

Aus der Klinik für Urologie
(Univ.-Prof. Dr. med. L. Trojan)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Modulation der Hitzesensitivität im
Prostatakarzinom *in vitro*:
Der Einfluss der Androgenachse**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Franziska Maria Heining

aus

Weiden in der Oberpfalz

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Univ.-Prof. Dr. med. L. Trojan

Ko-Betreuer/in: PD Dr. rer. nat. P. Krause

Prüfungskommission

Referent/in: Univ.-Prof. Dr. med. L. Trojan

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 11.10.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Modulation der Hitzesensitivität im Prostatakarzinom *in vitro*: Der Einfluss der Androgenachse" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Hahn O, **Heining FM**, Janzen J, Becker JCR, Bertlich M, Thelen P, Mansour JJ, Duensing S, Pahernik S, Trojan L et al. (2020): Modulating the Heat Sensitivity of Prostate Cancer Cell Lines In Vitro: A New Impact for Focal Therapies. *Biomedicines* 8, 585

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Prostatakarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie.....	1
1.1.3 Pathogenese – Androgene und Androgenrezeptor	3
1.1.4 Früherkennung und Diagnostik	4
1.1.5 Tumorklassifikation	5
1.2 Therapie des Prostatakarzinoms	7
1.2.1 Lokal begrenztes Prostatakarzinom: Fokale Therapie.....	8
1.2.2 Metastasiertes Prostatakarzinom	13
1.3 Zelllinien.....	16
1.3.1 BPH-1.....	17
1.3.2 VCaP.....	17
1.3.3 rVCaP	18
1.3.4 22Rv1.....	19
1.3.5 PC-3.....	20
1.4 Versuchsaufbau	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Geräte.....	22
2.1.2 Chemikalien.....	23
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.4 Zelllinien	24
2.1.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	24
2.1.6 Kleinmolekulare Inhibitoren.....	25
2.1.7 Software	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellhaltung und Zellkultur.....	26
2.2.2 Aussaat und Stimulation der Zellen.....	27
2.2.3 Hitzeinduktion als Simulation der HIFU-Therapie	29
2.2.4 Proliferationstest.....	31

2.2.5	Durchflusszytometrie	33
3	Ergebnisse	42
3.1	MTS-Test ohne medikamentöse Vorbehandlung.....	42
3.1.1	MTS-Test: BPH-1.....	42
3.1.2	MTS-Test: rVCaP	43
3.1.3	MTS-Test: VCaP	44
3.1.4	MTS-Test: 22Rv1.....	45
3.1.5	MTS-Test: PC-3	46
3.1.6	Zusammenfassung – MTS-Test ohne medikamentöse Vorbehandlung.....	47
3.2	MTS-Test medikamentös behandelte Zellen.....	48
3.2.1	MTS-Test: BPH-1 + Finasterid	49
3.2.2	MTS-Test: BPH-1 + Bicalutamid	50
3.2.3	MTS-Test: rVCaP + Finasterid	51
3.2.4	MTS-Test: rVCaP + Bicalutamid	52
3.2.5	MTS-Test: VCaP + Finasterid.....	53
3.2.6	MTS-Test: VCaP + Bicalutamid.....	54
3.2.7	MTS-Test: 22Rv1 + Finasterid	55
3.2.8	MTS-Test: 22Rv1 + Bicalutamid.....	56
3.2.9	MTS-Test: PC-3 + Finasterid.....	57
3.2.10	MTS-Test: PC-3 + Bicalutamid	58
3.2.11	Zusammenfassung – MTS-Test mit medikamentös behandelten Zellen	58
3.3	FACS-Analysen	59
3.3.1	FACS-Analyse BPH-1	60
3.3.2	FACS-Analyse BPH-1 + Finasterid	61
3.3.3	FACS-Analyse BPH-1 + Bicalutamid	61
3.3.4	FACS-Analyse rVCaP	62
3.3.5	FACS-Analyse rVCaP + Finasterid.....	63
3.3.6	FACS-Analyse rVCaP + Bicalutamid.....	63
3.3.7	FACS-Analyse VCaP.....	64
3.3.8	FACS-Analyse VCaP + Finasterid	65
3.3.9	FACS-Analyse VCaP + Bicalutamid	65
3.3.10	FACS-Analyse 22Rv1	66
3.3.11	FACS-Analyse 22Rv1 + Finasterid	67
3.3.12	FACS-Analyse 22Rv1 + Bicalutamid	67
3.3.13	FACS-Analyse PC-3.....	68
3.3.14	FACS-Analyse PC-3 + Finasterid	69
3.3.15	FACS-Analyse PC-3 + Bicalutamid	69
3.3.16	Zusammenfassung FACS-Analysen	70
4	Diskussion	73
4.1	Hyperthermie.....	73
4.1.1	Hyperthermie versus Thermoablation	74

4.1.2	Hyperthermische Ablationszonen der HIFU-Therapie	75
4.1.3	Expositionszeit und Rampenrate.....	78
4.1.4	Die thermische Isoeffektdosis (TID)	79
4.1.5	Singuläre Anwendung thermischer Effekte.....	80
4.2	Ansprechen der Zellreihen auf eine Androgendeprivation	83
4.2.1	Ansprechen der Zellreihen auf Finasterid unter Normothermie	84
4.2.2	Ansprechen der Zellreihen auf Bicalutamid unter Normothermie	87
4.2.3	Hyperthermie als mögliche Ursache einer Androgenresistenz	89
4.3	Rolle der HSP.....	90
4.3.1	Paradoxe Stoffwechsellaktanzstieg im MTS-Test.....	90
4.3.2	Ausbildung einer Thermotoleranz durch HSP	91
4.3.3	Zusammenhang zwischen Stoffwechselaktivität und Vitalität.....	93
4.3.4	Mögliche verstärkte Thermotoleranz durch HSP	98
4.3.5	Testosteron als mögliche Ursache der gesteigerten Stoffwechselaktivität	98
4.3.6	Mögliche Auswirkung des paradoxen Stoffwechselaktivitätsanstiegs.....	101
4.4	Limitationen der angewandten Messmethoden	102
4.4.1	MTS-Test.....	102
4.4.2	FACS-Analyse	105
4.5	Vergleich <i>in vitro</i> Ergebnisse mit klinischen Studien	107
4.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	109
5	Anhang.....	112
6	Literaturverzeichnis	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung Androgen-/ und AR-Signalweg	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der transrektalen HIFU-Therapie	9
Abbildung 3: Wirkweise von Finasterid und Bicalutamid im AR-Signalweg	15
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers	34
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung <i>FSC</i>	35
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung <i>SCC</i>	36
Abbildung 7: <i>FSC</i> -/ <i>SSC</i> -Diagramm	37
Abbildung 8: Schematische Darstellung Annexin V/Pi Färbung.....	39
Abbildung 9: Annexin V/FITC/Pi Diagramm	40
Abbildung 10: MTS-Test BPH-1 unstimuliert	42
Abbildung 11: MTS-Test rVCaP unstimuliert.....	43
Abbildung 12: MTS-Test VCaP unstimuliert	44
Abbildung 13: MTS-Test 22Rv1 unstimuliert	45
Abbildung 14: MTS-Test PC-3 unstimuliert	46
Abbildung 15: MTS-Test aller unstimulierten Zellreihen	47
Abbildung 16: MTS-Test BPH-1 mit Finasterid	49
Abbildung 17: MTS-Test BPH-1 mit Bicalutamid	50
Abbildung 18: MTS-Test rVCaP mit Finasterid	51
Abbildung 19: MTS-Test rVCaP mit Bicalutamid	52
Abbildung 20: MTS-Test VCaP mit Finasterid	53
Abbildung 21: MTS-Test VCaP mit Bicalutamid	54
Abbildung 22: MTS-Test 22Rv1 mit Finasterid.....	55
Abbildung 23: MTS-Test 22Rv1 mit Bicalutamid.....	56
Abbildung 24: MTS-Test PC-3 mit Finasterid	57
Abbildung 25: MTS-Test PC-3 mit Bicalutamid	58
Abbildung 26: FACS-Analyse BPH-1 unstimuliert.....	60
Abbildung 27: FACS-Analyse BPH-1 mit Finasterid 5 μ M.....	61
Abbildung 28: FACS-Analyse BPH-1 mit Bicalutamid 5 μ M.....	61
Abbildung 29: FACS-Analyse rVCaP unstimuliert	62
Abbildung 30: FACS-Analyse rVCaP mit Finasterid 5 μ M	63
Abbildung 31: FACS-Analyse rVCaP mit Bicalutamid 5 μ M.....	63
Abbildung 32: FACS-Analyse VCaP unstimuliert	64
Abbildung 33: FACS-Analyse VCaP mit Finasterid 5 μ M	65
Abbildung 34: FACS-Analyse VCaP mit Bicalutamid 5 μ M	65
Abbildung 35: FACS-Analyse 22Rv1 unstimuliert.....	66
Abbildung 36: FACS-Analyse 22Rv1 mit Finasterid 5 μ M.....	67
Abbildung 37: FACS-Analyse 22Rv1 mit Bicalutamid 5 μ M.....	67
Abbildung 38: FACS-Analyse PC-3 unstimuliert	68
Abbildung 39: FACS-Analyse PC-3 mit Finasterid 5 μ M	69
Abbildung 40: FACS-Analyse PC-3 mit Bicalutamid 5 μ M	69

Abbildung 41: Darstellung hyperthermischer Ablationszonen der HIFU-Therapie	76
Abbildung 42: Vereinfachte Darstellung der Fokussierungsstrategie der HIFU-Therapie.....	78
Abbildung 43: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe BPH-1	94
Abbildung 44: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe rVCaP	95
Abbildung 45: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe VCaP	96
Abbildung 46: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe 22Rv1	96
Abbildung 47: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe PC-3.....	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Therapieoptionen des Prostatakarzinoms	8
Tabelle 2: Die Zellreihen.....	17
Tabelle 3: Geräte.....	22
Tabelle 4: Chemikalien	23
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 6: Zelllinien	24
Tabelle 7: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	24
Tabelle 8: Kleinmolekulare Inhibitoren.....	25
Tabelle 9: Software	25
Tabelle 10: Stimulationsprotokoll MTS-Test.....	28
Tabelle 11: Stimulationsprotokoll FACS-Analyse	28
Tabelle 12: Erhitzungsprotokoll MTS-Test ohne medikamentöse Stimulation	30
Tabelle 13: Erhitzungsprotokoll MTS-Test mit medikamentöser Stimulation.....	30
Tabelle 14: Erhitzungsprotokoll FACS-Analyse	31
Tabelle 15: Pipettierschema FACS: Annexin V/Pi Färbung	41
Tabelle 16: FACS-Analysen im Vergleich	71
Tabelle 17: Mittelwerte und Standardfehler	112

Abkürzungsverzeichnis

5AR	5 α -Reduktase
5AR1	5 α -Reduktase Typ 1
5AR2	5 α -Reduktase Typ 2
ADT	Androgendeprivationstherapie
AJCC	American Joint Committee on Cancer (amerikanischer Ausschuss für Krebs)
AR	Androgenrezeptor
ARV7	AR Splicevariante 7
ATP	Adenosintriphosphat
Bic	Bicalutamid
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BPH-1	<i>Benign Prostatic Hyperplasia -1</i> (Benigne Prostatahyperplasie)
Ca	Calcium
CRPC	Kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CSP	Kälteschockproteine
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle' Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	Digital rektale Untersuchung
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ERG	ETS-ähnliche Gene
EtOH	Ethanol
ETS	Erythroblastentransformationsspezifisch
FACS	Durchflusszytometrie
Fin	Finasterid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
HDR-Brachytherapie	Hochdosierte-Brachytherapie
HIFU	Hochintensiv fokussierter Ultraschall
HSP	Hitzeschockprotein
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDR-Brachytherapie	Niedrigdosierte-Brachytherapie
LHRH	Luteinisierendes Hormon Releasing Hormon
LnCaP	<i>Lymph Node Carcinoma of the Prostate</i> (Prostatakarzinom der Lymphknoten)
Mg	Magnesium
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sul- fophenyl) -2H-tetrazolium

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PC-3	<i>Prostate Cancer - 3</i> (Prostatakarzinom - 3)
RCT	Randomisierte kontrollierte Studie
Pi	Propidiumiodid
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PSA	Prostataspezifisches Antigen
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TID	Thermische Isoeffektdosis
TMPRSS2	Transmembrane Serinprotease 2
TRUS	Transrektaler Ultraschall
TSL	Temperatursensitives Liposom
UICC	Union internationale contre le cancer (Internationale Union gegen Krebs)
VCaP	<i>Vertebral Cancer of the Prostate</i> (Vertebrales Prostatakarzinom)
rVCaP	<i>Reverte Vertebral Cancer of the Prostate</i> (Vertebrales Prostatakarzinom revert)

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2017 war die Inzidenz des Prostatakarzinoms mit 19% führend bei den männlichen Tumorneuerkrankungen (Siegel et al. 2017). Im Jahr 2018 lag das Prostatakarzinom mit einer geschätzten Inzidenz von 13,5% hinter dem Lungenkarzinom auf Platz zwei aller männlicher Tumorneuerkrankungen (Bray et al. 2018). 2020 stieg die Inzidenz des Prostatakarzinoms auf 21%, im Jahr 2021 auf 26% und bildete somit erneut die Spitze der geschätzten Tumorneuerkrankungen bei Männern. Bei den geschätzten krebsbedingten Todesfällen im Jahr 2020 lag das Prostatakarzinom mit 10%, im Jahr 2021 mit 11% auf Platz zwei hinter den Lungenkarzinomen (Siegel et al. 2021; Siegel et al. 2020). Die Todesrate durch Prostatakarzinome ist zwischen 1993 und 2014 um 51% reduziert worden. Dies hängt vor allem mit der Reduktion des Rauchens und neuen Behandlungsoptionen zusammen (Siegel et al. 2017).

1.1.2 Ätiologie

1.1.2.1 Alter

Der Entstehung des Prostatakarzinoms liegt eine multifaktorielle Genese zugrunde. Eine zentrale Rolle nimmt das Alter ein. Über 95% der Prostatakarzinome treten bei Männern ab 60 Jahren auf, über 50% bei Männern über dem 80. Lebensjahr (Siegel et al. 2017). Die prostatiche intraepitheliale Neoplasie scheint sich als Vorstufe des Prostatakarzinoms auch schon in jüngeren Jahren zu manifestieren und ist im Alter von 50 Jahren schon weit verbreitet (Sakr et al. 1993). Obwohl die morphologischen Veränderungen bereits früh eintreten können, findet die Progression zum invasiven Prostatakarzinom erst im Verlauf des Alterungsprozesses statt und betrifft lediglich einen von neun Patienten (Abate-Shen und Shen 2000).

1.1.2.2 Geographische und ethnologische Faktoren

Neben dem Alter nehmen auch geographische und ethnologische Faktoren Einfluss auf die Inzidenz des Prostatakarzinoms. Weltweit findet sich das Prostatakarzinom auf allen Kontinenten wieder, es zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Ländern: So

liegt die höchste Inzidenzrate mit 185/100.000 Männern/Jahr in der afroamerikanischen Bevölkerungsgruppe in den Vereinigten Staaten, gefolgt von ebenfalls hohen Inzidenzen in Nordeuropa. Die geringste Inzidenzrate mit weniger als 2/100.000 Männern/Jahr besteht in China (Haas et al. 2008). Insgesamt existiert in westlichen Industrieländern eine bis zu zehnfach höhere Inzidenz des Prostatakarzinoms als in ostasiatischen Ländern (Schulz et al. 2003).

1.1.2.3 Umwelteinflüsse

Grundsätzlich können in der Nahrung protektive Faktoren von Risikofaktoren für die Entstehung des Prostatakarzinoms unterschieden werden. Ein hoher Fettgehalt in der Nahrung scheint das Prostatakarzinom zu induzieren, während hingegen eine ballaststoffreiche Ernährung eine schützende Wirkung aufweist (Jankevicius et al. 2002; Schmitz-Dräger et al. 2001; Wargovich 1999). So wird die fettreiche, phytoöstrogenarme Ernährung der westlichen Gesellschaft als Hypothese für die höhere Inzidenz des Prostatakarzinoms in diesen Gebieten angesehen (Adlercreutz 1990).

1.1.2.4 Lokale Entzündungsprozesse

Männer mit einer sexuell übertragbaren Infektion wie Syphilis oder Gonorrhoe in ihrer Vorgeschichte haben ein erhöhtes Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken. Ebenso werden Assoziationen mit häufig wechselnden Sexualpartnern und mit erhöhter sexueller Aktivität beschrieben (Dennis und Dawson 2002). Dieser Metaanalyse zugrundeliegend wurden weitere Infektionen als potenzielle Risikofaktoren für das Prostatakarzinom in Erwägung gezogen. In nachfolgenden Studien konnte ein Zusammenhang zwischen vorausgegangenen Prostatitiden und einem erhöhten Risiko für Prostatakarzinome hergestellt werden (Dennis et al. 2002).

1.1.2.5 Genetische Faktoren

Männer mit positiver Familienanamnese zeigen ein signifikant höheres Risiko, ein klinisch manifestes Prostatakarzinom zu entwickeln, als Männer ohne erkrankte Verwandte. Das Risiko steigt sowohl mit der Anzahl der betroffenen Verwandten als auch mit dem Zeitpunkt der Diagnosestellung: je früher das Karzinom bei betroffenen Verwandten entdeckt wurde, desto höher das genetische Risiko selbst zu erkranken (Johns und Houlston 2003).

Im Gegensatz zu Kolon-, Brust- und Ovarialkarzinomen fällt es schwerer, eindeutige genetische Marker für das Prostatakarzinom zu identifizieren (Simard et al. 2002). Über eine

lange Zeit wurde die Entstehung des Prostatakarzinoms eher mit Polymorphismen als mit Mutationen in spezifischen Genen in Einklang gebracht (Schulz et al. 2003). Mittlerweile gibt es jedoch eindeutige Hinweise darauf, dass beispielsweise eine G84E Mutation im HOXB1-Gen oder eine Mutation im BRCA2 (*Breast Cancer 2, Early Onset*) - Gen mit einer Frühform des hereditären Prostatakarzinoms sowie einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist (Lynch et al. 2016).

1.1.3 Pathogenese – Androgene und Androgenrezeptor

Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt regulieren Androgene über den intrazellulär gelegenen Androgenrezeptor (AR) Wachstum und Differenzierung des männlichen Reproduktionstraktes, einschließlich der Prostata (Quarmby et al. 1990). Der AR, ein hormonbindendes Protein, ist ein Steroidhormonrezeptor und wird durch die Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) aktiviert (Vis und Schröder 2009a; Evans 1988). Obwohl Testosteron das am meisten vorhandene Androgen im Serum eines Mannes darstellt, besitzt es in der konvertierten Form des 5 α -DHT eine vielfach höhere Bindungsaffinität zum AR (Penning et al. 2008). Im herkömmlichen Steroidgeneseppfad wird DHT vorwiegend über die 5 α -Reduktase aus testikulären Testosteron und zu kleinen Teilen durch die Katalyse von adrenalen Dihydroepiandrosteron und Androstenediol gebildet (Sampson et al. 2013; Vis und Schröder 2009a). Zusätzlich wird ein Pfad beschrieben, welcher unter Umgehung von Testosteron direkt Progesteron als Vorläufer für die Bildung von DHT nutzt (Auchus 2004).

Die für den AR kodierenden AR-Gene sind auf Chromosom Xq11-q13 lokalisiert und umfassen 180 Kilobasen Desoxyribonukleinsäure (DNA) mit acht bekannten Exonen. Der NH₂-Terminus des AR reguliert die Transkription, am COOH-Terminus findet die Hormonbindung statt. Dazwischen liegt die DNA-bindende Domäne (Vis und Schröder 2009a). In der Prostata ist der AR sowohl in den Stromazellen also auch in den sekretorischen Epithelzellen zu finden, nicht hingegen in der nicht-proliferativen Basalzellschicht (Quarmby et al. 1990).

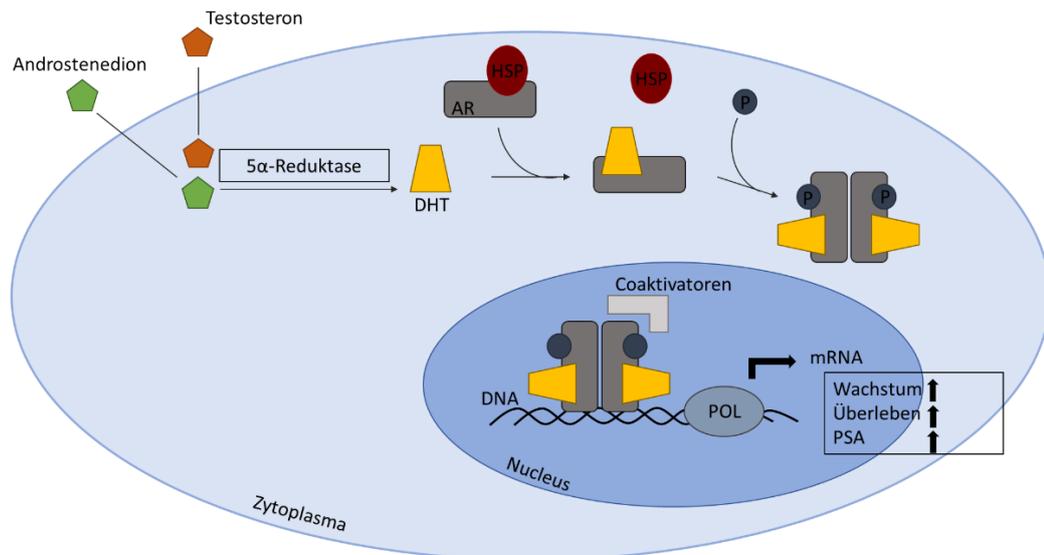


Abbildung 1: Darstellung Androgen- und AR-Signalweg: In Abwesenheit der Liganden befindet sich der AR im Zytoplasma im Ruhezustand. Der AR ist gebunden an Hitzeschockproteine (HSP), welche ein Übertreten in den Zellkern und somit die Bindung an DNA verhindern. Kommt es zur Ligandenbindung, ändert der AR seine Konformation, die HSP dissoziieren ab und der Rezeptor wird phosphoryliert (Edwards und Bartlett 2005). Der nun aktive Androgen-AR-Komplex bildet ein Homodimer, transloziert in den Zellkern, bindet an die Androgen-responsiven Elemente der DNA und ist nun unter Rekrutierung von Cofaktoren in der Lage, die Transkription zu initiieren und mithilfe der Polymerase (POL) durchzuführen. Die daraus resultierende Genexpression fördert Wachstum, Differenzierung, Sekretion, Überleben und Migration. Ein wichtiges Zielgen des AR ist das KLK3-Gen, welches für das zur Diagnostik und Überwachung unerlässliche Prostataspezifische Antigen (PSA) kodiert (Evans 1988; Knudsen und Penning 2010).

1.1.4 Früherkennung und Diagnostik

In der Früherkennung des Prostatakarzinoms werden zwei Verfahren angewandt: Die digital rektale Untersuchung (DRU) und der PSA-Wert. Eine Metaanalyse über die DRU aus dem Jahr 2018 berechnete eine gesammelte Spezifität von 0,59 und einen negativen prädiktiven Wert von 0,64. Auch die Sensitivität (0,51) und der positive prädiktive Wert (0,41) fielen gering aus (Naji et al. 2018). Der PSA-Wert ist als Früherkennungsmaßnahme weltweit umstritten (Ilic et al. 2018). In einer Metaanalyse wurden die Daten aus fünf großen randomisiert kontrollierten Studien (RCT) zusammengefasst. Hierbei konnte keine signifikante Senkung der prostatakarzinomassoziierten Mortalität und des Gesamtüberlebens durch ein Screening der Patienten mittels PSA-Wert Bestimmung im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Screening festgestellt werden (Ilic et al. 2013). Kontrovers dazu wurde 2018 eine multizentrische Studie der ERSPC (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer) veröffentlicht, welche eine signifikante Senkung der prostatakarzinomassoziierten

Mortalität durch das PSA-Screening über einen Beobachtungszeitraum von maximal 16 Jahren zeigt. Die positive Auswirkung des Screenings auf die Mortalität und damit dem Überlebensvorteil der Patienten nimmt hierbei mit der Dauer des Nachbeobachtungszeitraumes zu (Hugosson et al. 2019). Problematisch ist insbesondere der unspezifische Anstieg des PSA-Wertes. So können neben Prostatakarzinomen auch Prostatitiden und benigne Prostatahyperplasien in einem PSA-Anstieg resultieren (Price et al. 2001). Intraindividuelle biologische Variationen erschweren zusätzlich die Festlegung und Interpretation von Grenzwerten (Sölétormos et al. 2005). Zudem führt die Bestimmung des PSA-Wertes zur Gefahr der Überdiagnostik: Nicht therapiebedürftige Prostatakarzinome, die Patienten zu Lebzeiten in ihrer Lebensqualität nicht eingeschränkt hätten, werden entdeckt und unnötigerweise behandelt. Diese Behandlung kann den Patienten möglicherweise mehr Schaden als Benefit bringen (Qaseem et al. 2013). Zur Diagnose eines Rezidivs nach Primärtherapie bleibt der PSA-Wert jedoch unerlässlich (Stephenson et al. 2006; Roach et al. 2006).

Wurde ein suspekter Befund durch die DRU oder die PSA-Wert-Bestimmung identifiziert, wird zur weiteren Diagnostik eine Stanzbiopsie der Prostata durchgeführt (Türkeri et al. 1995; Renfer et al. 1995). Als Anzahl der Stanzzyylinder werden zehn bis zwölf Stenzen als optimal angesehen (Eichler et al. 2006). Die standardmäßig durchgeführte transrektale Ultraschall - (TRUS) gesteuerte Biopsie wurde im letzten Jahrzehnt vermehrt durch die Magnetresonanztomographie (MRT) - TRUS Fusionsbiopsie abgelöst. Hierbei wird der Vorteil der multiparametrischen Leistungsfähigkeit des MRTs mit der Möglichkeit der Echtzeitnavigation des TRUS kombiniert (Das et al. 2020).

1.1.5 Tumorklassifikation

Zur Klassifikation der Ausbreitung des Primärtumors sowie der Metastasierung wird die TNM-Klassifikation herangezogen. Diese wurde von dem Chirurgen Pierre Denoix im Jahr 1952 entwickelt und im Verlauf vom amerikanischen Ausschuss für Krebs (AJCC) sowie der internationalen Union gegen Krebs (UICC) weitergeführt (Asare et al. 2019; DENOIX 1953). Die AJCC veröffentlichte Ende 2016, die UICC im Januar 2018 die achte Auflage der TNM-Klassifikation (Bertero et al. 2018). Das Prinzip der TNM-Klassifikation basiert im Allgemeinen auf drei Kennwerten: Das T-Stadium (Tumor) beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors. Das N-Stadium (regionale Lymphknotenmetastasen) das Ausmaß des Lymphknotenbefalls und das M-Stadium (Fernmetastasen) die Existenz von Metastasen außerhalb des Primärtumors und der regionalen Lymphknoten (Boeker et al. 2016; DENOIX 1953).

Bezogen auf das Prostatakarzinom beschreibt das Stadium T1 ein klinisch unauffälliges, nicht tastbares Prostatakarzinom und das Stadium T2 ein auf die Prostata beschränktes Karzinom. Im Stadium T3 durchbricht das Karzinom die Prostatakapsel und im Stadium T4

infiltriert es in Nachbarorgane wie Harnblase, Rektum, Schließmuskel oder Beckenwand. Stadium N1 steht wie bereits erwähnt für vorhandene Lymphknotenmetastasen, M1 für Fernmetastasen (Boeker et al. 2016; Filson et al. 2014). In den aktualisierten Versionen der TNM-Klassifikationen hat die AJCC die weitere Untergliederung des T2-Stadiums (T2a Befall < 50% eines Seitenlappens, T2b Befall > 50% eines Seitenlappens und T2c Befall beider Seitenlappen) abgeschafft. Die UICC hat die neue Subkategorie pNmi (p für pathologisch, mi für Mikrometastasen) für Lymphknotenmetastasen < 0,2 cm eingeführt. Das M-Stadium hat sich weder in der AJCC noch in der UICC Version im Vergleich zur siebten Auflage geändert (Kandori et al. 2019; Paner et al. 2018).

Die histologische Klassifikation anhand der Drüsenmorphologie wurde im Jahre 1966 etabliert (Gleason 1966). Der Gleason-Wert stellt einen wichtigen prognostischen Parameter dar und wird in fünf Grade eingeteilt. Gleason 1 bedeutet eine geringe Zellentartung, Gleason 5 die maximale Entartung mit nicht mehr erkennbarer Herkunft des Ursprungsgewebes. Die Berechnung des Gleason-Wertes erfolgt bei der Prostatastanzbiopsie aus der Addition des am häufigsten und des am schlechtesten differenzierten Gleason Grades. Die Berechnung des Gleason-Wertes bei einem Prostatektomiepräparat erfolgt durch die Addition des am häufigsten und des am zweithäufigsten vorkommenden Gleason-Grades. Die Anwendung des Gleason-Wertes in der klinischen Praxis basiert auf den im Jahr 2014 festgelegten Kriterien der internationalen Gesellschaft der urologischen Pathologie (ISUP – Kriterien) (Epstein et al. 2017; Epstein et al. 2016; Epstein 2010; Epstein et al. 2005). In der achten Auflage der AJCC-Klassifikation wurden zusätzlich zum Gleason-Wert Gradierungsgruppen eingeführt, um eine exaktere Stratifizierung der Patienten hinsichtlich der Prognose und daraus resultierend der Therapie zu gewährleisten. Hierbei entspricht die Gradierungsgruppe 1 dem Gleason-Wert 6, die Gradierungsgruppe 2 dem Gleason-Wert 3 + 4 = 7, die Gradierungsgruppe 3 dem Gleason-Wert 4 + 3 = 7, die Gradierungsgruppe 4 dem Gleason-Wert 8 und die Gradierungsgruppe 5 dem Gleason-Wert 9 und 10 (Paner et al. 2018).

Anhand der TNM-Klassifikation lässt sich das Prostatakarzinom klinisch in ein lokal begrenztes Stadium (T1-T2, N0, M0), ein lokal fortgeschrittenes Stadium (T3-T4, N0, M0) und in ein fortgeschrittenes, metastasiertes Stadium (jedes T, N1-N3 und/oder M1) einteilen. Für das lokal begrenzte Prostatakarzinom kann unter Hinzunahme des Gleason-Wertes sowie des PSA-Wertes eine Risikostratifizierung bezüglich einer Rezidiventwicklung durchgeführt werden (D'Amico et al. 1998).

1.2 Therapie des Prostatakarzinoms

Die Therapie des Prostatakarzinoms zeigt sich vielgestaltig und sollte auf jeden Patienten individuell abgestimmt werden. Für Männer, die mit keiner Einschränkung ihrer Lebensqualität und Lebenserwartung durch das Prostatakarzinom rechnen müssen, gibt es Ansätze zur Vermeidung von Übertherapien: Active Surveillance folgt hierbei dem Prinzip, die Patienten mittels PSA-Bestimmung und Biopsien engmaschig zu kontrollieren und das Prostatakarzinom erst bei Progression zu behandeln (Parker 2004). Watchful Waiting hingegen ist ein palliatives Therapiekonzept mit abwartendem Verhalten und symptomorientierter Behandlung für Patienten in hohem Alter, mit erheblichen Komorbiditäten und langsam wachsendem Karzinom (Droz et al. 2010; Shappley et al. 2009). Zu den primär kurativen Therapieansätzen des lokal begrenzten Prostatakarzinoms zählen die radikale Prostatektomie, die perkutane Strahlentherapie sowie die niedrigdosierte (LDR) - und die hochdosierte (HDR) – Brachytherapie (Kupelian et al. 2004). Die radikale Prostatektomie und die perkutane Strahlentherapie sind für Patienten aller Risikogruppen geeignet (Hamdy et al. 2016; Bill-Axelson et al. 2011; Kupelian et al. 2004). Die LDR-Brachytherapie mit dem Einsatz von jod-/oder palladiumhaltigen Implantaten in die Drüse ist eine alternative Therapieoption für Patienten mit niedrigem Risikoprofil (Sharkey et al. 2005; Beyer und Brachman 2000). Die HDR-Brachytherapie in Kombination mit der perkutanen Strahlentherapie ist insbesondere für Patienten mit einem mittleren bis hohen Risikoprofil indiziert (Kuban et al. 2008; Galalae et al. 2004). Die Kombination aus perkutaner Strahlentherapie und einer Androgendeprivationstherapie (ADT) stellt eine effektive Therapiemöglichkeit des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms dar (Denham et al. 2011). Im lokal fortgeschrittenen Stadium ohne Möglichkeit der lokal kurativen Therapie und im fortgeschrittenen, metastasierten Stadium sollte den Patienten eine ADT empfohlen werden, ggf. auch in Kombination mit einem Antiandrogen der zweiten Generation oder einer Chemotherapie (James et al. 2017; James et al. 2016; Studer et al. 2006; Nair et al. 2002).

Ein Überblick über die umfangreichen Therapiemöglichkeiten soll in Tabelle 1 vermittelt werden:

Tabelle 1: Therapieoptionen des Prostatakarzinoms

		Active Surveillance	Watchful Waiting	Radikale Prostatektomie	Perkutane Radiatio	Endokrine Therapie	Brachytherapie
Lokal begrenzt (T1-T2)	Niedriges Risiko	X	X	X	X		X (LDR)
	Mittleres Risiko	X	X	X	Perkutane Radiatio +/- endokrine Therapie oder LDR Brachytherapie		
	Hohes Risiko		X	X	Perkutane Radiatio + endokrine Therapie oder HDR Brachytherapie		
Lokal fortgeschritten (T3-T4)			X	X	Perkutane Radiatio + endokrine Therapie und/oder HDR Brachytherapie		
Metastasiertes Stadium (T1-T4, N1-N3 und/oder M1)			X			X	

1.2.1 Lokal begrenztes Prostatakarzinom: Fokale Therapie

Zu den häufigsten Risiken einer kurativen Therapie durch eine radikale Prostatektomie oder eine perkutane Strahlentherapie zählen Urininkontinenz sowie sexuelle Funktionsstörungen (Resnick et al. 2013).

Fokale Therapien sind neuartige Strategien, die möglichst gewebeschonend die Vorteile der bisherigen onkologischen Therapien erhalten und gleichzeitig die Nebenwirkungen auf angrenzende Strukturen minimieren sollen (Valerio et al. 2014). Eine zentrale Rolle in der fokalen Therapie spielt die Erkenntnis, dass das Prostatakarzinom zwar multifokale Läsionen aufweist, der Krankheitsverlauf jedoch von der Indexläsion, der größten Läsion mit dem höchsten Grad an Entartung, bestimmt wird (Liu et al. 2009). Durch die gezielte Therapie der Indexläsion anstatt der gesamten Drüse können Kontinenz und Potenz in hohen Raten erhalten werden (Ahmed et al. 2015). Die Indexläsion kann durch eine multiparametrische Magnetresonanztomographie mit einer großen Treffsicherheit detektiert werden (Fütterer et al. 2015). Mögliche Verfahren der fokalen Therapie sind der hochintensiv fokussierte Ultraschall (HIFU), Kryotherapie, photodynamische Therapie, laserinduzierte Thermotherapie, irreversible Elektroporation und Radiofrequenzablation (Valerio et al. 2017). Vielen Studien über fokale Therapien fehlt es an Fallzahlen und Langzeitdaten. Die HIFU-Therapie gilt unter den fokalen Therapieoptionen als gut untersuchte und bewährte Methodik, sodass diese in den folgenden Kapiteln näher erläutert wird (Guillaumier et al. 2018).

1.2.1.1 Biophysiolgisches Prinzip der transrektalen HIFU-Therapie

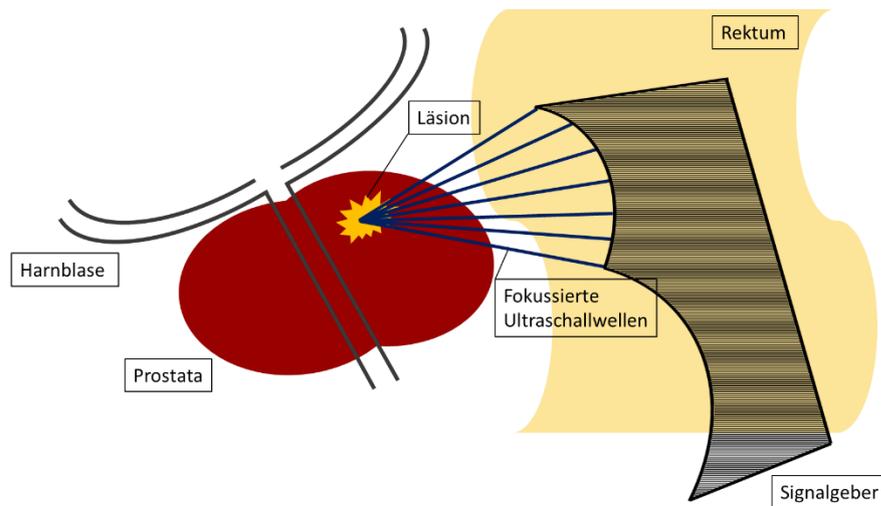


Abbildung 2: Schematische Darstellung der transrektalen HIFU-Therapie: der Signalgeber wird rektal eingeführt und positioniert. Die erzeugten Ultraschallwellen werden in der Indexläsion des Prostatakarzinoms fokussiert.

Um die Ultraschallwellen zu erzeugen und zu fokussieren werden hochfrequente Vibrationen eines Piezokeramiksingalgebers genutzt (Chapelon et al. 2000). HIFU beruht auf dem gleichen Prinzip wie der konventionelle Ultraschall, jedoch mit einer höheren Ultraschallintensität. Während der diagnostische Ultraschall mit 720 W/cm^2 arbeitet, werden beim therapeutischen Ultraschall $100 - 10.000 \text{ W/cm}^2$ verwendet (Zhou 2011). Weitere wichtige Parameter für den klinischen Nutzen der HIFU-Therapie sind die Ultraschall-Frequenz (MHz), die Dauer der Applikation, die Intervalle der Impulse, die Größe der zu behandelnden Läsion und die Penetrationstiefe (Alkhorayef et al. 2015). Der HIFU-Therapie liegen thermische und mechanische Effekte zu Grunde (Valerio et al. 2017). Beim thermischen Effekt kommt es am Fokuspunkt der Schallwellen durch eine Konvertierung der Ultraschallenergie zu Hitze zwischen $70-100^\circ\text{C}$, welche bis zu 20 Sekunden im Zielgewebe gehalten wird. Die generierten Temperaturen führen zu Koagulationsnekrosen und Proteindenaturierung in den Zellen und damit zum sofortigen, irreversiblen Untergang des Tumorgewebes (Chaussy und Thüroff 2017; Zhou und Gao 2013; Chaussy und Thüroff 2011; Kennedy 2005; Hynynen et al. 1996).

Der mechanische Effekt beruht auf der Kavitation - der Bildung und Zerstörung von Gasbläschen. Alternierende Druckwellen passieren das Gewebe. Negativer Druck bewirkt die Ausbildung von Mikrogasbläschen im Gewebe. Druckänderungen der Ultraschallimpulse verursachen einen Kollaps der Bläschen, wodurch die angrenzenden Zellen ihre Zellstruktur nicht mehr aufrechterhalten können. Diese Zerstörung des umliegenden Gewebes wird auch Histotrypsie genannt (Zhou und Gao 2013; Hempel et al. 2011; Xu et al. 2007). Eine

Veranschaulichung der Funktionsweise der häufig eingesetzten transrektalen HIFU-Therapie ist in Abbildung 2 dargestellt.

1.2.1.2 Indikationen und Kontraindikationen der HIFU-Therapie

Zu Beginn war die Indikation zur HIFU-Anwendung beschränkt auf Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom und geringem Risiko (T1-2, N0, M0; Gleason-Score < 6), welche nicht für die radikale Prostatektomie geeignet waren aufgrund von Alter, Komorbiditäten oder dem Wunsch, nicht operiert zu werden (Chaussy und Thüroff 2011; Thüroff et al. 2003). Durch den Fortschritt der Forschung und der klinischen Erfahrung hat sich das Indikationsspektrum erweitert: Die HIFU-Therapie kann zusätzlich angewendet werden als Salvage-Therapie nach Bestrahlung, in der Behandlung von lokal begrenzten Mittel- und Hochrisikokarzinomen sowie als palliative Therapieoption im metastasierten Prostatakarzinom (Rischmann et al. 2017; Sountoulides et al. 2012; Ficarra et al. 2006; Gelet et al. 2004). Mittelfristige Ergebnisse versprechen eine sichere und wirksame Behandlung des lokalisierten Prostatakarzinoms durch den Einsatz der HIFU-Therapie (Guillaumier et al. 2018; Eastham 2008). Erste Langzeitdaten vergleichen die onkologische Wirksamkeit der HIFU-Therapie der gesamten Prostata und der radikalen Prostatektomie bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom. Hierbei wird die onkologische Langzeitwirksamkeit der HIFU-Therapie bei einem medianen Follow-Up von sechseinhalb Jahren gleichwertig zur radikalen Prostatektomie bei Niedrigrisikokarzinomen angesehen. Bei Mittelrisikokarzinomen zeigen beide Therapieverfahren nach zehn Jahren ähnliche Ergebnisse im krebsspezifischen Überleben. Die HIFU-Therapie kann somit bei älteren Patienten als Behandlungsoption erwogen werden unter dem Vorbehalt eines erhöhten Risikos einer notwendigen Salvage-Therapie im Anschluss. Bei Hochrisikokarzinomen zeigt die HIFU-Therapie keine ausreichende Wirksamkeit (Rosenhammer et al. 2019). Kontraindikationen für die HIFU-Therapie sind ein fehlendes, ein zu enges oder ein durch vorangegangene Interventionen beschädigtes Rektum, Patienten mit einem erhöhten perioperativen Risiko (American Society of Anesthesiologists (ASA)-Score > 3) sowie Patienten unter oraler Antikoagulation (Alkhorayef et al. 2015; Sountoulides et al. 2012).

