Alternativen müssten sich hier nun noch weitere Versuche anschließen, um eine eventuelle Induktion einer chromosomalen Instabilität in dem „Normalgewebe“, ausgelöst durch diese Kombinationsbehandlung, auszuschließen, bzw. zu bestätigen. Hier ist zum einen das Beobachten über einen längeren Zeitraum als 15 Tage hinaus, zum anderen Versuche zur Tumorgenität und chromosomalen Veränderung dieser Zellen *in vivo* nach Durchführung dieser Kombinationsbehandlung indiziert.

Chromosomale Instabilität hat eine große Bedeutung in der klinischen Anwendbarkeit dieses Therapieregimes, da sie potentiell zur Entwicklung von Therapie-induzierten

Sekundärmalignitäten führen kann. In der anderen „normalen“ Zelllinie BPH-1 wurde kein Effekt einer Valproat-Behandlung, weder als Zunahme von chromosomalen Aberrationen gegenüber der alleinig bestrahlten Kontrolle nach 28 Stunden, noch als Induktion von chromosomaler Instabilität beobachtet.

Die PC-3-Zellen zeigten eine hohe Rate an chromosomalen Aberrationen 28 Stunden nach einer Bestrahlung mit $D = 2$ Gy. Eine zusätzliche Erhöhung durch Valproat zeigte sich jedoch nicht.

Die Bestrahlung mit $D = 2$ Gy führte bei den PC-3-Zellen ebenfalls zur Induktion chromosomaler Instabilität. Auch hier zeigten sich keine zusätzlichen Effekte durch die Valproat-Behandlung.

Dieser Mechanismus kann also die erhebliche Radiosensibilisierung der PC-3-Zellen durch Valproat nicht ausreichend erklären, da sich lediglich die Bestrahlung als auslösender Faktor für sowohl die Erhöhung an chromosomalen Aberrationen als auch die Induktion von chromosomaler Instabilität zeigte.

Es sind weitere Versuche mit eventuell höheren Valproat-Konzentrationen sowie Bestrahlungsdosen notwendig, um den Mechanismus der Radiosensibilisierung letztendlich zu klären.

Die DU-145-Zellen zeigten 28 Stunden nach der Bestrahlung, ähnlich wie die PC-3-Zellen, eine Erhöhung der chromosomalen Aberrationen. Dies wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Valproat nicht beeinflusst.

Nach 8 bzw. 15 Tagen war die Rate an chromosomalen Aberrationen niedriger, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die aberranten Zellen entweder die Fragmente ausgestoßen haben oder in den Zelltod gegangen sind.

Eine Induktion chromosomaler Instabilität ließ sich durch keine der hier angewandten Behandlungsformen induzieren.

Die als Ursache für den klonogenen Zelltod angenommenen DNA-Schäden ließen sich in den durchgeführten Versuchen nicht nachweisen.

Da bei anderen Zellarten (Gliom-Zellen, Erythroleukämie-Zellen) der Einsatz von Valproat zu einem erhöhten Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen geführt hat (Camphausen et al. 2005; Harikrishnan et al. 2008), wurde auch hier eine Erhöhung der Anzahl der Doppelstrangbrüche gegenüber der unbehandelten und der alleinig bestrahlten Kontrolle erwartet. Dies hat sich aber nicht bestätigt. Die Doppelstrangbrüche traten allerdings auch bei den anderen Versuchen erst bei höheren Valproat-Konzentrationen (1,5 bis 5 mM) auf, was hier weitere Versuche zur Aufdeckung des Mechanismus mit höheren Valproat-Konzentrationen erfordern würde.

Man kann DNA-Schäden als Ursache allerdings auch nicht ganz ausschließen, da hier nur die optisch in der Giemsa-Färbung sichtbaren Chromosomenveränderungen untersucht wurden. Alle Schäden die zu einem eventuellen klonogenen Zelltod führen könnten sind hier also nicht zur Darstellung gekommen. Des Weiteren können hier auch die Schäden, welche bereits zur Apoptose geführt haben nicht mehr dargestellt werden.

Zusammengefasst zeigte sich bei den „normalen“ Zelllinien PNT-2 und BPH-1 keine Radiosensibilisierung durch Valproat bei den Überlebenskurven (S/S_0).

Valproat hatte bei diesen Zelllinien auch keinen Einfluss auf die Apoptose-Rate, noch auf die Rate an polyploiden Zellen.

Auf die Anzahl an chromosomalen Aberrationen in der ersten Mitose nach Bestrahlung, sowie auf die Induktion von chromosomaler Instabilität hatte Valproat bei den BPH-1-Zellen keinen Einfluss.

Bei den PNT-2-Zellen konnte Valproat die Anzahl der Fragmente in der ersten Mitose nach Bestrahlung gegenüber der alleinig bestrahlten Kontrolle steigern. Außerdem konnte die 120-stündige Valproat-Behandlung (1 mM) in Kombination mit einer Bestrahlung ($D = 2$ Gy) eine chromosomale Instabilität induzieren.

Die chromosomale Instabilität spiegelt sich nicht in den Überlebenskurven (S/S_0) wider, da diese erst nach 15 Tagen Inkubationszeit auftrat, bzw. nachzuweisen war. Das klonogene Überleben wurde allerdings schon nach 10 Tagen Inkubationszeit nach Bestrahlung bestimmt.

Aufgrund der klinischen Bedeutung der genomischen Instabilität müssen sich hier noch weitere Versuche mit einer längeren Beobachtungsdauer und/oder einer höheren Valproat-Konzentration und einer höheren Bestrahlungsdosis anschließen.

Auch eine Tumorgenität *in vivo* dieser nun chromosomal veränderten Zellen muss untersucht werden.

Sowohl die PC-3 als auch die DU-145-Zellen zeigten eine Radiosensibilisierung durch Valproat in ihren Überlebenskurven (S/S_0). Der Effekt war bei PC-3 mehr ausgeprägt, zeigte sich jedoch erst nach einer Inkubationsdauer von 120 Stunden. Der Effekt bei den DU-145-Zellen zeigte eine klare Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis und wurde erst ab einer Dosis von $D = 4$ Gy signifikant. Die DU-145-Zellen, welche aus einer Gehirnmastase gewonnen wurden, scheinen also insgesamt etwas resistenter gegenüber der Behandlung zu sein als die PC-3-Zellen, welche aus einer Knochenmetastase stammen. Wahrscheinlich hängt dies mit der zunehmenden Entdifferenzierung bei Zunahme der Invasivität der Zellen zusammen. Da Prostata-Karzinome meist zunächst in das Skelett metastasieren, bevor sie Gehirnmastasen setzen, kann man bei den DU-145-Zellen von eben dieser fortgeschrittenen Entdifferenzierung ausgehen.

Hier würden sich nun Versuche *in vivo* anschließen, in welchen der klinische Effekt einer chronischen Valproatapplikation mit einer Zielerumkonzentration von ca. 1 mM mit einer gleichzeitigen Bestrahlung mit einer Dosis von $D = 2$ Gy, ggf. auch mit wiederholten Bestrahlungen (wie bei einem derzeitigen Therapieregime) auf Tumolvolumen, Metastasierung usw. in Xenografts untersucht werden müsste.

Die PC-3-Zellen zeigten keinen Einfluss von Valproat auf die Apoptose-Rate. Ganz ausschließen lässt sich eine Beteiligung der Apoptose an dem Mechanismus der Radiosensibilisierung von Valproat jedoch nicht, da eventuell früh nach der Bestrahlung auftretende Apoptosen in diesem Versuchsaufbau nicht erfasst wurden.

Auch die Rate an polyploiden Zellen, an chromosomalen Aberrationen und die Induktion einer chromosomalen Instabilität konnte die Ursache der erheblichen Radiosensibilisierung durch Valproat bei dieser Zelllinie nicht erklären.

Hier müssten zur Aufklärung des Mechanismus der Radiosensibilisierung noch weitere Versuche mit einem veränderten Zeitschema, sowie veränderten Valproat-Konzentrationen und Bestrahlungsdosen durchgeführt werden.

Die DU-145-Zellen zeigten eine Erhöhung der Rate an Apoptosen durch die alleinige als auch durch die Kombinationsbehandlung von Valproat mit einer Bestrahlung. Dieser Effekt war wie die radiosensibilisierende Wirkung auf die Überlebenskurven (S/S_0) von der Dosis der Bestrahlung abhängig.

Weder die Rate an polyploiden Zellen, an chromosomalen Aberrationen noch die Induktion einer chromosomalen Instabilität hat sich durch die zusätzliche Behandlung mit Valproat verändert.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei den DU-145-Zellen die Apoptose vornehmlich als Mechanismus für den erhöhten klonogenen Zelltod nach einer Kombinationsbehandlung mit Valproat und Bestrahlung verantwortlich ist.

Die Hypothese, dass eine Erhöhung des oxidativen Stresses durch die Kombination von Valproat mit Bestrahlung, an dem erhöhten klonogenen Zelltod und im Falle der DU-145-Zellen auch an der erhöhten Rate an Apoptosen ursächlich beteiligt ist, müsste durch weitere Experimente untersucht werden.

So würde sich zunächst die Messung des basalen ROS-Levels in den Zellen, und dann seine Veränderung durch die verschiedenen Therapien (Valproat, Bestrahlung, Kombination) anbieten.

Außerdem könnte der Vergleich der Überlebenskurven (S/S_0) (nach den oben genannten Therapieschemata) mit denen einer Versuchsreihe unter Zusatz von Antioxidanzien, die erhöhten ROS-Level als, zumindest anteilige, Ursache für das geringere klonogene Überleben nachweisen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von 1 mM Valproat in Kombination mit einer Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen auf „normale“ Prostata-Hyperplasie-Zelllinien sowie auf Prostata-Karzinom-Zelllinien *in vitro* untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung, bei einer Valproat-Konzentration von 1 mM, keinen Effekt auf die sogenannten „normalen“ Prostata-Zelllinien PTN-2 und BPH-1 hatte. Weder auf die Apoptose-Rate, noch auf das klonogene Überleben.

Bei den Prostata-Karzinom-Zelllinien konnte eine radiosensibilisierende Wirkung von 1 mM Valproat unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden.

So zeigten die PC-3-Zellen, welche aus einer Knochenmetastase stammen, ein erheblich vermindertes klonogenes Überleben nach einer 120-stündigen Valproat-Behandlung in Kombination mit Bestrahlung. Weder die Rate an Chromosomalen Aberrationen, noch die Apoptose-Rate wurden durch diese Behandlung beeinflusst, so dass hier eine unbekannte Ursache für das verminderte klonogene Überleben angenommen werden muss.

Die DU-145-Zellen, welche aus einer Gehirnmetastase stammen, zeigten nach einer Kombinationsbehandlung mit 1 mM Valproat und einer Bestrahlung mit $D = 4$ Gy ein vermindertes klonogenes Überleben. Diese Verminderung war abhängig von der Dosis der Bestrahlung und insgesamt geringer als bei den PC-3-Zellen. Die Apoptose-Rate der DU-145-Zellen ließ sich durch diese Kombinationsbehandlung ebenfalls steigern, so dass hier die Ursache für das verminderte klonogene Überleben vermutet werden kann. Auf die Rate an chromosomalen Aberrationen hatte die Behandlung mit Valproat und Bestrahlung keinen Einfluss.

Die Versuche zeigen, dass eine Wirkung der Kombinationsbehandlung mit Valproat und Bestrahlung vom genetischen Profil der jeweiligen Erkrankung abhängen wird und somit im klinischen Alltag noch nicht vorhergesehen werden kann.

Anhang**Materialien und Lösungen****Chemikalien**

- Apo-Transferrin	Katalog-Nr. T 2036	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- B-glycerolphosphate	Artikel-Nr. G 6376	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- Bromphenolblau	Artikel-Nr. 15375	Serva Heidelberg, Deutschland
- Colcemide, Karyo Max, 10 µg/ml	Katalog-Nr. 15212-046	Gibco, Invitrogen Carlsbad, USA
- DMEM Trockenmedium	Artikel-Nr. T 043-05	Biochrom AG Berlin, Deutschland
- DMEM	Katalog-Nr. 41965	Gibco, Invitrogen Carlsbad, USA
- EDTA	Artikel-Nr. E 5134	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- EGTA	Katalog-Nr. E 0396	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- Essigsäure	Katalog-Nr. Z 902562 624	Merck

		Darmstadt, Deutschland
- Ethanol 99,9% vergällt	Artikel-Nr. 64-175	DeRaSo
		Dassel-Lauenberg, Deutschland
- Fetales Kälber Serum: FBS Superior	Katalog-Nr. S 0615	Biochrom AG
		Berlin, Deutschland
- Formaldehyd 37%	Artikel-Nr. K 36761003	Merck
		Darmstadt, Deutschland
- Giemsa Azur-Eosin- Methylenblaulösung	Katalog-Nr. 0B 337141	Merck
		Darmstadt, Deutschland
- Glucose	Katalog-Nr. G 7021	Sigma-Aldrich
		Taufkirchen, Deutschland
- Glycerin 15%	Artikel-Nr. 23175	Serva
		Heidelberg, Deutschland
- Glycin	Katalog-Nr. G 8898	Sigma-Aldrich
		Taufkirchen, Deutschland
- HAM's F12 Trockenmedium	Artikel-Nr. T 081-05	Biochrom AG
		Berlin, Deutschland
- HEPES	Katalog-Nr. H 7523	Sigma-Aldrich
		Taufkirchen, Deutschland
- Insulin	Katalog-Nr. I 1882	Sigma-Aldrich
		Taufkirchen, Deutschland

- Isopropanol/ Isopropylalkohol	Artikel-Nr. UN 1219	Chemie Hannover Deutschland	Vertrieb Hannover,
- Kaliumchlorid (KCl)	Katalog-Nr. A 154336 908	Merck Darmstadt, Deutschland	
- Kristallviolett	Katalog-Nr. 14.07	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	
- L-Glutamine	Katalog-Nr. K 0282	Biochrom AR Berlin, Deutschland	
- 2-Mercaptoethanol		Merck Darmstadt, Deutschland	
- Methanol	Katalog-Nr. K 36943309 710	Merck Darmstadt, Deutschland	
- Natriumchlorid (NaCl)	Katalog-Nr. K 91107704 820	Merck Darmstadt, Deutschland	
- Natriumcitrat	Katalog-Nr. S 4641	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	
- Natrium- hydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Artikel-Nr. 6329	Merck Darmstadt, Deutschland	
- Natrium-Pyruvat	Katalog-Nr. S 8636	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland	
- Natrium-Vandate	Katalog-Nr. 6508		

- Natronlauge (NaOH), min 10%	Katalog-Nr. 1.05588.1000	Merck Darmstadt, Deutschland
- Neomycin	Artikel-Nr. A 301-26	Seromed
- Nonidet P-40	Katalog-Nr. N 0896	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin	Artikel-Nr. A 2213	Biochrom AG Berlin, Deutschland
- Ponceau S solution	Artikel-Nr. 33427	Serva Heidelberg, Deutschland
- RPMI 1640 Trockenmedium	Artikel-Nr. T 125-05	Biochrom AG Berlin, Deutschland
- Salzsäure (HCl) 1mol/l	Artikel-Nr. K 025.1	Roth Karlsruhe, Deutschland
- SDS (Lauryl Sulfate)	Katalog-Nr. L 3771	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- SDS (10%)	Katalog-Nr. L 4522	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- Sodium Selenite	Katalog-Nr. S 5261	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- Testosteron	Katalog-Nr. T 6147	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland

- Tris-Base	Katalog-Nr. T 6791	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- TRIS-HCl	Katalog-Nr. 4855.2	Roth Karlsruhe, Deutschland
- Triton X-100	Katalog-Nr. T 8787	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland
- Trypsin/EDTA Solution	Katalog-Nr. L 2153	Biochrom AG Berlin, Deutschland
- Valproat: 2-Propylentanoic acid	Artikel-Nr. P 4543	Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland

Laborkits, Gele

- DC Protein Assay Kit:	Reagent A	Katalog-Nr. 500- 0113	Bio Rad Hercules, USA
	Reagent B	Katalog-Nr. 500- 0114	
- Western Breeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit	Mouse Rabbit	Katalog-Nr. WB 7103 Katalog-Nr. WB 7105	Invitrogen Carlsbad, USA
Inhalt:	Blocker/Diluent (Part A)	Concentrated buffered saline solution containing detergent	
	Blocker/Diluent	Concentrated	Hammersten casein

(Part B)	solution
Antibody Wash	Concentrated buffered saline solution containing detergent
Chromogenic Substrate	Ready-to-use solution of BCIP/NBT substrate for alkaline phosphatase
Secondary Antibody solution	Ready-to-use solution of alkaline phosphatase-conjugated, affinity purified, anti-species IgG (goat conjugate)
Incubation Dishes	100mm x 100mm x 15mm plastic dishes with lids
- Western Blot Gel Kit	- Acrylamide/Bis Solution 30%
	Katalog-Nr. 161- Bio Rad 0156 Hercules, USA
	- APS: Ammonium Persulfate 15%
	Katalog-Nr. 161- 0700
	- TEMED
	Katalog-Nr. 161- 0800