1.2.1.3 Durchführung der HIFU-Therapie

Vor der HIFU-Behandlung erhält der Patient eine Darmspülung, eine Antibiotikaprophylaxe und einen Blasenkatheter. Der Eingriff findet, wenn möglich, in spinaler Anästhesie und unter adäquater Analgetikagabe statt. Die komplette Behandlungsdauer beträgt durchschnittlich 95 Minuten (Chaussy und Thüroff 2010).

Ein Therapiemodul besteht aus einem Behandlungstisch, einem rektal einzuführenden Positionierungssystem mit Signalgeber, einem TRUS zur intraoperativen dreidimensionalen Echtzeittherapieplanung und -überwachung, einem Kühlsystem, um die Rektumwand zu schützen, sowie dem Computersystem mit Software, welches die Behandlungsparameter beinhaltet (Chaussy und Thüroff 2011, 2010). Das definierte kleine Areal, das mit einer Ultraschallwellenfokussierung zerstört werden kann, nennt sich „Primärläsion“. Um größere Flächen zu behandeln, müssen mehrere kleine Areale nachgeschaltet werden. Dies geschieht mithilfe spezifischer Logarithmen wie durch eine mechanische Bewegung des Signalgebers als Energiequelle oder elektronisch durch eine phasengesteuerte Anordnung der Flächen (Chaussy und Thüroff 2011). Ein involviertes Sicherheitssystem stoppt die Behandlung bei fehlerhafter Ausrichtung der Schallwellen, zum Beispiel durch Bewegung des Patienten.

Das MRT ist der Goldstandard für eine Bewertung der Effektivität nach der Behandlung: nekrotische Areale stellen sich hierbei in der Gadolinium-angereicherten T1-Wichtung hypodens dar (Hynynen et al. 1996). Zudem ist das MRT die einzige Technik, um eine Echtzeitmessung der Temperatur während der Behandlung im Zielgewebe durchzuführen (Chaussy und Thüroff 2011).

Die perioperative Morbidität der HIFU-Behandlung ist gering: es werden keine signifikanten Blutungen, thromboembolische Komplikationen oder intensivmedizinische Betreuungen beschrieben (Chaussy und Thüroff 2010).

1.2.1.4 Nebenwirkungen und Ergebnis der HIFU-Therapie

Die häufigsten Nebenwirkungen der HIFU-Therapie sind Stenosen an Blasen Hals oder Urethra, Inkontinenz, erektile Dysfunktion und urethrorektale Fisteln. Durch Einführung der Kühl- und Sicherheitssysteme wurde die Inzidenz der Fisteln unter 1% reduziert (Tsakiris et al. 2008). Die Nebenwirkungen könnten durch die Durchführung eines MRT-Monitorings anstelle des TRUS während der Behandlung weiter minimiert werden (Copelan et al. 2015). Durch Darstellung der Temperaturveränderungen in Echtzeit würde die Gewebezerstörung exakter dargestellt werden und Verletzungen kritischer Strukturen wie Nervenbündel und Urethra könnten vermieden werden (Copelan et al. 2015; Hynynen et al. 1996).

Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2020 fasst die Raten der häufigsten Nebenwirkungen der HIFU-Therapie wie folgt zusammen: Die Urininkontinenzrate variiert zwischen 4% und 34,4%, wobei die Häufigkeit einer Urininkontinenz Grad I bei 0,8% bis 26,5% liegt, die Häufigkeit einer Urininkontinenz Grad II bei 1,8% bis 16% und die Häufigkeit einer Urininkonti-

nenz Grad III bei 0% bis 3,9%. Studien, welche das Auftreten von Harnwegsinfektion untersuchten, erbrachten Häufigkeiten zwischen 0,8% bis 26,5%. Ein akuter Harnverhalt tritt laut der Übersichtsarbeit bei 3,9% bis 28,3% der Patienten auf. Die oben genannten urethrorektalen Fisteln werden mit einer Häufigkeit von 3,6% bis 30,2% beschrieben, das Auftreten von urethralen Stenosen mit einer Wahrscheinlichkeit von 0% bis 30,2%. Zur Häufigkeit des Auftretens einer erektilen Dysfunktion wird keine Aussage getroffen (Ziglioli et al. 2020).

In einer Langzeitstudie wurden unter Einschluss von 1655 Patienten die Risiken der primären Therapieoptionen in der Behandlung des lokalisierten Prostatakarzinoms verglichen. Nach 15 Jahren zeigte sich in der operierten Patientenkohorte eine Urininkontinenzrate von 18,3%, eine erektilen Dysfunktionsrate von 87% sowie Probleme mit der Stuhlregulierung bei 5,2% der Patienten. In der Patientenkohorte nach Bestrahlung (mit oder ohne kombinierter ADT) ergab sich nach 15 Jahren eine Inkontinenzrate von 9,4%, eine erektilen Dysfunktionsrate von 93,9% sowie Probleme mit der Stuhlregulierung bei 16% (Resnick et al. 2013). In aktuelleren Studien zeigen sich bei der roboterassistierten laparoskopischen Prostatektomie Inkontinenzraten von 19% sowie erektilen Dysfunktionsraten von 68% nach 24 Monaten (Nyberg et al. 2018). Eine weitere Langzeitstudien über 42 Monate unter Einschluss von 4003 Patienten erbrachte bei 39% der Patienten nach Operation eine zufriedenstellende erektilen Funktion sowie eine vollständige Kontinenz bei 33% und eine milde Inkontinenz bei 26% der Patienten (Grabbert et al. 2018).

Eine vergleichende Einschätzung der Nebenwirkungsprofile zwischen den bisherigen Therapien und der HIFU-Therapie gestaltet sich durch die deutlich variierenden Werte in den verschiedenen Veröffentlichungen schwierig.

In aktuellen Studien beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach HIFU-Therapie 95%, die Zehn-Jahres Prostatakarzinom-spezifische Überlebensrate 97,4% (Dickinson et al. 2016; Uchida et al. 2015). Es liegen derzeit keine vergleichenden Studien mit anderen Therapieoptionen vor.

1.2.1.5 Zusammenfassung

Bislang musste sich für die Behandlung des lokalisierten Prostatakarzinoms zwischen Active Surveillance und definitiven Therapien wie Operation und Bestrahlung entschieden werden. Die fokale Therapie - wie die HIFU-Therapie - als minimal-invasiver Eingriff ermöglicht einen Mittelweg (van der Poel et al. 2015). Sie bietet für Patienten mit kurativem Therapiewunsch ähnliche kurz- und mittelfristige Heilungsraten wie die konventionellen primär kurativen Therapiekonzepte mit weniger Operations- und Bestrahlungsrisiken (Barkin 2011). Zudem löst das Prinzip der Active Surveillance bei vielen Patienten Ängste und Sorgen aus

(Klotz 2013). Für diese Patienten ist die HIFU-Therapie eine Alternative (Cordeiro et al. 2012). Fortschritte in Technologie und längere Follow-Up-Studien könnten die Relevanz der HIFU-Therapie bei der Behandlung des Prostatakarzinoms weiter steigern (Alkhorayef et al. 2015).

1.2.2 Metastasiertes Prostatakarzinom

1.2.2.1 Hormonablative Therapie

Seitdem Huggins und Hodges im Jahre 1941 zum ersten Mal ein Ansprechen des Prostatakarzinoms auf Androgenentzug gezeigt haben, ist die ADT ein zentraler Punkt in der Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms (Miyamoto et al. 2004; Huggins und Hodges 2002; Huggins 1941). Neuere Komplet-Genom-Analysen weisen darauf hin, dass die mit dem Prostatakarzinom assoziierten Einzelnukleotid-Polymorphismen vermehrt in den AR-Bindestellen zu finden sind (Lu et al. 2011). Ziel der ADT sind die Überlebenszeitverlängerung durch Risikoreduktion von Fernmetastasen und lokalen Rezidiven innerhalb der Prostata sowie die Symptomlinderung (Mitsuzuka und Arai 2017; Boustead und Edwards 2007). Die Langzeitanwendung der ADT, insbesondere in Kombination mit der perkutanen Bestrahlung, zeigen gute klinische Ergebnisse (Lee und Cho 2017). Leider hat die ADT durch die Suppression der Hormone auch einen negativen Einfluss auf den Lipid-, Glucose-, Muskel- und Knochenstoffwechsel. Diese können sekundär zu Adipositas, metabolischem Syndrom, Diabetes mellitus, kardiovaskulären Erkrankungen sowie Osteoporose und Sarkopenie führen (Mitsuzuka und Arai 2017). Erreicht werden kann die Androgendeprivation entweder durch Kastration mittels Orchiektomie, LHRH (luteinisierendes Hormon Releasing Hormon) – Analoga, LHRH - Antagonisten oder mit einem Antiandrogen (zum Beispiel Flutamid, Bicalutamid oder Enzalutamid) (Choi und Lee 2011; Iversen et al. 2006; Nair et al. 2002). Die mögliche Kombination der ADT mit Docetaxel oder mit Abirateron (+/-Prednisolon) bei der Behandlung des hormonsensitiven Prostatakarzinoms hat gute Therapieerfolge ergeben (Fizazi et al. 2017; James et al. 2017; James et al. 2016; Sweeney et al. 2015). Abirateron ist als CYP17A1-Inhibitor hierbei das einzige Medikament, das in der Lage ist, auch die intratumorale Androgensynthese sowie die adrenale androgene Biosynthese effizient zu hemmen und so die Produktion von Testosteron komplett zu verhindern (Yin und Hu 2014; Thelen et al. 2013).

1.2.2.2 Kastrationsresistentes Prostatakarzinom

Die ADT ist nur initial effektiv. Nach durchschnittlich zwei bis drei Jahren kommt es durch reaktivierte AR-Signalvermittlung zu einer weiteren Prostatagewebsproliferation trotz sehr geringer zirkulierender Androgenkonzentration. Dieses Stadium wird kastrationsresistentes Prostatakarzinom (CRPC) genannt (Grossmann et al. 2013). Die AR-Aktivität kann durch verschiedene Mechanismen wiederhergestellt werden: Deregulationen im AR führen über AR-Amplifikation zu einer gesteigerten Proteinexpression (Ford et al. 2003), „*Gain-of-function*“-Mutationen führen zu einer Verstärkung der Tumorprogression (Han et al. 2005). Somatische Mutationen können das Spektrum der AR-Rezeptor Liganden erweitern. Dadurch wird es nicht-androgenen Steroidhormonen wie Progesteron, Östrogen, Cortisol sowie schwächeren Androgenen ermöglicht, an den AR zu binden und diesen zu aktivieren (Brooke und Bevan 2009). Ein weiterer Mechanismus besteht in der Funktionsumwandlung von Androgenrezeptorantagonisten in Androgenrezeptoragonisten (Steinkamp et al. 2009). Studien entdeckten durch Flutamid oder Bicalutamid vermittelte somatische Mutationen und eine daraus resultierende Aktivierung des AR (Hara et al. 2003; Middleman et al. 1996). Darüber hinaus kann der AR alternative Spleißvarianten entwickeln, welche ligandenunabhängig konstitutiv aktiv sind (Hu et al. 2009; Guo et al. 2009; Dehm et al. 2008). Ein anderer wichtiger Vorgang im CRPC ist die abnorme posttranslationale Modifikation. Bekannte AR-modulierende Mechanismen sind Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung (Faus und Haendler 2006). Erste Entdeckungen zeigen einen Zusammenhang zwischen phosphoryliertem AR und einer verkürzten Lebenszeit für Patienten mit CRPC (McCall et al. 2008). Initiiert werden können diese Phosphorylierungen beispielsweise durch deregulierte Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) (Ponguta et al. 2008). Auch die Dysregulation von Cofaktoren begünstigt die Entwicklung eines CRPC. Erhöhte Co-Aktivator-Expressionen und der Verlust von Co-Repressor-Funktionen führen zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber geringeren Hormonspiegeln und zur bereits erwähnten Konvertierung von Androgenrezeptorantagonisten in Androgenrezeptoragonisten (Knudsen und Penning 2010).

1.2.2.3 Medikamente Finasterid und Bicalutamid

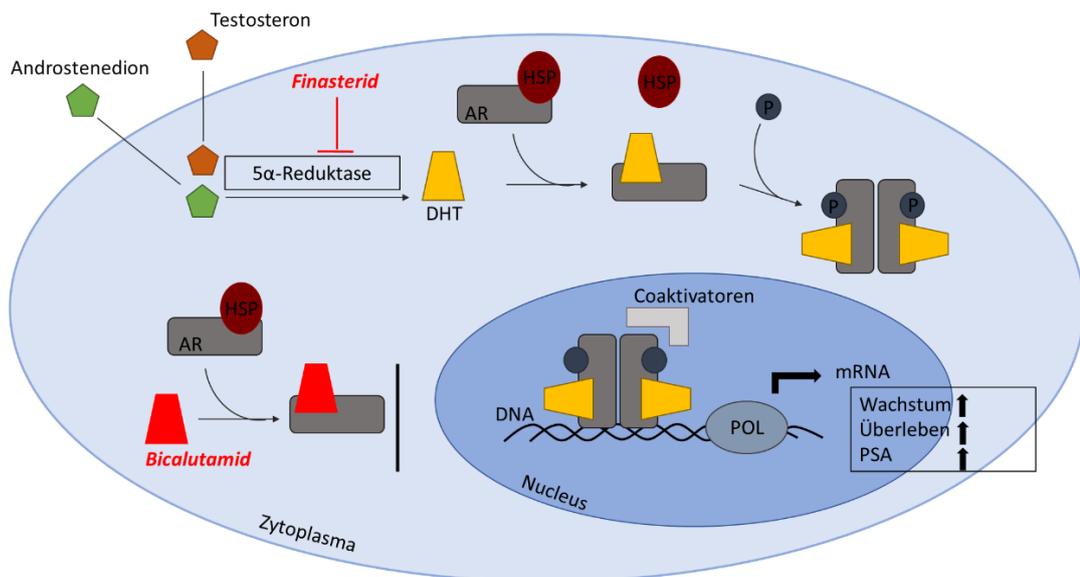


Abbildung 3: Wirkweise von Finasterid und Bicalutamid im AR-Signalweg: Das Medikament Finasterid hemmt die 5α-Reduktase und vermindert somit die Konzentration von DHT, welches mit hoher Affinität an den AR bindet, im Zytosol. Bicalutamid in seiner Funktion als Antiandrogen bindet kompetitiv den AR und verhindert damit ein Übertreten des AR in den Zellkern.

Intraprostatisches intrazelluläres Testosteron wird durch das Enzym 5AR (5α-Reduktase) irreversibel in DHT umgewandelt (Bruchofsky und Wilson 1999). Das Enzym wird kodiert von der SRD5A Genfamilie. Es existieren zwei Isoformen, 5AR1 (5α-Reduktase 1) und 5AR2 (5α-Reduktase 2) (Thigpen et al. 1993). Typ 1 wird stark in Geweben wie Haarfollikel, Haut und Leber exprimiert, Typ 2 ist vor allem in der Prostata, den Nebenhoden und in den Samenbläschen lokalisiert und besitzt eine höhere Bindungsaffinität zu Testosteron (Jin und Penning 2001). Der 5α-Reduktase-Hemmer Finasterid wirkt selektiv an der 5AR2. Finasterid supprimiert das Serum-DHT um 70%, das intraprostatistische DHT nach sieben Tagen um 85%, nach sechs Monaten um 68% (Vis und Schröder 2009b). Finasterid ist indiziert zur Symptomkontrolle bei benigner Prostatahyperplasie (BPH). Es verbessert die Miktionsbeschwerden und reduziert das Risiko einer Progression im Sinne von weniger Harnverhalten und notwendigen chirurgischen Interventionen. Mögliche Nebenwirkungen sind Libidoverlust, erektile Dysfunktion und Ejakulationsstörungen (Tacklind et al. 2010, 2010). Des Weiteren kann es zur Therapie der androgenetischen Alopezie eingesetzt werden (Gupta und Charette 2014).

Eine große RCT über sieben Jahre hat gezeigt, dass die Prostatakarzinominzidenzrate unter der Behandlung mit Finasterid um 24,8% geringer ist als in der Kontrollgruppe. Diese mög-

liche Chemoprävention muss mit den sexuellen Nebenwirkungen und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines High-grade Prostatakarzinoms abgewogen werden. Insbesondere durch Letzteres wird die Rolle als mögliche Chemoprävention kritisch angesehen (Wang et al. 2020; Wilt et al. 2008; Thompson et al. 2003). Ein Vorteil von Finasterid wird in der Reduzierung der Überdetektion und Übertherapie des niedrig malignen Prostatakarzinoms gesehen mit daraus resultierender Senkung der Morbidität und der Kosten. Insbesondere Männer mit Symptomen durch eine Prostatavergrößerung können durch den Einsatz von Finasterid durch die Linderung der Beschwerden bei gleichzeitig geringerem Risiko einer späteren Krebsdiagnose profitieren (Liss und Thompson 2018).

Bicalutamid ist ein nichtsteroidales Antiandrogen und wirkt kompetitiv am AR. Es ist das meist verwendete Antiandrogen in der sekundären Hormonbehandlung des CRPC zusätzlich zu LHRH – Agonisten / Antagonisten (Qian et al. 2015; Nakabayashi et al. 2011). In RCT zeigt Bicalutamid (150 mg) ein geringeres Nebenwirkungsprofil in Bezug auf den Erhalt des sexuellen Interesses, der körperlichen Verfassung sowie der Knochenmineraldichte im Vergleich zur Kastration (Sieber et al. 2004; Iversen et al. 2000). Die häufigsten Nebenwirkungen unter Bicalutamid-Gabe sind Brustschmerzen und Gynäkomastie (Iversen et al. 2002). Sowohl bei lokalisierten also auch bei lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen verbessert Bicalutamid signifikant das progressionsfreie Überleben, jedoch nicht das Gesamtüberleben (McLeod et al. 2006; Iversen et al. 2002).

Eine vereinfachte Darstellung über die Wirkweise der Medikamente Finasterid und Bicalutamid im AR-Signalweg ist in Abbildung 3 dargestellt.

1.3 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind BPH-1 (*Benign Prostatic Hyperplasia-1*), rVCaP (*Reverte Vertebral Cancer of the Prostate*), VCaP (*Vertebral Cancer of the Prostate*), 22Rv1 und PC-3 (*Prostate Cancer - 3*). Jedes Zellsystem, von der benignen Prostatahyperplasie bis zu verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, stellt seine eigenen Charakteristiken bezüglich des Ansprechens auf Androgene und den AR-Status dar. Hierbei wird unterschieden, ob eine Zellreihe einen AR positiven oder negativen Status besitzt und ob eine Zellreihe zum Überleben auf Androgene angewiesen ist (androgenabhängig), unter Androgenen ein verstärktes Wachstum aufzeigt (androgenresponsiv) oder keine Reaktion auf Androgene bezüglich des Wachstums zeigt (androgenunabhängig). Eine Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien sowie ihre Charakteristika in Bezug auf den Androgen- und AR-Status sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

Tabelle 2: Die Zellreihen

Name	Herkunft	Androgen-/AR-Status	Referenz
BPH-1	Transurethrale Prostataresektion	AR - Kein onkogenes Potential	(Hayward et al. 1995)
rVCaP	Zellreihenderivat VCaP	AR + (weniger malignes Expressionsprofil als VCaP) Androgenabhängig	(Thelen et al. 2013)
VCaP	Knochenmetastase	AR + AR-Deregulation Androgenresponsiv	(Korenchuk et al. 2001)
22Rv1	Primäres Prostatakarzinom, aus Xenograft CWR22R gewonnen	AR + AR-Deregulation Androgenresponsiv	(Sramkoski et al. 1999; Attardi et al. 2004)
PC-3	Knochenmetastase	AR - Androgenunabhängig	(Kaighn et al. 1979)

1.3.1 BPH-1

Die Zellen der Zelllinie BPH-1 wurden durch eine transurethrale Prostataresektion eines 68-jährigen Patienten gewonnen und mithilfe des SV40 T-Antigens immortalisiert. Die Transplantation oder Injektion der Zellen in männliche Mauswirte zeigte kein onkogenes Potential. Ein Testosteronmetabolismus konnte nachgewiesen werden, allerdings ohne Effekt auf die Proliferationsrate der Zellen. Die Anwesenheit von DHT, Δ^4 -Androstenedion, Androstandion, Androsteron und 5α -Androstan- 3α , 17β -diol impliziert die Anwesenheit und die Aktivität der Enzyme 5α -Reduktase, 3α -/ und 17β -Hydroxysteroidoxidoreduktase. Immunhistochemisch konnte ein sehr schwaches Anfärben durch den Anti-AR-Antikörper PG-21 nachgewiesen werden, doch weder die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion noch Northern-Blot Verfahren konnten die Expression von humaner AR-mRNA (*Messenger-RNA*) bestätigen (Hayward et al. 1995).

1.3.2 VCaP

Die Zelllinie VCaP wurde 1997 bei einem 59-jährigen kaukasischen Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom aus einer Knochenmetastase der Wirbelsäule gewonnen.

Die Zelle ist androgensensibel mit einer hohen Expression an Wildtyp-AR und PSA (Korenchuk et al. 2001). Die Zellreihe VCaP enthält die TMPRSS2¹-ERG²-Fusion (Tomlins et al. 2005). TMPRSS2 ist ein prostataspezifisches, androgensensitives Transmembran-Serin-Protease-Gen. ERG, aus der Familie der ETS-Gene, ist ein onkogenetischer Transkriptionsfaktor, der durch die Fusion mit TMPRSS2 nun auch androgenreguliert agiert (Kumar-Sinha et al. 2008). So bedarf es nur einer geringen Mengen an Androgenen, wie beispielsweise unter Hormonsuppression in der Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms, um eine ETS-Überexpression zu bewirken (Perner et al. 2007). Obwohl in Ewing-Sarkomen und akuten myeloischen Leukämien ERG-Umlagerungen bereits bekannt sind, deuten aktuelle Studien daraufhin, dass die TMPRSS2-ERG-Fusion spezifisch nur im Prostatakarzinom zu finden ist (Scheble et al. 2010). Diese Entdeckungen sind essenziell für die Anwendung der ERG-Umlagerungen als klinische Marker des Prostatakarzinoms. Des Weiteren könnten sie für die Entwicklung zukünftiger zielgerichteter Therapien von großer Bedeutung sein (Scheble et al. 2010). Zusätzlich zum Wildtyp-AR exprimiert die Zellreihe VCaP weitere alternativ gespleißte AR-Isoformen mit dem Fehlen von Ligandenbindungsdomänen (LBD) als Antwort auf Kastration oder Androgendeprivation. So kann der AR konstitutiv aktiv und Ligandenunabhängig wirken (Watson et al. 2010; Dehm und Tindall 2011; Dehm et al. 2008). Zusammen mit dem Mechanismus der AR-Überexpression und einer veränderten intrakrinen Androgenbiosynthese kann die Zellreihe VCaP die AR-Signalisierung unter einer geringen Menge Androgenen aufrechterhalten und kastrationsresistent wachsen (Thelen et al. 2013).

1.3.3 rVCaP

Die Zelllinie rVCaP wurde aus der Zelllinie VCaP abgeleitet. Hierfür wurden VCaP Zellen über einen Zeitraum von drei Monaten mit 1 nM Testosteronzusatz kultiviert. Die VCaP Zellreihe wurde so zu einem androgenabhängigen Zellreihenderivat zurückgeführt.

Die mRNA-Expression des AR in seiner Gesamtlänge sowie der AR Spleißvariante 7 (ARV7), ein wichtiger Mechanismus des CRPC, ist in der rVCaP im Vergleich zur originalen VCaP deutlich herunterreguliert. Ebenso verhält sich die AR-Proteinexpression. Mit der Ausnahme der PSA-Expression, welche in der rVCaP Zellreihe im Vergleich zur VCaP Zellreihe heraufreguliert ist, zeigt die Zellreihe rVCaP ein insgesamt weniger malignes Expressionsprofil als die Zellreihe VCaP (Thelen et al. 2013).

¹ TMPRSS2 = Transmembrane Serinprotease 2

² ERG = ETS (erythroblastentransformationspezifisch) - ähnliche Gene

Versetzt man VCaP Zellen schlagartig mit einem Testosteron-Boost von 1 nMol/L reagieren die Zellen mit einer massiven PSA-Freisetzung in das Zellkulturmedium sowie einem massiven Zellergang. Die PSA-Freisetzung resultiert hierbei wahrscheinlich aus dem massiven Zellergang und nicht aus einer verstärkten PSA-Expression. In den untersuchten Expressionslevels verschiedener Gene zeigt sich eine Herunterregulation des AR und der ARV7 Spleißvariante. Im Gegensatz dazu reagieren rVCaP Zellen unter Androgenentzug mit einer geringeren Menge an PSA-Freisetzung und einer Hochregulation des AR und der ARV7 Spleißvariante. Die Tumorzellproliferation der VCaP sinkt sehr stark unter dem plötzlichen Testosteron-Boost, während hingegen ein Androgenentzug der rVCaP keinen signifikanten Effekt auf deren Zellproliferation zeigt.

Die Ergebnisse demonstrieren einen starken antiproliferativen Effekt auf die VCaP Zellen durch intermittierende Testosteron-Boosts und lassen somit auf eine Vulnerabilität der VCaP Zellen gegenüber intermittierenden Testosteron-Boosts auf einem physiologischen Niveau bzw. intermittierenden Androgenentzug schließen. Es wird diskutiert, dass eine unidirektionale hormonelle Therapie den Weg für eine ultimative Kastrationsresistenz ebnen könnte. Diese ergibt sich aus einer Vielzahl von molekularen Veränderungen, die alle die Unabhängigkeit zahlreicher Androgene für die AR-Aktivierung gemeinsam haben. Die in dieser Studie nachgewiesenen herunterregulierten AR-Status der rVCaP Zellen durch die Testosteron-Boosts sprechen für das Erreichen eines weniger malignen Krankheitsstatus der Zellen und einer daraus resultierenden möglichen Therapieoption des Prostatakarzinoms durch eine intermittierende Form des Androgenentzugs (Thelen et al. 2013).

1.3.4 22Rv1

Die Zelllinie 22Rv1 wurde aus dem Xenograft CWR22R etabliert. CWR22R stellt die hormonresistenten Rezidivtumore des ursprünglich androgenabhängigen Xenografts CWR22 dar. CWR22R ist somit ein Modell für das primäre Prostatakarzinom, welches nach anfänglicher kastrationsinduzierter Regression nach zwei bis drei Monaten androgenunabhängig wächst (Le et al. 2009; Sramkoski et al. 1999; Pretlow et al. 1993). 22Rv1 Zellen bilden ähnliche Tumore wie ihre Ursprungxenografts in Mäusen aus und sekretieren eine geringe Menge PSA. 22Rv1 Zellen zeigen ein Ansprechen auf Testosteron und DHT und werden somit als hormonresponsive Zelllinie betrachtet (Koukourakis et al. 2018; Attardi et al. 2004). Die Zellen besitzen einen AR (Sramkoski et al. 1999). Untersucht in Western Blot-Analysen scheint die Zelllinie 22RV1 keine normal großen AR-Proteine (110-112 kDa) zu enthalten, sondern entweder größere oder kleinere Proteine. Die größere Form des AR (114-118 kDa) beinhaltet eine Tandemduplikation des Exon 3 sowie die H874Y-Mutation, welche bereits

in den CWR22-Xenografts identifiziert und mit einer reduzierten Rezeptorspezifität assoziiert wurde. Daraus resultiert mutmaßlich die Empfindlichkeit der 22Rv1 Zellen sowohl auf Steroidhormon-Agonisten als auch auf Steroidhormon-Antagonisten (Attardi et al. 2004; van Bokhoven et al. 2003; Tepper et al. 2002). Das kleinere Protein (75-80 kDa) ist eine am COOH-terminalen Ende verkürzte AR-Spezies. Diese Mutation wird durch das Fehlen der LBD als AR Δ LBD bezeichnet und ist in seiner Form auch ohne Anwesenheit von Androgenen nukleär lokalisiert und in der Lage, an DNA zu binden (Tepper et al. 2002). Neben Mutationen zur Umgehung der androgenabhängigen Rezeptoraktivierung bedient sich die Zelllinie 22Rv1 auch der AR-Amplifikation: Die Level der AR-Expression und AR-Proteine sind in der Zelllinie im Vergleich zur Ursprungszelle CWR22 bis zu 16-fach erhöht (Sirotnak et al. 2002). Somit dient die Zellreihe 22Rv1 als Modell, welches sich zwischen den hormonsensitiven, AR-positiven Zellreihen und den androgenunabhängigen, AR-negativen Zellreihen postiert (Tepper et al. 2002).

1.3.5 PC-3

Die Zelllinie PC-3 wurde 1979 aus der Knochenmetastase eines 62-jährigen kaukasischen, an einem Prostatakarzinom erkrankten Patienten etabliert. Die Zelllinie ist sehr aggressiv und weist ein hohes metastatisches Potential auf. PC-3 Zellen haben einen AR-negativen Status, produzieren kein PSA und wachsen androgenunabhängig (Tai et al. 2011; van Bokhoven et al. 2003; Kaighn et al. 1979). Obwohl die Zellreihe keine Empfindlichkeit auf Androgene zeigt konnte nachgewiesen werden, dass PC-3 Zellen eine geringe Aktivität der Androgen-metabolisierenden Enzyme 5 α -Reduktase und 17 β -Hydroxysteroid-Reduktase aufweisen (Negri-Cesi et al. 1999). Es wurden neue Studien veröffentlicht, in welchen die Expression von geringen Mengen an AR-mRNA in PC-3 Zellen nachzuweisen ist. Mithilfe von Immunoblots können auch AR-Proteinexpressionen nachgewiesen werden. Diese AR-Proteinlevel scheinen durch DHT-Stimulation hochreguliert zu werden und vermehrt nukleär lokalisiert zu sein. Da allerdings keine steigenden Aktivitäten durch die DHT-Stimulation zu erreichen sind, wird die PC-3 Zelllinie nach wie vor als AR-Status negativ angesehen (Alimirah et al. 2006).

1.4 Versuchsaufbau

Thermoablative Verfahren wie die HIFU-Therapie bieten als Bestandteil der aktuellen Forschung in der fokalen Behandlung des Prostatakarzinoms eine attraktive Alternative zu standardisierten Verfahren wie Operation und Radiotherapie. Die mögliche Auswirkung üblicher Prostatakarzinom-Therapeutika auf diese neue Art der Therapie ist bis dato nicht umfassend geklärt und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden. Für die Versuche

werden Zelllinien ausgewählt, welche sich in ihrem AR-Status unterscheiden und lokale bis metastasierte Stadien des Prostatakarzinoms repräsentieren. Zunächst werden diese Zelllinien unterschiedlichen Temperaturen mithilfe eines Thermozyklers ausgesetzt. Im Anschluss wird die metabolische Aktivität via MTS³-Test gemessen. Im nächsten Schritt werden die Zellen 48 Stunden vor Versuchsbeginn mit den Medikamenten Finasterid (Sigma-Aldrich) oder Bicalutamid (Sigma-Aldrich) stimuliert. Finasterid wird als 5 α -Reduktase-Hemmer als mögliche Chemoprävention für das Prostatakarzinom diskutiert und ist mit einem vergleichsweise geringen Nebenwirkungsspektrum verknüpft. Bicalutamid ist eines der zentralen Elemente der klassischen ADT. Beide Medikamente greifen in den Androgen-/AR-Signalweg ein. Ziel der MTS-Tests der unbehandelten Zellreihen ist die Erstellung individueller Hitzeprofile und deren Vergleich untereinander. Zudem wird mithilfe der MTS-Tests analysiert, ob sich die Stoffwechselaktivität der Zellen durch die medikamentöse Vorbehandlung als Reaktion auf die Hitzeeinwirkung von den nicht medikamentös vorbehandelten Zellen unterscheidet. Wichtige Grenzwerte werden im Anschluss mittels FACS⁴-Analyse, einem durchflusszytometrischen Verfahren, erneut untersucht. Die Zellen werden hierbei mittels dem Protein Annexin V und dem Nukleinsäureinterkalator Pi (Propidiumiodid) gefärbt und nach vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen differenziert. Die FACS-Analyse ist als unabhängiger Versuch zu betrachten, da hier nicht die Stoffwechselaktivität der Zellen wie im MTS-Test, sondern die Vitalitäts-, Apoptose- und Nekroserate der Zellen mit und ohne medikamentöse Vorbehandlung ermittelt werden.

³ MTS = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium

⁴ FACS = Durchflusszytometrie

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller
8-Kanal Mehrkanalpipette Research® (30-300 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
BD FACSCanto™ II Flow Cytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Expirion™ Vortex Station II	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Infinite M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Liebherr Kühlschrank (-20°C), Modell GS 2302	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Liebherr Kühlschrank (4°C), Modell GS 2302	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Mikroskop Labovert, Modell Typ 090-122.012, ID Nummer 112157	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Pipetten Reference® (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sanyo CO ₂ -Inkubator, Modell MCO-17AI	Sanyo, Moriguchi, Osaka, Japan
Sterilbank LaminAir® HA2472 GS	Heraeus; Hanau, Deutschland
TC10™ Automated Cell Counter (automatischer Zellzähler)	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Vacumat 100 Suction Pump (Absaugpumpe)	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Wasserbad, Modell GFL Typ 1003	GFL, Grossburgwedel, Deutschland
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus; Hanau, Deutschland
Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS	Heraeus; Hanau, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Name	Hersteller
Testosteron (1 nMol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) Solution (1X) gibco®	Life Technologies, Kalifornien, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England
Bio Whittaker™ DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 0,0095 M (PO ₄) ohne Ca und Mg, Artikelnummer BE 17-512 F	BioResearch, Lonza, Basel, Schweiz
DMEM (Dulbecco's modified Eagle' Medium) 4.5 g/L Glukose, FBS (Sigma-Best Nr. F0804), Glutamin (Gibco REF: 25030-081), Natriumpyruvat (Gibco REF: 11360-039)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Trypan Blue Dye (0,40%)	Bio Rad, Hercules, CA, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Biosphere® Filterspitzen (0,1-10 µl; 2-100 µl)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Cellstar® 6-Loch-Platte	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® 96-Loch-Platte	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Zellkulturschale 60x15 mm	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Zellkulturflasche 50 ml	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one, Kremsmünster, Österreich
2-Kammer-Zählplatten zur Zellzahlmessung	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, USA
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Glaspasteurpipetten, Artikelnummer 7.691061	Th. Geyer Labsolute®, Renningen, Deutschland
optische/sichtdurchlässige Klebestreifen, iCycler iQ®	Bio Rad, Hercules, CA, USA
PCR 12er-SoftStrips (12-Gefäß-PCR-Streifen), 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen (200 µl; 1000 µl)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 10 ml	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Glasröhrchen, 5 ml, 75 x 12 mm	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

2.1.4 Zelllinien

Tabelle 6: Zelllinien

Zelllinie	Referenz	Medium
BPH-1	(Hayward et al. 1995)	DMEM
rVCaP	(Thelen et al. 2013)	DMEM + Testosteron (1 nMol)
VCaP	(Korenchuk et al. 2001)	DMEM
22Rv1	(Sramkoski et al. 1999)	DMEM
PC-3	(Kaighn et al. 1979)	DMEM

2.1.5 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Tabelle 7: Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Hersteller
BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, Madison, USA

2.1.6 Kleinmolekulare Inhibitoren

Tabelle 8: Kleinmolekulare Inhibitoren

Medikament	Zielstruktur	Hersteller	Lösungsmittel	Konzentrationen [µM]
Bicalutamid	Kompetitive Hemmung des AR	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	DMSO	0,1; 1; 5; 10
Finasterid	Inhibitor der 5AR	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	EtOH	0,1; 1; 5; 10

2.1.7 Software

Tabelle 9: Software

Software	Hersteller
DIVA (Software FACS-Gerät)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FlowJo Single Cell Analysis Software v10	FlowJo LLC, Ashland, OR, USA
Inkscape	
Microsoft Excel 2016	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft PowerPoint 2016	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word 2016	Microsoft, Redmond, Washington, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellhaltung und Zellkultur

Die Zellreihen BPH-1, VCaP, 22Rv1 und PC-3 wurden im Medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle' Medium, 4.5 g/L, FBS, Glutamin, Natriumpyruvat) kultiviert, die Zellreihe rVCaP wurde im Medium DMEM, versetzt mit 1 nMol Testosteron, gehalten. Alle Zellen wurden in 50 ml Zellkulturflaschen mit Filter im CO₂-Inkubator (Sanyo) bei 37°C mit 5% CO₂-Begasung angezüchtet. Die Zellen wurden alle zwei Tage unter dem Mikroskop morphologisch kontrolliert. Ein regelmäßiger Wechsel des Mediums wurde durchgeführt. Dies erfolgte durch vorsichtiges Absaugen des Mediums mit einer Glaspasteurpipette. Dabei wurde darauf geachtet, die angewachsenen Zellen auf dem Boden der Kulturflasche nicht zu manipulieren. Hiernach wurden 3 ml neues zellspezifisches Medium auf die Zellen gegeben. Bei einer Konfluenz von circa 80% wurden die Zellen passagiert, um ein Sistieren des Zellwachstums durch Kontakthemmung zu vermeiden. Hierfür wurde das Medium mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt. Anschließend wurden 2 ml Trypsin auf den Zellrasen pipettiert. Die Kulturflasche wurde kurz geschwenkt und in den Brutschrank zurückgestellt, um die Zellen abzulösen. Da jede Zellreihe unterschiedlich langer Inkubationszeiten (zwei bis zehn Minuten) bedarf, um sich vom Boden der Zellkulturflasche zu trennen, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mikroskopisch beurteilt. Zur Unterstützung wurde der Flaschenboden leicht gegen eine Auflage geklopft, so dass sich die noch adhären Zellen lösen konnten. Wenn die Zellen sich nun frei in der Trypsinsuspension bewegten, wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2 ml Medium mit 10% FBS versetzt, um die lytische Wirkung des Trypsins auf die Zellen zu kompensieren. Im Anschluss wurde das Gemisch bei 307 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Danach zeigte sich ein trübes Zellpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens sowie 4 ml Überstand aus Trypsin und Medium. Dieser wurde abgesaugt. Das Pellet wurde mit 6 ml Medium resuspendiert und einige Male auf- und abpipettiert, um eine Trennung und gleichmäßige Verteilung der Zellen im Medium zu erreichen. Die Zellen wurden danach auf zwei neue Kulturflaschen verteilt, so dass sich am Ende des Passagierens jeweils 3 ml frische Zellsuspension in jeder Flasche befand.

Sowohl der Wechsel des Mediums als auch das Passagieren der Zellen wurde unter einer Sterilbank mit Abzug durchgeführt, es wurden stets Einmalhandschuhe getragen. Somit wurde gewährleistet, dass die Zellen unter sterilen Bedingungen bearbeitet wurden und das Risiko einer Kontamination minimiert wurde.