Lösungen

- Waschlösung:	Wash Solution	12,5 ml
	Aqua bidest	187,5 ml
- Apoptose-Färbelösung	Hoechst-Stock 33342	1 µl
	Acridine Orange-Stammlösung	250 µl
- Apo-Transferrin:	20 mg/ml gelöst in PBS und steril filtriert	
- Blocking-Solution:	für 2 Membranen	
	Aqua bidest	28 ml
	Blocker/Diluent (Part A)	8 ml
	Blocker/Diluent (Part B)	4 ml
-Chemilumineszenz-Substrat:	für 2 Membranen:	
	Chemiluminescent Substrate	2,375 ml
	Chemiluminescent Substrate Enhancer	0,125 ml
- DMEM	DMEM Trockenmedium	1 Packung
	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	15 g
	Penicillin/Streptomycin	25 ml
	ad 5 l Aqua bidest. Steril filtriert.	
- HAM's F12:	HAM's F12 Trockenmedium	1 Packung
	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	5,88 g

	Neomycin	50 mg
	ad 5 l Aqua bidest. Steril filtriert.	
- Hypotone Lösung:	Natriumcitrat	0,6 g
	Kaliumchlorid	0,47 g
	in jeweils 100ml Aqua bidest lösen und dann 1:1 mischen.	
- Insulin:	20 mg/ml gelöst in PBS und steril filtriert.	
- Laufpuffer:	Glycin	0,192 M
	Tris-Base	0,025 M
	w/v SDS	
	in 2l Aqua bidest; pH=8,3 nicht einstellen.	
- Lösung A:	Reagenz A mit SDS 10% → 50 : 1 vermischen	
	Reagenz A mit SDS 10% → 50 : 1 vermischen	
- Lyse-Puffer:	50mM Tris pH 7,4	605,5 mg
	150mM NaCl	876,6 mg
	2mM EDTA	74,4 mg
	2mM EGTA	74,4 mg
	0,1mM Natrium-Vandate	1,8 mg
	25mM β-Glycerolphosphate	540,0 mg
	in 100 ml Aqua bidest lösen und autoklavieren, anschließend	
	0,2% Triton X-100	200,0 µl

	0,3% NP40	300,0 µl
	hinzugeben.	
- RPMI:	RPMI 1640 Trockenmedium	1 Packung
	Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	7,13 g
	HEPES	11,92 g
	Glucose	12,5 g
	Penicillin/Streptomycin	25 ml
	ad 5 l Aqua bidest. Steril filtriert.	
- Sammelgel:	Acrylamid/Bis 30%	1 ml
2% für 2 Gele mit 1,0mm Dicke.	Aqua bidest	4 ml
	Sammelgelpuffer	1,67 ml
	TEMED	6,67 µl
	APS 15%	100 µl
- Sammelgelpuffer:	Tris-HCl	15,1 g
	SDS	1,0 g
	ad 250ml Aqua Bidest, pH 6,8	
- Spaltpuffer:	Tris-Base pH 7,4	30 mM
	SDS	9%
	Glycerin	15%
	Bromphenolblau	0,04%
- Trenngel:		
10% für 2 Gele mit		

1,0mm Dicke	Acrylamid/Bis 30%	4 ml
	Aqua bidest	5 ml
	Trenngelpuffer	5 ml
	TEMED	6 μ l
	APS 15%	60 μ l
- Trenngelpuffer:	Tris-HCl	45,5 g
	SDS	1,0 g

ad 250 ml Aqua Bidest, pH 8,8

- Valproat 1M Lösung: 166,2 g/l in PBS gelöst und steril filtriert.

Pro Milliliter der jeweiligen Nährlösung wurde ein Mikroliter der 1 M Valproatlösung gegeben, so dass eine 1 mM Valproat-/Nährlösung entsteht.

Antikörper

- Anti-p21 ^{WAF1} (Ab-1) Mouse mAb (EA10)	Katalog-Nr. OP64	Calbiochem, Merck Darmstadt, Deutschland
- Anti-p53 (Ab-1) (Pantropic) Mouse mAb (PAb421)	Katalog-Nr. OP03	Calbiochem, Merck Darmstadt, Deutschland
- Actin (C-2) mouse monoclonal IgG ₁	Katalog-Nr. SC-8432	Santa Cruz Biotechnology
- Actin (H-300) rabbit polyclonal IgG	Katalog-Nr. SC-10731	Santa Cruz Biotechnology

Geräte

- Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus; Hanau, Deutschland
- Elektrophoresekammer Western Blot	Bio Rad; Hercules, USA
- Gel-Gieß-Kammer Western Blot	Bio Rad; Hercules, USA
- Linearbeschleuniger	Varian; Palo Alto, USA
- Mini Protean 3 Cell Ser/No 67S/14290	Bio Rad; Hercules, USA
- Mini Protean 3 System Glass Plates:	Bio Rad
- Spacer Plates 1,0mm (Katalog-Nr. 1653311)	Hercules, USA
- Short Plates (Katalog-Nr. 1653308)	
- Orbitalschüttler Polymax 1040	Heidolph
- Pico 17 centrifuge, Termo electron corporation	Heraeus

	Hanau, Deutschland
- Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences; Chur, Schweiz
- Pipetten Eppendorf Research mit Spitzen	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
- Power Pac 200	Bio Rad; Hercules, USA
- Power Pac 300	Bio Rad; Hercules, USA
- Reax 1 R Vortexer	Heidolph
- Stereomikroskop	Zeiss; Göttingen, Deutschland
- Sterile Werkbankk, Lamin Air	Heraeus; Hanau, Deutschland
- Sterilisator	Memmert; Schwalbach, Deutschland
- Thermomixer comfort	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
- Trans-Blot SD: Semi Dry Transfer Cell	Bio Rad; Hercules, USA
- Trockenschrank	Memmert; Schwalbach, Deutschland
- Vortexer MSI Mnishaker	IKA; Taquara, Brasilien
- Wärmebad	GFL; Burgwedel, Deutschland
- Zentrifuge: Centrifuge 5415C	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge: Megafuge 1,0 R	Heraeus; Hanau, Deutschland
- Waage BP 1219	Sartorius; Göttingen, Deutschland

- Waage TE 612

Sartorius; Göttingen,
Deutschland

Materialien

- Eppendorf-Cups 1,5 ml

Artikel-Nr. 0300 125-150 Eppendorf

Hamburg, Deutschland

- Filter Paper

Katalog-Nr. 170-3965 Bio Rad

Hercules, USA

- Gewebekulturflaschen

Artikel-Nr. 690175

Greiner Bio One

50 ml

Frickenhausen,
Deutschland

- Gewebekulturflaschen

Artikel-Nr. 658175

Greiner Bio One

250 ml

Frickenhausen,
Deutschland

- Pasteur-Pipetten

Katalog-Nr. 747715

Brand

Wertheim, Deutschland

- Pipetten steril 2 ml, 10 ml,

Artikel-Nr. 861254.001

Sarstedt

25 ml

Nümbrecht, Deutschland

- Polypropylen-Röhrchen

Artikel-Nr. 62.547.004

Sarstedt

15 ml

Nümbrecht, Deutschland

- Slot-Kamm

Bio Rad

(10 Slots; 1,0 mm)

Hercules, USA

- Sterilfilter Minisart

Artikel-Nr. 16555

Sartorius

		Göttingen, Deutschland
- Sterilfilter Filtropur	Artikel-Nr. 050468	Sarstedt
		Nümbrecht, Deutschland
- Trans-Blot Transfer Medium (Nitrocellulose-Membran)	Katalog-Nr. 162-0115	Bio Rad
		Hercules, USA
- Zählkammer 0,0025 mm, (Neubauer improved)		Brand
		Wertheim, Deutschland
- Zell Schaber: Cell scraper	Artikel-Nr. 83.1830	Sarstedt
		Nümbrecht, Deutschland

Software

ANOVA	www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html	
Excel, Version 2007	Microsoft	Redmont, USA
KaleidaGraph, Version 3.5	Synergy Software	Reading, USA
Word, Version 2007	Microsoft	Redmont, USA

Rohdaten und Einzelwerte

Rohdaten zum klonogenen Überleben der BPH-1- und PC-3-Zellen übernommen von Golombeck (2008, S. 70-75).

BPH-1

Tabelle 18: Rohdaten der Koloniebildungstests nach Bestrahlung und 1 mM Valproat-Inkubation über 48 Stunden bei BPH-1-Zellen

Dosis (Gy)	Kontrolle		Valproat	
	ausgeimpfte Zellzahl	Klone	ausgeimpfte Zellzahl	Klone
0	1000	174	1000	185
0	1000	144	1000	158
0	1000	111	1000	137
0	1000	137	1000	169
0	1000	249	1000	203
0	1000	199	1000	207
0	1000	210	1000	176
0	1000	179	1000	190
0	1000	198	1000	212
0	1000	235	1000	180
0	1000	227	1000	223
0	1000	238	1000	167
0,5	1500	244	1500	233
0,5	1500	216	1500	200
0,5	1500	229	1500	223
0,5	1500	208	1500	253
0,5	2000	267	2000	300
0,5	2000	331	2000	366
0,5	2000	375	2000	388
0,5	2000	420	2000	390
0,5	2000	297	2000	391
0,5	2000	307	2000	296
0,5	n. d.	n. d.	2000	324
0,5	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
1	2000	220	2000	205
1	2000	257	2000	281
1	2000	258	2000	294
1	2000	222	2000	237
1	2000	350	2000	364
1	2000	356	2000	362

Dosis (Gy)	Kontrolle		Valproat	
	ausgeimpfte Zellzahl	Klone	ausgeimpfte Zellzahl	Klone
1	2000	316	2000	320
1	2000	389	2000	313
1	2000	416	2000	429
1	2000	439	2000	312
1	2000	434	2000	367
1	2000	449	2000	460
2	2000	255	2000	226
2	2000	232	2000	196
2	2000	220	2000	231
2	2000	222	2000	189
2	2000	236	4000	437
2	2000	232	4000	421
2	2000	252	4000	439
2	2000	280	4000	464
2	2000	330	2000	275
2	2000	312	2000	297
2	2000	411	2000	279
2	2000	239	2000	352
2	n. d.	n. d.	2000	364
2	n. d.	n. d.	2000	193
2	n. d.	n. d.	2000	251
2	n. d.	n. d.	2000	299
4	4000	307	4000	258
4	4000	329	4000	338
4	4000	287	4000	254
4	4000	316	4000	375
4	2000	166	2000	102
4	2000	200	2000	95
4	2000	167	2000	76
4	2000	146	2000	127
4	2000	305	2000	234
4	2000	236	2000	201
4	2000	234	2000	208
4			2000	224
6	6000	332	6000	278
6	6000	288	6000	331
6	6000	268	6000	179
6	6000	216	6000	165
6	4000	107	4000	123
6	4000	115	4000	121

Dosis (Gy)	Kontrolle		Valproat	
	ausgeimpfte Zellzahl	Klone	ausgeimpfte Zellzahl	Klone
6	4000	98	4000	124
6	4000	126	4000	152
6	4000	260	4000	282
6	4000	288	4000	244
6	4000	265	4000	183
6	4000	303	4000	282

Tabelle19: Rohdaten der Koloniebildungstests nach Bestrahlung und 1 mM Valproat-Inkubation über 120 Stunden bei BPH-1-Zellen

Kontrolle			Valproat		
Dosis (Gy)	ausgeimpfte Zellzahl	Klone	Dosis (Gy)	ausgeimpfte Zellzahl	Klone
0	500	189	0	500	206
0	500	179	0	500	206
0	500	202	0	500	218
0	500	181	0	500	231
1	2000	345	1	2000	360
1	2000	339	1	2000	281
1	2000	335	1	2000	350
1	2000	332	1	2000	332
2	1000	320	2	1000	379
2	1000	278	2	1000	346
2	1000	313	2	1000	346
2	1000	262	2	1000	341
4	2000	389	4	2000	427
4	2000	459	4	2000	428
4	2000	340	4	2000	359
4	2000	352	4	2000	341
6	2000	250	6	2000	162
6	2000	255	6	2000	192
6	2000	290	6	2000	94
6	2000	259	6	2000	96
0	500	79	0	500	65
0	500	87	0	500	71
0	500	88	0	500	71
0	500	87	0	500	68
1	2000	113	1	2000	123
1	2000	118	1	2000	165
1	2000	148	1	2000	179
1	2000	146	1	2000	166
2	1000	138	2	1000	137
2	1000	131	2	1000	131
2	1000	139	2	1000	131
2	1000	139	2	1000	145
4	2000	117	4	2000	162
4	2000	161	4	2000	157
4	2000	172	4	2000	141
4	2000	161	4	2000	118
6	2000	125	6	2000	104
6	2000	83	6	2000	102
6	2000	117	6	2000	80
6	2000	94	6	2000	82

PC-3

Tabelle 20: Rohdaten der Koloniebildungstests nach Bestrahlung und 1 mM Valproat-Inkubation über 48 Stunden bei PC-3-Zellen

Dosis (Gy)	Kontrolle		Dosis (Gy)	Valproat	
	ausgeimpfte Zellzahl	Klone		ausgeimpfte Zellzahl	Klone
0	500	208	0	1000	347
0	500	219	0	1000	316
0	500	207	0	1000	289
0	500	242	0	1000	318
0,5	500	222	0,5	1000	359
0,5	500	223	0,5	1000	360
0,5	500	239	0,5	1000	321
0,5	500	176	0,5	1000	270
1	1000	356	1	2000	606
1	1000	402	1	2000	419
1	1000	396	1	2000	561
1	1000	416	1	2000	503
2	1000	249	2	2000	483
2	1000	259	2	2000	373
2	1000	198	2	2000	405
2	1000	252	2	2000	693
4	2000	163	4	4000	161
4	2000	260	4	4000	242
4	2000	291	4	4000	214
4	2000	267	4	4000	252
6	3000	69	6	6000	16
6	3000	39	6	6000	48
6	3000	100	6	6000	55
6	3000	70	6	6000	43
0	500	70	0	1000	57
0	500	76	0	1000	41
0	500	55	0	1000	50
0	500	51	0	1000	53
0,5	500	158	0,5	1000	128
0,5	500	165	0,5	1000	87
0,5	500	147	0,5	1000	109
0,5	500	162	0,5	1000	66
1	1000	99	1	2000	230
1	1000	94	1	2000	225
1	1000	98	1	2000	223
1	1000	88	1	2000	201
2	1000	70	2	2000	120
2	1000	58	2	2000	70
2	1000	29	2	2000	70
2	1000	30	2	2000	86
4	2000	28	4	4000	19
4	2000	21	4	4000	24
4	2000	17	4	4000	20

Kontrolle			Valproat		
Dosis (Gy)	Ausgeimpfte Zellzahl	Klone	Dosis (Gy)	Ausgeimpfte Zellzahl	Klone
4	2000	30	4	4000	27
6	3000	5	6	6000	3
6	3000	3	6	6000	1
6	3000	4	6	6000	2
6	3000	4	6	6000	1
0	500	107	0	1000	294
0	500	136	0	1000	240
0	500	76	0	1000	300
0	500	101	0	1000	281
0,5	500	63	0,5	1000	262
0,5	500	48	0,5	1000	243
0,5	500	42	0,5	1000	271
0,5	500	51	0,5	1000	309
1	1000	185	1	2000	459
1	1000	146	1	2000	239
1	1000	130	1	2000	367
1	1000	139	1	2000	265
2	1000	103	2	2000	225
2	1000	88	2	2000	116
2	1000	87	2	2000	227
2	1000	99	2	2000	108
4	2000	53	4	4000	126
4	2000	17	4	4000	91
4	2000	22	4	4000	51
4	2000	42	4	4000	165
6	3000	9	6	6000	2
6	3000	5	6	6000	1
6	3000	6	6	6000	2
6	3000	8	6	6000	2

Tabelle 21: Rohdaten der Koloniebildungstests nach Bestrahlung und nach 1 mM Valproat-Inkubation über 120 Stunden bei PC-3-Zellen