2.2.2 Aussaat und Stimulation der Zellen

Die Stimulation der Zellreihen mit Bicalutamid (Sigma-Aldrich) und Finasterid (Sigma-Aldrich) fand in 6-Loch-Platten statt. Am ersten Tag erfolgte die Aussaat der Zellen. Da alle Zellen nach Aussaat bis zur Durchführung des Versuches sechs Tage lang in einer 6-Loch-Platte gehalten wurden, wurde für die Aussaat eine geringere Zellzahl gewählt als für den Versuch nötig war. Dies stellte ein weiteres gleichmäßiges Wachstum ohne Kontakthemmung innerhalb der 6-Loch-Platte sicher. Für den MTS-Test wurden pro Loch $1,5 - 4 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Für den Versuch wurde eine Zellzahl von $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml angestrebt. Für die Durchflusszytometrie wurden $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät. Für den Versuch wurden $1 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml angestrebt. Insgesamt wurden 2 ml Zellsuspension in jedes Loch pipettiert. Die Zellzahl wurde mittels dem Gerät TC10TM Automated Cell Counter (Bio Rad, Hercules) gemessen. Am darauffolgenden Tag wurden die Löcher unter dem Mikroskop kontrolliert, um ein gleichmäßiges Wachstum sicherzustellen und um eine Kontamination frühzeitig zu erkennen. Am dritten Tag nach Aussaat erfolgte die Stimulation mit der jeweils untersuchten Substanz. Bevor die Stimulation stattfand, wurden die 2 ml Medium abgesaugt und durch frische 2 ml spezifisches Zellmedium ersetzt. Das erste Loch der 6-Loch-Platte wurde für die unstimulierte Zellgruppe (Zellen mit Medium ohne weitere medikamentöse Behandlung) genutzt. Für den MTS-Test wurden die Zellen mit vier verschiedenen Konzentrationen der Medikamente Bicalutamid und Finasterid stimuliert. Zusätzlich wurde ein Loch der 6-Loch-Platte mit dem Lösungsmittel des jeweiligen Medikaments befüllt. Dies stellte sicher, dass die Ergebnisse nicht durch eine Reaktion mit dem Lösungsmittel beeinflusst wurden. Bei der Stimulation mit Finasterid kam hier Ethanol (EtOH) zum Einsatz, bei Bicalutamid Dimethylsulfoxid (DMSO). Als Volumen wurden $2 \mu\text{l}$ Lösungsmittel gewählt, da dies der höchsten Menge an Medikamentenzugabe entsprach. Für die Durchflusszytometrie wurde sich, nach Auswertung des MTS-Tests, auf eine der vier Konzentrationen fokussiert und auf die Lösungsmittelkontrolle verzichtet. Am Tag vier wurde die mikroskopische Kontrolle der Zellen wiederholt. Am Tag fünf fand der jeweilige Versuch statt. Jeder der einzelnen Schritte wurden zur selben Tageszeit durchgeführt, so dass die Zellreihen der Wirkung der Medikamente für genau 48 Stunden ausgesetzt waren. Die Stimulationsprotokolle des MTS-Tests sowie der FACS-Analyse werden nachfolgend in Tabelle 10 und 11 dargestellt.

Tabelle 10: Stimulationsprotokoll MTS-Test: Das erste Loch wurde für die unstimulierten Zellen genutzt. Dem zweiten Loch wurde das Lösungsmittel (EtOH/DMSO) zugefügt. Insgesamt wurden vier Konzentrationen des jeweiligen Medikaments ausgewählt. So wurde in das dritte Loch 0,2 µl / 1 mM Medikament pipettiert, in das vierte 2 µl / 1 mM, in das fünfte 1 µl / 10 mM und in das sechste 2 µl / 10 mM. Dies entsprach 0,1 µM, 1 µM, 5 µM und 10 µM des jeweiligen Medikaments.

	Loch 1: Unstimuliert	Loch 2: Lösungsmittel	Loch 3: 0,1 µM	Loch 4: 1 µM	Loch 5: 5 µM	Loch 6: 10 µM
Tag 1	Aussaat 2 ml Zellsuspension: $1,5 - 4 \times 10^5$ Zellen/ml					
Tag 2	Kontrolle unter Mikroskop					
Tag 3	/	Hinzufügen 2 µl Lösungsmittel (EtOH/DMSO)	Hinzufügen 0,2 µl / 1 mM Medikament	Hinzufügen 2 µl / 1 mM Medikament	Hinzufügen 1 µl / 10 mM Medikament	Hinzufügen 2 µl / 10 mM Medikament
Tag 4	Kontrolle unter Mikroskop					
Tag 5	Versuch					

Tabelle 11: Stimulationsprotokoll FACS-Analyse: Im ersten Loch wurden die unstimulierten Zellen gehalten, das zweite Loch wurde an Tag 3 mit 1 µl / 10 mM Medikament versehen. Dies entsprach einer Medikamentenkonzentration von 5 µM.

	Loch 1: Unstimuliert	Loch 2: 5 µM
Tag 1	Aussaat 2 ml Zellsuspension $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml	
Tag 2	Kontrolle unter Mikroskop	
Tag 3	/	Hinzufügen 1 µl / 10 mM Medikament
Tag 4	Kontrolle unter Mikroskop	
Tag 5	Versuch	

2.2.3 Hitzeinduktion als Simulation der HIFU-Therapie

Um die Hitzeauswirkung der HIFU-Therapie auf die Prostatakrebszellen zu simulieren, wurde ein PCR⁵-Thermozykler (Bio Rad, Hercules) verwendet. Zur Vorbereitung der Hitzeinduktion der Zellen für den MTS-Test ohne medikamentöse Stimulation wurden die Zellen aus den Kulturflaschen entnommen. Für die zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführten MTS-Tests und FACS-Analysen mit medikamentöser Vorbehandlung wurden die unstimulierten und die stimulierten Zellen aus den 6-Loch-Platten gelöst (siehe Tabelle 10 und 11). Alle Zellen wurden trypsinisiert, zentrifugiert und mit neuem Medium versehen. Im Anschluss fand erneut eine Zellzahlmessung statt. Für den MTS-Test wurden je nach Zellreihe zwischen 5×10^5 - 1×10^6 Zellen/ml verwendet, da sich die Teilungsrates und Teilungsgeschwindigkeit der Zelllinien sehr deutlich voneinander unterschied. Für die Durchflusszytometrie wurden 1×10^6 - 3×10^6 Zellen/ml verwendet, da hier höhere Zellzahlen zur Durchführung des Versuches nötig waren. Nach der Zellzählung wurden jeweils 33 μ l Zellsuspension in 12-Gefäß-PCR-Streifen mittels Mehrkanalpipette pipettiert. Als Rahmen wurden an der unteren Grenze 37°C und an der oberen Grenze 100°C bestimmt. Jede Runde hatte eine fünfsekündige Vorheizperiode bei 37°C, die Zellen wurden der Zieltemperatur für zehn Sekunden ausgesetzt, danach erfolgte die Abkühlung bis 37°C, welche wiederum für fünf Sekunden gehalten wurde. Die Temperatursteigerung und Temperatursenkung wurde mit einer Rampenrate von 3,5°C/s durchgeführt. Die 12-Gefäß-PCR-Streifen wurden mit optischen Klebestreifen verschlossen, um eine Verdunstung der Zellsuspension im Thermozykler zu verhindern.

Insgesamt wurden drei verschiedene Protokolle für die nachfolgenden Versuche verwendet, diese ergaben sich wie folgt:

2.2.3.1 Erhitzungsprotokoll – MTS-Test

Um sich einen generellen Überblick über die Reaktion der verschiedenen Zellreihen auf die Hitzeinduktion zu verschaffen, wurde zunächst der MTS-Test ohne medikamentöse Stimulation und über die gesamte Temperaturspannweite durchgeführt. Für jede Temperatur wurden Duplikate verwendet. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mitgeführt. Diese enthielt Zellen mit Medium und wurde keiner Hitze ausgesetzt, sondern im CO₂-Inkubator bei 37°C für die Zeit während der Erhitzung der übrigen Zellen aufbewahrt. Somit ergab sich für das erste Protokoll folgendes Schema (siehe Tabelle 12).

⁵ PCR = *Polymerase Chain Reaction* (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Tabelle 12: Erhitzungsprotokoll MTS-Test ohne medikamentöse Stimulation

37°C	38,4°C	41,4°C	45,8°C	50°C	51,3°C	53,9°C	57,8°C	62,6°C	65°C	66,4°C
69°C	72,7°C	77,6°C	80°C	81,4°C	84,1°C	87,9°C	92,7°C	96,7°C	99°C	100°C

Nachdem betrachtet wurde, wie sich die metabolische Aktivität der unstimulierten Zellen unter der HIFU-Simulation verhielt, wurde die Auswirkung der Hitzeinduktion auf die Prostatakrebszellreihen nun unter medikamentöser Vorbehandlung mit vier verschiedenen Konzentrationen untersucht. Begleitend wurden unstimulierte Zellen und eine Lösungsmittelkontrolle getestet (siehe Kapitel 2.2.2, Tabelle 10). Hierfür wurden die 22 Temperaturen aus Tabelle 12 auf acht Temperaturen dezimiert, so dass nur noch die relevanten Temperaturpunkte getestet wurden. Diese sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Erhitzungsprotokoll MTS-Test mit medikamentöser Stimulation

37°C	51,3°C	53,9°C	57,8°C	62,6°C	65°C	69°C	92,7°C
------	--------	--------	--------	--------	------	------	--------

Für den MTS-Test mit Medikamentenstimulation wurden analog zum MTS-Test ohne Medikamentenstimulation Duplikate verwendet. Zudem wurde für jede spezifische Untergruppe, also für die unstimulierten Zellen, für die Lösungsmittelkontrolle und für die vier stimulierten Zellgruppen eine Kontrolle mitgeführt. Diese wurden wiederum keiner Hitze ausgesetzt, sondern im CO₂-Inkubator bei 37°C für die Zeit während der Erhitzung der übrigen Zellen aufbewahrt.

2.2.3.2 Erhitzungsprotokoll – FACS-Analyse

Zur Verifikation der Ergebnisse der MTS-Tests wurde die FACS-Analyse verwendet. Hierfür wurde nun, basierend auf den Ergebnissen der MTS-Tests, für jede einzelne Zellreihe mit und ohne medikamentöse Stimulation die Anzahl der Temperaturpunkte weiter reduziert. Diese entsprachen in jeder Zellreihe einer Anfangstemperatur von 37°C und einer Endtemperatur von 92,7°C. Des Weiteren wurde sich für die Temperatur entschieden, bei welcher die Stoffwechselaktivität in den MTS-Tests sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten Zellen < 30% lag sowie eine Temperaturabstufung höher, sodass sich das in Tabelle 14 abgebildete Protokoll ergab. Anders als beim MTS-Test wurden hier pro gewählte Temperatur Quadruplikate verwendet.

Tabelle 14: Erhitzungsprotokoll FACS-Analyse

Zellreihe	Temperatur 1	Temperatur 2	Temperatur 3	Temperatur 4
BPH-1	37°C	57,8°C	62,6°C	92,7°C
rVCaP				
VCaP				
22Rv1				
PC-3	37°C	62,6°C	65°C	92,7°C

2.2.4 Proliferationstest

2.2.4.1 Messprinzip MTS-Test

Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Proliferationstest, der häufig eingesetzt wird, um indirekt die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen in einer Zellpopulation zu bestimmen. Der gelbe MTT-Farbstoff ist ein Tetrazoliumsalz mit der chemischen Summenformel 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid. Er wird in stoffwechselaktiven Zellen zu dem blau-violetten Farbstoff Formazan reduziert und spiegelt so über die Glykolyserate proportional die metabolische Aktivität und damit indirekt die Viabilität der Zellpopulation wieder (Mosmann 1983). In den hier vorliegenden Versuchen wurde ein modifizierter Test, der MTS-Test, angewandt. Der „CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ (Promega, Madison, USA) ist zusammengesetzt aus dem MTS-Farbstoff 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium und Phenazin Ethosulfat (PES). Der Vorteil dieser Methode ist, dass das durch Dehydrogenasen über Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) reduzierte Endprodukt Formazan im Medium löslich ist. Somit entfallen aufwendige Arbeitsschritte wie Lösungs- & Extraktionsprozesse, die bei der Testung mit MTT angewandt werden müssten (Buttke et al. 1993). Das gebrauchsfertige, steril gefilterte Reagenz kann folglich direkt in die 96-Loch-Platte addiert werden und nach einer Inkubationszeit von ein bis vier Stunden bei einer Wellenlänge von 490 nm in einem Mikroplattenleser analysiert werden. Die quantitative Menge an umgesetzten Formazan entspricht hierbei direkt proportional der Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen, da apoptotische und nekrotische Zellen nicht in der Lage sind, das Tetrazoliumsalz zu reduzieren.

2.2.4.2 Messung

Nachdem den Zellen als Simulation einer HIFU-Therapie im Thermozykler die Wärme zugeführt wurde (siehe Kapitel 2.2.3), wurden die Zellen für den MTS-Test präpariert. Ebenso wurden die Kontrollen, die nicht im Thermozykler erhitzt wurden, sondern im Inkubator bei 37°C aufbewahrt wurden, für die weitere Messung vorbereitet. Hierzu wurden jeweils 77 µl zellspezifisches Medium den 33 µl Zellsuspension pro Loch mittels Mehrkanalpipette hinzugefügt. Das Gemisch wurde vorsichtig 3 x auf- und abpipettiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl in eine 96-Loch-Platte überführt. Für alle MTS-Tests wurden zwei Leerproben mit 100 µl Medium mitgeführt, welche bei der Auswertung von den Ergebnissen der Zellproben subtrahiert wurde. Dies stellte sicher, dass keine Reduktion von MTS zu Formazan durch das Medium selbst herbeigeführt wurde. Das „CellTiter 96® AQueous One Solution“ Reagenz wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen aliquotiert und bei - 20°C abgeschirmt von Licht gelagert. Für jeden Versuch wurden 1,5 ml MTS-Lösung 90 Minuten vor Benutzung bei Raumtemperatur erwärmt. War dies sichergestellt, wurden 20 µl MTS-Farbstoff in jeweils eine Zellsuspension-enthaltende Vertiefung der 96-Loch-Platte pipettiert. Die gesamte Platte wurde für vier Stunden bei 37°C im CO₂-Inkubator aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe mithilfe des Infinite M200 PRO Readers (Tecan, Mänedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 490 nm ausgelesen.

2.2.4.3 Statistische Auswertung

Für jede Zellreihe wurden drei Versuche durchgeführt und im Anschluss der Mittelwert aus den Daten berechnet. Die Daten wurden im Microsoft Excel Programm in Liniendiagrammen mit Standardfehlern abgebildet. Auf der x-Achse wurde die Temperatur aufgezeichnet, auf der y-Achse die Stoffwechselaktivität der Zellen, angegeben in der relativen Häufigkeit. Alle Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle der Zellreihe innerhalb eines Versuches bezogen, welche nicht erhitzt, sondern bei 37°C im Inkubator gelagert wurde. Die Kontrolle enthielt für die Messung der Stoffwechselaktivität der unstimulierten Zellen nur Zellen mit Medium, für die Messung der Stoffwechselaktivität der stimulierten Zellen das entsprechende Stimulans. Der Kontrollwert wurde als 100%ige Stoffwechselaktivität normiert. Die Kontrolle sollte dazu dienen, einen eventuellen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der Zellen allein durch die Erhitzung im Thermozykler aufzuzeigen. So konnte für jede Zellreihe ein individuelles Hitzeprofil generiert werden.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Eine geeignete Methode zur Differenzierung verschiedener Zellpopulationen einer Zellsuspension ist die Durchflusszytometrie. Hierdurch können einzelne Zellen mit einer hohen Durchsatzrate simultan nach verschiedenen Kriterien sortiert und nach Größe, Form und Eigenschaften quantifiziert werden (Hulett et al. 1969). Das Messprinzip der Durchflusszytometrie beruht auf einem Laserstrahl, durch den die Zellen einzeln geschleust werden. Wenn der Laserstrahl auf eine Zelle trifft, werden verschiedene Streulichtsignale ausgesendet, welche jeweils charakteristisch für diese eine Zelle sind. Jene Signale können daraufhin durch Detektoren vermessen und durch Analyseprogramme ausgewertet werden.

2.2.5.1 Messprinzip FACS

Das Durchflusszytometer besteht aus mehreren Teilen:

- Fluidsystem (Probenzufuhrstation und Messküvette)
- Laser
- optisches System mit Prismen und Linsen
- Spiegel und Filter für verschiedene Wellenlängen
- Detektoren (Photodiode und Photomultiplier)
- Datenweiterleitung aus Glasfaserkabel
- Verarbeitungselektronik

Eine vereinfachte Darstellung der Funktionsweise des Durchflusszytometers ist in Abbildung 4 skizziert.

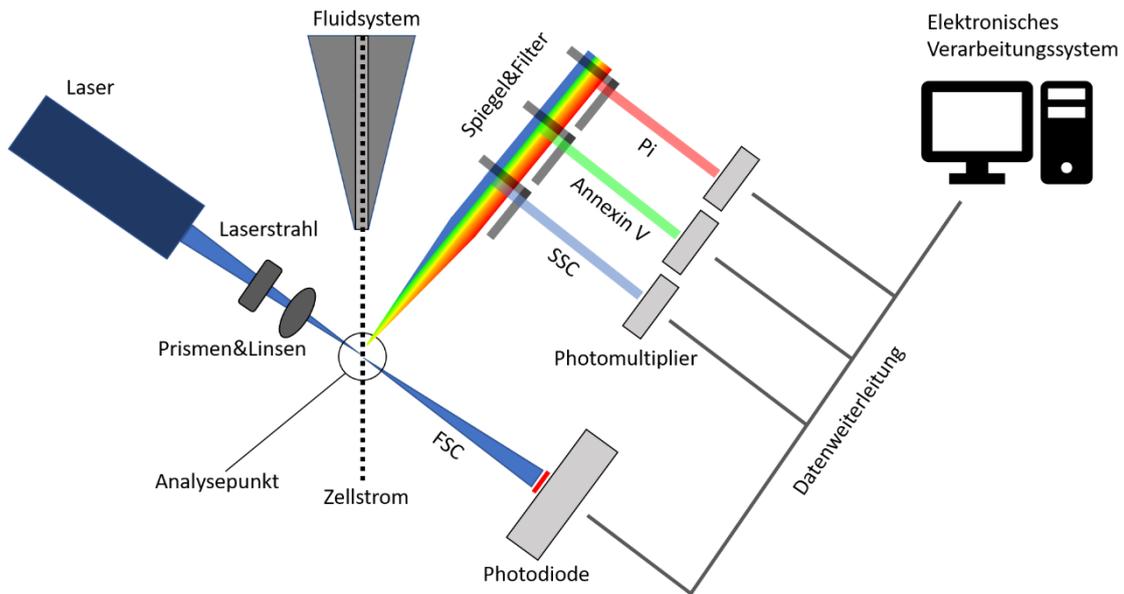


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers. Die Zellen treffen im Analysepunkt auf den Laserstrahl und werden über die Streulichteigenschaften in ein Vorwärtsstreulicht (engl. *FSC = Forward Scatter*) und ein Seitwärtsstreulicht (engl. *SSC = Side Scatter*) charakterisiert. Eine weitere Quantifizierung der Population kann über die Messung von Fluoreszenzen erfolgen.

Zunächst wird die Zellsuspension durch die Probenzufuhrstation in die Messküvette geleitet. Das Fluidsystem folgt dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung: Die Zellsuspension wird von einem Hüllstrom umspült, welcher Druck auf die Zellen ausübt und diese so innerhalb der Küvette in Richtung des Laserstrahls lenkt. Dieser Effekt wird verstärkt durch die Verkleinerung des Querschnitts derselbigen Küvette. Dies führt dazu, dass sich sowohl Zellsuspension also auch Hüllstrom beschleunigen und die Zellen untereinander an Abstand gewinnen. Das Ziel des Fluidsystems ist es also, die Zellen in Reihe zu setzen, damit diese möglichst einzeln den Laserstrahl passieren und folgend individuell analysiert werden können.

Im BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) wird ein blauer Laser genutzt. Dieser emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm und wird zunächst durch Prismen und Linsen geführt, um eine optimale Zentralisierung zu erreichen. Trifft nun eine Zelle im Analysepunkt den Laserstrahl, macht sich die Durchflusszytometrie das daraus entstehende Streulicht zu Nutze.

Das *FSC* wird linear zum Einfall des Laserstrahls gemessen. Trifft der Laser auf die Zelle, werden die Wellen an der Oberfläche der Zelle abgelenkt und es entsteht eine Lichtbeugung der Strahlen. Umso größer der Durchmesser der Zelle ist, desto stärker wird der Laserstrahl aufgefächert. Folglich wird die Fläche der Strahlen und somit die Lichtintensität

größer, welche der Detektor erfasst. Der Detektor, eine Photodiode, ist nun in der Lage, das einfallende Licht in elektrische Spannung umzuwandeln. Das Verarbeitungsprogramm stellt die Werte graphisch dar. Das *FSC* gibt dementsprechend Auskunft über die Oberfläche der Zelle, so also über die Zellgröße, welche proportional zur Intensität des erfassten Lichtes ist und wird in Abbildung 5 vereinfacht dargestellt.

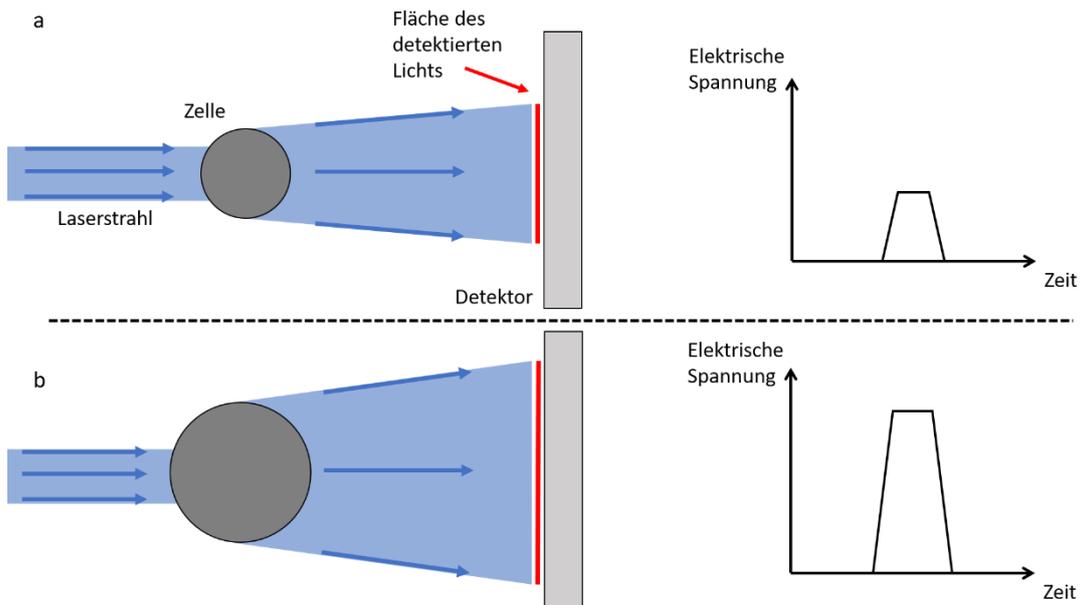


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung *FSC*. Verglichen werden zwei Zellen mit unterschiedlichen Durchmessern. An der kleineren Zelle im Bildabschnitt a findet weniger Lichtbeugung der Laserstrahlen im Vergleich zur größeren Zelle im Bildabschnitt b statt. Folglich ist also auch die Fläche des Lichtes, welche auf den Detektor trifft, und dementsprechend das umgewandelte elektrische Signal im Zeit-/Spannungsdiagramm in Bildabschnitt a geringer als in Bildabschnitt b.

Das *SSC* entsteht hingegen in einem 90° Winkel zum ursprünglichen Laserstrahl. Die im Analysepunkt entstehende Lichtbrechung und Reflexion ist direkt abhängig von der Granularität der Zelle und dient somit als Maß für ihre intrastrukturelle Komplexität. Zur Detektion kommen hier Photomultiplier zum Einsatz, welche in der Lage sind, sehr schwache Lichtsignale bis hin zu einzelnen Photonen zu erfassen. Diese werden wiederum in ein Spannungs-/Zeit-Diagramm überführt und mit dem Analyseprogramm erfasst. Eine vereinfachte Darstellung des *SSC* findet sich in Abbildung 6.

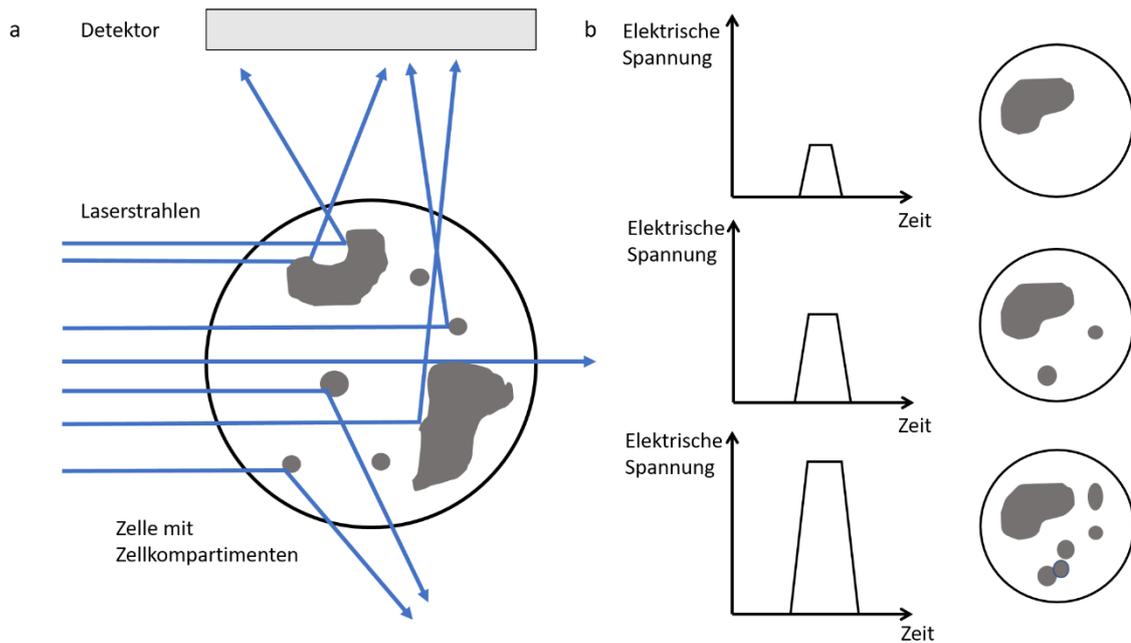


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung SCC. Bildabschnitt a: Die Laserstrahlen treffen auf die Zelle und werden an den einzelnen Bestandteilen im Inneren der Zelle gebrochen. Der Detektor befindet sich im 90° Winkel zum einfallenden Licht. Im Bildabschnitt b sind verschiedene Diagramme aufgezeigt: Desto komplexer die Struktur der Zelle, umso mehr Lichtstrahlen werden gebrochen und umso höher ist das umgesetzte Signal der elektrischen Spannung.

Um mit diesen Parametern nun die ganzheitliche Struktur einer Zelle zu registrieren, werden *FSC* und *SSC*, wie in Abbildung 7 gezeigt, gegeneinander aufgetragen. Häufig wird die Durchflusszytometrie dazu verwendet, verschiedene Zelltypen zu quantifizieren. Da in den Experimenten dieser Dissertation jeweils nur eine Zellart pro Experiment analysiert wurde, diente das *FSC* und *SSC* dazu, die Zellsuspension hinsichtlich ihrer Konformität zu ordnen. So konnten Zelldetritus und verformte Zellen für die weitere Charakterisierung aus der Population ausgeschlossen werden.

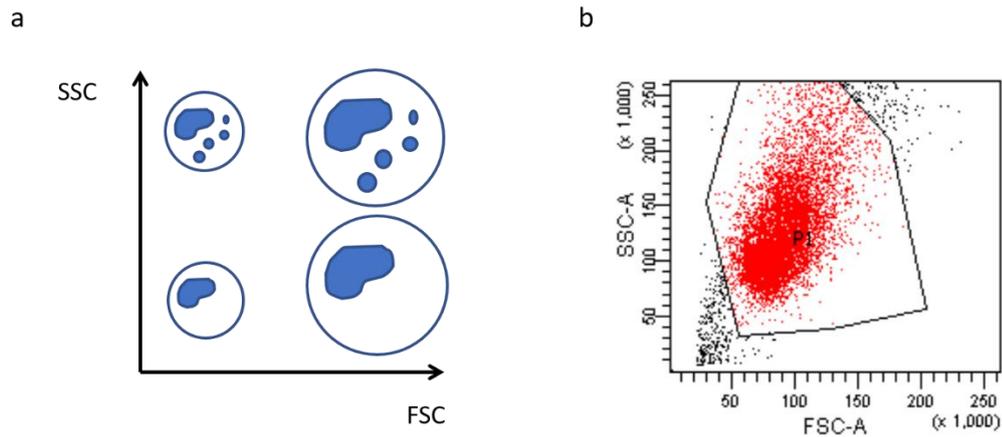


Abbildung 7: FSC-/SSC-Diagramm. In Bildabschnitt a ist schematisch ein FSC-/SSC-Diagramm aufgezogen. Die x-Achse beschreibt die Größe der Zelle, die y-Achse die intrastrukturelle Komplexität. In Bildabschnitt b ist ein FSC-/SSC-Diagramm als Beispiel der FACS-Analyse dieser Arbeit anhand der Zellreihe PC-3 aufgezeigt. Die rote Population in der Mitte des Diagrammes entspricht intakten Prostatadrüsenzellen. Diese ist für die weitere Analyse gegatet worden.

Die Durchflusszytometrie ist neben der Messung des Streulichts zusätzlich in der Lage, weitere Merkmale einer Zelle mithilfe fluoreszierender Antikörper zu quantifizieren. Diese Antikörper sind mit Fluorchromen konjugiert, welche ein definiertes Absorptions- und Emissionsmaximum besitzen. Die verschiedenen Wellenlängen der Emissionsspektren ermöglichen hierbei durch separate Detektoren den Einsatz unterschiedlicher Fluorochrome in einem Versuch. Passiert nun eine Zelle den Laserstrahl, absorbiert das Fluorchrom die Lichtenergie und es kommt zur Fluoreszenz. Elektronen werden angestoßen, Schwingungsenergie und Wärme wird freigesetzt. Es kommt zur Aussendung von energieärmerem Licht mit einer größeren Wellenlänge als zuvor, wobei sich die Emission dabei proportional zur Menge der markierten Epitope verhält – je mehr gebundene Antikörper desto größer die Fluoreszenzintensität. Die Emission wird im FACS-Gerät wiederum von den Detektoren des optischen Systems aufgenommen, in elektrische Impulse umgewandelt und an das Computersystem weitervermittelt.

2.2.5.2 Annexin V/Propidiumiodid Färbung

Die Durchflusszytometrie wird schon seit langer Zeit in der Forschung eingesetzt, um apoptotischen Zelltod zu identifizieren und zu klassifizieren (Vermes et al. 2000). Eine der zur Verfügung stehenden Methoden ist der Einsatz der beschriebenen fluoreszenzmarkierten Antikörper. Die Annexin V/Propidiumiodid Färbung dient dazu, apoptotische und nekrotische Zellen von lebenden Zellen zu differenzieren und die Population so nach ihrer Vi-

talität zu quantifizieren (Vermees et al. 1995). Dies gelingt durch die unterschiedliche Plasmamembranintegrität und -permeabilität während der verschiedenen Vorgänge. Der Farbstoff Annexin V/FITC⁶ ist ein Protein, das calciumabhängig und hochaffin an Phosphatidylserin bindet. Das Molekül Phosphatidylserin, in vitalen Zellen an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert, unterliegt während der Apoptose einem Flip-Flop Effekt, kehrt sich auf die Außenseite der Zellmembran und ist nun für die Umwelt exponiert. Dort dient es *in vivo* als Erkennungssignal für die Phagozytose der Zelle durch nicht-inflammatorische Makrophagen (Bratton et al. 1997). *In vitro* wird Phosphatidylserin von Annexin V mit hoher Affinität gebunden und dient somit als Marker für den programmierten Zelltod. Dieses Prinzip gilt für die frühe Phase der Apoptose. In der späten Phase der Apoptose und beim nekrotischen Zelltod kann die Plasmamembran ihre Stabilität nicht mehr aufrechterhalten und wird durchlässig. Diese Permeabilität nutzt der Farbstoff Propidiumiodid (Pi), um in die Zelle einzudringen und sich in seiner Eigenschaft als Nukleinsäureinterkalator an die DNA zu legen. Eine schematische Darstellung der Annexin V/Pi Färbung findet sich in Abbildung 8. Somit befinden sich Zellen, welche sich FITC Annexin V+/Pi- anfärben, in Apoptose, während FITC Annexin V+/Pi+ Zellen entweder im Endstadium der Apoptose sind, im Nekrosevorgang oder bereits tot. Zellen, welche mit keinem der beiden Farbstoffe interagieren, sind vital (Vermees et al. 1995).

⁶ Fluorescein isothiocyanate

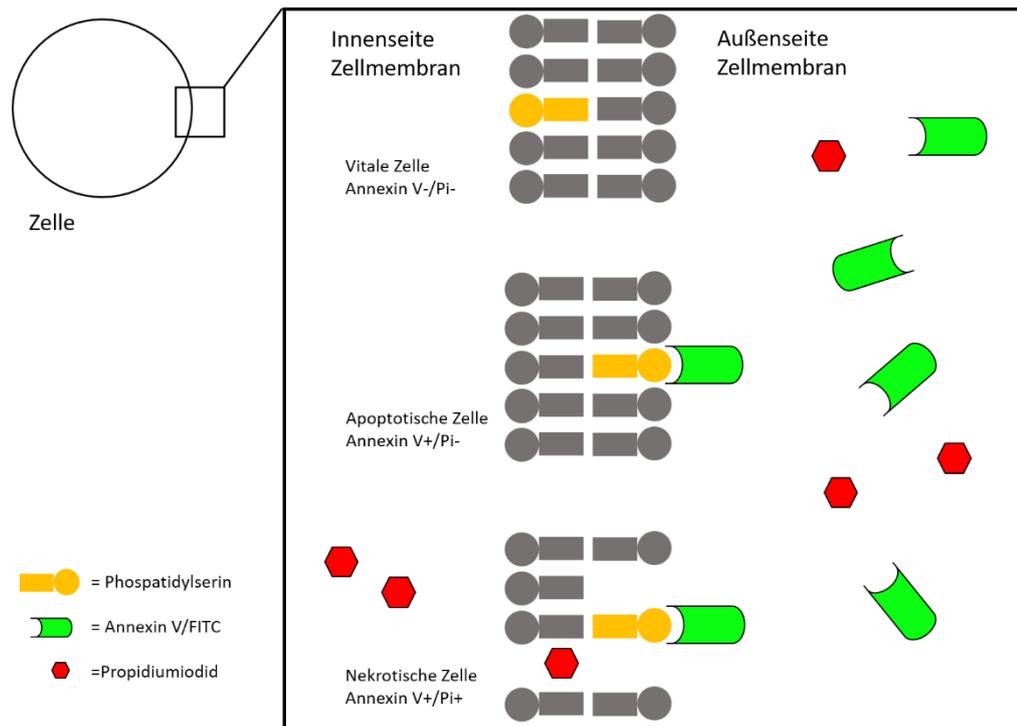


Abbildung 8: Schematische Darstellung Annexin V/Pi Färbung. Gezeigt wird ein vergrößerter Ausschnitt der Doppellipidmembran einer Zelle in drei verschiedenen Zuständen. Oben im Bild ist die Zellmembran intakt, die Zelle wird nicht mit Annexin V und Pi angefärbt. In der Mitte ist der apoptotische Zustand dargestellt, Phosphatidylserin klappt auf die Membranaußenseite und ist für Annexin V zugänglich. Die Zelle ist Annexin V+/Pi-. Unten im Bild ist die Zellmembran der Nekrose zu sehen. Die Zellmembran wird permeabel, Pi kann ins Innere der Zelle eindringen. Die Zelle ist Annexin V+/Pi+.

Die Fluoreszenzintensitäten der beiden Farbstoffe können nun im FACS-Gerät durch Detektoren vermessen werden. Die elektronische Datenverarbeitung überführt Annexin V/FITC und Pi in ein x-/y-Diagramm. Ein Beispiel eines Annexin V/FITC-/Pi-Diagramms ist in Abbildung 9 dargestellt.

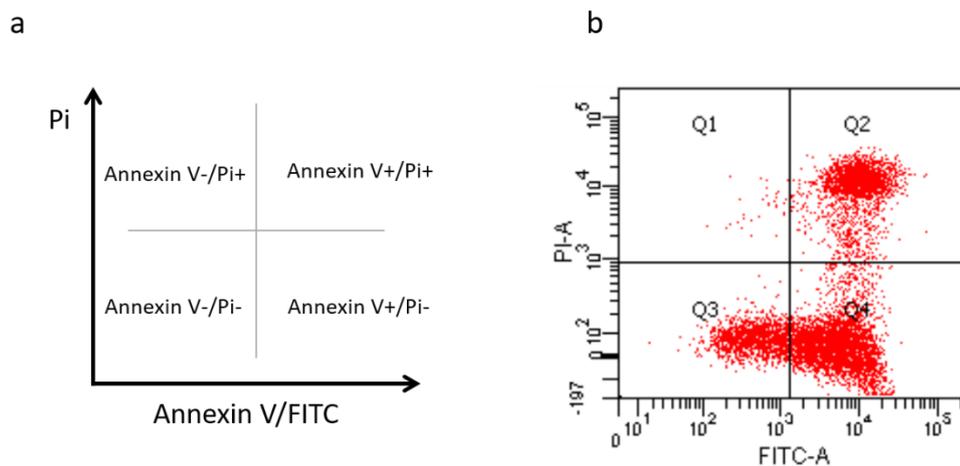


Abbildung 9: Annexin V/FITC/Pi Diagramm. In Bildabschnitt a ist schematisch ein Annexin V/FITC/Pi Diagramm gezeichnet. Auf der x-Achse ist Annexin V/FITC aufgetragen, auf der y-Achse Pi. Die vier Quadranten innerhalb des Diagrammes spiegeln die verschiedenen Färbungszustände wider. Annexin V-/Pi-, Annexin V+/Pi-, Annexin V-/Pi+ und Annexin V+/Pi+. In Bildabschnitt b ist ein Beispiel für das bereits vom Analyseprogramm ausgewerteten Annexin V/FITC/Pi Diagramm anhand der Zellreihe PC-3 dargestellt. Die rote Wolke im linken unteren Quadranten zeigt nun also die Population vitaler Zellen, rechts unten ist der Anteil apoptotischer Zellen und rechts oben der Anteil nekrotischer Zellen quantifiziert.

2.2.5.3 Messung

Nachdem die Zellen zuerst mit Medikamenten vorbehandelt (siehe Kapitel 2.2.2) und daraufhin im Thermozykler mit verschiedenen Temperaturen erhitzt wurden (siehe Kapitel 2.2.3.2), wurden sie für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Zunächst wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung gereinigt, um möglichst viel Medium aus der Suspension zu entfernen. Hierfür wurden pro Waschgang 100 μ l der phosphatgepufferten Salzlösung auf 33 μ l Zelllösung, welche sich zu diesem Zeitpunkt noch in den 12-Gefäß-PCR-Streifen befanden, mittels Mehrkanalpipette suspendiert und die Zellen bei 307 x g fünf Minuten zentrifugiert. Waren daraufhin makroskopisch Zellpellets am Boden der Gefäße zu erkennen, wurden die Überstände sorgsam mithilfe der Mehrkanalpipette abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Nun wurde das Zellpellet mit 100 μ l Binding Buffer (BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), welcher zuvor im Verhältnis 1:9 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde, aufgefüllt und vorsichtig dreimal auf- und abpipettiert, um Zellen und Binding Buffer zu vermischen. Die Lösung wurde jeweils von einem Gefäß des 12-Gefäß-PCR-Streifens in ein 5 ml FACS-Röhrchen transferiert. Da für jede Temperatur vier Gefäße des 12-Gefäß-PCR-Streifens angesetzt wurden, ergab sich für die Addition der Reagenzien Annexin V/FITC und Pi in die Röhrchen folgendes Prinzip (Tabelle 15):

Tabelle 15: Pipettierschema FACS: Annexin V/Pi Färbung

Röhrchen 1:	Röhrchen 2:	Röhrchen 3:	Röhrchen 4:
/	5 µl FITC / Annexin V	5 µl Pi	5 µl FITC / Annexin V + 5 µl Pi

Röhrchen 1 enthält die Kontrolle, in Röhrchen 2 wird 5 µl FITC Annexin V pipettiert, in Röhrchen 3 5 µl Pi und in Röhrchen 4 eine Kombination beider Farbstoffe. Jedes Röhrchen wurde nach Zugabe der Farbstoffe gevortext und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden nochmals 400 µl Bindung Buffer in jedes der einzelnen FACS-Röhrchen pipettiert und dieses daraufhin kurz gevortext. Alle Proben wurden innerhalb einer Stunde im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.5.4 Statistische Auswertung

Für jede Zellreihe wurden drei Versuche durchgeführt. Die Daten der Durchflusszytometrie wurden zunächst mithilfe der FlowJo Single Cell Analysis Software v10 analysiert. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der ungefärbten sowie der mit Antikörpern angefärbten Zellen ohne und mit medikamentöser Vorbehandlung ermittelt. Die Daten wurden im Anschluss in Microsoft Excel 2016 exportiert. Dort wurden die Mittelwerte aus den jeweils drei Versuchen sowie die jeweiligen Standardfehler berechnet. Im Anschluss wurden die Daten in Balkendiagramme umgewandelt. In einem Balken wurde der prozentuale Anteil der ungefärbten, der Annexin V+ sowie der Annexin V+/Pi+ Zellen dargestellt. In einem Diagramm wurden je vier Balken entsprechend den vier untersuchten Temperaturen zusammengefasst. Die Darstellung der Pi+ Zellen wurde bewusst nicht mit in die Balkendiagramm einbezogen, da die Werte der Pi+ Zellen in keinem der Versuche einen prozentualen Anteil von > 3% erreichten. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden ebenfalls die Standardfehler in den Balkendiagrammen nicht mit eingezeichnet. Alle Standardfehler lagen < 0,09 mit Ausnahme eines Datensatzes (PC-3 + Bicalutamid bei 57,8°C), hier betrug der Standardfehler einmalig 0,14. Die Mittelwerte und Standardfehler wurden zur Einsicht in einer separaten Tabelle aufgelistet und finden sich im Anhang dieser Dissertation.

3 Ergebnisse

Die zentrale Fragestellung der Arbeit lag darin, fokale thermoablative Therapien wie die HIFU-Therapie des Prostatakarzinoms *in vitro* zu simulieren. Dabei wurde analysiert, ob eine medikamentöse Vorbehandlung der Zellen mit Finasterid oder Bicalutamid einen Einfluss auf deren Stoffwechselaktivität und deren Vitalität unter Hitzeeinwirkung zeigt.

3.1 MTS-Test ohne medikamentöse Vorbehandlung

Als ersten Schritt des Versuches wurden die Reaktionen der fünf Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 auf die Einwirkung von Hitze mittels MTS-Test untersucht. Ziel war es, durch eine engmaschige Temperaturabstufung zwischen 37°C und 100°C einen Überblick über die Auswirkung der Hitze auf die Stoffwechselaktivität einer jeden Zellreihe zu gewinnen (siehe Tabelle 12, Kapitel 2.2.3.1). Alle Werte wurden auf einen Kontrollwert bezogen. Die Zellen der Kontrolle wurden nicht erhitzt, sondern im Inkubator bei 37°C gelagert. Der Kontrollwert wurde mit einer Stoffwechselaktivität von 1 gleichgesetzt. Hierdurch sollte herausgearbeitet werden, ob eine Behandlung im Thermozykler per se die Stoffwechselaktivität der Zellen beeinflusst. Die blauen Graphen entsprechen der Stoffwechselaktivität der im Thermozykler behandelten Zellen zwischen 37-100°C. Der orange Punkt entspricht der Stoffwechselaktivität der unerhitzten Kontrolle bei 37°C und liegt somit auf der y-Achse bei 1.

3.1.1 MTS-Test: BPH-1

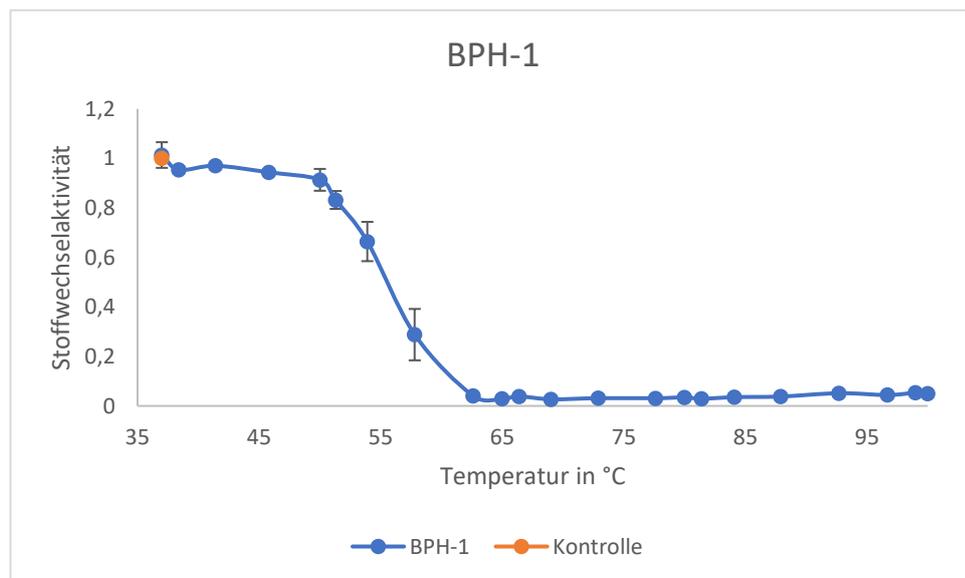


Abbildung 10: MTS-Test BPH-1 unstimuliert

In Abbildung 10 ist die Auswertung der MTS-Tests der Zellreihe BPH-1 dargestellt. Bezogen auf den Kontrollwert – also denjenigen BPH-1 Zellen, die bei 37°C im Inkubator aufbewahrt wurden und nicht im Thermozykler erhitzt wurden – zeigt sich bei der Erhitzung der Zellen mit der niedrigsten Temperatur von 37°C eine nahezu gleiche Stoffwechselaktivität. Die Kurve beschreibt bei Erhöhung der Temperatur von 37°C auf 50°C zunächst nur einen leichten Abfall der Stoffwechselaktivität auf 91%. Zwischen 50°C und 62,6°C zeigt sich dann ein deutlicher Verlust der metabolischen Aktivität der Zellen. Hierbei ereignet sich zwischen 53,9°C und 57,8°C der größte Abfall von 66% auf 29%. Dies entspricht einer Reduktion der Stoffwechselaktivität von 37%. Bei diesen beiden Temperaturen ist der Standardfehler im Liniendiagramm am größten mit Werten von 0,08 bei 53,9°C und 0,1 bei 57,8°C. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur auf 62,6°C nimmt die Stoffwechselaktivität der BPH-1 Zellen erneut um 25% ab und beträgt dann 4%. Ab dieser Temperatur bleibt die Aktivität konstant unter 6% bis zur Endtemperatur von 100°C.

3.1.2 MTS-Test: rVCaP

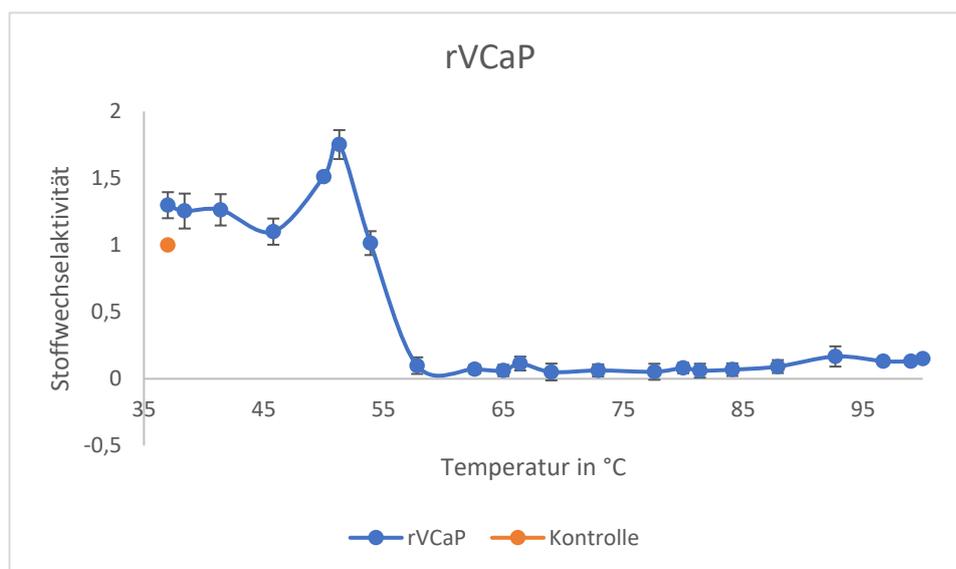


Abbildung 11: MTS-Test rVCaP unstimuliert

In Abbildung 11 ist die Auswertung der Daten der MTS-Tests der Zellreihe rVCaP ohne medikamentöse Vorbehandlung der Zellen illustriert. Bezogen auf die unerhitzte Kontrollgruppe zeigen die Zellen bei einer Temperatur von 37°C eine Stoffwechselaktivität von 130%. Zwischen 37°C und 45,8°C ereignet sich ein leichter Abfall der Stoffwechselaktivität der Zellen bis zu einer Aktivität von 110%. Bei weiterer Hitzezufuhr beschreibt die Kurve einen steilen Anstieg. Dies entspricht einer deutlichen Zunahme der Stoffwechselaktivität der Zellen. Bei einer Temperatur von 50°C entspricht dies einer Aktivität von 151%, das Maximum der Stoffwechselaktivität wird bei 51,3°C (175%) erreicht. Zwischen 51,3°C und

57,8°C findet dann ein rapider Abfall der Stoffwechselaktivität auf 10% statt. Bei weiterer Hitzezufuhr auf 62,6°C sinkt auch die Stoffwechselaktivität weiter ab bis auf Werte von 7%. Bis auf einen kleinen Anstieg auf 11% bei 66,4°C hält sich die Aktivität bis zu 87,9°C unter eine Grenze von 10%. Zwischen 87,9°C und 100°C zeigt sich nochmals ein leichter Anstieg des Graphen, sodass die Stoffwechselaktivität bei der finalen Temperatur von 100°C 15% entspricht. Die Standardfehler sind in der Temperaturspanne von 37°C bis 53,9°C am größten und messen Werte zwischen 0,06 und 0,13.

3.1.3 MTS-Test: VCaP

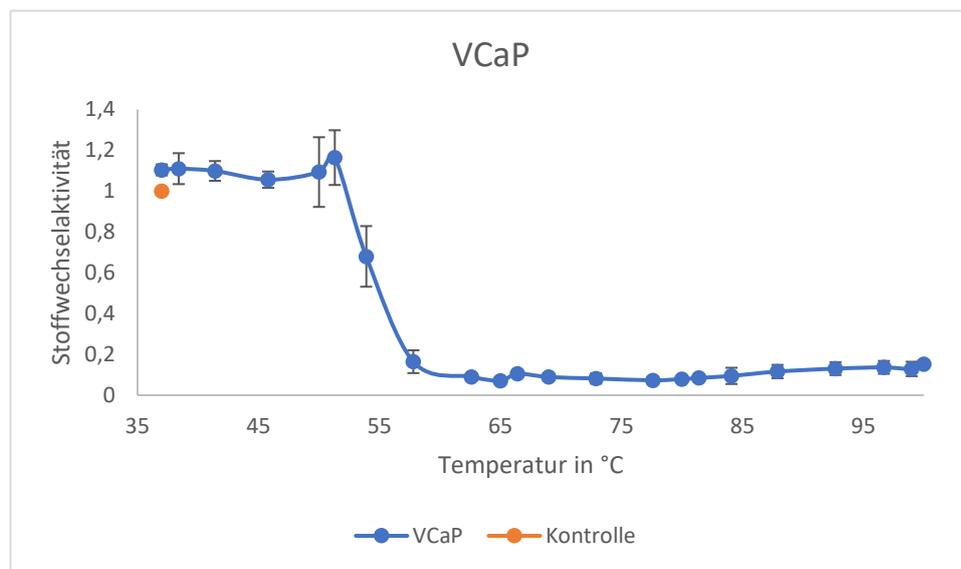


Abbildung 12: MTS-Test VCaP unstimuliert

In Abbildung 12 ist die Datenauswertung der MTS-Tests der Zellreihe VCaP ohne medikamentöse Behandlung der Zellen dargestellt. Bei 37°C beträgt die Stoffwechselaktivität der VCaP Zellen – bezogen auf den unerhitzten Kontrollwert – 110%. Die Kurve beschreibt zunächst eine sukzessive Abnahme, die Stoffwechselaktivität sinkt somit bei stufenweiser Temperaturerhöhung bis zu 50°C langsam auf einen Wert von 109% ab. Bei 51,3°C zeigt sich ein kleiner Gipfel im Kurvenverlauf. Dieser entspricht einem Anstieg der metabolischen Aktivität auf 116%. Zwischen 51,3°C und 57,8°C fällt der Graph stark ab. Die stoffwechselaktiven Zellen reduzieren sich von 116% auf 16%. Bei weiterer Hitzezufuhr auf 65°C sinkt die metabolische Aktivität weiter auf 7%. Bei 66,4°C zeigt sich analog zur Zellreihe rVCaP ein kleiner Anstieg der Kurve. Die Stoffwechselaktivität nimmt an diesem Punkt von 7% auf 10% zu. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur auf 77,6° fällt die Stoffwechselaktivität der VCaP Zellen wieder auf einen Wert von 7%. Zwischen 77,6°C und der finalen Temperatur von 100°C zeigt die Kurve wiederum einen Anstieg. Der Prozentsatz metabolisch aktiver Zellen liegt in diesem Bereich zwischen 7-15%. Die Standardfehler in diesem Graphen sind

bei Temperaturen zwischen 50°C und 53,9°C am höchsten und liegen hier bei Werten zwischen 0,13 und 0,17.

3.1.4 MTS-Test: 22Rv1

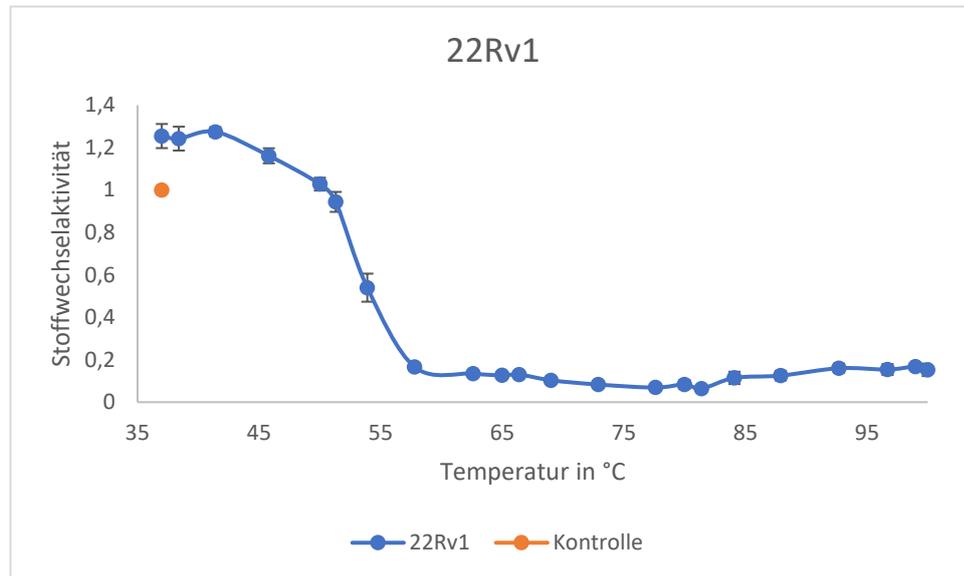


Abbildung 13: MTS-Test 22Rv1 unstimuliert

In Abbildung 13 ist die Datenauswertung der MTS-Tests der Zellreihe 22Rv1 ohne medikamentöse Vorbehandlung der Zellen dargestellt. Bei 37°C liegt die Stoffwechselaktivität bezogen auf den unerhitzten Kontrollwert bei 125% und hält sich bei diesem Wert bis zu einer Temperatur von 41,4°C. Zwischen 41,4°C und 51,3°C sinkt der Anteil stoffwechselaktiver Zellen in einem nahezu linearen Kurvenverlauf auf 94% ab. Zwischen 51,3°C und 57,8°C fällt der Graph steil ab, es ereignet sich der größte Stoffwechselaktivitätsabfall von 94% auf 17%. Zwischen 57,8°C und 81,4°C zeigt sich ein gleichmäßiger langsamer Abfall der Kurve. Die metabolische Aktivität der 22Rv1 Zellen sinkt weiter auf 6%. Durch weitere Hitzezufuhr erfährt der Graph einen Anstieg. Die Stoffwechselaktivität steigt an und erreicht bei der 99°C erneut eine Aktivität von 17%. Die größten Standardfehler in diesem Diagramm messen bei den Anfangstemperaturen von 37°C und 38,4°C Werte von 0,06 und bei 53,9°C Werte von 0,07.

3.1.5 MTS-Test: PC-3

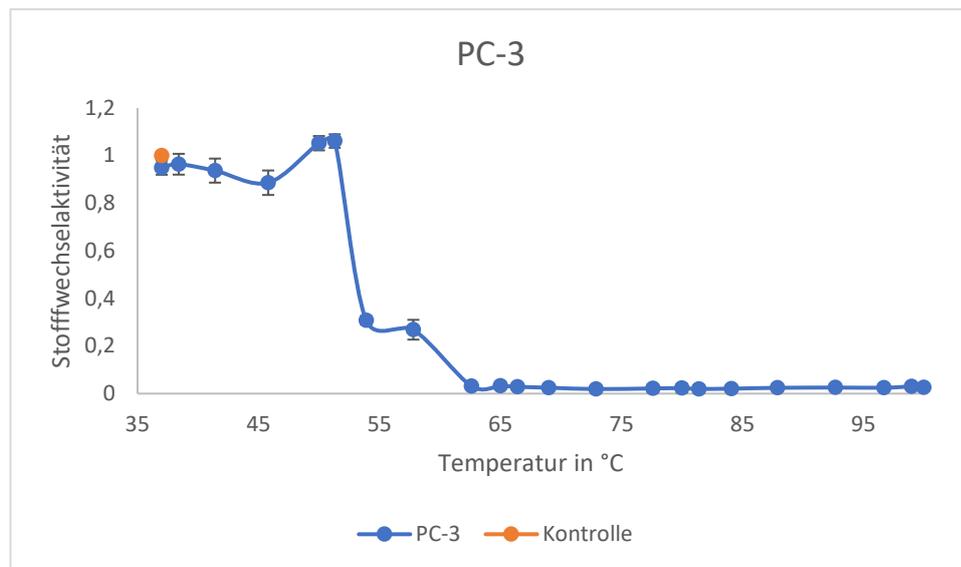


Abbildung 14: MTS-Test PC-3 unstimuliert

In Abbildung 14 ist das Liniendiagramm der Datenauswertung der MTS-Tests der unbehandelten Zellreihe PC-3 dargestellt. Bei 37°C sind 95% der PC-3 Zellen im Vergleich zur unerhitzten Kontrollprobe metabolisch aktiv. Nach einem leichten Anstieg der Stoffwechselaktivität auf 96% bei 38,4°C kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall der Stoffwechselaktivität auf 89% bis zu einer Temperatur von 45,8°C. Im Verlauf zeigt sich bei Temperaturerhöhung ein Anstieg des Graphen und somit eine Steigerung der metabolischen Aktivität der Zellen. Diese entspricht bei 50°C einem Anteil an stoffwechselaktiven Zellen von 105%. Es bildet sich ein Maximum von 106% metabolisch aktiver Zellen bei 51,3°C. Zwischen 51,3°C und 53,9°C fällt die Stoffwechselaktivität der PC-3 Zellen stark auf 31% ab. Hier bildet sich bis zur nächsten Temperaturabstufung von 57,8°C ein kleines Plateau. Bei 57,8°C beträgt der Wert an metabolisch aktiven Zellen 27%. Zwischen 57,8°C und 62,6°C fällt die Stoffwechselaktivität der PC-3 Zellreihe weiter auf 3% ab und bleibt bis zu der finalen Temperatur von 100°C unter diesem Wert. Die Standardfehler sind bei den niedrigeren Temperaturen am größten. Bei 38,4°C und 57,8°C beträgt der Standardfehler 0,04. Bei 41,4°C und 45,8°C beträgt der Standardfehler 0,05.

3.1.6 Zusammenfassung – MTS-Test ohne medikamentöse Vorbehandlung

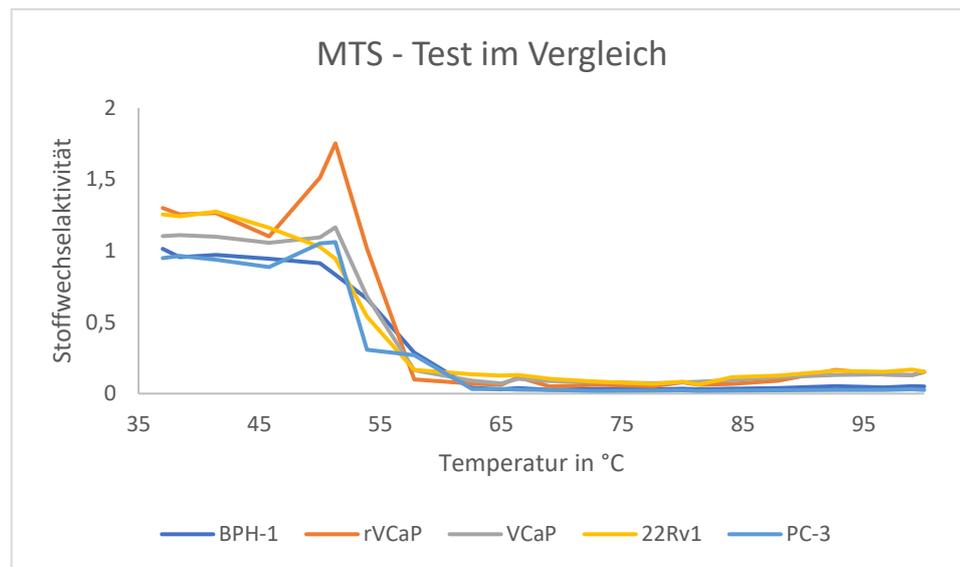


Abbildung 15: MTS-Test aller unstimulierten Zellreihen

In Abbildung 15 sind alle Graphen der untersuchten Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 ohne medikamentöse Vorbehandlung in einem Diagramm dargestellt, um die Verläufe der Kurven vergleichen zu können. Jede Zellreihe ist weiterhin auf ihren individuellen Kontrollwert bei 37°C bezogen worden, welcher nicht mit dargestellt wurde. Die Standardfehler sind für eine bessere Übersicht ebenfalls nicht mit in das Diagramm eingezeichnet.

Vergleicht man zunächst die Werte der Stoffwechselaktivität bei der Anfangstemperatur von 37°C zeigt sich bereits ein merklicher Unterschied der Werte, welche sich auf die jeweilige Kontrollgruppe der Zellen beziehen. Während die Zellreihen BPH-1 und PC-3 eine nahezu identische Stoffwechselaktivität mit ihrer unerhitzten Kontrollgruppe zeigen, sieht man bei der Zellreihe VCaP eine leichte, bei den Zellreihen rVCaP und 22Rv1 eine stark erhöhte Stoffwechselaktivität im Vergleich zur unerhitzten Kontrollgruppe.

Der nächste erkennbare Unterschied erfolgt im Temperaturbereich zwischen 37°C und 51,3°C. Während die Zellreihen BPH-1 und 22Rv1 in diesem Abschnitt einen kontinuierlichen Abfall der Stoffwechselaktivität zeigen, weisen die übrigen Zellreihen jeweils einen paradoxen Anstieg der Stoffwechselaktivität auf. Dieser entspricht bei der Zellreihe VCaP nur einem kleinen Gipfel. Bei der Zellreihe PC-3 ist der Gipfel deutlicher ausgeprägt. Bei der Zellreihe rVCaP ist der Anstieg als sehr deutlicher Ausschlag im Diagramm sichtbar.

Die nächste Auffälligkeit ist die Ausbildung des Plateaus der Zellreihe PC-3 zwischen 53,9°C und 57,8°C. Alle anderen Zellreihen zeigen in dieser Temperaturspanne einen kontinuierlichen Stoffwechselaktivitätsabfall.

Die Zellreihen rVCaP, VCaP und 22Rv1 zeigen bei einer Temperatur von 57,8°C erstmals einen Anteil stoffwechselaktiver Zellen unter 20%. Die Zellreihen BPH-1 und PC-3 erreichen diesen Anteil erst bei einer Hitzeabstufung später, dies entspricht einer Temperatur von 62,6°C.

Der letzte auffallende Unterschied ereignet sich im Temperaturbereich zwischen 62,6°C und 100°C. Während die Zellreihen BPH-1 und PC-3 nach Erreichen der geringsten Stoffwechselaktivität bis zur Endtemperatur von 100% unter dieser Aktivitätsgrenze bleiben, fällt bei den Zellreihen rVCaP, VCaP und 22Rv1 ein erneuter Anstieg der Graphen und somit eine Erhöhung der Stoffwechselaktivität bei weiterer Hitzezufuhr auf.

3.2 MTS-Test medikamentös behandelter Zellen

Nachdem für die Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 ein jeweils individuelles Hitzeprofil ohne medikamentöse Vorstimulation generiert wurde, wurden im zweiten Teil der Arbeit die Zellen mit dem 5 α -Reduktase-Hemmer Finasterid sowie dem Antiandrogen Bicalutamid vorbehandelt und im Anschluss die Stoffwechselaktivität der Zellen unter Hitzeinduktion mittels MTS-Test gemessen (siehe Tabelle 10, Kapitel 2.2.2).

Nachfolgend sind in einer Grafik jeweils sechs Graphen zusammengefasst: die dunkelblaue Kurve entspricht der Stoffwechselaktivität unstimulierter Zellen, die orange Kurve stellt die Stoffwechselaktivität der Zellen dar, die mit dem jeweiligen Lösungsmittel des Medikamentes behandelt wurden. Die graue, gelbe, hellblaue und grüne Kurve bildet die Stoffwechselaktivität der medikamentös behandelten Zellen ab. Alle gemessenen Werte wurden analog zum MTS-Test der unstimulierten Zellen auf einen Kontrollwert bezogen. Für jede der sechs Untergruppen - also unstimulierte Zellen, Lösungsmittelkontrolle und vier stimulierte Zellgruppen – wurde eine spezifische Kontrolle mitgeführt. Wurden die Zellen mit Lösungsmittel oder einem Medikament behandelt, so wurde die Kontrolle mit der gleichen Konzentration des jeweiligen Agens stimuliert. Die Zellen der Kontrolle wurden nicht erhitzt, sondern im Inkubator bei 37°C aufbewahrt, während die übrigen Zellen im Thermozykler erhitzt wurden. Der Kontrollwert wurde mit einer Stoffwechselaktivität von 1 gleichgesetzt. Der Kontrollwert wurde zur besseren Übersicht in nachfolgenden Grafiken nicht dargestellt.

Es wurde sich auf weniger Temperaturen als im MTS-Test ohne medikamentöse Stimulation fokussiert (siehe Tabelle 13, Kapitel 2.2.3.1): Diese Temperaturspannweite beinhaltete als Rahmen 37°C als niedrigste Temperatur und 92,7°C als höchste Temperatur. Im Fokus

stand der Temperaturbereich, in welchem die Stoffwechselaktivität der Zellen in den vorangegangenen individuellen Hitzeprofilen ohne medikamentöse Stimulation stark abfiel. Dieser Bereich ergab sich für alle Zellreihen zwischen 51,3°C und 69°C.

Im Fokus dieses Versuches stand nun die Frage, ob sich die Stoffwechselaktivität der Zellen unter Hitzeeinfluss durch die medikamentöse Vorbehandlung verändert.

3.2.1 MTS-Test: BPH-1 + Finasterid

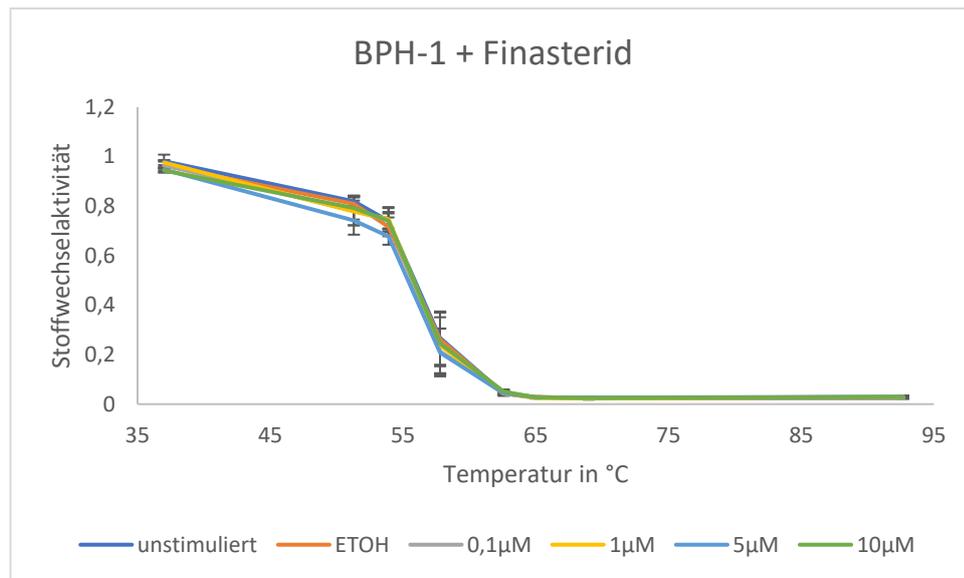


Abbildung 16: MTS-Test BPH-1 mit Finasterid

In Abbildung 16 sind die MTS-Tests der Zellreihe BPH-1 unter medikamentöser Vorbehandlung mit Finasterid 48 Stunden vor Versuchsbeginn zu sehen. Bei 37°C weisen alle sechs Zellgruppen eine metabolische Aktivität zwischen 94–98% bezogen auf ihre jeweils unerhitzte Kontrollgruppe auf. Die mit 10 µM Finasterid stimulierten Zellen zeigen bei 37°C die geringste Stoffwechselaktivität im Vergleich zum Kontrollwert mit 94%, die unstimulierten Zellen die höchste Stoffwechselaktivität mit 98%. Zwischen 37°C und 51,3°C zeigt sich bei allen Zellen ein gleichmäßiger Stoffwechselaktivitätsabfall zwischen 15-21%, wobei sich der stärkste Abfall in der mit 5 µM Finasterid stimulierten Zellgruppe ereignet. Dies entspricht bei 51,3°C einer metabolischen Aktivität von 74% bei den mit 5 µM Finasterid stimulierten Zellen und einer metabolischen Aktivität zwischen 78% und 82% bei den übrigen Gruppen. Zwischen 51,3°C und 53,9°C fällt die Stoffwechselaktivität in jeder Zellgruppe um 4-9%. Zwischen 53,9°C und 57,8°C findet der größte Abfall der Stoffwechselaktivität bei allen Zellen statt. Dieser entspricht zwischen 47-53% Aktivitätsverlust. Die Zellen befinden sich unter einer Aktivitätsgrenze von 27%, wobei die mit 5 µM Finasterid stimulierten BPH-1 Zellen die geringste Stoffwechselaktivität mit 21% aufweisen. Bei Erreichen einer Temperatur von

62,6°C zeigen sowohl die unstimulierten Zellen als auch die mit EtOH und Finasterid behandelten Zellen eine metabolische Aktivität $\leq 5\%$, welche bis zur Endtemperatur von 92,7°C gehalten wird. Der Standardfehler ist bei 57,8°C am größten mit einem Wert von 0,1.

3.2.2 MTS-Test: BPH-1 + Bicalutamid

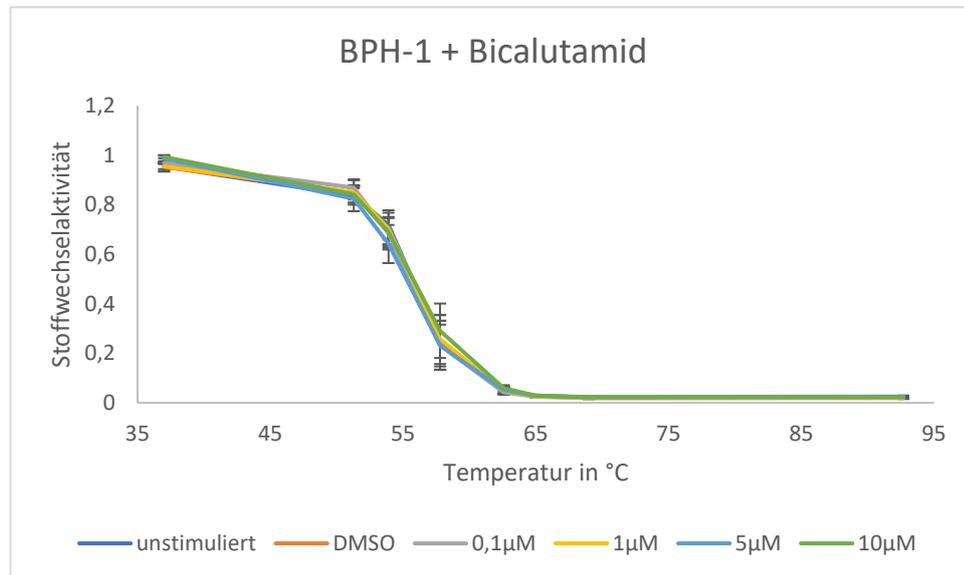


Abbildung 17: MTS-Test BPH-1 mit Bicalutamid

Das in Abbildung 17 dargestellte Diagramm präsentiert die Ergebnisse der MTS-Tests der mit Bicalutamid behandelten BPH-1 Zellen. Die unstimulierten Zellen sowie die mit DMSO stimulierten Zellen zeigen eine Stoffwechselaktivität von 95%, die mit 0,1 µM und 1 µM Bicalutamid stimulierten Zellen eine Aktivität zwischen 96-97% und die mit 5 µM und 10 µM Bicalutamid stimulierten Zellen zeigen eine Stoffwechselaktivität von 99% bei der niedrigsten Temperatur von 37°C bezogen auf den jeweils unerhitzten Kontrollwert. Bei einer Erhitzung der Zellen auf eine Temperatur von 51,3°C fällt die metabolische Aktivität bei allen Zellgruppen auf Werte zwischen 82% und 87% ab, wobei sich der stärkste Abfall mit 17% in der mit 5 µM Bicalutamid stimulierten Zellgruppe ereignet. Zwischen 51,3°C und 53,9°C fällt die Aktivität in jeder Zellgruppe um 12-18% ab. Der steilste Abfall der Graphen erfolgt zwischen 53,9°C und 57,8°C und entspricht einem Stoffwechselaktivitätsverlust zwischen 40-48%. Die metabolische Aktivität ist an diesem Punkt bei allen Zellgruppen zwischen 23-30%, wobei sich die höchste Aktivität von 29% in der mit 10 µM Bicalutamid stimulierten Zellgruppe findet. Bei der nachfolgenden Temperatur von 62,6°C sinkt die Stoffwechselaktivität in allen Zellgruppen weiter auf unter 6% ab, bei 65°C unter 3% und hält sich bis zur Endtemperatur unter dieser Grenze. Der größte Standardfehler ist bei 57,8°C zu sehen und beträgt 0,1.

3.2.3 MTS-Test: rVCaP + Finasterid

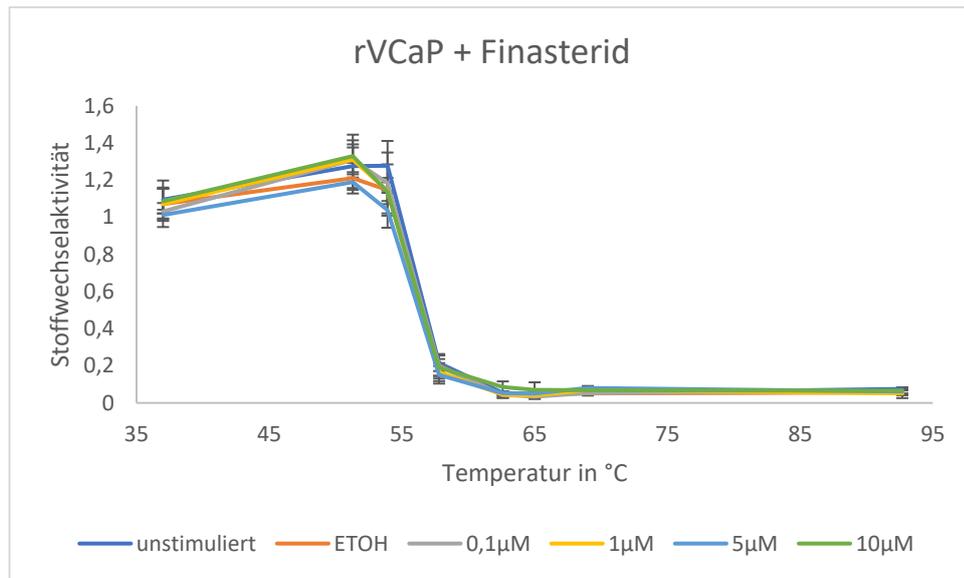


Abbildung 18: MTS-Test rVCaP mit Finasterid

In Abbildung 18 wird die Hitzeeinwirkung auf die Stoffwechselaktivität der Zellreihe rVCaP unter medikamentöser Vorbehandlung mit Finasterid veranschaulicht. Bei 37°C zeigt sich bei allen Zellgruppen eine Steigerung der metabolischen Aktivität in Bezug auf die jeweils unerhitzte Kontrollgruppe. Die mit 5 µM Finasterid stimulierten Zellen weisen hierbei die geringste Stoffwechselaktivität mit 101%, die unstimulierte Zellgruppe die höchste Stoffwechselaktivität mit 110% im Vergleich zur Kontrolle. Wie bereits in Kapitel 3.1.2, Abbildung 11 – rVCaP MTS-Test unstimuliert – zu sehen, zeigt sich auch unter medikamentöser Vorbehandlung mit Finasterid zunächst ein Anstieg der Stoffwechselaktivität um 14-28% bei Steigerung der Temperatur auf 51,3°C. Der geringste Anstieg erfolgt bei der mit EtOH behandelten Gruppe, der größte bei den mit 0,1 µM Finasterid stimulierten Zellen. Zwischen 51,3°C und 53,9°C erfolgt bei den mit EtOH und Finasterid stimulierten Zellen ein Abfall der Stoffwechselaktivität um 6-19% auf Werte zwischen 104-119%. Die Stoffwechselaktivität der unstimulierten Zellen bleibt zwischen 51,3°C und 53,9°C konstant bei 127%. Zwischen 53,9°C und 57,8°C fallen alle Graphen steil ab, dies entspricht somit dem größten Stoffwechselaktivitätsverlust aller Zellgruppen. Die geringste metabolische Aktivität bei 57,8°C findet sich in der mit 5 µM Finasterid stimulierten Zellgruppe mit 15%, die höchste Aktivität zeigen die unstimulierten Zellen mit 21%. Bei einer Temperatur von 62,6°C findet ein weiterer Verlust der Stoffwechselaktivität mit Werten von unter 9% statt, welche sich bis zur Endtemperatur von 92,7°C halten. Der größte Standardfehler findet sich bei dem Temperaturpunkt 53,9°C und liegt zwischen 0,1-0,2.

3.2.4 MTS-Test: rVCaP + Bicalutamid

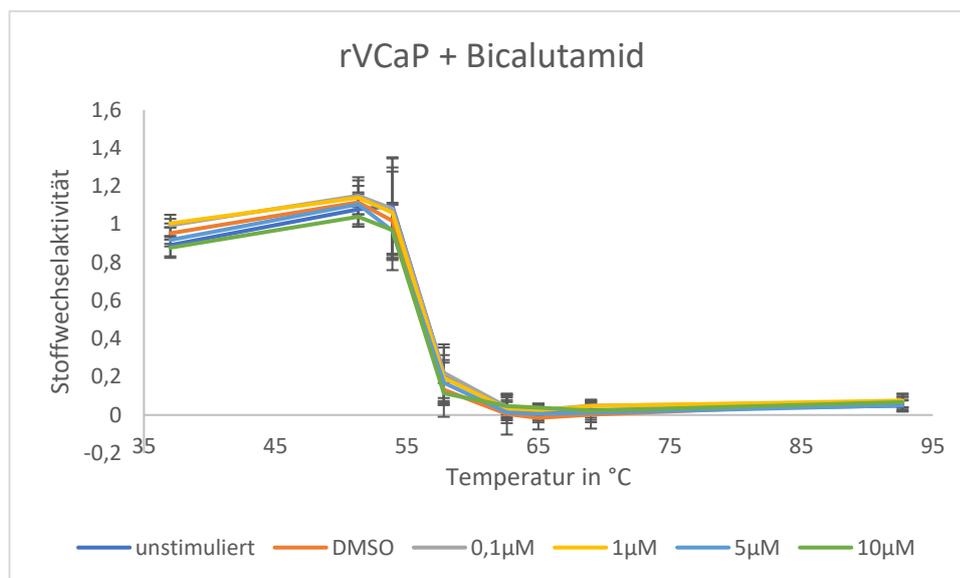


Abbildung 19: MTS-Test rVCaP mit Bicalutamid

In Abbildung 19 wird die Stoffwechselaktivität der rVCaP Zellreihe unter Hitzeinfluss mit medikamentöser Vorbehandlung durch das Antiandrogen Bicalutamid präsentiert. Bei 37°C zeigt sich eine Spannweite der Stoffwechselaktivität unter den verschiedenen Zellgruppen in Bezug auf ihre spezifische Kontrolle. Diese erstreckt sich zwischen Minimalwerten von 88% bei den mit 10 µM Bicalutamid behandelten Zellen bis zu maximal 100% metabolischer Aktivität bei den mit 1 µM Bicalutamid behandelten Zellen. Im weiteren Verlauf des Graphen lässt sich analog zu den Ergebnissen des MTS-Tests der unstimulierten rVCaP Zellen sowie den mit Finasterid stimulierten rVCaP Zellen eine Steigerung der metabolischen Aktivität bei steigenden Temperaturen verzeichnen. Dieser Anstieg erfolgt bei den mit DMSO und mit Bicalutamid vorbehandelten Zellen bis 51,3°C und umfasst eine Steigerung der Stoffwechselaktivität um 13-17%. Der Anstieg des Graphen der unstimulierten Zellen erfolgt bis 53,9°C und umfasst eine Aktivitätssteigerung um 21%. Zwischen 53,9°C und 57,8°C fallen alle Graphen steil ab. Dies entspricht in allen Zellgruppen einen Verlust der metabolischen Aktivität um 80-89%. Bei 57,8°C befindet sich die Stoffwechselaktivität in allen Zellgruppen unter einer Grenze von 22%. Bei 62,6°C liegt die Stoffwechselaktivität in allen Zellgruppen unter 5%. Paradoxe Weise steigt die metabolische Aktivität bei allen Zellen bei Erhöhung der Temperatur auf 92,7°C nochmals an mit Höchstwerten bei den mit 1 µM Bicalutamid stimulierten Zellen von 8%. Dieses Bild zeigte sich bereits bei den unstimulierten rVCaP Zellen in Kapitel 3.1.2. Bei den Temperaturen 53,9°C und 57,8°C zeigen sich die größten Standardfehler und betragen maximal 0,3.