Kontrolle			Valproat		
Dosis (Gy)	Ausgeimpfte Zellzahl	Klone	Dosis (Gy)	Ausgeimpfte Zellzahl	Klone
0	500	31	0	1000	59
0	500	33	0	1000	40
0	500	27	0	1000	32
0	500	26	0	1000	48
1	1000	53	1	2000	5
1	1000	38	1	2000	28
1	1000	36	1	2000	13
1	1000	44	1	2000	7
2	1000	37	2	2000	7
2	1000	42	2	2000	2
2	1000	32	2	2000	1
2	1000	26	2	2000	0
4	2000	5	4	4000	3
4	2000	9	4	4000	3
4	2000	7	4	4000	4
4	2000	6	4	4000	0
6	3000	3	6	6000	1
6	3000	3	6	6000	0
6	3000	2	6	6000	0
6	3000	2	6	6000	0
0	500	78	0	1000	68
0	500	62	0	1000	61
0	500	97	0	1000	81
0	500	73	0	1000	79
1	1000	119	1	2000	21
1	1000	113	1	2000	31
1	1000	116	1	2000	41
1	1000	100	1	2000	14
2	1000	58	2	2000	12
2	1000	60	2	2000	10
2	1000	57	2	2000	34
2	1000	65	2	2000	14
4	2000	27	4	4000	2
4	2000	38	4	4000	4
4	2000	36	4	4000	1
4	2000	28	4	4000	2
6	3000	4	6	6000	3
6	3000	6	6	6000	1
6	3000	8	6	6000	0
6	3000	3	6	6000	0
0	500	148	0	1000	88
0	500	129	0	1000	128
0	500	155	0	1000	105
0	500	142	0	1000	104
1	1000	175	1	2000	49
1	1000	152	1	2000	71

Kontrolle			Valproat		
Dosis (Gy)	Ausgeimpfte Zellzahl	Klone	Dosis (Gy)	Ausgeimpfte Zellzahl	Klone
1	1000	244	1	2000	97
1	1000	219	1	2000	61
2	1000	136	2	2000	60
2	1000	133	2	2000	20
2	1000	111	2	2000	43
2	1000	168	2	2000	59
4	2000	89	4	4000	23
4	2000	94	4	4000	19
4	2000	84	4	4000	16
4	2000	128	4	4000	10
6	3000	17	6	6000	2
6	3000	32	6	6000	2
6	3000	16	6	6000	2
6	3000	32	6	6000	9

Einzeldaten Chromosomale Aberrationen

Folgend ist tabellarisch dargestellt, wie sich die Summen der chromosomalen Aberrationen aus den jeweiligen Arten von strukturellen Aberrationen zusammensetzen. Hierbei gelten folgende Abkürzungen:

Dic: Dizentrische Chromosomen in Begleitung eines azentrischen Fragmentes

Fg: Fragmente, sowohl azentrische Fragmente als auch Chromatidbrüche

CEF: Chromatid-Austausch-Figuren

Ab: Summe der Aberrationen

PNT-2

Tabelle 22: Chromosomale Aberrationen in „diploiden“ (Modalzahl: 72 Chromosomen/Zelle) PNT-2-Zellen nach 48- bzw. 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Chromosomen wurden 28 Stunden, 8 und 15 nach der Bestrahlung ausgewertet.

Kulturzeit: 28 Stunden

	N _{rel} [%]	y _{Dic} <95%PVB>	y _{Fg} <95%PVB>	y _{CEF} <95%PVB>	y _{Ab} <95%PVB>
Ko	2	0 <0;0,03>	0,02 <0;0,07>	0 <0;0,03>	0,02 <0;0,07>
2 Gy	17	0,05 <0,02;0,08>	0,27 <0,20;0,34>	0 <0;0,02>	0,32 <0,24;0,40>
48h VPA	4	0,01 <0;0,05>	0,03 <0,01;0,08>	0 <0;0,03>	0,04 <0,01;0,10>
48hVPA + 2Gy	34	0,11 <0,07;0,16>	0,44 <0,36;0,54>	0 <0;0,02>	0,55 <0,45;0,66>

Aus jeweils 100-200 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich

Kulturzeit: 8 Tage

	N _{rel} [%]	Y _{Dic} <95%PVB>	Y _{Fg} <95%PVB>	Y _{CEF} <95%PVB>	Y _{Ab} <95%PVB>
Ko	12	0,01 <0;0,04>	0,11 <0,06;0,18>	0,01 <0;0,04>	0,13 <0,07;0,19>
2Gy	11,3	0,02 <0,01;0,05>	0,20 <0,14;0,28>	0 <0;0,02>	0,22 <0,15;0,30>
48h-VPA	11,3	0,03 <0,01;0,06>	0,17 <0,11;0,25>	0 <0;0,02>	0,20 <0,14;0,28>
120h- VPA	10,7	0,03 <0,01;0,06>	0,12 <0,07;0,18>	0 <0;0,02>	0,15 <0,09;0,22>
48h-VPA + 2Gy	12,7	0,02 <0,01;0,05>	0,24 <0,16;0,32>	0 <0;0,02>	0,25 <0,18;0,34>
120h- VPA + 2Gy	12,7	0,03 <0,01;0,07>	0,20 <0,14;0,29>	0 <0;0,02>	0,24 <0,17;0,32>

Aus jeweils 150 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich

Kulturzeit: 15 Tage

	N _{rel} [%]	y _{Dic} <95%PVB>	y _{Fg} <95%PVB>	y _{CEF} <95%PVB>	y _{Ab} <95%PVB>
Ko	15,3	0,02 <0,01;0,05>	0,15 <0,09;0,22>	0 <0;0,02>	0,17 <0,11;0,24 >
2Gy	13,3	0,01 <0;0,04>	0,17 <0,11;0,25>	0 <0;0,02>	0,19 <0,13;0,27 >
48h-VPA	14	0,01 <0;0,04>	0,15 <0,09;0,22>	0 <0;0,02>	0,16 <0,10;0,23 >
120h- VPA	11,3	0,02 <0,01;0,05>	0,11 <0,06;0,17>	0 <0;0,02>	0,13 <0,07;0,19 >
48h-VPA + 2Gy	14	0,07 <0,04;0,12>	0,09 <0,04;0,14>	0 <0;0,02>	0,16 <0,10;0,23 >
120h- VPA + 2Gy	14,7	0,06 <0,03;0,11>	0,23 <0,16;0,31>	0 <0;0,02>	0,29 <0,21;0,38 >

Aus jeweils 150 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

BPH-1

Tabelle 23: Chromosomale Aberrationen in „diploiden“ (Modalzahl: 68 Chromosomen/Zelle) BPH-1-Zellen nach 48- bzw. 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Chromosomen wurden an Tag 8 und 15 nach der Bestrahlung ausgewertet.

Kulturzeit: 28 Stunden

	N _{rel} [%]	y _{Dic} <95%PVB>	y _{Fg} <95%PVB>	y _{CEF} <95%PVB>	y _{Ab} <95%PVB>
Ko	7	0,00 <0;0,03>	0,07 <0,03;0,14>	0 <0;0,03>	0,07 <0,03;0,14>
2 Gy	60	0,10 <0,05;0,18>	0,90 <0,71;1,10>	0 <0;0,03>	1,00 <0,80;1,20>
48h VPA	6	0,00 <0;0,03>	0,08 <0,03;0,15>	0 <0;0,03>	0,08 <0,03;0,15>
48hVPA + 2Gy	58	0,11 <0,05;0,19>	0,80 <0,62;0,99>	0 <0;0,03>	0,91 <0,73;1,10>

Aus jeweils 100 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

Kulturzeit: 8 Tage

	N _{rel} [%]	Y _{Dic} <95%PVB>	Y _{Fg} <95%PVB>	Y _{CEF} <95%PVB>	Y _{Ab} <95%PVB>
Ko	8	0,01 <0,00;0,04>	0,10 <0,05;0,16>	0 <0,00;0,02>	0,11 <0,06;0,17>
2Gy	12,7	0,03 <0,01;0,6>	0,23 <0,16;0,31>	0 <0,00;0,02>	0,25 <0,18;0,34>
48h-VPA	9,3	0,02 <0,01;0,05>	0,08 <0,04;0,14>	0,01 <0,00;0,04>	0,11 <0,06;0,17>
120h-VPA	11,3	0,02 <0,01;0,05>	0,13 <0,07;0,19>	0 <0,00;0,02>	0,15 <0,09;0,22>
48h-VPA + 2Gy	13,3	0,02 <0,01;0,05>	0,14 <0,09;0,21>	0 <0,00;0,02>	0,16 <0,10;0,23>
120h-VPA + 2Gy	16	0,03 <0,01;0,07>	0,17 <0,11;0,25>	0 <0,00;0,02>	0,20 <0,14;0,28>

Aus jeweils 150 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

Kulturzeit: 15 Tage

	N _{rel} [%]	Y _{Dic} <95%PVB>	Y _{Fg} <95%PVB>	Y _{CEF} <95%PVB>	Y _{Ab} <95%PVB>
Ko	11,3	0,01 <0,00;0,04>	0,15 <0,09;0,22>	0 <0;0,02>	0,15 <0,10;0,23>
2Gy	10,7	0,01 <0,00;0,04>	0,15 <0,09;0,22>	0 <0,00;0,02>	0,15 <0,10;0,23>
48h-VPA	11,3	0,01 <0,00;0,04>	0,11 <0,06;0,18>	0 <0,00;0,02>	0,12 <0,07;0,18>
120h-VPA	12,7	0,02 <0,01;0,05>	0,16 <0,13;0,27>	0 <0,00;0,02>	0,18 <0,12;0,25>
48h-VPA + 2Gy	11,3	0,03 <0,01;0,07>	0,09 <0,05;0,15>	0 <0,00;0,02>	0,13 <0,07;0,19>
120h-VPA + 2Gy	12,7	0,01 <0,00;0,04>	0,13 <0,07;0,19>	0 <0,00;0,02>	0,14 <0,09;0,21>

Aus jeweils 150 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

PC-3

Tabelle 24: Chromosomale Aberrationen in „diploiden“ (50 bis 60 Chromosomen/Zelle) PC-3-Zellen nach 48- bzw. 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Chromosomen wurden an Tag 8 und 15 nach der Bestrahlung ausgewertet.

Kulturzeit: 28 Stunden

	N _{rel} [%]	Y _{Dic} <95%PVB>	Y _{Fg} <95%PVB>	Y _{CEF} <95%PVB>	Y _{Ab} <95%PVB>
Ko	2,5	0,01 <0;0,05>	0,02 <0;0,07>	0 <0;0,03>	0,03 <0;0,08>
2 Gy	47,5	0,23 <0,15;0,34>	0,31 <0,21;0,43>	0 <0;0,03>	0,54 <0,41;0,70>
48h VPA	3,3	0,01 <0;0,05>	0,02 <0;0,07>	0 <0;0,03>	0,03 <0;0,08>
48hVPA + 2Gy	51,8	0,16 <0,10;0,25>	0,36 <0,25;0,49>	0 <0;0,03>	0,52 <0,38;0,67>

Aus jeweils 90-200 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

Kulturzeit: 8 Tage

	N _{rel} [%]	Y _{Dic} <95%PVB>	Y _{Fg} <95%PVB>	Y _{CEF} <95%PVB>	Y _{Ab} <95%PVB>
Ko	9	0,03 <0,01;0,06>	0,09 <0,05;0,13>	0,01 <0;0,03>	0,13 <0,08;0,19>
2Gy	12,5	0,06 <0,03;0,10>	0,15 <0,10;0,21>	0,03 <0,01;0,06>	0,24 <0,17;0,31>
48h-VPA	8	0,02 <0,01;0,04>	0,09 <0,06;0,13>	0 <0;0,01>	0,11 <0,08;0,15>
120h-VPA	8,5	0,01 <0;0,03>	0,08 <0,04;0,12>	0 <0;0,02>	0,09 <0,06;0,14>
48h-VPA + 2Gy	12,5	0,02 <0,01;0,05>	0,20 <0,14;0,27>	0,01 <0;0,03>	0,23 <0,17;0,30>
120h-VPA + 2Gy	15,5	0,06 <0,03;0,10>	0,24 <0,17;0,31>	0 <0;0,02>	0,30 <0,23;0,39>

Aus jeweils 200-300 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

Kulturzeit: 15 Tage

	N _{rel} [%]	y _{Dic} <95%PVB>	y _{Fg} <95%PVB>	y _{CEF} <95%PVB>	y _{Ab} <95%PVB>
Ko	20	0,08 <0,05;0,11>	0,24 <0,19;0,30>	0,06 <0,04;0,09>	0,38 <0,31;0,45>
2Gy	24	0,12 <0,07;0,17>	0,43 <0,34;0,52>	0,03 <0,01;0,06>	0,58 <0,47;0,69>
48h-VPA	20,5	0,06 <0,03;0,10>	0,38 <0,29;0,47>	0,03 <0,01;0,06>	0,47 <0,38;0,57>
120h-VPA	17	0,06 <0,03;0,10>	0,20 <0,14;0,27>	0,04 <0,02;0,07>	0,30 <0,23;0,38>
48h-VPA + 2Gy	19	0,13 <0,08;0,18>	0,19 <0,13;0,26>	0,02 <0;0,04>	0,34 <0,26;0,42>
120h-VPA + 2Gy	22,5	0,11 <0,07;0,16>	0,25 <0,19;0,32>	0,01 <0;0,03>	0,37 <0,29;0,46>

Aus jeweils 200-300 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

DU-145

Tabelle 26: Chromosomale Aberrationen in „diploiden“ (Modalzahl: 59 Chromosomen/Zelle) DU-145-Zellen nach 48- bzw. 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy. Die Chromosomen wurden 28 Stunden, 8 und 15 nach der Bestrahlung ausgewertet.

Kulturzeit: 28 Stunden

	N _{rel} [%]	y _{Dic} <95%PVB>	y _{Fg} <95%PVB>	y _{CEF} <95%PVB>	y _{Ab} <95%PVB>
Ko	12	0,03 <0,01;0,06>	0,10 <0,06;0,14>	0,02 <0,01;0,05>	0,15 <0,10;0,21>
2 Gy	28	0,11 <0,05;0,19>	0,26 <0,17;0,38>	0 <0;0,03>	0,37 <0,26;0,50>
48h VPA	1	0 <0;0,03>	0,01 <0;0,05>	0 <0;0,03>	0,01 <0;0,05>
48hVPA + 2Gy	26	0,13 <0,07;0,21>	0,22 <0,14;0,32>	0 <0;0,03>	0,35 <0,23;0,48>

Aus jeweils 100-200 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

Kulturzeit: 8 Tage

	N _{rel} [%]	Y _{Dic} <95%PVB>	Y _{Fg} <95%PVB>	Y _{CEF} <95%PVB>	Y _{Ab} <95%PVB>
Ko	9	0 <0,00;0,02>	0,09 <0,06;0,14>	0 <0,00;0,02>	0,09 <0,06;0,14>
2Gy	12,5	0,03 <0,01;0,06>	0,13 <0,08;0,18>	0 <0,00;0,02>	0,16 <0,11;0,22>
48h-VPA	8,5	0,03 <0,01;0,06>	0,09 <0,06;0,14>	0 <0,00;0,02>	0,12 <0,07;0,17>
120h-VPA	8	0,01 <0,00;0,03>	0,07 <0,04;0,11>	0 <0,00;0,02>	0,08 <0,05;0,13>
48h-VPA + 2Gy	12	0,04 <0,02;0,07>	0,11 <0,06;0,16>	0 <0,00;0,02>	0,15 <0,10;0,20>
120h-VPA + 2Gy	11	0,05 <0,03;0,09>	0,09 <0,06;0,14>	0 <0,00;0,02>	0,14 <0,10;0,20>

Aus jeweils 200 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

Kulturzeit: 15 Tage

	N _{rel} [%]	Y _{Dic} <95%PVB>	Y _{Fg} <95%PVB>	Y _{CEF} <95%PVB>	Y _{Ab} <95%PVB>
Ko	9	0,01 <0,00;0,03>	0,09 <0,06;0,14>	0 <0,00;0,02>	0,10 <0,06;0,15>
2Gy	9	0,06 <0,03;0,10>	0,09 <0,05;0,13>	0 <0,00;0,02>	0,14 <0,10;0,20>
48h-VPA	7,5	0,03 <0,01;0,06>	0,04 <0,02;0,07>	0,01 <0,00;0,03>	0,08 <0,04;0,12>
120h- VPA	10,5	0,04 <0,02;0,07>	0,07 <0,03;0,11>	0,01 <0,00;0,03>	0,11 <0,07;0,16>
48h-VPA + 2Gy	8,5	0,03 <0,01;0,06>	0,07 <0,04;0,11>	0 <0,00;0,02>	0,10 <0,06;0,14>
120h- VPA + 2Gy	13	0,05 <0,02;0,08>	0,09 <0,05;0,13>	0 <0,00;0,02>	0,13 <0,08;0,19>

Aus jeweils 200 ausgezählten Zellen.

95%PVB: 95% Poisson-Vertrauensbereich.

Literaturverzeichnis

Angelucci A, Valentini A, Millimaggi D, Gravina GL, Miano R, Dolo V, Vincentini C, Bologna M, Federici G, Bernardini S (2006):

Valproic acid induces apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple death pathways. *Anticancer Drugs* 17, 1141-1150.