3.2.5 MTS-Test: VCaP + Finasterid

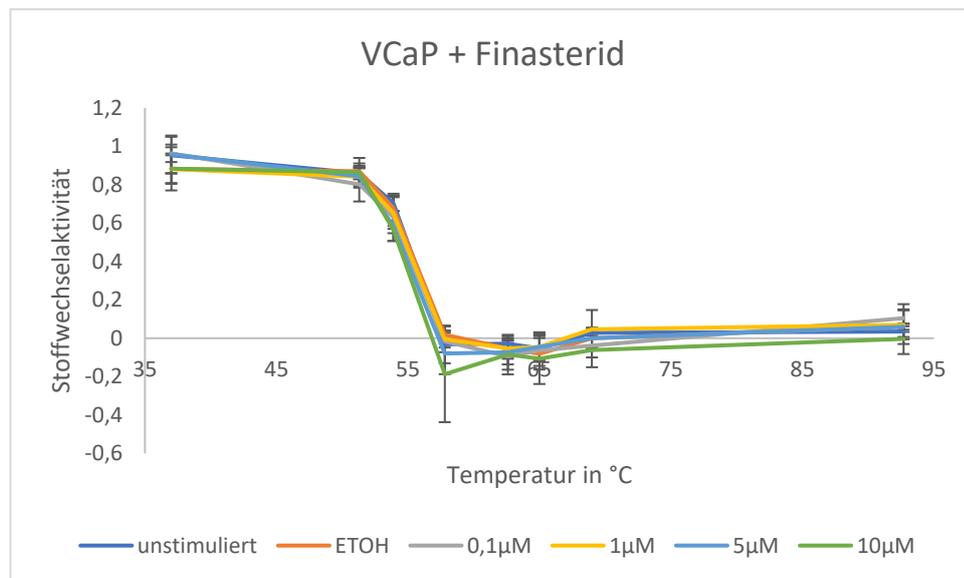


Abbildung 20: MTS-Test VCaP mit Finasterid

In Abbildung 20 ist die Datenauswertung der MTS-Tests der Zellreihe VCaP unter medikamentöser Vorbehandlung mit Finasterid dargestellt. Bei 37°C zeigen die unstimulierten und die mit 0,1 µM und 5 µM Finasterid stimulierten Zellen eine Stoffwechselaktivität von 95-96%, die mit EtOH, 1 µM und 10 µM Finasterid stimulierten Zellen zeigen eine Stoffwechselaktivität von 88% in Bezug auf den jeweils spezifischen Kontrollwert. Zwischen 37°C und 51,3°C sinkt die metabolische Aktivität der unstimulierten Zellen sowie der mit 0,1 µM und 5 µM Finasterid stimulierten Zellen um 9-12% ab. Die metabolische Aktivität der mit EtOH, 1 µM und 10 µM Finasterid stimulierten Zellen nimmt um 1-4% ab und bleibt somit in diesem Abschnitt nahezu konstant. Bei Erhöhung der Temperatur auf 53,9°C verlieren alle Zellgruppen zwischen 16-30% ihrer Stoffwechselaktivität. Zwischen 53,9°C und 57,8°C erfolgt dann der steilste Abfall der Graphen. Die Stoffwechselaktivität nimmt sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten Zellen um 65-74% ab und erreicht Werte $\leq 2\%$. Hier zeigen alle Zellgruppen mit Ausnahme der mit EtOH vorbehandelten Zellen negative Aktivitätswerte in Bezug zum Kontrollwert der nicht erhitzten Zellen. Zwischen 62,6°C und 65°C zeigen dann alle Zellgruppen negative Werte. Bei der finalen Temperatur des Versuches von 92,7°C steigt die Stoffwechselaktivität dann wieder in den positiven Bereich mit Maximalwerten von 11% bei den mit 0,1 µM Finasterid stimulierten Zellen. Auffallend ist der Standardfehler von 0,25 bei 57,8°C in der mit 10 µM Finasterid stimulierten Zellgruppe. Dieser ist der größte Wert der berechneten Standardfehler in dieser Abbildung.

3.2.6 MTS-Test: VCaP + Bicalutamid

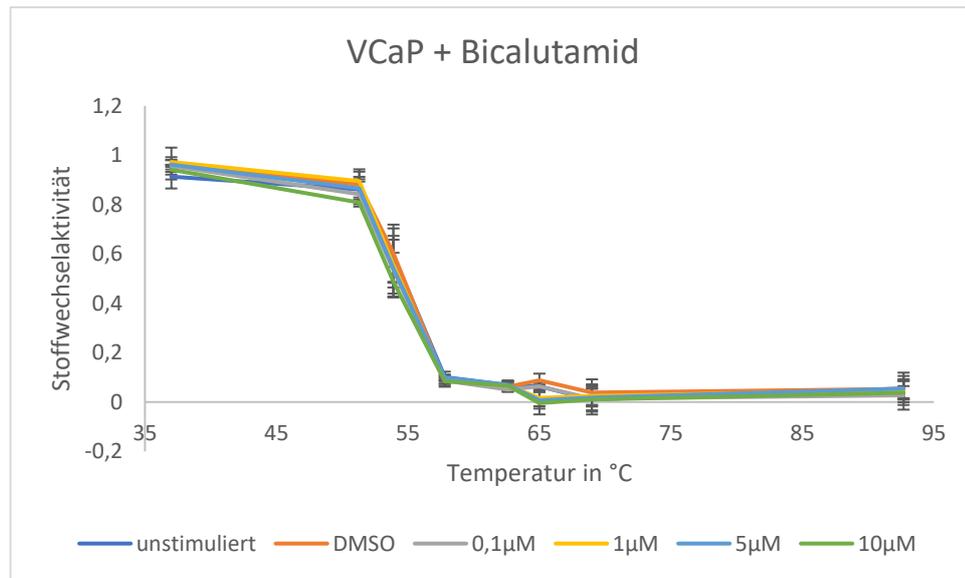


Abbildung 21: MTS-Test VCaP mit Bicalutamid

In Abbildung 21 ist die Zellreihe VCaP unter medikamentöser Vorbehandlung mit dem Antiandrogen Bicalutamid dargestellt. Es zeigt sich bei 37°C eine Stoffwechselaktivität der unstimulierten Zellen von 91% und eine Stoffwechselaktivität der stimulierten Zellgruppen zwischen 94-97% bezogen auf die jeweils spezifische nicht erhitzte Kontrolle. Die metabolische Aktivität fällt zwischen 37°C und 51,3°C mit 5% in der unstimulierten Zellgruppe etwas weniger ab als in den übrigen Gruppen mit Werten zwischen 7-14%. Zwischen 51,3°C und 57,8°C fallen alle Graphen nahezu gleich steil ab. Zwischen 51,3°C und 53,9°C beträgt der Aktivitätsverlust in allen Zellgruppen 27-34%, zwischen 53,9°C und 57,8°C 41-51%. Bei der Temperatur 57,8°C beträgt die metabolische Aktivität in allen Zellen zwischen 8-10%, bei 62,6°C zwischen 5-7%. Während die mit 1 μM, 5 μM und 10 μM Finasterid stimulierten Zellen bereits bei einer Erhöhung der Temperatur auf 65°C unter eine Stoffwechselaktivität von 4% fallen, erreichen die übrigen drei Gruppen diese Werte erst bei 69°C. Alle Gruppen zeigen bei weiterer Temperaturerhöhung nochmals einen minimalen Anstieg der metabolischen Aktivität, diese übertrifft jedoch in keiner Gruppe Werte über 5% bis zur finalen Temperatur von 92,7°C. Der größte Standardfehler zeigt sich bei 53,9°C und beträgt maximal 0,1.

3.2.7 MTS-Test: 22Rv1 + Finasterid

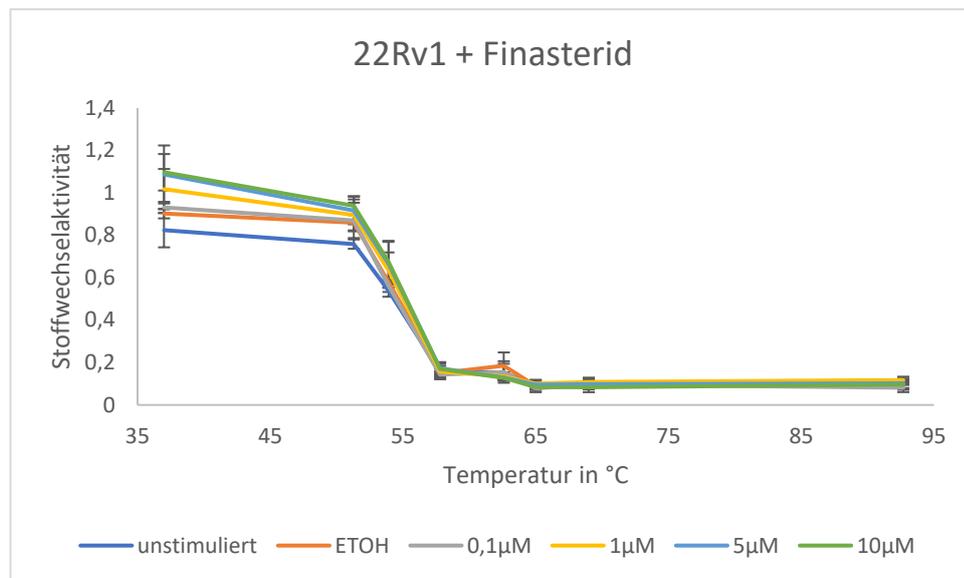


Abbildung 22: MTS-Test 22Rv1 mit Finasterid

In Abbildung 22 sind die MTS-Tests der Zellreihe 22Rv1 unter medikamentöser Vorbehandlung mit Finasterid gezeigt. Die Stoffwechselaktivität bei 37°C zeigt eine große Spannweite und beträgt zwischen 82-110%. Die geringste metabolische Aktivität zeigen die unstimulierten Zellen mit 82% im Vergleich zur unerhitzten Kontrolle. Die höchste metabolische Aktivität zeigen die mit 5 µM und 10 µM Finasterid stimulierten Zellen mit Werten zwischen 109-110% im Vergleich zur unerhitzten Kontrolle. Zwischen 37°C und 51,3°C sinkt die Stoffwechselaktivität der unstimulierten Zellen sowie der mit EtOH und der mit 0,1 µM Finasterid stimulierten Zellen nur leicht um 4-6% ab, wohingegen die mit 1 µM, 5 µM und 10 µM stimulierten Zellen zwischen 12-17% an Stoffwechselaktivität verlieren. Zwischen 51,3°C und 57,8°C fallen alle Graphen steil ab. Die Stoffwechselaktivität nimmt bei allen Zellgruppen zwischen 51,3°C und 53,9°C um 22-31% und zwischen 53,9°C und 57,8°C um 38-50% ab. Bei 57,8°C beträgt die metabolische Aktivität in allen Zellgruppen $\leq 17\%$. Bei weiterer Hitzezufuhr auf 62,6°C bleibt die metabolische Aktivität der unstimulierten Zellen konstant bei 15%, die metabolische Aktivität der mit EtOH stimulierten Zellen erhöht sich nochmals um 4% auf 19%, ebenso erhöht sich die metabolische Aktivität der mit 0,1 µM Finasterid stimulierten Zellen auf 16%. Die übrigen Zellen zeigen einen Aktivitätsverlust zwischen 57,8°C und 62,6°C auf 13% Stoffwechselaktivität. Bei Erhöhung der Temperatur bis auf 92,7°C sinkt die Stoffwechselaktivität in allen Zellgruppen unter maximal 12% ab.

3.2.8 MTS-Test: 22Rv1 + Bicalutamid

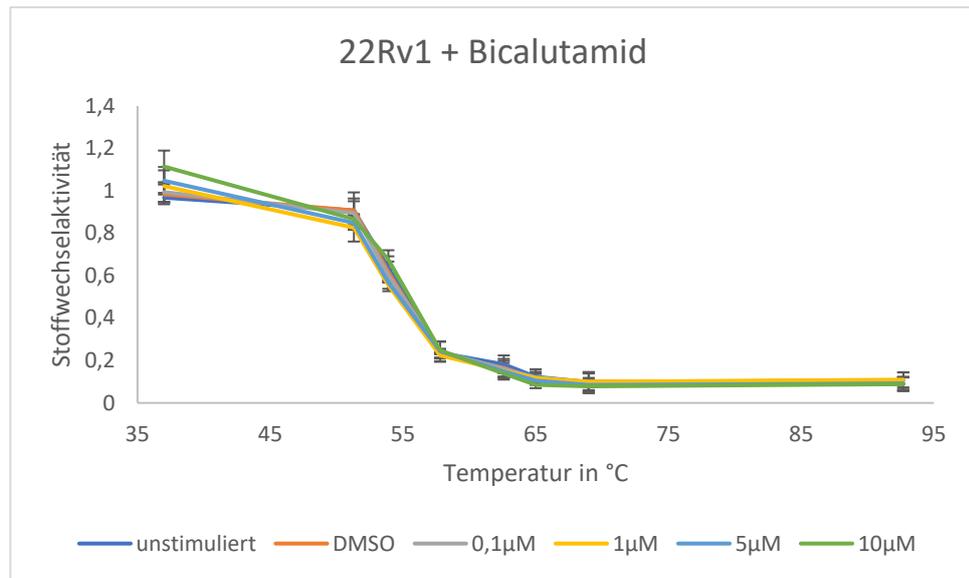


Abbildung 23: MTS-Test 22Rv1 mit Bicalutamid

In Abbildung 23 sind die MTS-Tests der Zellreihe 22Rv1 unter medikamentöser Vorbehandlung mit Bicalutamid dargestellt. Bei 37°C zeigt sich eine metabolische Aktivität zwischen 97% bei den unstimulierten Zellen und 111% bei den mit 10 μM Bicalutamid stimulierten Zellen bezogen auf die jeweilige Kontrolle. Bis zur Temperatur von 51,3°C kann ein leichter Abfall der metabolischen Aktivität nachgewiesen werden. Dieser entspricht bei den unstimulierten Zellen sowie bei den mit DMSO und 0,1 μM Bicalutamid stimulierten Zellen 6-10%, bei den mit 1 μM, 5 μM und 10 μM Bicalutamid stimulierten Zellen 19-23%. Zwischen 51,3°C und 57,8°C ereignet sich der steilste Kurvenabfall. Dieser entspricht zwischen 51,3°C und 53,9°C einem Verlust der metabolischen Aktivität um 19-29% und zwischen 53,9°C und 57,8°C einen Verlust der metabolischen Aktivität um 33-43% in allen Zellgruppen. Bei 57,8°C liegt die Stoffwechselaktivität der Zellen zwischen 22-25%. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur auf 62,6°C sinkt die Stoffwechselaktivität auf ≤18 %, bei 65°C auf ≤ 12%, bei 69°C auf ≤ 11% und stagniert bei diesen Werten bis zur endgültigen Erhitzung von 92,7°C. In dieser Grafik überschreitet kein Standardfehler Werte über 0,07.

3.2.9 MTS-Test: PC-3 + Finasterid

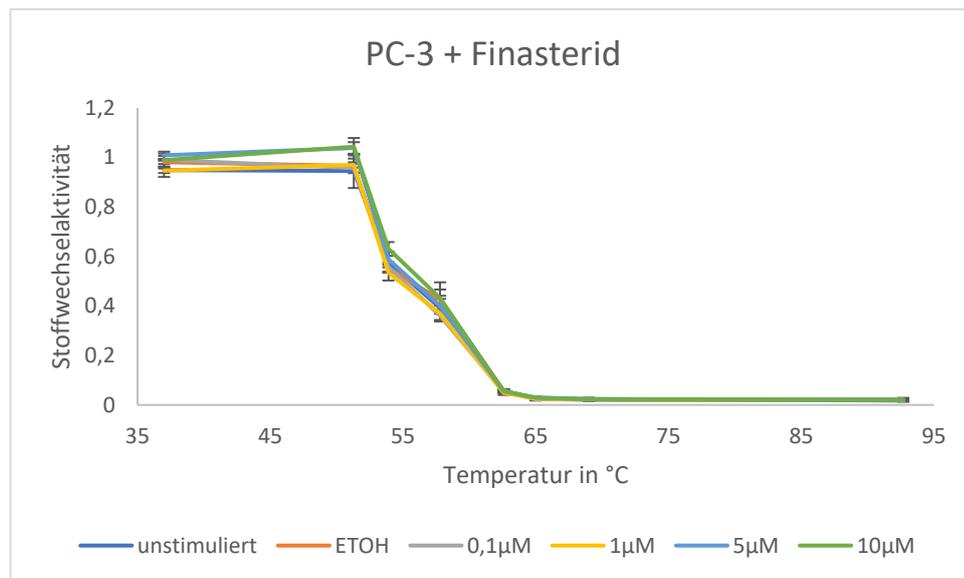


Abbildung 24: MTS-Test PC-3 mit Finasterid

In Abbildung 24 ist die Hitzeeinwirkung auf die Zellreihe PC-3 unter medikamentöser Vorbehandlung mit Finasterid dargestellt. Bei 37°C befinden sich die Zellen bei einer metabolischen Aktivität zwischen 95-100% im Vergleich zur jeweils unerhitzten Kontrollgruppe. Die Stoffwechselaktivität bleibt bei den unstimulierten Zellen bei Erhöhung der Temperatur auf 51,3°C nahezu stabil. In den mit EtOH und 0,1 μM Finasterid behandelten Zellgruppen sinkt die Stoffwechselaktivität in dieser Temperaturspanne um 1-3% ab, während sie bei den mit 1 μM, 5 μM und 10 μM Finasterid stimulierten Zellen um 2-5% ansteigt. Im Verlauf folgt ein stufenweiser Abfall der metabolischen Aktivität mit Werten von 53-63% bei 53,9°C, 36-43% bei 57,8°C und 5-6% bei 62,6°C. Ab dieser Temperatur bis zur Endtemperatur von 92,7°C bleibt die Stoffwechselaktivität konstant unter 6% sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten Zellen. Die größten Standardfehler liegen zwischen 0,02-0,06 bei 57,8°C.

3.2.10 MTS-Test: PC-3 + Bicalutamid

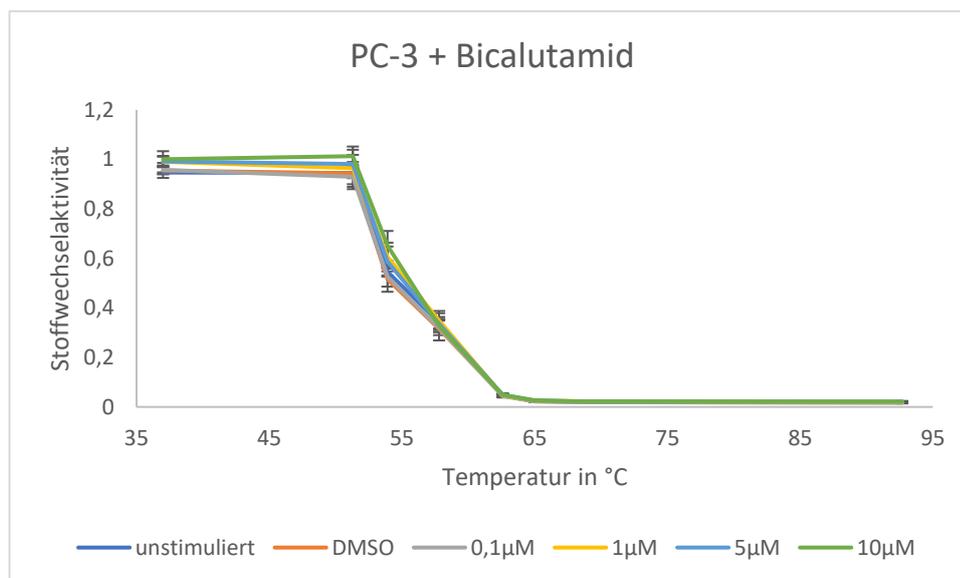


Abbildung 25: MTS-Test PC-3 mit Bicalutamid

In Abbildung 25 sind die MTS-Tests der Zellreihe PC-3 unter medikamentöser Vorbehandlung mit dem Antiandrogen Bicalutamid aufgezeigt. Es zeigt sich bei 37°C eine Stoffwechselaktivität zwischen 95% bei den unstimulierten Zellen und 100% bei den mit 10 µM Bicalutamid stimulierten Zellen bezogen auf die unerhitzten Kontrollen. Der Wert der jeweiligen metabolischen Aktivität der verschiedenen Zellgruppen bleiben bis zur nächsten Temperaturabstufung von 51,3°C nahezu stabil oder fallen leicht ab. Lediglich die mit 10 µM Bicalutamid behandelten Zellen zeigen einen minimalen Anstieg in der Stoffwechselaktivität um knapp 1%. Im Anschluss findet bei Temperaturerhöhung analog zum MTS-Test der PC-3 Zelllinie mit Finasterid ein stufenweiser Abfall der Stoffwechselaktivität statt mit Werten von 52-65% bei 53,9°C und 32-35% bei 57,8°C. Ab einer Temperatur von 62,6°C befinden sich die Zellen bei einer metabolischen Aktivität von $\leq 5\%$, bei 65°C $\leq 3\%$. Diese Werte werden bis zur finalen Temperatur von 92,7°C nicht mehr überschritten. Die größten Standardfehler werden bei 53,9°C erreicht und liegen bei 0,06.

3.2.11 Zusammenfassung – MTS-Test mit medikamentös behandelten Zellen

Nach Durchführung der MTS-Tests aller Zellzeihen mit medikamentöser Vorbehandlung durch Finasterid und Bicalutamid konnte festgestellt werden, dass sich in keiner der Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 ein signifikanter Unterschied in der Hitzesensitivität zwischen der unstimulierten Kontrolle, der Lösungsmittelgruppe und den medikamentös vorbehandelten Zellgruppen zeigt. Dies ist an dem Verlauf der Graphen in x-Richtung der Diagramme abzulesen. Würden sich eine Zellgruppe in ihrer Hitzesensitivität gemessen an der Stoffwechselaktivität der Zellen von den anderen Gruppen unterscheiden,

hätte sich eine Links-/ bzw. Rechtsverschiebung der Kurven in den Diagrammen dargestellt. Diese Verschiebung hätte einem früheren oder späteren Abfall der Stoffwechselaktivität der Zellen unter der Hitzeeinwirkung entsprochen. Lediglich in der Zellreihe rVCaP zeigte sich ein um eine Temperaturabstufung früherer Abfall der Stoffwechselaktivität der medikamentös behandelten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen bei 51,3°C. Da diese Verschiebung jedoch minimal ist, ist davon auszugehen, dass kein relevanter Unterschied in der Hitzesensitivität der Zellen unter medikamentöser Vorbehandlung mit Finasterid oder Bicalutamid besteht.

Erwähnenswert ist in jedem Fall der paradoxe Stoffwechselanstieg bei zunehmender Hitze der Zellreihe rVCaP. Bereits im MTS-Test ohne medikamentöse Stimulation ist entsprechender Gipfel zwischen 37°C und 51,3°C aufgefallen und konnte in den Versuchen mit medikamentöser Stimulation bestätigt werden. Der paradoxe Stoffwechselanstieg der Zellreihe PC-3 ist in den MTS-Tests mit medikamentöser Vorbehandlung nur noch gering in einzelnen Zellgruppen zu erkennen. Der ebenfalls in den MTS-Tests ohne medikamentöse Stimulation gemessene dezente Gipfel der Zellreihe VCaP konnte in den MTS-Tests mit medikamentöser Stimulation nicht reproduziert werden.

3.3 FACS-Analysen

Nach Durchführung des MTS-Tests aller Zellreihen mit und ohne medikamentöse Vorbehandlung wurden die Zellen im Anschluss mittels Durchflusszytometrie analysiert, um die Rate an vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen zu detektieren. Nachdem sich für alle Zellreihen unter Stimulation mit den verschiedenen Konzentrationen der Medikamente Finasterid und Bicalutamid kein Unterschied in der Hitzesensitivität der Zellreihen gezeigt hat, wurde sich bei der FACS-Analyse auf eine Medikamentenkonzentration von 5 µM des jeweiligen Medikamentes fokussiert (siehe Kapitel 2.2.2, Tabelle 11). Es wurde sich auf die vier relevantesten Temperaturen der jeweiligen Zellreihen konzentriert, welche mithilfe der vorangegangenen MTS-Tests ausgewählt wurden (siehe Kapitel 2.2.3.2, Tabelle 14): Die Anfangstemperatur von 37°C, die Endtemperatur von 92,7°C sowie diejenige Temperatur, bei welcher die Stoffwechselaktivität der Zellen in den MTS-Tests < 30% lagen sowie eine Temperaturabstufung höher.

Somit ergaben sich für die FACS-Analyse der Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP und 22Rv1 die Temperaturen 37°C, 57,8°C, 62,6°C und 92,7°C, für die Zellreihe PC-3 die Temperaturen 37°C, 62,6°C, 65°C und 92,7°C.

In den folgenden Kapiteln werden nun die Auswertungsdiagramme der FACS-Analysen der 5 Zellreihen mit und ohne medikamentöse Stimulation durch Finasterid und Bicalutamid

dargestellt. Zur Darstellung wurden Balkendiagramme verwendet. Jeder der Balken steht für eine bestimmte Temperatur. Innerhalb des Balkens werden die Zellpopulationen unterteilt in vitale Zellen (ungefärbt = Annexin V-/Pi-), apoptotische Zellen (Annexin V+/Pi-) sowie spät apoptotische und nekrotische Zellen (Annexin V+/Pi+). Der Anteil des Zelldetritus (Annexin V-/Pi+) betrug in jedem Versuch < 3% der Gesamtzellpopulation, sodass diese Färbung für eine bessere Übersicht bewusst in den Diagrammen weggelassen wurde. Für jede Zellreihe entstanden so jeweils drei Diagramme à vier Balken, welche die Auswertung der FACS-Analyse ohne medikamentöse Stimulation sowie unter Vorbehandlung mit Finasterid und Bicalutamid widerspiegelt.

3.3.1 FACS-Analyse BPH-1

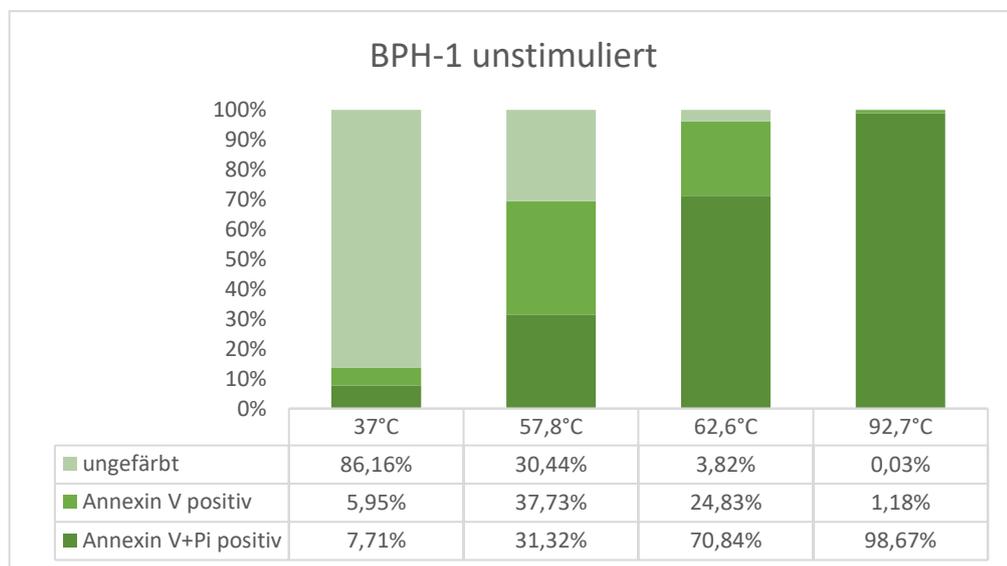


Abbildung 26: FACS-Analyse BPH-1 unstimuliert

In Abbildung 26 ist die FACS-Analyse der Zellreihe BPH-1 ohne medikamentöse Stimulation dargestellt. Der erste Balken links im Diagramm spiegelt die Hitzeauswirkung auf die Zellen bei 37°C wider. Hierbei befinden sich 86% in einem vitalen Stadium, 6% in Apoptose und 8% der Zellen sind bereits nekrotisch. Im nächsten Balken zeigen sich bei einer Temperatur von 57,8°C 30% der Zellen vital, 38% der Zellen in Apoptose und 31% nekrotisch. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 62,6°C sind noch 4% der Zellen vital, 25% in Apoptose und 71% tot, bei 92,7°C befinden sich fast 99% der Zellen in nekrotischem Zustand und 1% der Zellen in Apoptose. Der Anteil lebender Zellen liegt bei 0,03%.

3.3.2 FACS-Analyse BPH-1 + Finasterid

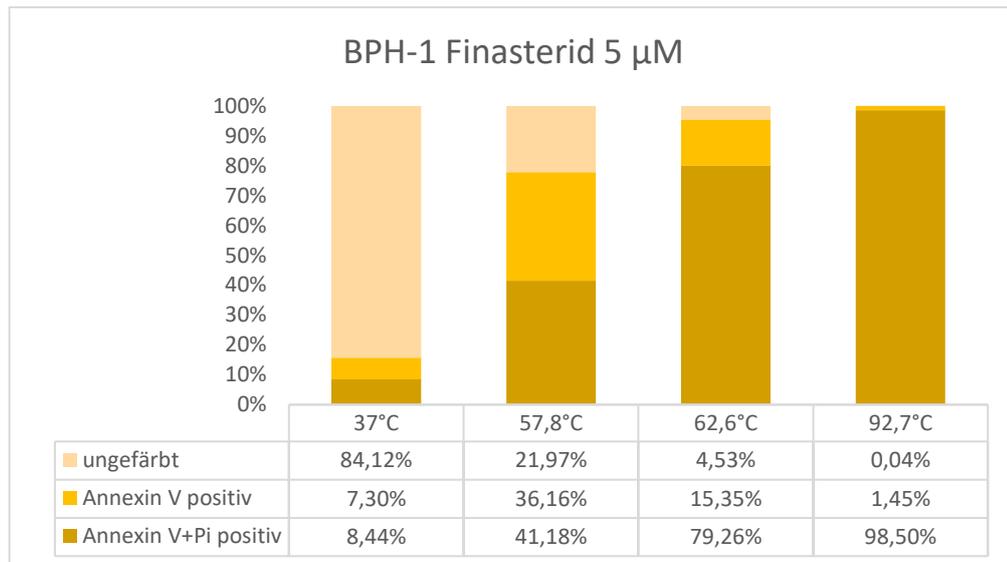


Abbildung 27: FACS-Analyse BPH-1 mit Finasterid 5 μ M

In Abbildung 27 ist die FACS-Analyse der Zellreihe BPH-1 unter medikamentöser Vorbehandlung 48 Stunden vor Versuchsbeginn mit 5 μ M Finasterid dargestellt. Bei 37°C sind 84% der Zellen vital, 7% apoptotisch und 8% nekrotisch. Bei 57,8°C zeigen sich noch 22% der Zellen vital, 36% sind in Apoptose und 41% in einem nekrotischen Stadium. Bei 62,6°C sinkt die Vitalität der Zellen weiter auf unter 5% ab, 15% der Zellen befinden sich in Apoptose und 79% sind in Nekrose. Bei 92,7°C steigt der nekrotische Zellanteil auf knapp 99%, der apoptotische Anteil liegt bei 1,5%, der vitale Anteil der Zellen liegt bei 0,04%.

3.3.3 FACS-Analyse BPH-1 + Bicalutamid

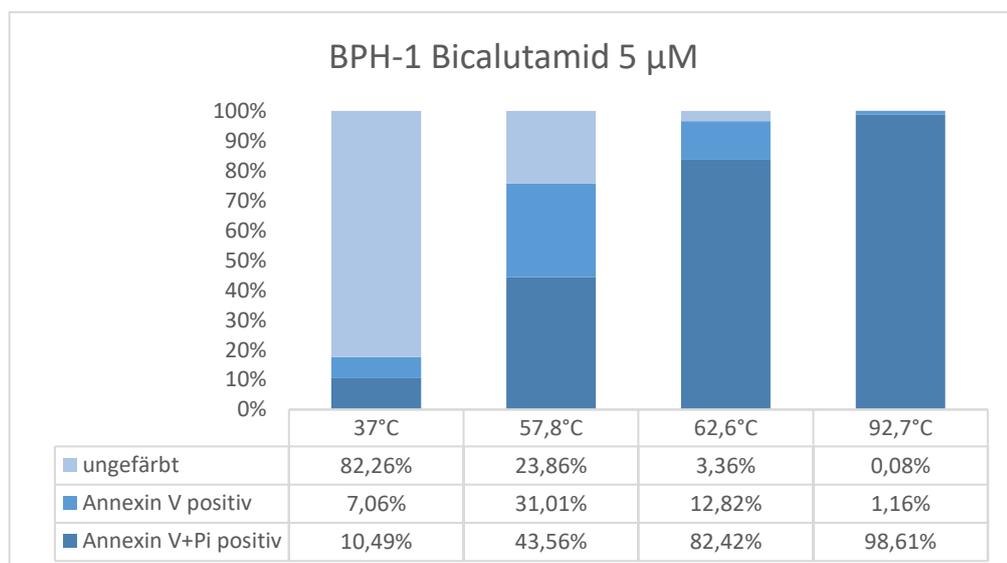


Abbildung 28: FACS-Analyse BPH-1 mit Bicalutamid 5 μ M

In Abbildung 28 ist das Balkendiagramm der FACS-Analyse der BPH-1 Zellreihe unter medikamentöser Stimulation mit 5 μM Bicalutamid aufgeführt. Bei 37°C zeigen sich 82% vitale Zellen, 7% apoptotische sowie 10% nekrotische Zellen. Bei Erhöhung der Temperatur auf 57,8°C liegt der Anteil an vitalen Zellen bei 24%, der Anteil an apoptotischen Zellen bei 31% und der Anteil an nekrotischen Zellen bei 44%. Bei weiterer Temperaturerhöhung auf 62,6°C sinken die vitalen Zellen auf unter 4%, die apoptotischen Zellen sinken ebenfalls auf Werte von 13%, die nekrotischen Zellen steigen auf 82%. Bei der höchsten Temperatur sind 99% der Zellen in Nekrose.

3.3.4 FACS-Analyse rVCaP

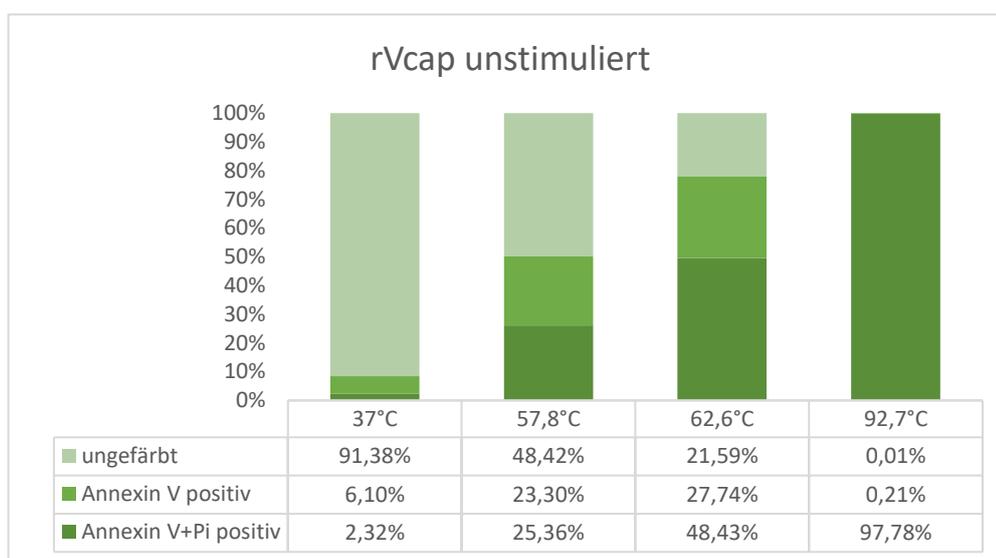


Abbildung 29: FACS-Analyse rVCaP unstimuliert

In Abbildung 29 ist die FACS-Analyse der Zellreihe rVCaP ohne medikamentöse Vorbehandlung ausgewertet. Auf der linken Seite des Diagrammes ist die Zellpopulation bei 37°C dargestellt. Bei dieser Temperatur befinden sich 91% in einem vitalen Zustand. 6% der Zellen sind in Apoptose und 2% der Zellen bereits in Nekrose. Bei Erhöhung der Hitzezufuhr auf 57,8°C sinkt der Anteil der vitalen Zellen auf 48%, der Teil der apoptotischen Zellen steigt auf Werte von 23%, der Teil der nekrotischen Zellen auf Werte bis 25% an. Bei weiterer Hitzezufuhr auf 62,6°C befinden sich weiterhin noch 22% der Zellen in einem vitalen Stoffwechselzustand. 28% der Zellen haben die Apoptose eingeleitet und knapp die Hälfte der Zellen sind nekrotisch. Bei der Endtemperatur von 92,7°C steigt der nekrotische Anteil der Zellen auf 98%.

3.3.5 FACS-Analyse rVCaP + Finasterid

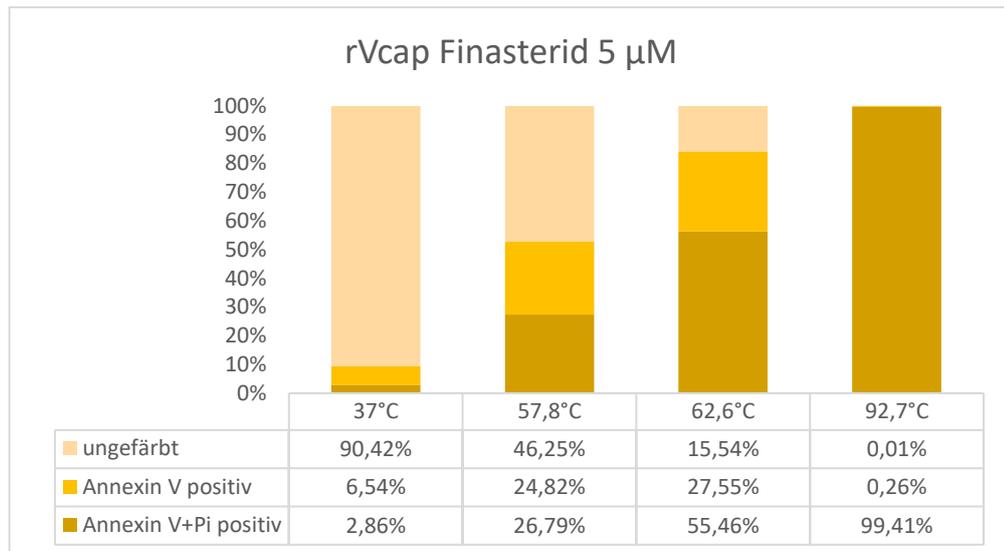


Abbildung 30: FACS-Analyse rVCaP mit Finasterid 5 µM

In Abbildung 30 ist die FACS-Analyse der Zellreihe rVCaP mit medikamentöser Vorbehandlung mit 5 µM Finasterid gezeigt. Bei der Ausgangstemperatur von 37°C sind 90% der Zellen vital, 7% der Zellen in Apoptose und 3% der Zellen in Nekrose. Bei einer Steigerung der Temperatur auf 57,8°C fällt der vitale Anteil der Zellen auf 46% ab, der apoptotische Anteil steigt auf 25%, der nekrotische Anteil auf 27%. Bei 62,6°C lässt sich in 16% der Zellen eine Stoffwechselfitalität nachweisen, 28% der rVCaP Zellen haben die Apoptose eingeleitet, 55% der Zellen sind tot. Bei 92,7°C steigt der Anteil der toten Zellen auf 99%.

3.3.6 FACS-Analyse rVCaP + Bicalutamid

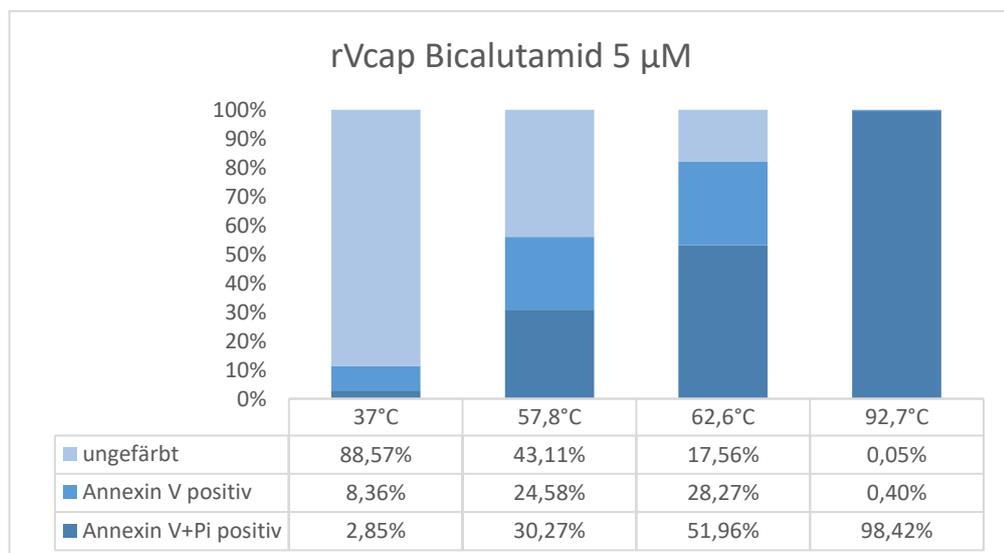


Abbildung 31: FACS-Analyse rVCaP mit Bicalutamid 5 µM

In Abbildung 31 ist die Auswertung der Durchflusszytometrie der Zellreihe rVCaP mit medikamentöser Vorbehandlung durch 5 μ M Bicalutamid dargestellt. Bei 37°C sind knapp 89% der Zellen vital, 8% der Zellen befinden sich in Apoptose, 3% der Zellen in Nekrose. Bei 57,8°C sinkt die Vitalitätsrate auf 43% ab, der apoptotische Anteil der Zellen steigt auf 25%, ebenso der nekrotische Anteil mit Werten um die 30%. Bei Erhöhung der Hitzezufuhr auf 62,6°C liegt der Anteil der vitalen Zellen bei 18%, 28% der Zellen haben die Apoptose eingeleitet, 52% der Zellen sind tot. Bei der Endtemperatur von 92,7°C sind 98% der Zellen nekrotisch.

3.3.7 FACS-Analyse VCaP

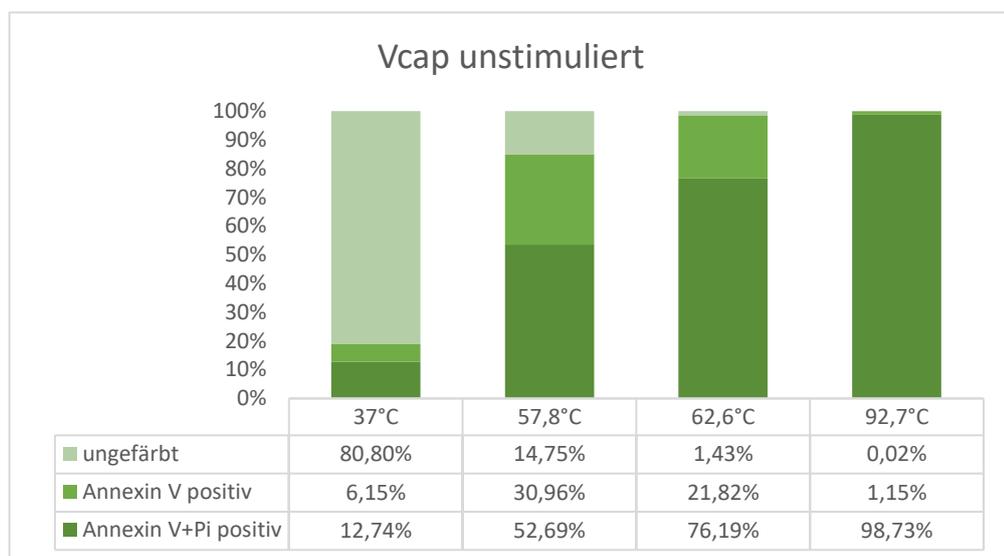


Abbildung 32: FACS-Analyse VCaP unstimuliert

In Abbildung 32 ist die Auswertung der Durchflusszytometrie der unbehandelten Zellreihe VCaP dargestellt. Bei einer Ausgangstemperatur von 37°C zeigen sich 81% der Zellen vital, 6% der Zellen in einem apoptotischen, 13% der Zellen in einem nekrotischen Stoffwechselzustand. Bei Erhitzung der Zellen auf 57,8°C sinkt der Vitalitätsanteil auf 15%, der apoptotische Zellanteil steigt auf 31%, ebenso steigt der nekrotische Anteil der Zellen auf Werte von 53%. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur sind noch 1% der Zellen vital, 22% der Zellen sind apoptotisch, 76% der Zellen nekrotisch. Der nekrotische Zellanteil steigt bei der Endtemperatur von 92,7°C weiter auf 99%.

3.3.8 FACS-Analyse VCaP + Finasterid

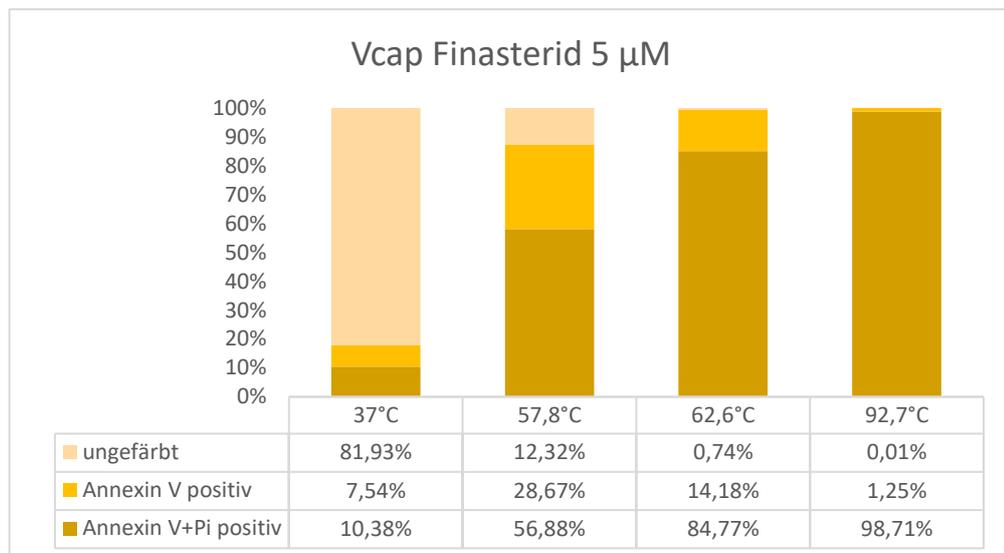


Abbildung 33: FACS-Analyse VCaP mit Finasterid 5 μ M

In Abbildung 33 ist die FACS-Analyse der mit 5 μ M Finasterid vorbehandelten VCaP Zellen aufgezeigt. Hierbei beträgt die Vitalitätsrate bei 37°C 82%, 8% der Zellen befinden sich in Apoptose, 10% der Zellen sind bereits tot. Bei 57,8°C befinden sich 12% der Zellen in einem vitalen Zellzustand, 29% der Zellen sind in Apoptose und 57% in Nekrose. Bei weiterer Hitzezufuhr zeigen sich unter 1% der Zellen vital, 14% der Zellen apoptotisch und 85% der Zellen nekrotisch. Bei der Endtemperatur von 92,7°C sind nahezu alle Zellen mit Werten von 99% in Nekrose.

3.3.9 FACS-Analyse VCaP + Bicalutamid

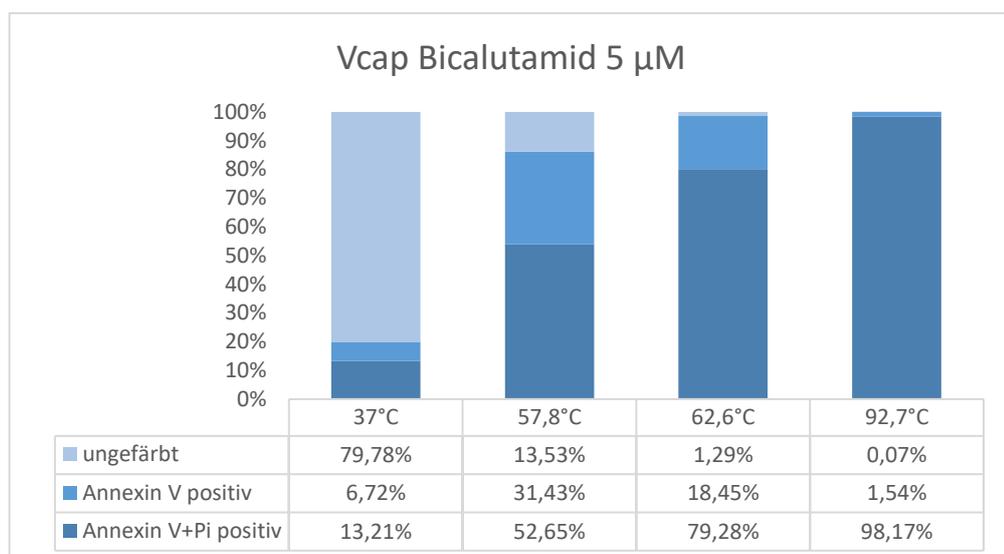


Abbildung 34: FACS-Analyse VCaP mit Bicalutamid 5 μ M

In Abbildung 34 ist das Auswertungsdiagramm der Durchflusszytometrie der Zellreihe VCaP, stimuliert mit 5 μM Bicalutamid, dargestellt. Im Balken ganz links zeigen sich bei der niedrigsten Temperatur von 37°C 80% der Zellen vital. 7% der Zellen sind in Apoptose, 13% der Zellen bereits tot. Bei Erhöhung der Temperatur auf 57,8°C sinkt die Vitalität der Zellen auf Werte unter 14%, 31% der Zellen haben die Apoptose eingeleitet, 53% der Zellen sind in Nekrose. Bei der nächsten Temperaturabstufung von 62,6°C zeigen sich 1% der Zellen vital, die Apoptoserate steigt auf 18%, die Nekroserate auf 79%. Bei der höchsten Temperatur von 92,7°C im rechten Balken sind kaum vitale Zellen nachzuweisen, 2% der Zellen befinden sich in Apoptose, 98% der Zellen sind tot.

3.3.10 FACS-Analyse 22Rv1

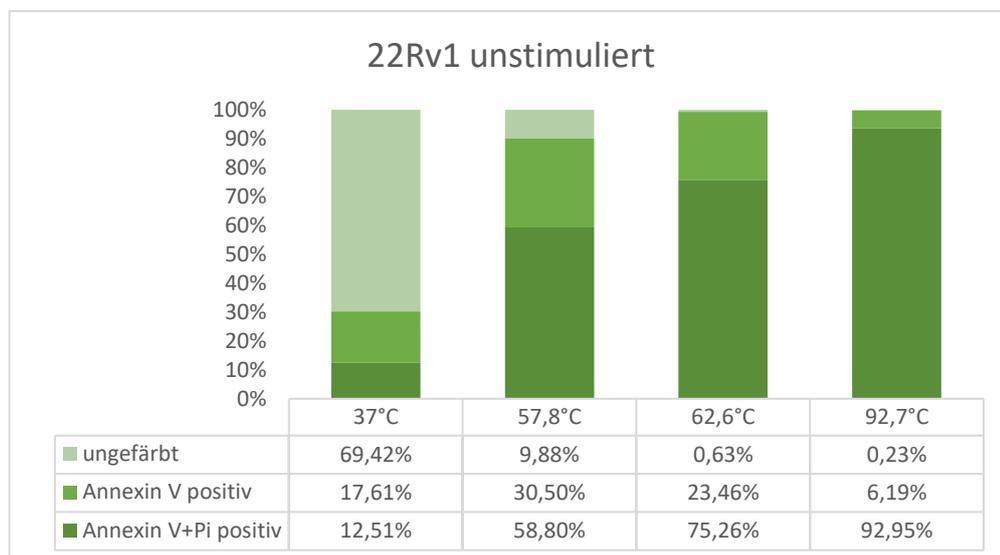


Abbildung 35: FACS-Analyse 22Rv1 unstimuliert

In Abbildung 35 ist die FACS-Analyse der unstimulierten 22Rv1 Zellreihe abgebildet. Bei der Anfangstemperatur von 37°C befinden sich 69% der Zellen in einem vitalen Stoffwechselzustand, 18% sind in Apoptose, 13% bereits nekrotisch. Bei Erhöhung der Temperatur auf 57,8°C sinkt die Vitalität der Zellen auf 10%. 31% der Zellen leiten den Zelltod ein, 59% der Zellen sind gestorben. Bei weiterer Hitzezufuhr auf 62,6°C ist eine Vitalität nur noch bei unter 1% der Zellen nachweisbar. 23% der Zellen befinden sich in Apoptose und 75% der Zellen in Nekrose. Dieser Anteil steigt bei 92,7°C weiter auf 93% der Zellen, 6% der Zellen sind weiterhin apoptotisch.

3.3.11 FACS-Analyse 22Rv1 + Finasterid

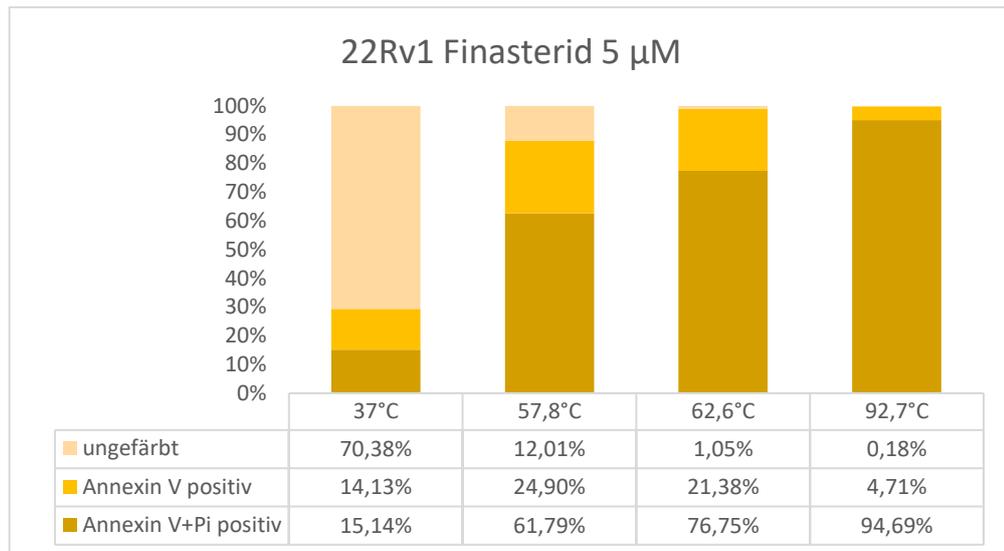


Abbildung 36: FACS-Analyse 22Rv1 mit Finasterid 5 μ M

In Abbildung 36 ist die Durchflusszytometrie der Zellreihe 22Rv1 unter medikamentöser Vorbehandlung mit 5 μ M Finasterid aufgezeigt. Bei 37°C zeigen sich 70% der Zellen vital, 14% der Zellen in Apoptose sowie 15% der Zellen in Nekrose. Bei 57,8°C sinkt der Vitalitätsanteil auf 12% ab, der apoptotische Anteil steigt auf 25%, der nekrotische Anteil auf 62%. Bei Erhöhung der Temperatur auf 62,6°C sinkt der Anteil stoffwechselaktiver Zellen weiter ab auf Werte von 1%, während der nekrotische Anteil auf 77% der Zellen wächst. Die übrigen 21% befinden sich im Stadium der Apoptose. Bei der höchsten Temperatur von 92,7°C sind 95% der Zellen tot, die übrigen 5% der Zellen haben den Zelltod eingeleitet.

3.3.12 FACS-Analyse 22Rv1 + Bicalutamid

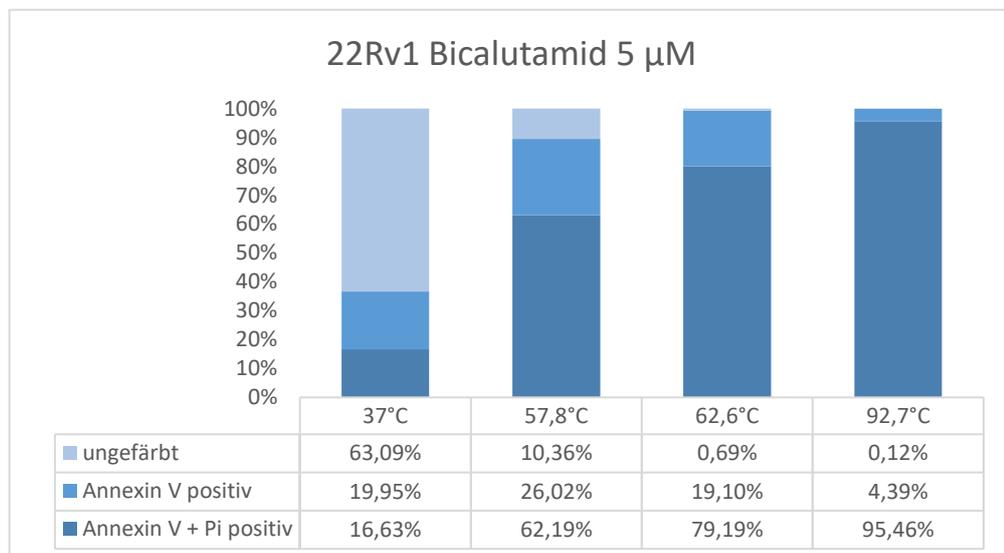


Abbildung 37: FACS-Analyse 22Rv1 mit Bicalutamid 5 μ M

In Abbildung 37 ist die FACS-Analyse der Zellreihe 22Rv1 unter medikamentöser Vorbehandlung mit 5 μM Bicalutamid dargestellt. Im Balkendiagramm zeigen sich bei 37°C 63% der Zellen vital, 20% der Zellen in Apoptose, 17% der Zellen in Nekrose. Der vitale Anteil der Zellen sinkt bei 57,8°C auf 10% ab, während der apoptotische Anteil auf 26%, der nekrotische Anteil auf 62% ansteigt. Bei weiterer Hitzezufuhr auf 62,6°C sinkt der stoffwechselaktive Zellanteil auf unter 1%, 19% der Zellen haben die Apoptose eingeleitet, 79% der Zellen sind bereits tot. Bei der finalen Temperatur von 92,7°C zeigen sich 95% der Zellen in Nekrose und 4% der Zellen in Apoptose, der Anteil der vitalen Zellen liegt bei unter 1%.

3.3.13 FACS-Analyse PC-3

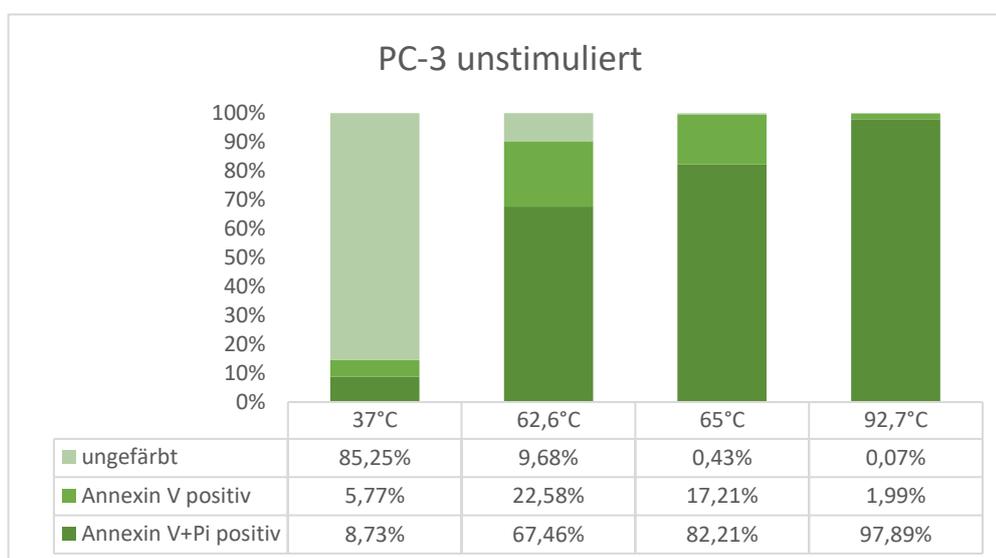


Abbildung 38: FACS-Analyse PC-3 unstimuliert

In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der unstimulierten Zellreihe PC-3 ausgewertet. Es zeigen sich bei der Ausgangstemperatur von 37°C 85% der Zellen vital, 6% der Zellen apoptotisch und 9% der Zellen nekrotisch. Bei Erhöhung der Temperatur auf 62,6°C kann bei 10% der Zellen noch ein vitaler Stoffwechselzustand nachgewiesen werden, während 23% der Zellen bereits die Apoptose eingeleitet haben. 67% der Zellen sind bei dieser Temperatur nekrotisch. Bei weiterer Hitzezufuhr auf 65°C sinkt der Anteil vitaler Zellen auf unter 1% ab, 17% der Zellen sind in Apoptose, 82% der Zellen in Nekrose. Bei der höchsten Temperatur von 92,7°C steigt der Anteil nekrotischer Zellen auf 98% an, die übrigen 2% befinden sich weiterhin in Apoptose.

3.3.14 FACS-Analyse PC-3 + Finasterid

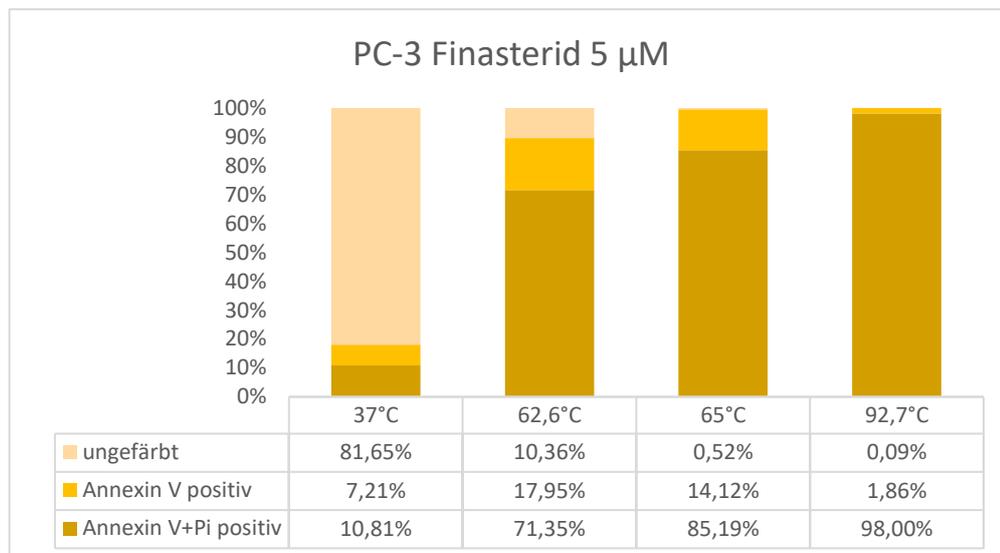


Abbildung 39: FACS-Analyse PC-3 mit Finasterid 5 μ M

In Abbildung 39 ist die FACS-Analyse der Zellreihe PC-3 unter medikamentöser Vorbehandlung mit 5 μ M Finasterid dargestellt. Hierbei zeigen sich bei 37°C 82% vitale Zellen, 7% apoptotische Zellen sowie 11% nekrotische Zellen. Bei Erhöhung der Temperatur auf 62,6°C sind 10% der Zellen vital, 18% apoptotisch und 71% nekrotisch. Bei der nächsten Temperaturabstufung von 65°C sinkt der vitale Anteil der Zellen unter 1%, der apoptotische Anteil sinkt ebenfalls auf Werte von 14%, der nekrotische Anteil steigt auf 85% aller Zellen an und befindet sich bei 92,7°C bei 98%. Die übrigen 2% der Zellen sind in Apoptose.

3.3.15 FACS-Analyse PC-3 + Bicalutamid

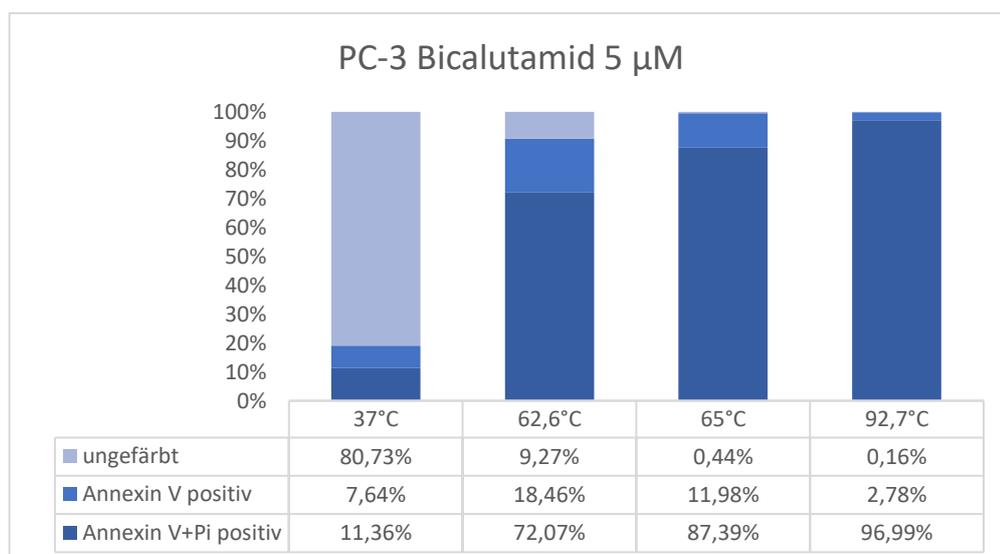


Abbildung 40: FACS-Analyse PC-3 mit Bicalutamid 5 μ M

In Abbildung 40 ist die Auswertung der Durchflusszytometrie der Zellreihe PC-3 unter medikamentöser Vorbehandlung mit 5 μ M Bicalutamid dargestellt. Hierbei befinden sich bei 37°C 81% der Zellen in einem vitalen Stoffwechselzustand, 8% der Zellen in Apoptose sowie 11% der Zellen in Nekrose. Bei 62,6°C sinkt der Wert vitaler Zellen auf 9% ab, während der Anteil apoptotischer Zellen auf 18%, der Anteil nekrotischer Zellen auf 72% steigt. Bei weiterer Hitzezufuhr auf 65°C sind kaum mehr vitale Zellen nachzuweisen, weitere 12% der Zellen sind apoptotisch, 87% der Zellen sind tot. Bei der höchsten und zuletzt getesteten Temperatur von 92,7°C sind noch 3% der Zellen in Apoptose während 97% der Zellen keine Vitalität mehr nachweisen.

3.3.16 Zusammenfassung FACS-Analysen

Ziel der FACS-Analysen war es, die Ergebnisse der MTS-Tests zu verifizieren. Die MTS-Tests ließen auf keine Änderung der Hitzesensitivität im Sinne einer veränderten Stoffwechselaktivität der Zellen durch eine medikamentöse Stimulation schließen. In der FACS-Analyse wurde direkt die Vitalität sowie die Apoptose- und Nekroserate der Zellen nach Hitzeinduktion mit und ohne medikamentöse Stimulation gemessen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse soll nachfolgend Tabelle 16 illustrieren:

Tabelle 16: FACS-Analysen im Vergleich: Die Tabelle ist in sieben Spalten gegliedert. In der linken Spalte sind die Temperaturen aufgetragen, mit welchen die Zellen vor der FACS-Analyse erhitzt wurden. In der nächsten Spalte ist die Stimulation der Zellen aufgeführt. Jede Zellgruppe wurde unbehandelt sowie nach Vorbehandlung mit 5 μM Finasterid und 5 μM Bicalutamid untersucht. In den übrigen fünf Spalten ist, aufgeteilt nach Zellreihe, der Anteil an vitalen, also Annexin V und Pi negativ gefärbten Zellen nach Erhitzung mit der jeweiligen Temperatur abgebildet. Rot hervorgehobene Werte entsprechen einem signifikant höheren Anteil an gefärbten Zellen einer Zellreihe bei einer bestimmten Temperatur im Vergleich zu den übrig getesteten Zellreihen.

°C	Stimulation	BPH-1	rVCaP	VCaP	22Rv1	PC-3
37°C	unbehandelt	86%	91%	81%	69%	85%
	Finasterid 5 μM	84%	90%	82%	70%	82%
	Bicalutamid 5 μM	82%	89%	80%	63%	80%
57,8°C	unbehandelt	30%	48%	15%	10%	/
	Finasterid 5 μM	22%	46%	12%	12%	/
	Bicalutamid 5 μM	24%	43%	14%	10%	/
62,6°C	unbehandelt	4%	22%	1%	1%	10%
	Finasterid 5 μM	5%	16%	1%	1%	10%
	Bicalutamid 5 μM	3%	18%	1%	1%	9%
65°C	unbehandelt	/	/	/	/	0,4%
	Finasterid 5 μM	/	/	/	/	0,5%
	Bicalutamid 5 μM	/	/	/	/	0,4%
92,7°C	unbehandelt	0,03%	0,01%	0,02%	0,2%	0,07%
	Finasterid 5 μM	0,04%	0,01%	0,01%	0,2%	0,09%
	Bicalutamid 5 μM	0,08%	0,05%	0,07%	0,1%	0,2%

Betrachtet man obenstehende Tabelle fällt auf, dass sich die Vitalitätswerte der unstimulierten und stimulierten Zellen innerhalb einer Zellreihe und bezogen auf die jeweils zuvor erhitzte Temperatur in keiner der Zellreihen signifikant unterscheiden. Bei 37°C zeigt sich der größte Unterschied der Vitalität bei der Zellreihe 22Rv1 mit 7%. Bei 57,8°C liegt der größte Unterschied der Vitalität bei der Zellreihe BPH-1 mit 8%. Bei 62,6°C liegt der größte Unterschied bei der Zellreihe rVCaP mit 6%. Alle übrigen Vergleiche zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen ergeben maximale Vitalitätsunterschiede von $\leq 5\%$. Diese Ergebnisse lassen also ebenfalls darauf schließen, dass eine medikamentöse Vorbehandlung der Zellen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 mit Finasterid oder Bicalutamid keine Änderung der Hitzesensitivität der Zellen nach sich zieht.

Rot hervorgehoben wurden die gemessenen Vitalitätswerte der Zellreihe rVCaP bei 57,8°C und 62,6°C sowie die gemessenen Vitalitätswerte der Zellreihe PC-3 bei 62,6°C. Im Vergleich zu den übrigen Zellreihen zeigt die Zellreihe rVCaP bei 57,8°C mit 43-48% vitalen Zellen die mit Abstand höchsten Vitalitätswerte. Auch bei 62,6°C sinkt die Vitalität bis maximal

16% ab. Die Zellreihen BPH-1, VCaP und 22Rv1 zeigen bei 62,6°C allesamt Vitalitätswerte von maximal 5%. Nur die Zellreihe PC-3 scheint ebenfalls einen größeren Anteil an vitalen Zellen zwischen 9-10% bei 62,6°C aufzuweisen.

4 Diskussion

Die Zielsetzung der Arbeit bestand darin, die thermische Komponente einer möglichen fokalen Therapie (zum Beispiel der HIFU-Therapie) in der Behandlung des Prostatakarzinoms *in vitro* zu simulieren. Es wurde untersucht, ob die Vorbehandlung von Prostatakrebszellen durch die Medikamente Finasterid und Bicalutamid eine Auswirkung auf deren Stoffwechsellaktivität bzw. Vitalität unter Hitze einwirkung zeigt. Diese Annahme konnten wir negieren. Keine der fünf untersuchten Zellreihen zeigte nach der Hitzezugabe einen signifikanten Reaktionsunterschied zwischen nicht-medikamentös und medikamentös vorbehandelten Zellen. Allerdings konnten durch die Anfertigung der einzelnen Hitzeprofile der fünf Zellreihen intraindividuelle Unterschiede der Zellreihen in ihrer Reaktion auf eine Hitzezugabe herausgearbeitet werden.

Der Einsatz von Hitze über das physiologische Maß hinaus nimmt in mehreren Fachgebieten der Medizin als Therapieoption einen wichtigen Stellenwert ein. Nicht nur im Bereich der malignen Erkrankungen, auch in der Kardiologie zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen oder in der Neurologie zur Therapie der Parkinsonerkrankung wird die Hyperthermie angewandt (Rossmanna und Haemmerich 2014). Eine Kombination aus Hyperthermie und medikamentöser Therapie erreicht in der Krebsforschung mehr und mehr an Interesse: Einer der Hauptgründe ist die verbesserte Technologie, die eine lokale und regionale Hitzeapplikation überhaupt erst ermöglicht. Die generelle Akzeptanz, lokal begrenzte Tumore mittels multimodalen Therapiestrategien zu behandeln und damit eine lokale Kontrolle über den Krebs sowie eine Abwendung von Fernmetastasen zu erzielen, steigert sich (Falk und Issels 2001). Es wurde in experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen, dass durch Hitzeapplikation eine verstärkte Wirkung einiger Chemotherapeutika erreicht werden kann (Issels 2008). Eine Begründung hierfür ist die verbesserte Membranpermeabilität, welche die Penetration von gewissen Medikamenten in die Zelle begünstigt (Ponce et al. 2006). Die genannten Untersuchungen und Erfolge unterstreichen die Wichtigkeit der weiteren Forschung in diesem Gebiet sowie die Zielsetzung dieser Dissertation.

4.1 Hyperthermie

Der erste Teil eines jeden Versuches in dieser Arbeit bestand darin, die thermische Komponente der fokalen Therapie *in vitro* zu simulieren. Hierfür wurden die Zellen in einem Thermozykler auf Temperaturen zwischen 37-100°C erhitzt. Die Zellen wurden im Thermozykler für fünf Sekunden auf 37°C vorgeheizt und der Zieltemperatur für zehn Sekunden ausge-

setzt. Danach erfolgte die Abkühlung bis 37°C für weitere fünf Sekunden. Die Temperatursteigerung und Temperatursenkung wurde mit einer Rampenrate von 3,5°C/s durchgeführt. In den nachfolgenden Kapiteln soll nun zunächst diskutiert werden, inwieweit die Bedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Simulation auf eine fokale Therapie *in vivo*, wie beispielsweise der HIFU Therapie, übertragen werden kann.

4.1.1 Hyperthermie versus Thermoablation

In der Literatur wird zwischen einer reversiblen Zellschädigung durch Hyperthermie (40-45°C) und einem irreversiblen Zelltod bei höheren Temperaturen via Thermoablation oder längerer Expositionsdauer der Hitzeeinwirkung auf die Zellen unterschieden (Goldberg et al. 2000). Eine milde Hyperthermie von 40-45°C kann eine direkte Tumortoxizität, eine Radiosensitivität, beispielweise in der Behandlung von Tumoren der Brust, sowie einen verbesserten Blutfluss im Tumorgebiet bewirken. Dies wiederum kann eine bessere Medikamentenwirkung im Bereich des Karzinoms fördern, wie es in Weichgewebssarkomen gezeigt werden konnte (Zagar et al. 2010; Issels et al. 2010; Hildebrandt 2002). Langzeitergebnisse zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms mit einer Kombination aus Radiotherapie und Hyperthermie mit Temperaturen zwischen 37,5°C und 45,9°C liefern vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben (Hurwitz et al. 2011). *In vivo* Studien zeigen eine verstärkte Aufnahme von Doxorubicin in Prostatakarzinomen von Mäusen durch eine modifizierte, impulsartige fokussierte Ultraschalltherapie mit Temperaturen < 42°C (Chen et al. 2012). Eine dreifache Kombination aus fokussiertem Ultraschall, Docetaxel-Gabe und Radiotherapie hemmte das Tumorwachstum in Mausprostate stärker als eine zweifache Kombination bzw. jede Therapieform für sich allein. In diesen *in vivo* Versuchen wurden ebenfalls hyperthermische Temperaturen < 42°C angestrebt (Mu et al. 2012). Die Kombination üblicher Prostatakarzinomtherapien mit Hyperthermie bildet also einen zentralen Punkt in der Forschung der Krebstherapie und unterstützt die Idee dieser Arbeit, einen möglichen Effekt von Hitze im Zusammenhang mit einer Androgendeprivation zu untersuchen.

Die eben beschriebene Studien beziehen sich auf hyperthermische Temperaturen. Höhere Temperaturen zwischen 60-100°C, wie sie in dieser Arbeit zusätzlich untersucht wurden, sorgen für eine nahezu sofortige Induktion von Proteinkoagulation mit nachfolgender Schädigung zytosolischer und mitochondrialer Enzyme (Goldberg et al. 2000). Diese Temperaturen entsprechen der Simulation der HIFU-Therapie, da während des Verfahrens Spitzentemperaturen von 70-100°C in der Zielläsion erreicht werden können (Chaussy und Thüroff 2017).

In dieser Arbeit wurde daher für die MTS-Tests eine Temperaturspannweite zwischen 37°C und 100°C gewählt, um einen möglichen Einfluss der zur Androgendeprivation eingesetzten Medikamente Finasterid und Bicalutamid sowohl im hyperthermischen als auch im thermoablativen Bereich auszuarbeiten. Zunächst wurden die MTS-Tests mit unstimulierten Zellen und einer sehr engen Temperaturabstufung durchgeführt, um individuelle Hitzeprofile der Zellreihen zu erstellen, welche in späteren Kapiteln der Diskussion genauer betrachtet werden. In den daraufhin durchgeführten MTS-Tests mit medikamentöser Stimulation der Zellen konnte weder im hyperthermischen noch im thermoablativen Bereich ein Unterschied in der Stoffwechselaktivität der unstimulierten und stimulierten Zellen nach Hitzeexposition gezeigt werden.

4.1.2 Hyperthermische Ablationszonen der HIFU-Therapie

Nachdem im MTS-Test zwischen 37-100°C keine Änderung der Stoffwechselaktivität auf die Hitzeeinwirkung durch eine medikamentöse Behandlung mit Finasterid oder Bicalutamid gezeigt werden konnte, wurde als nächster Schritt die Vitalität der unstimulierten und stimulierten Zellen nach Erhitzung mittels FACS-Analyse untersucht, um die Ergebnisse der MTS-Tests zu verifizieren. Hierbei wurde sich auf vier Temperaturen konzentriert. Für jede Zellreihe wurde 37°C als niedrigste Temperatur gewählt. Als Hyperthermie werden Temperaturen > 40°C beschrieben, als Hypothermie Temperaturen < 35°C (Gomez 2014). 37°C spiegeln folglich die normale Körpertemperatur wider und erlauben somit auch einen Rückschluss auf einen potenziellen Effekt der Medikamente bei Körpertemperatur. 92,7°C wurde als höchste Temperatur gewählt, da die meisten HIFU-Geräte versuchen Temperaturen von 90-100°C in der Zielregion zu erreichen (Diederich 2005). In anderen Quellen werden Zieltemperaturen von 80°C für den Fokuspunkt in der Indexläsion beschrieben (Rouvière et al. 2007).