Ballarini F, Ottolenghi A (2004):

Models of chromosome aberration induction: an example based on radiation track structure. *Cytogenet Genome Res* 104, 149-156.

Bowden CL (2003):

Review Article Valproate. *Bipolar Disord* 5, 189-202.

Bromfield GP, Meng A, Warde P, Bristow RG (2003):

Cell death in irradiated prostate epithelial cells: role of apoptotic and clonogenic cell kill. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 6, 73-85.

Camphausen K, Cerna D, Scott T, Sproull M, Burgan WE, Cerra MA, Fine H, Tofilon PJ (2005):

Enhancement of *in vitro* and *in vivo* tumor cell radiosensitivity by valproic acid. *Int J Cancer* 114, 380-386.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004):

Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23(16), 2825-2837.

Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A, Dessen P, Pequignot MO, Casares N, Valent A, Mouhamad S et al. (2006):

Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J* 25, 2584–2595.

Chalah A und Khosravi-Far R (2008):

The Mitochondrial Death Pathway; in: Programmed cell death in cancer progression and therapy Vol. 615; hrsg. Khosravi-Far R, White E; Springer Science and Business Media B.V., New York 2008, 25-45.

Chen CL, Sung J, Cohen M, Chowdhury WH, Sachs MD, Li Y, Lakshmanan Y, Yung BYM, Lupold SE, Rodriguez R (2006):

Valproic Acid Inhibits Invasiveness in Bladder Cancer but Not in Prostate Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 319(2), 533-542.

Choudhury A, Cuddihy A, Bristow RG (2006):

Radiation and new molecular agents part I: targeting ATM-ATR checkpoints, DNA repair, and the proteasome. *Semin Radiat Oncol* 16(1), 51-58.

Coleman MC, Asbury CR, Daniels D, Du J, Aykin-Burns N, Smith BJ, Li L, Spitz DR, Cille JJ (2008):

2-Deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer. *Free Radic Biol Med* 44, 322-331.

De Schutter H und Nuyts S (2009):

Radiosensitizing potential of epigenetic anticancer drugs. *Anticancer Agents Med Chem* 9(1), 99-108.

Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA (2008):

Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev* 34, 206-222.

Efeyan A, Serrano M (2007):

p53: Guardian of the Genome and Policeman of the Oncogenes. *Cell Cycle* 6(9), 1006-1010.

Fan R, Kumaravel TS, Jalali F, Marrano P, Squire JA, Bristow RG (2004):

Defective DNA Strand Break Repair after DNA Damage in Prostate Cancer Cells: Implication for Genetic Instability and Prostate Cancer Progression. *Cancer Res* 64, 8526-8533.

Flatmark K, Nome RV, Folkvord S, Bratland A, Rasmussen H, Ellefsen MS, Fodstad O, Ree AH (2006):

Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Radiat Oncol* 1: 25, 1-26.

Ford HL, Pardee AB (1999):

Cancer and the Cell Cycle. *J Cell Biochem Suppl* 32/33, 166-172.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.. Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends; 5. Ausgabe: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Saarbrücken 2006, 13-15 und 68-71.

Göttlicher M, Minucci S, Zhu Ping, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Coco FL, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001):

Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20(24), 6969-6978.

Golombeck K:

In vitro Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Bestrahlung und Valproat beim Prostatakarzinom. Med. Diss. Göttingen 2008.

Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA (2004):

Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21^{WAF1} involves changes in promotor-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci* 101(5), 1241-1246.

Harikrishnan KN, Karagiannis TC, Chow MZ, El-Osta A (2008):

Effect of valproic acid on radiation-induced DNA damage in euchromatin and heterochromatin compartments. *Cell Cycle* 7(4), 468-476.

Hayward SW, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, Narayan P (1995):

Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31(1), 14-24.

Hendry JH (2001):

Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy. *Radiother Oncol* 59(2), 117-126.

Heng HH, Stevens JB, Liu G, Bremer SW, Ye KJ, Reddy PV, Wu GS, Wang YA, Tainsky MA, Ye CJ (2006):

Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. *J Cell Physiol* 208, 461-472.

Herrmann T, Baumann M: Einflussfaktoren auf das Zellüberleben nach Bestrahlung; in: Klinische Strahlenbiologie –kurz und bündig-. 3. Auflage; Gustav Fischer Verlag, Jena 1997, 49-57.

Ivanov A, Cragg MR, Erenpreisa J, Emzinsh D, Lukman H, Illidge TM (2003):

Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J Cell Sci* 116, 4095-4106.

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lahner JF, Jones LW (1979):

Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17(1): 16-23.

Karow T, Lang-Roth R (2007): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Karow T, o. Verl., Pulheim 2007, 885-890.

Kellerer AM, Rossi HH (1973):

The biophysical properties of 3.9-GeV nitrogen ions. VI. Interpretation of results. *Radiat Res* 55(3), 447-456.

Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK (2009):

Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Lett* 282, 125-136.

Khanna KK, Jackson SP (2001):

DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27, 247-254.

Klein EA, Casey G, Silverman R (2006):

Genetic susceptibility and oxidative stress in prostate cancer: integrated model with implications for prevention. *Urology* 68, 1145-1151.

Kostrouchova M, Kostrouch Z (2007):

Valproic Acid, a Molecular Lead to Multiple Regulatory Pathways. *Folia Biol (Praha)* 53, 37-49.

Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Göttlicher M (2003):

The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* 22(13), 3411-3420.

Kuribayashi K und El-Deiry WS:

Regulation of Programmed Cell Death by P53 Pathway; in: *Programmed cell death in cancer progression and therapy* Vol. 615; hrsg. Khosravi-Far R, White E; Springer Science and Business Media B.V., New York, 2008, 201-221.

Levy D, Reeder C, Loucas B, Hlatky L, Chen A, Cornforth M, Sachs R (2007):

Interpreting Chromosome Aberration Spectra. *J Comput Biol* 14(2), 144-155.

Liu T, Kuljaca S, Tee A, Marshall GM (2006):

Histone deacetylase inhibitors: Multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev* 32, 157-165.

Loblaw DA, Mendelson DS, Talcott JA, Virgo KS, Somerfield MR, Ben-Josef E, Middleton R, Porterfield H, Sharp SA, Smith TJ (2004):

American Society of Clinical Oncology Recommendation for the Initial Hormonal Management of Androgen-Sensitive Metastatic, Recurrent, or Progressive Prostate Cancer. *J Clin Oncol* 22(14), 2927-2941.

Lorimore SA, Coates PJ, Wright EG (2003):

Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation. *Oncogene* 22, 7058-7069.

Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN (2005):

Valproic Acid Alters Chromatin Structure by Regulation of Chromatin Modulation Proteins. *Cancer Res* 65, 3815- 3822.

Marmorstein R (2001):

Structure of histone deacetylases: insights into substrate recognition and catalysis. *Structure* 9(12), 1127-33.

Melet A, Song K, Bucur O, Jagani Z, Grassian AR, Khosravi-Far R:

Apoptotic Pathways in Tumor Progression and Therapy; in: Programmed cell death in cancer progression and therapy Vol. 615; hrsg. Khosravi-Far R, White E; Springer Science and Business Media B.V., New York, 2008, 47-79.

Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Ismail S, Stevens C, Meyn RE (2005):

Histone Deacetylase Inhibitors Radiosensitize Human Melanoma Cells by Suppressing DNA Repair Activity. Clin Cancer Res 11, 4912-4922.

Natarajan AT (2002):

Chromosome aberrations: past, present and future. Mutat Res 504, 3-16.

Ozawa A, Tanji N, Kikugawa T, Sasaki T, Yanagihara Y, Miura N, Yokoyama M (2009):

Inhibition of bladder tumour growth by histone deacetylase inhibitor. BJU Int 105(8), 1181-1186.

Ozben T (2007):

Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. J Pharm Sci 96(9), 2182-2196.

Pan Y, Kytölä S, Farnebo F, Wang N, Lui WO, Nupponen N, Isola J, Visakorpi T, Bergerheim USR, Larsson (1999):

Characterization of chromosomal abnormalities in prostate cancer cell lines by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet* 87, 225-232.

Peterson GM und Naunton M (2005):

Valproate: a simple chemical with so much to offer. *J Clin Pharm Ther* 30, 417-421.

Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001):

Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J Biol Chem* 276(39), 36734-36741.

Pinthus JH, Bryskin I, Trachtenberg J, Lu JP, Singh G, Fridman E, Wilson BC (2007):

Androgen Induces Adaption to Oxidative Stress in Prostate Cancer: Implications for Treatment with Radiation Therapy. *Neoplasia* 9(1), 68-80.