Die Hitzeverteilung um den Fokuspunkt herum erfolgt exzentrisch. Es werden verschiedene Zonen der hyperthermischen Ablation unterschieden. Bei Temperaturen > 50°C wird eine Koagulationsnekrose der Zellen beobachtet: die Zellmembran kollabiert, Proteine denaturieren, Proteinaktivitäten kommen zum Stillstand und mitochondriale Dysfunktionen treten auf. Bei Temperaturen zwischen 41-45°C treten weiterhin hitzeinduzierte Schäden auf, jedoch sind diese Schäden subletal und potenziell reversibel. Diese Zone wird als periphere Zone oder Transitionszone beschrieben. Es finden sich dort sowohl geschädigte Zellen als auch vitale Zellen (Chu und Dupuy 2014). Verständlicherweise ist somit die äußere Grenze der Gewebszerstörung in der HIFU-Therapie in einem Bereich zwischen 50-54°C definiert (Diederich 2005). Diese Temperatur wurde auch in weiteren Studien als diejenige Temperatur genannt, die einen akuten thermischen Schaden im Sinne einer Koagulationsnekrose

in verschiedenen Geweben auslöst (Puccini et al. 2003; Graham et al. 1999). In MRT-gestützten Echtzeitmessungen des thermischen Abbildes nach transurethraler Ultraschalltherapie der Prostata sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen wurden ebenfalls 55°C als Zieltemperatur an den Grenzen der zu behandelnden Läsion gewählt (Klotz et al. 2021; Chopra et al. 2012; Chopra et al. 2009; Siddiqui et al. 2010). Die Zonen der hyperthermischen Ablation sollen vereinfacht anhand Abbildung 41 verdeutlicht werden:

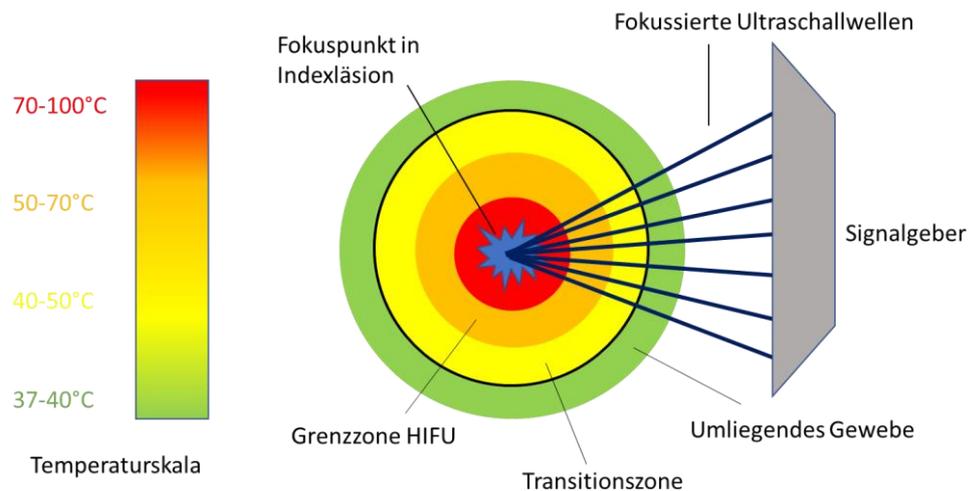


Abbildung 41: Darstellung hyperthermischer Ablationszonen der HIFU-Therapie: In der linken Bildhälfte zeigt sich die Temperaturskala, welche farblich gekennzeichnet zwischen 37°C im grünen Bereich und 100°C im roten Bereich liegt. In der rechten Bildhälfte wird die Fokussierung der Ultraschallwellen dargestellt, welche im Zentrum der Energiefokussierung zu einer maximalen Temperatur von 70-100°C führt und in exzentrischer Anordnung abkühlt, um in der Grenzzone der HIFU-Therapie > 50°C zu erreichen. Bis zu dieser Temperatur findet eine Koagulationsnekrose der Zellen statt. In der Transitionszone zwischen 40-50°C sind die Temperaturen subletal, der thermische Schaden ist potenziell reversibel. Im umliegenden Gewebe wird eine Temperatur zwischen 37-40°C erreicht.

In den Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP und 22Rv1 ist in den MTS-Tests die Stoffwechselaktivität bei 57,8°C erstmals auf < 30% gefallen, in der Zellreihe PC-3 bei 62,6°C. Aus diesem Grund wurde sich für die FACS-Analyse jeweils für diese Temperatur sowie eine Temperaturabstufung höher entschieden. In Zusammenschau wurden also für die Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP und 22Rv1 die Temperaturen 37°C, 57,8°C, 62,6°C und 92,7°C und für die Zellreihe PC-3 die Temperaturen 37°C, 62,6°C, 65°C und 92,7°C gewählt, um die Vitalität der Zellen zu untersuchen. Diese Temperaturen repräsentieren somit ungefähr die Temperaturen im Fokuspunkt, der Grenzzone und des umliegenden Gewebes in der HIFU-Therapie *in vivo*.

In allen Zellreihen, sowohl ohne als auch mit medikamentöser Stimulation, konnte bei einer maximalen Temperatur von 92,7°C, welche die Temperatur im Fokuspunkt der HIFU-Behandlung *in vivo* widerspiegelt, eine Vitalität der Zellen in der FACS-Analyse < 0,2% gemessen werden. Dies entspricht dem Ziel der HIFU-Therapie. Interessant sind die Vitalitätswerte der Temperaturen zwischen 57,8°C und 65°C, welche die Grenzzone in der *in vivo* Anwendung repräsentieren. Wie bereits erwähnt soll ab 50°C eine Koagulationsnekrose auftreten, ab einer Temperatur von > 56°C scheint eine einsekündige Exposition auszureichen, um in der HIFU-Therapie einen sofortigen Zelltod zu induzieren (Chu und Dupuy 2014; Kennedy 2005). Aus diesem Grund wird in der *in vivo* Anwendung die Grenze zwischen behandelten und unbehandelten Geweben bei dieser Temperatur definiert (Siedek et al. 2019).

Unsere Ergebnisse widersprechen dieser Aussage. In der Zellreihe BPH-1 waren bei 57,8°C noch 22-30% der Zellen vital, in der Zellreihe rVCaP 43-48%. In den Zellreihen VCaP und 22Rv1 konnte bei 57,8°C ein Anteil an vitalen Zellen zwischen 10-15% gemessen werden und in der Zellreihe PC-3 waren 9-10% der Zellen bei einer Temperatur von 62,6°C noch vital. Diese Vitalitätswerte würden eher in der Transitionszone bei Temperaturen zwischen 41-45°C erwartet werden, da hier nachgewiesen nicht alle Zellen vom thermischen Schaden betroffen sind. Überträgt man diese Vitalitätswerte auf die HIFU-Behandlung *in vivo*, würde daraus ein Therapieversagen resultieren, da die Krebszellen in der Grenzzone weiterhin lebendig wären. Hinzu kommt, dass *in vivo* aufgrund des Temperaturverlustes durch den bestehenden Blutstrom, welcher auch als „*Heat Sink* -Effekt“ bezeichnet wird, von Beginn an tendenziell höhere Temperaturen appliziert werden müssten, um die finale Zieltemperatur im Gewebe zu erreichen (Zorbas und Samaras 2015).

Ebenfalls interessant in diesem Zusammenhang ist die bereits erwähnte transurethrale Ultraschalltherapie der Prostata. 2015 wurde die klinische Phase I Studie „Magnetic Resonance Imaging–Guided Transurethral Ultrasound Ablation (MRI-TULSA)“ veröffentlicht. Hierbei wird minimalinvasiv durch die Harnröhre die gesamte Prostata auf $\geq 55^\circ\text{C}$ erhitzt, um das Prostatagewebe durch thermische Koagulation abzutragen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode bei Patienten mit niedrig malignem Prostatakarzinom sicher und nebenwirkungsarm eingesetzt werden kann und eine gute Lebensqualität erreicht wird. Allerdings konnte 12 Monate post interventionem in den durchgeführten Prostatabiopsien in 55% der Fällen erneut ein Prostatakarzinom nachgewiesen werden, hiervon in 31% der Fällen ein klinisch signifikantes Karzinom (Chin et al. 2016). In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen könnte der Grund der überlebenden Zellen in diesem Bereich einer zu geringen Erhitzung der Zellen zugeschrieben werden. In der MRI-TULSA Studie wird der Grund der Rezidive jedoch vor allem in einem zu hohen Sicherheitsabstand zur Prostatakapsel hin

gesehen, sodass die häufig in der Peripherie gelegenen malignen Zellen während der Therapie nicht erreicht und somit nicht zerstört werden können (Klotz et al. 2021; Chin et al. 2016).

4.1.3 Expositionszeit und Rampenrate

Ein Grund für die Abweichung unserer Messergebnisse könnte die Expositionszeit der Hitze auf die Zellen sein, welche im Folgenden genauer erläutert wird.

In der HIFU-Behandlung *in vivo* unterscheidet sich die Zeitdauer bis zum Erreichen der Zieltemperatur im Fokuspunkt je nach Gerät und liegt in Bereichen zwischen 10-20 Sekunden (Diederich 2005). In unserem Studiendesign wurden die Zellen der jeweiligen Zieltemperatur für zehn Sekunden ausgesetzt, dies entspricht damit der gleichen Expositionszeit wie in der HIFU-Behandlung *in vivo*.

Der Bereich der Gewebszerstörung in der HIFU-Therapie der Prostata misst circa 1-3 mm in der Weite und 5-20 mm in der Höhe. Um also den kompletten Tumor zu zerstören, ist es nötig, den Fokuspunkt Schritt für Schritt zu versetzen, um die notwendigen Temperaturen in der gesamten Krebsformation zu erreichen (Rouvière et al. 2007). Diese mechanische Bewegung des Fokuspunktes durch das gesamte Volumen des Prostatakarzinoms ist aktuell die gängigste Methode (Wang und Zhou 2016). Zum besseren Verständnis soll diese Fokussierungsstrategie in Abbildung 42 vereinfacht aufgezeigt werden:

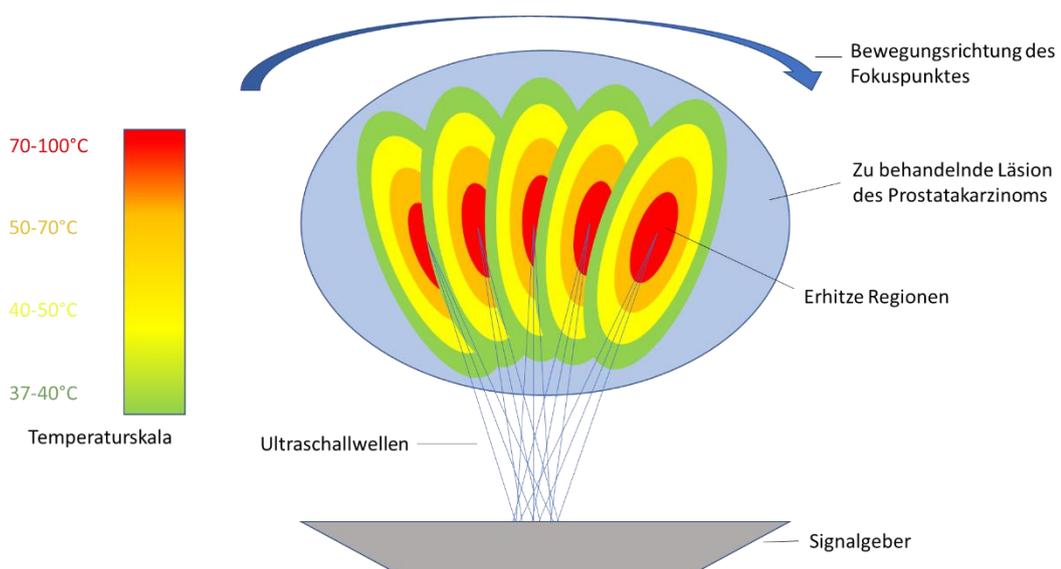


Abbildung 42: Vereinfachte Darstellung der Fokussierungsstrategie der HIFU-Therapie: Um die zu behandelnde Läsion des Prostatakarzinoms in ihrer Gesamtheit zu erfassen, muss der Fokuspunkt (Zusammentreffen der Ultraschallwellen) bewegt werden. In der linken Bildhälfte ist die Temperaturskala angegeben, um die Temperaturverteilung in den erhitzten Regionen darzustellen. In der

rechten Bildhälfte fokussiert der Signalgeber Ultraschallwellen, welche sich im Zentrum einer erhitzten Region bündeln und Kerntemperaturen von 70-100°C erreichen. In der Umgebung des Fokuspunktes werden in exzentrischer Ordnung niedrigere Temperaturen zwischen 37-70°C erzeugt. Der Fokuspunkt und damit die erhitzte Region wandert nun nach rechts, um möglichst die gesamte Läsion zu behandeln. Dies hat zur Folge, dass sich sowohl die Grenzzonen als auch die Transitionszonen der erhitzten Regionen überlappen und somit die Zellen für eine längere Zeit als 10-20 Sekunden den erhöhten Temperaturen ausgesetzt werden.

Wie in Abbildung 42 zu erkennen ist überschneiden sich die erhitzten Regionen, wenn der Fokuspunkt über die gesamte Läsion Schritt für Schritt bewegt wird. Dies hat zur Folge, dass die Zellen der Grenz- und Transitionszone nicht nur für 10-20 Sekunden während einer Ultraschallbestrahlung der Hitze ausgesetzt werden und danach abkühlen, sondern dass die Zellen bei Bewegung des Fokuspunktes weiterhin mit erhöhten Temperaturen exponiert werden. Diese Dynamik in der Erhitzung und Abkühlung der Zellen wurde in dieser Arbeit mittels Rampenrate berücksichtigt.

Wie bereits erwähnt wurde für die HIFU-Simulation eine Rampenrate von 3,5°C/Sekunde genutzt, um die Zellen von 37°C auf die jeweilige Zieltemperatur zu erhitzen und wieder abzukühlen. So ergaben sich beispielsweise für Zellen, die von 37°C auf 57,8°C erhitzt wurden, eine ungefähre Verweildauer von 22 Sekunden im Thermozykler. Für eine Erhitzung der Zellen auf 92,7°C wurden die Zellen für circa 42 Sekunden im Thermozykler behandelt.

Es stellt sich nun die Frage, für wie lange und in welchem Ausmaß das benachbarte Prostatagewebe *in vivo* weiterhin erhöhte Temperaturen erfährt und ob diese Zeit der hier gewählten Rampenrate gleicht. Die Wichtigkeit des Vergleiches der Expositionszeiten zwischen unserem *in vitro* Modell und der *in vivo* HIFU-Behandlung liegt in der thermischen Isoeffektdosis (TID), welche im nachfolgenden Kapitel erläutert wird.

4.1.4 Die thermische Isoeffektdosis (TID)

Es ist belegt, dass das Maß des Zelltodes durch Hyperthermie exponentiell von der Temperaturhöhe sowie der Dauer der Hitzeexposition abhängig ist (Dewhirst et al. 2003). Mittels der TID wird ein Zeit-Temperatur-Verhältnis beschrieben, welches den Zusammenhang zwischen der Expositionsdauer der Hitze und der Temperaturerhöhung widerspiegelt. Zwischen einer Temperaturspannweite von 43-57°C induziert eine Erhöhung der Hitzeexpositionsdauer um den Faktor zwei das gleiche Ausmaß an thermischen Schaden auf eine Zelle wie eine Temperaturerhöhung um 1°C. Die 43°C dienen als Anhaltspunkt, da ab dieser Temperatur wichtige Stoffwechselwege wie Enzymaktivierung, Zelltod und Tumornekrose eingeleitet werden. Bei Temperaturen < 43°C muss sich die Expositionszeit um den Faktor vier

erhöhen, um den gleichen Effekt wie einen Temperaturanstieg um 1°C zu erzielen (ter Haar 2015; Dewey 2009).

Überlappen sich in der *in vivo* HIFU-Behandlung die erhitzten Regionen erhöht sich damit die Expositionszeit der Hitze auf die Zellen. Übersteigt die *in vivo* Expositionszeit unsere *in vitro* Expositionszeit, welche maximal 48 Sekunden für die Erhitzung der Zellen auf 100°C betrug, wäre der thermische Schaden trotz gleicher Temperatur *in vivo* deutlich höher. In einer MRT-gestützten Echtzeitmessung des thermischen Abbildes nach transurethraler Ultraschalltherapie der Prostata bei Hunden wurde während der HIFU-Behandlung alle drei Minuten ein MR-Temperaturbild angefertigt. In diesen Aufnahmen zeigen sich in dieser dreiminütigen Zeitspanne noch Überlappungen der erhitzten Zonen (Siddiqui et al. 2010). Daraus lässt sich die Vermutung ziehen, dass *in vivo* die Expositionszeit der Zellen mit den Temperaturen der Grenz- und Transitionszone signifikant länger ist als in unseren *in vitro* Versuchen.

Vor allem im Temperaturbereich um 55°C, welcher die Grenzzone der HIFU-Therapie darstellt, spielt die TID eine wichtige Rolle. Wie bereits erwähnt wurden circa 22 Sekunden benötigt, um die Zellen im Thermozykler auf eine Temperatur von 57,8°C zu erhitzen und wieder abzukühlen. In der FACS-Analyse ergaben sich hierbei Vitalitätswerte zwischen 10-48% in den Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP und 22Rv1. Nimmt man nun an, dass die Expositionszeit *in vivo* durch die sich während der einzelnen Sequenzen überlappenden Ultraschallbestrahlungen deutlich länger ist, würde dies auch das Maß des thermischen Schadens erhöhen, obwohl die Zellen mit derselben Temperatur erhitzt wurden.

Somit könnte die potenziell unterschiedliche Expositionszeit unserer *in vitro* Behandlung und der *in vivo* Therapie ein Grund für die abweichenden Vitalitätswerte bei 57,8°C darstellen.

4.1.5 Singuläre Anwendung thermischer Effekte

Ein weiterer Grund für die abweichenden Vitalitätswerte bei 57,8°C zwischen unserem *in vitro* HIFU-Modell und der *in vivo* HIFU-Behandlung könnte in der singulären Anwendung der thermischen Effekte liegen. In diesem Versuchsaufbau wurden zur Simulation der HIFU-Therapie die Krebszellen im Thermozykler der Hitze ausgesetzt. Folglich wurden also nur die thermischen Effekte genutzt. Wie bereits in Kapitel 1.2.1.1 - das biophysiological Prinzip der HIFU-Therapie - aufgeführt wurde, setzt sich die Wirkung der HIFU-Therapie aus thermischen und mechanischen Einflüssen zusammen. Die mechanischen Effekte beruhen auf dem Prinzip der Kavitation, welche wiederum eine Schädigung der Zellen bewirken (Chaussy und Thüroff 2011; ter Haar 2015). In der *in vivo* Anwendung sind diese beiden

Effekte schwierig zu trennen. Beispielsweise beeinflusst eine Änderung der Temperatur die Kavitationsschwelle (ter Haar 2015).

4.1.5.1 Einfluss auf Zellviabilität

In einer Studie aus dem Jahr 2016 wurde der Unterschied zwischen der kombinierten Anwendung von mechanischen und thermischen Effekten der HIFU-Therapie mit einer singulären Anwendung thermischer Effekte auf die Viabilität von Prostatakrebszellen untersucht. Hierzu wurde die Zellreihe DU145 mit drei verschiedenen Leistungsabstufungen der HIFU-Therapie behandelt: 4,1 Watt, 8,7 Watt und 12 Watt. Dies entspricht im dreidimensionalen Raum 380 W/cm^2 , 700 W/cm^2 , und 880 W/cm^2 . Zudem wurden die Zellen in einem Wasserbad mit 45°C , 50°C und 60°C erhitzt. Diese Temperaturen sind äquivalent zu den während der jeweiligen HIFU-Behandlung gemessenen Temperaturen. Beide Behandlungen wurden für 30 Sekunden durchgeführt. Gemessen wurde die Viabilität der Zellen nach der Exposition im Wasserbad versus nach HIFU-Therapie mittels Trypanblau-Exklusionstest. Die Ergebnisse erbrachten deutliche Unterschiede: Bei einer Leistung von 4,1 Watt zeigte sich eine Zellviabilität von 26%, bei einer Temperatur von 45°C eine Zellviabilität von 63%. Bei einer Leistung von 8,7 Watt ergab sich eine Viabilität von 9,6% wohingegen bei 50°C noch 49% Zellviabilität gezeigt werden konnte. Bei 12 Watt Leistung zeigte sich eine Viabilität von 5,3%, bei 60°C waren 42% der Zellen viabel (Arora et al. 2016). Der Trypanblau-Exklusionstest basiert auf dem Prinzip, dass eine intakte Zellmembran einer viablen Zelle den Farbstoff Trypanblau ausschließt. Erst bei Zerstörung der Zellmembran kann der Farbstoff die Zelle anfärben und damit nicht-viable Zellen identifizieren (Strober 2015).

Ein Vergleich der Ergebnisse aus der Studie mit den Ergebnissen des MTS-Tests ist nicht möglich, da im MTS-Test die Stoffwechselaktivität der Zellen gemessen wurde und über diese nur indirekt ein Schluss auf die Viabilität gezogen werden kann. Ein Vergleich mit der FACS-Analyse ist jedoch gut durchführbar, da hier mit dem Farbstoff Propidium gearbeitet wurde, der in seiner Wirkweise dem Farbstoff Trypanblau ähnelt (Strober 2015). Betrachtet man die Ergebnisse der FACS-Analyse sind bei $62,6^\circ\text{C}$ in der Zellreihe BPH-1 30% viabel – dies entspricht dem Anteil der ungefärbten und Annexin V positiven Zellen -, in der Zellreihe rVCaP 52%, in der Zellreihe VCaP 23%, in der Zellreihe 22Rv1 24% und in der Zellreihe PC-3 33%. Diese Daten korrelieren ungefähr mit der 42% Viabilität der Zellreihe DU145 bei einer Temperatur des Wasserbades von 60°C in der aufgezeigten Studie, nicht jedoch mit den 5,3% bei einer entsprechenden HIFU-Leistung. Wichtig zu erwähnen sind noch die unterschiedlichen Methoden der Erhitzung, also Erhitzung im Wasserbad versus Erhitzung im Thermozykler, sowie die unterschiedlichen Expositionsdauern mit 30 Sekunden versus zehn Sekunden. Definitiv wurde jedoch durch die Studie deutlich gemacht, dass die HIFU-

Therapie nicht auf die rein thermischen Effekte reduziert werden kann. Die in dieser Arbeit angewandte Simulation der HIFU-Therapie durch den Thermozykler entspricht also nicht dem deutlich komplizierteren Wirkmechanismus der HIFU-Therapie *in vivo*, sodass die gemessenen Vitalitätswerte in unseren Versuchen nur beschränkt auf die HIFU-Therapie *in vivo* übertragen werden können.

4.1.5.2 Einfluss auf Medikamente

Die Wichtigkeit der mechanischen Einflüsse der HIFU-Therapie wurden durch weitere Untersuchungen der Studie von Arora et al. deutlich gemacht. Getestet wurde, ob eine ablativ HIFU-Therapie die Wirkung thermisch getriggert Chemotherapeutika verstärken kann (Arora et al. 2016). Ausgewählt wurde Sorafenib, ein hydrophober, schwer löslicher Tyrosinkinaseinhibitor (Budha et al. 2012). Die kombinierte Anwendung von Tyrosinkinaseinhibitoren mit anderen Chemotherapeutika spielt eine immer wichtigere Rolle in der modernen Krebsbehandlung (Bologna et al. 2011). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die kombinierte Gabe von Sorafenib die Wirksamkeit der singulären Enzalutamid-Therapie im CRPC-Modell im Sinne eines verminderten Tumorwachstums verbesserte (Wu et al. 2017). Um jedoch eine Wirkung hydrophober Chemotherapeutika trotz erschwelter Löslichkeit zu erreichen, müssen hohe Dosen verabreicht werden, welche mit starken Nebenwirkungen einhergehen. Eine Einbringung der Chemotherapeutika in Medikamententräger wie Liposomen – auch genannt Nanomedizin - verstärkt den therapeutischen Benefit und reduziert schädliche Nebenwirkungen. Bringt man die Chemotherapeutika dabei in temperatursensitive Liposomen (TSL) ein, kann die Ausschüttung des Medikamentes thermisch getriggert werden (Escoffre et al. 2013). Eine *in vivo* Studie bei Mäusen konnte eine erleichterte Freigabe von Doxorubicin aus TSL durch hyperthermische Temperaturen bis maximal 50°C nachweisen (Smet et al. 2011). In der Studie von Arora et al. wurde dieser Mechanismus für in TSL eingebrachtes Sorafenib bei thermoablativen Temperaturen, wie sie in der HIFU-Therapie üblicherweise angewendet werden, untersucht. Getestet wurde erneut die Zellreihe DU145. Nach 72 Stunden zeigte sich eine signifikant geringere Viabilität der Zellen bei der Kombinationstherapie von HIFU und TSL-Sorafenib als bei einer TSL-Sorafenib-Therapie allein (9,6% versus 36%). Des Weiteren zeigte eine elektronenmikroskopische Untersuchung deutliche Poren in der Zellmembran bis hin zur Membranerosion sowie ein zerstörtes Zytoskelett durch die Kavitation. In Zusammenschau mit dem Wasserbadversuch wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Thermoablation synergistisch mit der Zellmembranerosion durch mechanische Einflüsse der HIFU-Therapie die Medikamentenfreigabe verstärkt und damit die Wirkung des Medikamentes erhöht (Arora et al. 2016).

Eine singuläre thermische Behandlung der Prostatakrebszellen in dieser Arbeit zeigte keinen Unterschied in der Stoffwechselaktivität bzw. Vitalität durch eine medikamentöse Behandlung mit Finasterid oder Bicalutamid im Vergleich zu nicht medikamentös behandelten Zellen. Da jedoch die mechanischen Effekte der HIFU-Therapie vernachlässigt wurden, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit keine Schlussfolgerung auf einen potenziellen Einfluss der Medikamente in Kombination mit der HIFU-Therapie *in vivo* zu.

4.2 Ansprechen der Zellreihen auf eine Androgendeprivation

In dieser Arbeit sollte ein möglicher Effekt einer Androgendeprivation durch Finasterid und Bicalutamid unter Hitzeexposition auf die Stoffwechselaktivität bzw. Vitalität der Zellen herausgearbeitet werden. Die Zellen zeigten sowohl in der Stoffwechselaktivität, welche mittels MTS-Tests gemessen wurde, als auch in der Vitalität, welche mittels der Durchflusszytometrie analysiert wurde, die gleiche Reaktion auf die Hitzeeinwirkung, unabhängig davon, ob die Zellen zuvor medikamentös stimuliert wurden oder nicht.

Wie in Kapitel 1.3 ausführlich erläutert unterscheiden sich die fünf untersuchten Zellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 in ihrem AR-Status und ihrer Androgensensitivität. Die Zellreihe BPH-1 weist einen AR negativen Status auf und hat kein onkogenes Potential (Hayward et al. 1995). Die Zellreihe VCaP sowie das Zellreihenderivat rVCaP haben beide einen AR positiven Status, wobei die Zellreihe rVCaP ein weniger malignes Expressionsprofil aufzeigt. Beide Zellreihen sind androgensensibel (Thelen et al. 2013; Korenchuk et al. 2001). Die Zellreihe 22Rv1 hat ebenfalls einen AR positiven Rezeptorstatus und zeigt eine geringe Responsivität auf Androgene (Sramkoski et al. 1999; Attardi et al. 2004). Die Zellreihe PC-3 exprimiert keinen AR und wächst androgenunabhängig (Kaighn et al. 1979).

Betrachtet man die Unterschiede im AR-Status und im Ansprechen der Zellen auf Androgene stellt sich die Frage, ob die Zellen ungeachtet der Hitzeexposition ein Ansprechen auf einen Androgenentzug mittels Finasterid oder Bicalutamid zeigen. Da die Zellen sowohl im MTS-Test als auch in der FACS-Analyse bei 37°C untersucht wurden und diese Temperatur der physiologischen Körpertemperatur entspricht, lassen sich unsere Ergebnisse auch mit anderen Studien vergleichen, welche ebenfalls den Effekt von Finasterid und Bicalutamid auf Prostatakrebszellen untersucht haben, ohne die Zellen erhöhten Temperaturen ausgesetzt zu haben.

4.2.1 Ansprechen der Zellreihen auf Finasterid unter Normothermie

In den hier durchgeführten Experimenten wurde Finasterid als 5 α -Reduktase-Hemmer als eine Möglichkeit der Androgendepriavation gewählt. Das Medikament blockiert die intrazelluläre Synthese von DHT, das potenteste Androgen in seiner Wirkung auf den AR (Vis und Schröder 2009b). Als Dosierungen für den MTS-Test wurden 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M Finasterid gewählt, für die FACS-Analyse wurde 5 μ M Finasterid untersucht. Mit Ausnahme des um eine Temperaturabstufung früheren Abfalls der Stoffwechselaktivität in der Zellreihe rVCaP bei den mit Finasterid behandelten Zellen, auf welchen in einem späteren Kapitel genauer eingegangen wird, konnte keine Veränderung der Stoffwechselaktivität bzw. der Vitalität unter dem Einfluss von Finasterid auf die Zellen gezeigt werden.

In Studien wurde festgestellt, dass die Inhibition der 5 α -Reduktase mit Finasterid sowohl in Stroma- also auch in Epithelzellen der benignen Prostatahyperplasie dosisabhängig ist. Hierfür wurden Konzentrationen zwischen 1-125 nM Finasterid gewählt. In den Epithelzellen konnte bei ≤ 5 nM Finasterid eine nicht-kompetitive Inhibition, bei Dosierungen ≥ 10 nM eine kompetitive Inhibition der 5 α -Reduktase nachgewiesen werden. Bei den Stromazellen zeigten geringe Konzentrationen von 1-2 nM Finasterid keine Inhibition, wohingegen Konzentrationen von 5-125 nM Finasterid das Enzym kompetitiv inhibierten (Weisser et al. 1994). Eine ebenfalls dosisabhängige Inhibition bei Dosierungen zwischen 1-125 nM Finasterid wurde für das Enzym Androstenedion 5 α -Reduktase festgestellt (Weisser und Krieg 1998). Die in dieser Arbeit untersuchten Dosierungen 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M Finasterid entsprechen 100 nM, 1000 nM, 5000 nM und 10000 nM. Somit wurden die erforderlichen Dosierungen zum Erreichen einer Inhibition der 5 α -Reduktase untersucht. Trotz hohen Dosen des Medikamentes konnte kein signifikanter Unterschied in der Reaktion auf eine Hitzeexposition zwischen medikamentös und nicht medikamentös behandelten Zellen in der Stoffwechselaktivität und der Vitalität festgestellt werden. Im Nachfolgenden werden unsere Ergebnisse mit anderen Studien verglichen, welche einen potenziellen Einfluss von Finasterid auf die in dieser Arbeit untersuchten Zellreihen ungeachtet einer Hitzeexposition untersuchten.

Die Zellreihe BPH-1 exprimiert keinen AR. Sie zeigt einen Testosteronmetabolismus, jedoch scheint dieser keinen Effekt auf die Proliferationsrate der Zellen zu haben (Hayward et al. 1995). Der fehlende Effekt des Testosteronmetabolismus auf die Proliferation der Zellen spricht gegen einen Therapieerfolg mit dem 5 α -Reduktase-Hemmer Finasterid. Diese Annahme bestätigte eine Studie aus China: BPH-1 Zellen, welche in Monokulturen gezüchtet wurden, zeigen keine vermehrte Zelltodinduktion im MTS-Test durch eine 12-72 stündige Behandlung mit 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M Finasterid, gelöst in DMSO (Wang et al. 2017). In unserem Studiendesign wurden die BPH-1 Zellen mit 0,1 μ M, 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M für

48 Stunden behandelt. Die Dauer der Behandlung entspricht dem Studiendesign der chinesischen Studie, die Finasterid Konzentrationen sind in unserer Arbeit geringer. In unserer Arbeit wurde EtOH als Solvens für Finasterid verwendet, in der Studie von Wang et al. DMSO. Die Anwendung desselben Proliferationstestes erleichtert jedoch den Vergleich der Studie mit unseren Ergebnissen. In unseren Ergebnissen zeigt sich bei 37°C ebenfalls kein Unterschied in der Stoffwechselaktivität der BPH-1 Zellen. Eine Konzentrationserhöhung scheint laut Wang et al. keine Effektsteigerung zu bewirken. Der fehlende Effekt auf die Proliferation der BPH-1 Zellen überrascht allerdings nicht, da in eben genannter chinesischer Studie ebenfalls die mRNA Level verschiedener 5-AR in der Zellreihe BPH-1 getestet wurden. Obwohl vor allem der 5-AR2 in prostatischem Gewebe exprimiert wird, konnte in der Studie keine mRNA des 5-AR2 in der Zellreihe BPH-1 festgestellt werden. Hingegen zeigten sich niedrige Level an AR mRNA und hohe Level an 5-AR1 mRNA (Wang et al. 2017; Jin und Penning 2001). Da Finasterid jedoch selektiv den 5AR-2 inhibiert ist es nicht erstaunlich, dass das Medikament in der Zellreihe BPH-1 keine Wirkung zeigt (Vis und Schröder 2009b).

Eine weitere Studie untersuchte die Wirkung von Finasterid auf die Zellreihe PC-3. Die Zellreihe PC-3 hat ebenfalls einen AR negativen Status und wächst androgenunabhängig (Kaighn et al. 1979). Eine Wirkung von Finasterid auf die Proliferation der PC-3 Zellen scheint also gleichermaßen unwahrscheinlich. Die Studie exponierte die Zellen für 24 und 48 Stunden mit 10 µM Finasterid und maß anschließend die Viabilität der Zellen mittels Trypanblau-Exklusionstest. Die Messungen ergaben keinen zytotoxischen Effekt auf das Wachstum der Zellen durch eine medikamentöse Stimulation mit Finasterid (Yun et al. 2013). Diese Ergebnisse decken sich mit dem fehlenden Unterschied in der Stoffwechselaktivität der Zellreihe PC-3 unter Stimulation mit Finasterid bei 37°C in unseren Versuchen. Zudem wurde in genannter Studie via Western Blot Analysen keine verstärkte Caspaseaktivität durch eine Behandlung der PC-3 Zellen mit Finasterid nachgewiesen. Hierdurch wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass eine Behandlung mit Finasterid keine verstärkte Apoptose in den PC-3 Zellen einleitet (Yun et al. 2013). Auch hier finden sich Übereinstimmungen mit unseren Ergebnissen. In der FACS-Analyse zeigte sich in der PC-3 Zellreihe kein Unterschied in der Vitalität sowie in der Apoptose- und Nekroseraten der Zellen zwischen unstimulierten und mit 5 µM Finasterid stimulierten Zellen bei 37°C. Auch hier überrascht das Ergebnis bei Betrachtung einer weiteren Studie nicht. Diese hat mittels MTS-Tests die mittlere inhibitorische Konzentration (IC50), also die Konzentration des Medikamentes Finasterid, welche für eine halbmaximale Hemmung des Wachstums der Zellreihe PC-3 benötigt wird, ermittelt. Diese liegt bei weit über 100 µM und erklärt, warum eine Hemmung mit Konzentrationen zwischen 0,1 µM – 10 µM nicht erfolgsversprechend ist (Kim und Ma 2009).

Die Zellreihe VCaP, ihr Zellreihenderivat rVCaP und die Zellreihe 22Rv1 sind AR positiv und zeigen eine Androgensensibilität. Eine Wirkung von Finasterid auf diese Zellreihen scheint also plausibel. In einer Studie aus New York wurde der Effekt von Finasterid auf das Zellwachstum und den Zelltod der Zellreihen VCaP und 22Rv1 mittels Trypanblau Färbung getestet. Eine Behandlung der beiden Zellreihen mit 1 μ M Finasterid zeigte nach 72 Stunden in der Zellreihe 22Rv1 keinen vermehrten Zelltod, in der Zellreihe VCaP führte die Behandlung zu einem marginalen Anstieg des Zelltodes. In dieser Studie wurde zusätzlich der Effekt einer Behandlung mit Finasterid auf parallel mit DHT stimulierte Zellen untersucht (Chhipa et al. 2013). Dies könnte eine Rolle spielen, da die Zellreihe rVCaP ebenfalls durch eine 1 nM Testosteronbehandlung aus der Zellreihe VCaP hergeleitet wurde und somit potentiell ein Vergleich gezogen werden kann (Thelen et al. 2013). Eine dreitägige Behandlung mit 1 nM DHT führte zu einer vermehrten Proliferation der Zellreihe VCaP, die gleichzeitige Behandlung mit 1 μ M Finasterid hatte jedoch ebenfalls keinen Effekt im Sinne eines vermehrten Zelltodes (Chhipa et al. 2013). Dies lässt folglich die Annahme einer ebenfalls fehlenden Wirkung von Finasterid auf die Zellreihe rVCaP zu. Die Ergebnisse decken sich also mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten MTS-Tests und FACS-Analysen. Bei 37°C zeigte sich weder ein Unterschied in der Stoffwechselaktivität noch in der Vitalität der Zellreihen rVCaP, VCaP und 22Rv1 durch eine Stimulation der Zellen mit Finasterid.

Finasterid agiert nicht nur als 5 α -Reduktase-Hemmer, sondern teilt sich eine signifikant strukturelle Ähnlichkeit mit Testosteron und DHT. Eine Studie aus dem Jahr 2011 stellt aus diesem Grund die Hypothese auf, dass Finasterid neben seiner Rolle als 5 α -Reduktase-Hemmer ebenfalls als möglicher antagonistischer Ligand am AR agieren kann. Für die Versuche wurde die Zellreihe LnCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*), welche einen mutierten AR aufweist und die Zellreihe VCaP mit ihrem Wildtyp AR untersucht. Die Zellen wurden mit 0,5 μ M Finasterid sowie mit 1 nM DHT als Liganden für den AR stimuliert. In den LnCaP Zellreihen inhibierte Finasterid die Bindung von DHT um 40% und senkte die AR-Aktivität. In der Zellreihe VCaP sorgte Finasterid hingegen nur für eine marginale Inhibition der Bindung von DHT und zeigte keinen antagonistischen Effekt. Um herauszufinden, ob der antiandrogene Effekt von Finasterid zellreihenspezifisch ist, wurde eine Transfektion des mutierten AR sowie des Wildtyp AR auf die AR negative Zellreihe PC-3 vorgenommen. Auch hier inhibierte Finasterid nur die Bindung von DHT im mutierten AR und reduzierte die AR-Aktivität, nicht jedoch im Wildtyp AR. Für die Zellreihe VCaP wurde nachfolgend noch eine MTT-Testung unter einer medikamentösen Stimulation mit 1 nM DHT und 0,5 μ M Finasterid durchgeführt. Nach sechs Tagen zeigte sich eine vermehrte Zellproliferation durch die Behandlung mit DHT, eine Inhibition dieses Wachstums durch Finasterid

konnte nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit dem fehlenden Effekt von Finasterid auf die DHT-AR Bindung und der AR-Aktivität überein (Wu et al. 2011). Vor allem die MTT-Testung der Zellreihe VCaP kann gut mit den in dieser Arbeit durchgeführten MTS-Tests unter medikamentöser Stimulation mit Finasterid verglichen werden und zeigt, dass auch der antiandrogene Effekt von Finasterid auf die Zellreihe VCaP keinen Effekt hat. Dies verifiziert weiterhin unsere Ergebnisse, welche ebenfalls keinen Unterschied in der Zellproliferation bei 37°C der VCaP Zellen unter medikamentöser Stimulation mit Finasterid zeigen.

Betrachtet man also die Wirkung von Finasterid auf die Zellreihen BPH-1, VCaP, 22Rv1 und PC-3 ungeachtet einer Hitzeexposition stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit, welche alleamt keine Auswirkung von Finasterid auf die Proliferation und Vitalität der Zellreihen zeigen, mit anderen Studien überein. Über die Wirkung von Finasterid auf die Zellreihe rVCaP kann nur indirekt eine Aussage getroffen werden, da das Zellreihenderivat in anderen Studien nicht direkt untersucht wurde.

4.2.2 Ansprechen der Zellreihen auf Bicalutamid unter Normothermie

Das nicht-steroidale Antiandrogen agiert kompetitiv am AR und blockiert so den wachstumsstimulierenden Effekt der Androgene am prostatischen Tumor (Cockshott 2004). Analog zu den Versuchen mit Finasterid wurden bei dem Medikament Bicalutamid im MTS-Test die Konzentration 0,1 µM, 1 µM, 5 µM und 10 µM, bei der FACS-Analyse die Konzentration 5 µM Bicalutamid gewählt. Auch hier konnte mit Ausnahme des minimal früheren Abfalls der Stoffwechselaktivität der Zellreihe rVCaP unter Vorbehandlung mit Bicalutamid keine signifikante Änderung bezüglich der Hitzesensitivität der fünf Zellreihen gezeigt werden.

In den nächsten Absätzen sollen analog zum Medikament Finasterid nun unsere Ergebnisse mit anderen Studien verglichen werden, welche einen potenziellen Einfluss von Bicalutamid auf die in dieser Arbeit untersuchten Zellreihen ungeachtet einer Hitzeexposition untersuchten.

Die Zellreihe BPH-1 ist AR-negativ (Hayward et al. 1995). Ein Effekt auf die Therapie mit einem Antiandrogen ist deshalb nicht zu erwarten. Diese Annahme belegt eine Studie aus China, welche zeigte, dass erst eine AR-Transfektion der Zellreihe BPH-1 eine Transaktivierung von ebenfalls transfizierten PSA-Gen Promotoren durch AR-Agonisten wie Testosteron und DHT ermöglicht und dass diese Transaktivierung durch das Antiandrogen Flutamid inhibiert werden kann. Die unveränderten BPH-1 Zellen zeigten keine Transaktivierung durch AR-Agonisten (Yu et al. 2009). Auch unsere Ergebnisse zeigen keine unterschiedlichen Reaktionen in der Stoffwechselaktivität und in der Vitalität durch eine Vorbehandlung der BPH-1 Zellen durch Bicalutamid bei 37°C.