Roh M, Franko OE, Hayward SW, Meer van der R, Abdulkadir SU (2008):

A Role for Polyploidy in the Tumorigenicity of Pim-1-Expressing Human Prostate and Mammary Epithelial Cells. *PLoS ONE* 3(7), e2572.

Ross GM (1999):

Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 6, 41-44.

Salvesen GS und Riedl SJ:

Caspase Mechanisms; in: Programmed cell death in cancer progression and therapy Vol. 615; hrsg. Khosravi-Far R, White E; Springer Science and Business Media B.V., New York, 2008, 13-24.

Savage JRK (1975):

Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. J Med Genet 12, 103-122.

Schulpis KH, Lazaropoulou C, Regoutas S, Karikas GA, Margeli A, Tsakiris S, Papassotiriou I (2006):

Valproic acid monotherapy induces DNA oxidative damage. Toxicology 217, 228-232.

Shabbeer S, Kortenhorst MSQ, Kachhap S, Galloway N, Rodriguez R, Carducci MA (2007):

Multiple Molecular Pathways Explain the Anti-Proliferative Effect of Valproic Acid on Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo. Prostate 67, 1099-1110.

Sökeland J, Schulze H, Rübber H Urologie: Verstehen-Lernen-Anwenden. 13. Auflage; Thieme, Stuttgart 2004, 300-314.

Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978):

Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU-145). *Int J Cancer* 15:
21(3): 274-281.

Storchova Z, Pellman D (2004):

From Polyploidy to Aneuploidy, Genome Instability and Cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 45-54.

Strahl BD und Allis CD (2000):

The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Suzuki K, Ojima M, Kodama S, Watanabe M (2003):

Radiation-induced DNA damage and delayed genomic instability. *Oncogene* 22, 6988-6993.

Takahishi H, Fukutome K, Watanabe M, Furusato M, Shiraishi T, Ito H, Suzuki H, Ikawa S, Hano H (2001):

Mutation Analysis of the p51 Gene and Corralation Between p53, p73, and p51 Expressions in Prostatic Carcinoma. *Prostate* 47, 85-90.

Tan TT und White E:

Therapeutic Targeting of Death Pathways in Cancer; in: *Programmed cell death in cancer progression and therapy* Vol. 615; hrsg. Khosravi-Far R, White E; Springer Science and Business Media B.V., New York, 2008, 81-104.

Terbach N, und Williams RSB (2009):

Struturefunction studies for the panacea, valproic acid. *Biochem Soc Trans* 37, 1126-1132.

Thelen P, Schweyerer S, Hemmerlein B, Wuttke W, Seseke F, Ringert RH (2004):

Expressional changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 24, 25-31.

Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA (2005):

Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 102(3), 673-678.

Uzgare AR und Isaacs JT (2005):

Prostate cancer: potential targets of anti-proliferative and apoptotic signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37(4), 707-714.

Weterings E und Chen DJ (2008):

The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* 18, 114-124.

Wittgen HGM und van Kempen LCLT (2007):

Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res* 17, 400-409.

Xia Q, Sung J, Chowdhury W, Chen CI, Höti N, Shabbeer S, Carducci M, Rodriguez R (2006):

Chronic Administration of Valproic Acid Inhibits Prostate Cancer Cell Growth *In vitro* and *In vivo*. *Cancer Res* 66(14), 7237-7244.

Xu WS, Perez G, Ngo L, Gui CY, Marks PA (2005):

Induction of Polyploidy by Histone Deacetylase Inhibitor: A Pathway for Antitumor Effects. *Cancer Res* 65, 7832-7839.

Yossepowitch O, Pinchuk I, Gur U, Neumann A, Lichtenberg D, Baniel J (2007):

Advanced but Not Localized Prostate Cancer is Associated With Increased Oxidative Stress. *J Urol* 178, 1238-1244.

Zambetti GP (2007):

The p53 Mutation „Gradient Effekt“ and its Clinical Implications. *J Cell Physiol* 213, 370–373.

Zgouras D, Becker U, Loitsch S, Stein J (2004):

Modulation of angiogenesis-related protein synthesis by valproic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 316, 693–697.

Zhang B, Wang, X, Nazarali AJ (2010):

Ascorbic Acid Reverses Valproic Acid-Induced Inhibition of *Hoxa2* and Maintains Glutathion Homeostasis in Mouse Embryos in Culture. *Cell Mol Neurobiol* 30(1), 137-148.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Zwei Wege der Doppelstrangbruchreparatur	3
2	Organisation der zellulären Antwort auf einen Doppelstrangbruch	4
3	Schema des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges	5
4	Dies Regulation der Apoptosewege durch p53	6
5	Unterschiedliche Effekte von DNA-Schädigung oder onkogenen Signalen in Abhängigkeit vom p53-Status	7
6	Einfache Chromosomenaberration	8
7	Strukturformel von Valproat	12
8	Koloniebildung von PNT-2-Zellen nach 48- und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat	26
9	Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostata-Zelllinie PNT-2 in Abhängigkeit der Strahlendosis in Kombination mit 48-stündiger Inkubation bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat	28
10	Anteil apoptotischer PNT-2-Zellen nach 48-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy	30
11	Anteil apoptotischer PNT-2-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy	31
12	Prozentualer Anteil an tetra- und polyploiden PNT-2-Zellen	33
13	Chromosomale Instabilität der PNT-2-Zellen	36

Abbildungsverzeichnis	143	
14	Koloniebildung von BPH-1-Zellen nach 48- und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat	39
15	Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostata-Zelllinie BPH-1 in Abhängigkeit der Strahlendosis in Kombination mit 48-stündiger bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat.	40
16	Anteil apoptotischer BPH-1-Zellen nach 48-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy	42
17	Anteil apoptotischer BPH-1-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy	43
18	Prozentualer Anteil an tetraploiden und an polyploiden BPH-1-Zellen	45
19	Chromosomale Instabilität der BPH-1-Zellen	48
20	Koloniebildung von PC-3-Zellen nach 48- und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat	51
21	Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 in Abhängigkeit der Strahlendosis in Kombination mit 48-stündiger bzw. 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat	52
22	Anteil apoptotischer PC-3-Zellen nach 48-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy	54
23	Anteil apoptotischer PC-3-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy	55
24	Anteil polyploider PC-3-Zellen nach einer Kulturzeit von 28 Stunden, 8 und 15 Tagen nach einer Inkubation mit 1 mM Valproat und einer Bestrahlung mit 2 Gy	57

Abbildungsverzeichnis		144
25	Chromosomale Instabilität der PC-3-Zellen	60
26	Koloniebildung von DU-145-Zellen nach 48- und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat	62
27	Normiertes klonogenes Überleben S/S_0 der Prostatakarzinom-Zelllinie DU-145 in Abhängigkeit der Strahlendosis in Kombination mit 48-stündiger und 120-stündiger Inkubation mit 1 mM Valproat	64
28	Anteil apoptotischer DU-145-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy und mit 4 Gy	66
29	Anteil später Apoptosen der DU-145-Zellen nach 120-stündiger Valproat-Inkubation und Bestrahlung mit 2 Gy und mit 4 Gy	67
30	Prozentualer Anteil an tetraploiden und an polyploiden DU-145-Zellen	70
31	Chromosomale Instabilität der DU-145-Zellen	73

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herr PD Dr. med. H. Christiansen für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit bedanken.

Für die Möglichkeit zum Mikroskopieren und die Unterstützung bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Virsik.

Beim Team des Strahlentherapie-Labors möchte ich mich für die viele Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Lebenslauf

Am 22.12.1981 wurde ich als Tochter der Krankenschwerster Heidi Friedrich, geb. Wolf und dem Kaufmann Wolfgang Friedrich in Göttingen geboren.

Von 1988 bis 1992 besuchte ich die Egelsberg-Grundschule in Göttingen, anschließend erfolgte bis 1994 die weitere Schulbildung in der Orientierungsstufe der Jahnschule in Göttingen. Von dort wechselte ich 1994 auf das Felix-Klein-Gymnasium Göttingen. Im Sommer 2001 legte ich am Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen mein Abitur ab.

Zum Wintersemester 2001 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Im Rahmen des Studiums legte ich im September 2003 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach Beendigung des Praktischen Jahres begann ich im Sommer 2007 meine Dissertation in der Abteilung Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikums Göttingen.

Im Mai 2008 habe ich den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung nach der neuen Approbationsordnung abgelegt und anschließend die Approbation erhalten.

Im September 2008 nahm ich meine Tätigkeit als Assistenzärztin in der Abteilung für Orthopädie, Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Klinikum Uelzen auf und bin dort bis heute tätig.