Die Zellreihe VCaP hat einen AR positiven Status und ist androgensensibel. In einer im Jahr 2019 veröffentlichten Studie wurde der Effekt des Antiandrogens Bicalutamid mit dem Effekt weiterer Deshydroxy-Bicalutamid Derivaten auf die Zellreihe VCaP verglichen. Mittels MTS-Tests wurde die IC50 ermittelt. Diese entspricht für die Zellreihe VCaP 5,96 μM Bicalutamid (Kandil et al. 2019). Somit scheint Bicalutamid bei einer Konzentration von 6 μM eine Wachstumsinhibition der Zellreihe VCaP auszulösen. In unseren Ergebnissen zeigte sich keine verminderte Stoffwechselaktivität im MTS-Test und keine verminderte Vitalität in der FACS-Analyse durch eine vorangegangene Stimulation der Zellreihe VCaP mit 0,1 μM , 1 μM , 5 μM und 10 μM Bicalutamid und stehen somit im Widerspruch zur genannten Studie. Allerdings wurden in unserem Studiendesign die Zellen 48 Stunden vor Versuchsbeginn mit Bicalutamid stimuliert, wohingegen in der Studie von Kandil et al. die Zellen 96 Stunden vor Versuchsbeginn, also doppelt so lange wie in unserem Studiendesign, mit Bicalutamid stimuliert wurden (Kandil et al. 2019). Möglicherweise liegt also der Grund für die fehlende Proliferationshemmung bzw. dem fehlenden Vitalitätsverlust der Zellreihe VCaP durch Bicalutamid in unseren Versuchen in einer zu kurzen Inkubationszeit der Zellen mit dem Medikament.

Die Zellreihe PC-3 wächst androgenunabhängig und besitzt keinen AR. Eine Wirkung durch eine Behandlung mit einem Antiandrogen scheint daher sinnlos. In eben genannter Studie von Kandil et al. wurde mittels MTT-Tests auch die IC50 von Bicalutamid für die Zellreihe PC-3 ermittelt. Diese liegt bei 92,63 μM und damit bei einer vielfach höheren Konzentration als in dieser Arbeit getestet wurde (Kandil et al. 2019).

Bei einer ähnlichen Untersuchung wurde der Effekt von Bicalutamid auf die Zellreihen 22Rv1 und PC-3 untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass Konzentrationen zwischen 1-5 $\mu\text{mol/l}$ Bicalutamid keinen Effekt auf die Zellproliferation der Zellreihen 22Rv1 und PC-3 unter Zusatz von Testosteron aufweisen. In der AR positiven und hormonsensitiven Zellreihe 22Rv1 zeigte sich eine Reduktion der Proliferations – bzw. Vitalitätsrate dosisabhängig bei Konzentrationen von 10 μM , 50 μM und 100 μM . Bei der PC-3 Zellreihe zeigte sich bei gleichen Konzentrationen ebenfalls eine Reduktion der Vitalität, welche weniger stark ausgeprägt war als in der Zellreihe 22Rv1 (Koukourakis et al. 2018). Das bedeutet, dass die Effekte auf das Zellwachstum erst bei Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ aufgetreten sind. Zudem wurden die Zellen für sechs Tage, also dreimal so lange wie in dem hier vorliegenden Studiendesign, mit Bicalutamid stimuliert. Somit könnte die weniger lange Stimulationszeit sowie die zu geringe Konzentration des Medikamentes Bicalutamid ein Grund für den fehlenden Effekt des Antiandrogens auf die Stoffwechselaktivität und die Vitalität der 22Rv1 und PC-3 Zellen in unserem Versuchsaufbau sein.

Da die Zellreihe 22Rv1 einen mutierter AR aufweist und die Zellreihe PC-3 eine AR negativen Status hat überrascht es nicht, dass in diesen Zelllinien hohe Dosierungen des Antiandrogens angewandt werden müssen, um einen Effekt zu erzielen. Ebenfalls ist es nachvollziehbar, dass die Zellreihe BPH-1 durch den fehlenden AR keine Reaktion auf eine Therapie mit Bicalutamid zeigt. Einzig die Zellreihe VCaP scheint einen Verlust der Zellproliferation durch Bicalutamid zu erfahren, jedoch erst bei längeren Stimulierungen mit dem Medikament, als es in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Für das Zellreihenderivat rVCaP wurde keine vergleichende Studie über eine Stimulation mit Bicalutamid durchgeführt.

Eben beschriebene Studien werfen also die Frage auf, ob eine Konzentrationserhöhung des Medikamentes Bicalutamid bzw. eine längere Stimulationszeit der Zellreihen VCaP, rVCaP, 22Rv1 und PC-3 zu einer Reduktion der Proliferationsrate führen würde und gibt Anlass für weitere Forschung mit veränderten Rahmenbedingungen.

4.2.3 Hyperthermie als mögliche Ursache einer Androgenresistenz

Der fehlende Effekt von Finasterid und Bicalutamid in den in dieser Arbeit untersuchten Konzentrationen und Stimulationsdauer auf die fünf Zellreihen bei Normothermie wurde nun anhand weiterer Studien verifiziert. Somit sollten nun an dieser Stelle Überlegungen getroffen werden, warum auch unter Hitzeeinwirkung weiterhin kein Effekt auf die Zellen durch die medikamentöse Stimulation erzielt werden konnte. Eine mögliche Ursache könnte der Zusammenhang zwischen Hyperthermie und einer daraus resultierenden Androgenresistenz sein:

Studien weisen darauf hin, dass eine Therapie mit Hyperthermie eine Androgenresistenz induzieren kann. Hierbei wurden die Zellreihen PC-3, DU145 sowie LnCaP untersucht. Die AR negativen Zellreihen PC-3 und DU145 zeigten nach Hitzezufuhr weiterhin keine AR Expression auf Proteinebene, wohingegen die AR positive Zellreihe LnCaP ihre AR-Expression nach einer Behandlung mit 44°C für eine Stunde komplett verloren hat. (Pajonk et al. 2005).

Die Medikamente Finasterid und Bicalutamid greifen beiden in den Androgen-Haushalt der Zelle ein und sollen durch eine Suppression des DHT-Spiegels bzw. durch eine kompetitive Hemmung des AR die Wirkung der Androgene auf die Zellen im Sinne eines gesteigerten Wachstums minimieren (Nakabayashi et al. 2011; Vis und Schröder 2009b). Betrachtet man nun die Ergebnisse aus der Pajonk et al. Studie, welche auf einen Verlust der AR-Expression von AR positiven Zellen durch eine Behandlung mit Hyperthermie hinweisen, unterstützt dies unsere Ergebnisse. Sollten alle Zellen durch die Hitzeexposition im Thermozykler eine Androgenresistenz entwickelt haben, erklärt dies den fehlenden Effekt von Finasterid und Bicalutamid auf die Proliferation und Vitalität der erhitzten Zellen, da beide Medikamente ihre Wirkung durch die Inaktivierung des AR nicht entfalten können.

Wie bereits in Kapitel 1.2.2.3 beschrieben ist eine mögliche Chemoprävention mit Finasterid für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms weiterhin umstritten und bis dato nicht zugelassen (Liss und Thompson 2018). Das Medikament Bicalutamid bedürfte für eine Wirkung auf die Zellreihen einer längeren Stimulationsdauer und/oder einer vielfach höheren Konzentration. Studien zeigen, dass eine Erhöhung der Bicalutamid-Dosis *in vivo* keine vermehrte Toxizität zeigt, allerdings auch keinen Vorteil im Überleben bringt (Tyrrell et al. 2006). Eine Dosiserhöhung von Bicalutamid sollte demnach kritisch betrachtet werden.

In Zusammenschau mit der fehlenden Veränderung der Hitzesensitivität durch eine Vorbehandlung mit Finasterid oder Bicalutamid vor dem Hintergrund einer Hyperthermie-induzierten Androgenresistenz scheint eine neoadjuvante Therapie mit den beiden untersuchten Medikamenten vor einer HIFU-Therapie nicht sinnvoll.

4.3 Rolle der HSP

4.3.1 Paradoxe Stoffwechsellaktanzstieg im MTS-Test

Ungeachtet der medikamentösen Stimulation ist eine interessante Auffälligkeit im Ergebnisteil der paradoxe Anstieg der Stoffwechselaktivität der Zellreihen rVCaP, VCaP und PC-3 zwischen 46-52°C. Diese sind vor allem in den Versuchen ohne vorherige medikamentöse Stimulation und in den Zellreihen rVCaP und PC-3 deutlich zu sehen, da hier die Temperaturabstufungen in kleineren Schritten vorgenommen wurden. Durch einen vorherigen Stoffwechselaktivitätsabfall bei Temperaturen zwischen 37-46°C kommt der darauffolgende Stoffwechselaktivitätsanstieg besser zur Geltung. Der Stoffwechselaktivitätsanstieg wirft die Frage auf, ob eine Hitzezufuhr in diesen Temperaturbereichen die Stoffwechselaktivität im Sinne einer Proliferationssteigerung der Zellen anregt oder ob es andere Erklärungen für den Anstieg der Graphen im MTS-Test gibt.

Der zytotoxische Effekt mit dem Ziel der Wachstumssuppression ab Temperaturen von 41°C ist bewiesen. Proliferationstests der Zellreihe PC-3 und DU145 zeigen eine Thermosensitivität der Zellen, also ein Ansprechen auf die Hyperthermie im Sinne eines Sistierens des Wachstums bei 40°C. Das Studiendesign unterscheidet sich sehr von den hier durchgeführten Experimenten. Die Proliferationstests wurden in genannter Studie nach einer dreitägigen Inkubationszeit bei 40°C durchgeführt, wohingegen in der hier vorliegenden Arbeit die Zellen nur für wenige Sekunden den hyperthermischen Temperaturen ausgesetzt waren (Kalamida et al. 2015). Trotzdem würde man anhand dieser Studien erwarten, dass durch das Sistieren des Wachstums bei Temperaturerhöhung auch die Stoffwechselaktivität der Zellen bei Temperaturerhöhung sukzessive abnimmt. Diese Annahme steht im Widerspruch zu den Ergebnissen des MTS-Tests dieser Arbeit. Insbesondere die starken

Anstiege der Zellreihen rVCaP und PC-3 zwischen 46-52°C lassen die Möglichkeit eines Stoffwechsellanstiegs aufgrund einer Proliferationssteigerung der Zellen unwahrscheinlich erscheinen.

Aus diesem Grund sollte die Wirkungsweise des MTS-Tests im Zusammenhang mit dem paradoxen Anstieg des Stoffwechsels genauer hinterfragt werden. Der MTS-Test beruht auf der Umwandlung des MTS-Farbstoffs in das blaue Formazan, welches durch die Reduktion von NADH und NADPH während der Glykolyse stattfindet (Buttke et al. 1993; Mosmann 1983). Die Induktion von Hyperthermie auf Gewebe hat eine immense Anzahl an Reaktionen zu Folge, welche mit einem Energieverbrauch der Zelle verbunden sind: Eine verbesserte Vaskularisation durch die Expression von reaktiven Sauerstoffspezies und vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren, das Aussenden von Lymphozytentransportsignalen, die Expression von inflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung von HSP (Repasky et al. 2013). Beispielsweise sind HSP für die Faltung von Proteinen verantwortlich und benötigen hierfür Adenosintriphosphat (ATP) (Beckmann et al. 1992). Die ATP-Gewinnung findet in der Glykolyse statt. Die Steigerung der Glykolyse in der Zelle wiederum zeigt im MTS-Test eine vermehrte Stoffwechselaktivität und damit indirekt eine Steigerung der Viabilität der Zelle an. Es ist also denkbar, dass der Anstieg der Graphen der Zellreihen rVCaP und PC-3 bei steigender Temperatur im Zusammenhang mit den Reaktionswegen aufgrund der Hitzeexposition steht - wie beispielsweise einer erhöhten Expression der HSP und den damit verbundenen gesteigerten ATP-Verbrauch im Rahmen der Glykolyse. Diese Vermutung wird nun im nächsten Kapitel weiter ausgeführt.

4.3.2 Ausbildung einer Thermotoleranz durch HSP

Eine erworbene Strategie von Zellen, sich vor der thermischen Zytotoxizität zu schützen, ist die Thermotoleranz. Diese wird reguliert von HSP (Lindquist und Craig 1988).

HSP sind wie bereits erwähnt verantwortlich für die Proteinfaltung und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Signale, insbesondere in thermischen, chemischen und physikalischen Stresssituationen der Zelle (Ciocca und Calderwood 2005). Sie kontrollieren die Proteinstabilität und Proteinfunktion, verhindern eine Aggregation von fehlgefalteten Proteinen und ermöglichen einen intrazellulären Proteintransport. In Stresssituationen sind sie für die Aufrechterhaltung der Proteinkonformationen verantwortlich und gewährleisten somit das Bestehen von Ligandenbindungen. Zu stark geschädigte Proteine werden durch HSP abgebaut (Azad et al. 2015).

HSP sind in vielen Krebszellen überexprimiert. Diese Überexpression verhindert eine spontane Apoptose und kann somit die Malignität einer Krebszelle verstärken (Ciocca und Calderwood 2005). Im Prostatakarzinom haben die HSP 70 und 90 einen zytoprotektiven

Effekt durch eine Inhibierung der Apoptose, durch die Modulation des Zellzyklus sowie durch eine Steigerung der Invasion und Metastasierung des Karzinoms (Kita et al. 2017; Teng et al. 2012). Eine erhöhte HSP 27-Expression ist mit einer schlechten Prognose des Prostatakarzinoms vergesellschaftet (Ciocca und Calderwood 2005).

HSP werden also im Gegensatz zu den meisten anderen Proteinen während und für eine gewisse Zeit nach Hitzeexposition nicht herunter-, sondern heraufreguliert und sollten angesichts unserer Experimente mit dem Einsatz von Hyperthermie näher betrachtet werden (Dewhirst et al. 2003).

In einer Studie aus Österreich wurde untersucht, in welchem Ausmaß die HSP in Prostatakarzinomzellen auf subletale Temperaturen im Grenzbereich der HIFU-Therapie reagieren. Hierfür wurden unter anderem die auch in dieser Arbeit untersuchten PC-3 Zellen verwendet. Eine einstündige Behandlung der Zellen mit 43°C *in vitro* resultierte in einem fünf - neunfachen Anstieg des HSP 27-Levels sowie einem vier - fünffachen Anstieg des HSP 86-Levels. Eine *in vivo* Untersuchung wurde ebenfalls durchgeführt. Hierfür wurde bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom zunächst eine HIFU-Therapie und in der gleichen Sitzung drei Stunden später eine Prostatektomie durchgeführt. Das Gewebe wurde immunhistochemisch gefärbt. In der Grenzzone der HIFU-Therapie zeigte sich eine deutliche Hochregulierung der HSP 72/73-Level, wohingegen die HSP 72/73-Level nahe der Nekrosezone abnahmen. In der Nekrosezone waren die HSP 72/73-Level heterogen verteilt, also teils herunter-, teils heraufreguliert und teils gleichbleibend (Kramer et al. 2004). Diese Studie deutet daraufhin, dass die Prostatakrebszellen in den Grenzregionen der HIFU-Therapie, also zwischen 43-55°C, eine Hochregulation der HSP erfahren und dadurch protektive Maßnahmen wie eine verstärkte Inhibition der Apoptose stattfinden.

Eine weitere Studie untersuchte die Auswirkung von Hitze auf HSP 27 *in vitro* bei der androgensensitiven Prostatakrebszellreihe LnCaP bei höheren Temperaturen. Die Zellen wurden für 60 Minuten Temperaturen zwischen 43-49°C ausgesetzt. Dabei zeigte sich auch hier ein Anstieg der HSP-Expressionslevel um das drei - vierfache in der LnCaP Zellreihe. *In vivo* zeigte sich insbesondere am Randbereich der Nekrosezone eine Heraufregulierung des HSP 27-Levels. Hierfür wurden neun menschliche Prostatae (fünf Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom und vier Patienten mit invasivem Blasenkarzinom) untersucht. Die Prostatae wurden durch Thermoablation mittels HIFU zwei Stunden bis acht Tage vor der chirurgischen Entfernung behandelt. Anschließend wurde das HSP 27-Expressionsmuster durch immunhistochemische Verfahren dargestellt. Als Kontrolle dienten unbehandelte BPH - (n = 10) und PC - (n = 7) Proben (Madersbacher et al. 1998).

In den beiden Studien wurde für die *in vitro* Versuche eine Inkubationszeit der Hyperthermie von einer Stunde gewählt. Die Zellen waren also deutlich länger der Hitze ausgesetzt

als in dieser Arbeit, in welcher die Rampenrate $3,5^{\circ}\text{C}/\text{s}$ betrug und die Zellen somit einigen Sekunden der Hitze ausgesetzt wurden. Diese Tatsache ist wichtig zu erwähnen, da die Rampenrate, mit der die Zellen erhitzt werden, die Hitzesensitivität nachweislich beeinflusst. Studien mit Ovarialzellen zufolge erhöht eine langsamere Hitzezufuhr das Risiko für die Ausbildung protektiver Strategien, um die Zelle vor thermischen Effekten zu schützen. Hierbei werden Rampenraten von Minuten mit Rampenraten von Stunden verglichen, um eine Temperaturerhöhung von 37°C auf $42,4^{\circ}\text{C}$ zu erreichen (Herman et al. 1981). Diese Tatsache erschwert einen Vergleich zwischen den *in vitro* Versuchen der Studien und dieser Arbeit, da eine schnellere Erhitzung potenziell zu einer weniger ausgeprägten Expressionssteigerung der HSP führen könnte und daraus ein geringerer Anstieg der Stoffwechselaktivität resultieren würde.

In den *in vivo* Versuchen wurden HIFU-Therapien durchgeführt und das Prostatagewebe im Anschluss untersucht. Die Zeit der Erhitzung der Zellen liegt somit im Sekundenbereich und entspricht damit eher den Expositionszeiten, die auch in unserem Studiendesign verwendet wurden. Somit könnten die verstärkten Expressionslevel der HSP unter hyperthermischen Bedingungen eine Erklärung für die erhöhte Stoffwechselaktivität und damit den paradoxen Kurvenanstieg der Zelllinien rVCaP und PC-3 im MTS-Test bei Temperaturen zwischen $46\text{-}52^{\circ}\text{C}$ sein. Bis dato gibt es keine Studien, welche die Expressionslevel der HSP der hier untersuchten fünf Zellreihen bei Normothermie sowie deren Veränderung bei Hitzeexposition untersuchen und vergleichen. Somit bleiben die verstärkten Expressionslevel der HSP lediglich eine Vermutung für die gesteigerte Stoffwechselaktivität der Zellen unter hyperthermischen Bedingungen.

4.3.3 Zusammenhang zwischen Stoffwechselaktivität und Vitalität

Der paradoxe Stoffwechselanstieg war am stärksten in den MTS-Tests der Zellreihe rVCaP und PC-3 ausgeprägt. Nimmt man an, dass die erhöhte Stoffwechselaktivität mit einer vermehrten Expression der HSP in Zusammenhang steht, würde man eine stärkere Thermotoleranz im Sinne einer höheren Vitalität in der FACS-Analyse in diesen beiden Zellreihen im Vergleich zu den übrigen Zellreihen erwarten. Tatsächlich zeigen die beiden Zellreihen rVCaP und PC-3 die höchsten Vitalitätswerte in dem Temperaturbereich um 60°C . Bei $57,8^{\circ}\text{C}$ sind in der Zellreihe rVCaP fast noch 50% der Zellen vital, wohingegen sich die Vitalitätswerte der Zellreihen BPH-1, VCaP und 22Rv1 in einem Rahmen zwischen 10-30% bewegen. Bei $62,6^{\circ}\text{C}$ zeigen die Zellreihen BPH-1, VCaP und 22Rv1 eine Vitalität $< 5\%$, wohingegen die Zellen der rVCaP noch um die 20% Vitalität zeigen und die Zellreihe PC-3 um die 10%. Um den Zusammenhang zwischen der Stoffwechselaktivität in den MTS-Tests und den

Vitalitätswerten der FACS-Analysen anschaulicher zu gestalten, wurden die beiden Versuche für jede Zellreihe in jeweils einer Grafik zusammengefasst. Hierzu wurde eine Kombination aus den Liniendiagrammen der MTS-Tests und den Balkendiagrammen der FACS-Analysen erstellt. Auf der x-Achse ist die Temperatur in °C aufgetragen, auf der y-Achse links der Abbildung die Stoffwechselaktivität der MTS-Tests und auf der y-Achse rechts der Abbildung die Vitalitätswerte der FACS-Analyse. Wichtig ist, dass die Daten des MTS-Tests auf eine Kontrolle normalisiert wurden, wohingegen die Daten der FACS-Analyse einen Prozentsatz aller untersuchten Zellen darstellen. Die Abbildungen dienen also nicht dem direkten Vergleich der Ergebnisse der beiden Versuche sondern sollen lediglich einen potenziellen Zusammenhang abbilden. Für die Daten der unstimulierten Zellen der MTS-Tests wurde jeweils der Mittelwert aus den Ergebnissen der MTS-Tests ohne medikamentöse Stimulation sowie aus den Ergebnissen der unstimulierten Zellgruppen der MTS-Tests mit Finasterid und Bicalutamid berechnet und der Standardfehler mit in die Grafik übernommen.

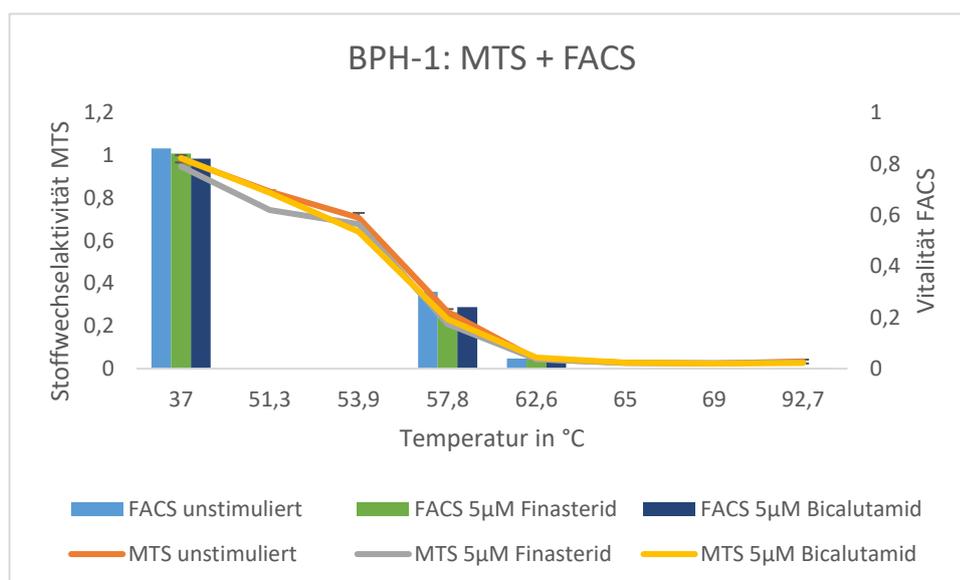


Abbildung 43: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe BPH-1

In Abbildung 43 sind die Ergebnisse der MTS-Tests sowie der FACS-Analysen der Zellreihe BPH-1 dargestellt. Bei 37°C zeigt sich eine Stoffwechselaktivität von knapp unter 100% der unstimulierten und stimulierten Zellen bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe sowie eine Vitalität von > 80% bezogen auf die gesamte Zellpopulation. Mit sinkender Stoffwechselaktivität nimmt auch der Anteil an vitalen Zellen ab, sodass bei 57,8°C 20-30% der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe im MTS-Test stoffwechselaktiv und zwischen 20-30% der Zellen in der FACS-Analyse vital sind. Mit weiterhin steigenden Temperaturen verlieren die

Zellen nahezu ihr gesamte Stoffwechselaktivität und es sind kaum mehr vitale Zellen nachzuweisen. Die Ergebnisse der MTS-Tests und der FACS-Analyse stimmen für die Zellreihe BPH-1 also gut überein.

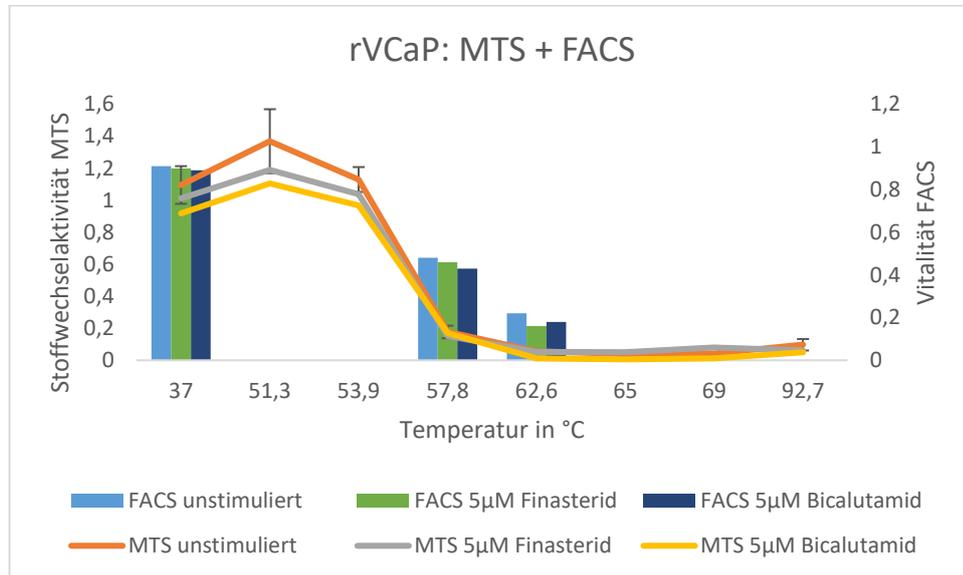


Abbildung 44: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe rVCaP

In Abbildung 44 ist die Gegenüberstellung der MTS-Tests sowie der FACS-Analysen der Zellreihe rVCaP dargestellt. Bei 37°C sind zwischen 90-110% der stimulierten und unstimulierten Zellen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe stoffwechselaktiv. In der FACS-Analyse zeigt sich bei 37°C eine Vitalität um 90% sowohl bei den stimulierten als auch bei den unstimulierten Zellen. Im MTS-Test erfolgt dann bei 51,3°C der bereits beschriebene Stoffwechselaktivitätsanstieg. Interessanterweise sind die Zellen bei 57,8°C nur noch zu 20% stoffwechselaktiv, in der FACS-Analyse zeigen sich jedoch Vitalitätswerte von fast 50%. Bei einer Temperatur von 62,6°C kann im MTS-Test eine Stoffwechselaktivität von knapp 5% gemessen werden, wohingegen die Zellen in der FACS-Analyse weiterhin um die 20% Vitalität zeigen. Wie bereits erwähnt kann ein direkter Vergleich zwischen den Ergebnissen nicht gezogen werden, da die Werte der MTS-Tests auf eine Kontrolle normiert wurden und die Ergebnisse der FACS-Analyse einen Anteil einer Population widerspiegelt. Trotzdem scheint es so, als seien die Zellen zwar kaum mehr stoffwechselaktiv, jedoch weiterhin vital. Verknüpft man nun erneut die Annahme, dass der zuvor beobachtete Stoffwechselanstieg der Zellreihe rVCaP mit einer Aktivierung der HSP einhergeht und damit die Ausbildung einer Zytprotektion vor dem thermischen Schaden verstärkt wird, würde dies den erst späteren Vitalitätsabfall der Zellreihe rVCaP im Vergleich zu den übrigen Zellreihen erklären.

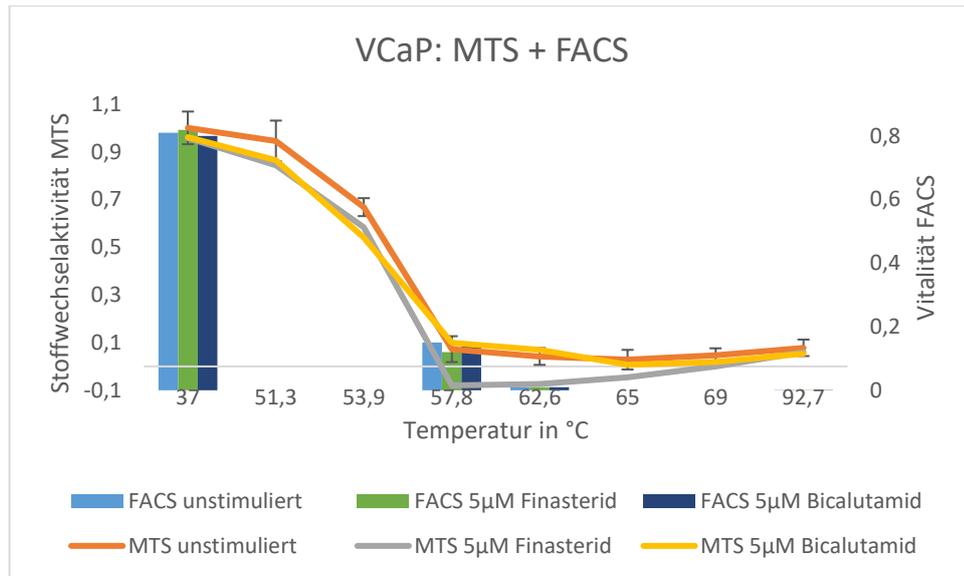


Abbildung 45: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe VCaP

In Abbildung 45 wurden die Ergebnisse des MTS-Tests sowie der FACS-Analyse der unstimulierten und stimulierten Zellen der Zellreihe VCaP gegenübergestellt. Hier bietet sich ein ähnliches Bild wie bereits bei der Zellreihe BPH-1. Bei 37°C sind die Zellen nahezu zu 100% stoffwechselaktiv im Vergleich zu den Kontrollgruppen. In der FACS-Analyse entspricht der Anteil vitaler Zellen 80%. Bei Erhöhung der Temperatur auf 57,8°C sind im MTS-Test < 10% der Zellen stoffwechselaktiv und in der FACS-Analyse circa 15% der Zellen vital. Bei weiterer Temperaturerhöhung nimmt die Stoffwechselaktivität der Zellen zunächst ab, um dann bei 92,7°C wieder leicht zuzunehmen. Die Vitalität der Zellen in den FACS-Analysen nimmt hingegen konstant ab und ist bei 92,7°C nahezu 0%.

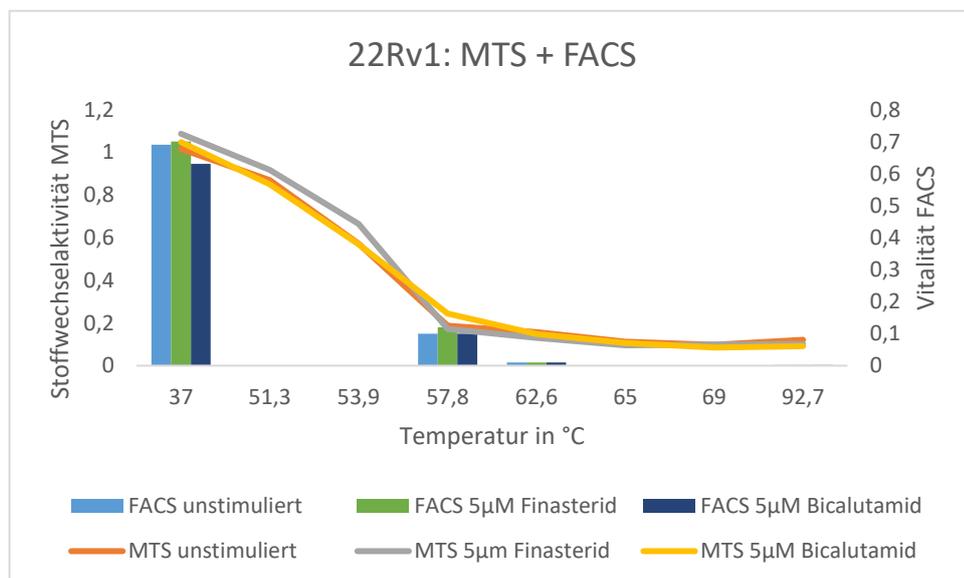


Abbildung 46: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe 22Rv1

In Abbildung 46 sind die Ergebnisse der MTS-Tests sowie der FACS-Analysen der Zellreihe 22Rv1 gegenübergestellt. Die Stoffwechselaktivität und die Vitalität stimmen wie bei der Zellreihe BPH-1 und VCaP gut überein: Bei einer Temperatur von 37°C zeigt sich eine Stoffwechselaktivität von etwas > 100% im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe der unstimulierten und stimulierten Zellen. Die Vitalität der Zellen in der FACS-Analyse beträgt zwischen 63-70%. Bis zu einer Temperatur von 57,8°C nimmt die Stoffwechselaktivität dann konstant ab und erreicht knapp 20%. Auch der Anteil an vitalen Zellen in der FACS-Analyse sinkt und beträgt bei 57,8°C circa 10%. Bei weiterer Temperaturerhöhung nimmt sowohl die Stoffwechselaktivität in den MTS-Tests als auch die Vitalität in der FACS-Analyse weiter ab.

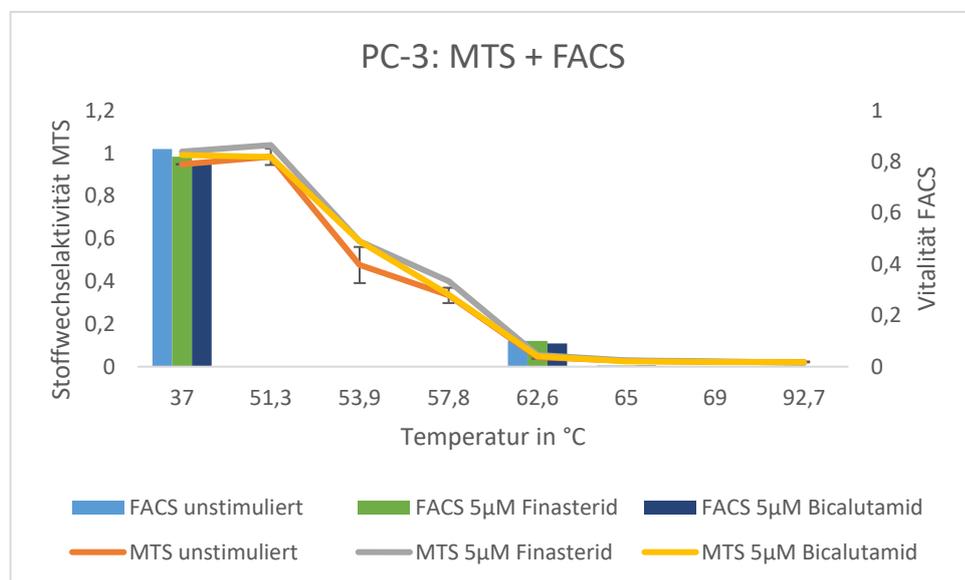


Abbildung 47: Gegenüberstellung MTS-Test und FACS-Analyse der Zellreihe PC-3

In Abbildung 47 ist die Gegenüberstellung der MTS-Tests und der FACS-Analysen der unstimulierten und stimulierten PC-3 Zellen dargestellt. Hier zeigt sich nun wiederum ein ähnliches Bild wie bereits in der Zellreihe rVCaP. Bei 37°C sind zwischen 95-100% der Zellen in den MTS-Tests bezogen auf die jeweilige Kontrolle stoffwechselaktiv. Die Vitalität in der FACS-Analyse gemessen an der Gesamtpopulation beträgt zwischen 80-85%. Bei weiterer Steigerung der Temperatur lässt sich anhand der gemessenen Daten der MTS-Tests eine kleine Steigerung der Stoffwechselaktivität verzeichnen. Diese ist nicht so stark ausgeprägt wie bei der Zellreihe rVCaP aber sichtlich vorhanden. Im weiteren Verlauf senkt sich die Stoffwechselaktivität der Zellreihe PC-3 auf knapp 5% bei einer Temperatur von 62,6°C ab. Die Vitalität bei dieser Temperaturabstufung beträgt weiterhin fast 10%. Somit scheinen analog zur Zellreihe rVCaP auch die PC-3 Zellen um 60°C zwar stark an Stoffwechselaktivität

zu verlieren jedoch weiterhin eine höhere Vitalität als die übrigen Zellreihen ohne vorausgehenden Stoffwechselanstieg aufzuweisen. Somit kann auch in der Zellreihe PC-3 diskutiert werden, ob der Stoffwechselanstieg durch eine vermehrte Aktivierung der HSP zustande kommt und ob diese vermehrte Aktivierung die Zellen länger vor thermischen Schäden durch eine vermehrte Ausbildung von protektiven Strategien schützt. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur auf 92,7°C liegt sowohl die Stoffwechselaktivität im MTS-Test als auch die Vitalität in der FACS-Analyse bei nahezu 0%.

4.3.4 Mögliche verstärkte Thermotoleranz durch HSP

Die Gegenüberstellung der MTS-Tests und der FACS-Analysen der einzelnen Zellreihen zeigt also bei der Zellreihe rVCaP und PC-3 eine prolongierte Thermotoleranz im Vergleich zu den übrigen Zellgruppen. Die Zellreihe rVCaP hat bei 62,6°C einen Anteil an vitalen Zellen von circa 20%, die Zellreihe PC-3 knapp 10%. Beiden Zellreihen geht im MTS-Test ein Anstieg der Stoffwechselaktivität voraus. Die Zellreihen BPH-1, VCaP und 22Rv1 weisen keinen Stoffwechselanstieg auf und die Vitalität bei 62,6°C liegt zwischen 1-5%. Aus diesen Beobachtungen könnte also die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Zellreihe rVCaP und PC-3 einen Stoffwechselanstieg im hyperthermischen Bereich im Rahmen einer vermehrten HSP-Expression im Vergleich zu den übrigen Zellreihen zeigt, dadurch die Zellen eine verstärkte Thermotoleranz entwickeln und folglich im Vergleich zu den anderen Zellreihen bei Erhöhung der Temperatur länger vital bleiben. Für diese Schlussfolgerung spricht eine vergleichende *in vitro* Untersuchung der HSP-Hochregulation zwischen den androgeninsensitiven PC-3 Zellen und den androgensensitiven LNCaP Zellen unter hyperthermischen Bedingungen in bereits erwähnter österreichischer Studie. So resultiert aus einer Erhitzung der Zellen auf 43°C für eine Stunde ein höheres Ausmaß der Hochregulation der HSP 27-mRNA in den PC-3 Zellen im Vergleich zu den LNCaP Zellen. Auch die HSP 86-mRNA-Expression wurde in den PC-3 Zellen um ein Vielfaches stärker hochreguliert als in den LNCaP Zellen (Kramer et al. 2004). Diese Ergebnisse unterstützen somit die These, dass die Zellreihe PC-3 den vermehrten Stoffwechselanstieg und die daraus resultierende prolongierte Thermotoleranz durch eine stärkere Expression der HSP im hyperthermischen Bereich erreicht hat. Um diese Annahme auch für die Zellreihe rVCaP zu bestätigen, müssten in weiteren Versuchen die HSP-Expression aller fünf Zellreihen unter Hitzeapplikation untersucht werden und diese nachfolgend miteinander verglichen werden.

4.3.5 Testosteron als mögliche Ursache der gesteigerten Stoffwechselaktivität

Der erwähnte paradoxe Stoffwechselaktivitätsanstieg im MTS-Test ist in der Zellreihe rVCaP mit Abstand am stärksten ausgeprägt. Die androgenabhängige Zelllinie rVCaP wurde

durch eine dreimonatige Testosteronbehandlung aus der Zellreihe VCaP abgeleitet (Thelen et al. 2013). Somit unterscheidet sich das Zellreihenderivat von allen anderen in dieser Arbeit getesteten Zellreihen durch eine vorherige Testosteronzugabe und wirft die Frage auf, ob die hohe Stoffwechselaktivität während der Hyperthermiebehandlung mit dieser Testosteronbehandlung in Zusammenhang gebracht werden kann.

Testosteron dient als Ligand für den AR und fördert durch dessen Aktivierung das Überleben und Wachstum in Prostatakarzinomzellen (Balk und Knudsen 2008). Somit verwundert es nicht, dass eine Zugabe von Testosteron in einer vermehrten Proliferationsaktivität der Zellen resultiert. Dies bestätigt die bereits erwähnte Studie aus New York von Chhipa et al., welche das Zellwachstum der Zellreihe VCaP unter Substitution mit 1 nM DHT via Trypanblau Test gemessen hat. Nach drei Tagen zeigte sich eine Steigerung der Proliferationsrate der VCaP Zellen unter DHT-Behandlung um das nahezu Vierfache im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Chhipa et al. 2013). Auch wenn DHT mit einer Vielfach höheren Rezeptoraffinität an den AR der Prostatazellen bindet als Testosteron ist davon auszugehen, dass eine Stimulation der VCaP Zellen mit Testosteron ebenfalls in einer Steigerung der Proliferationsrate mündet (Knudsen und Penning 2010).

Obwohl also eine generell erhöhte Stoffwechselaktivität der mit Testosteron behandelten rVCaP Zellen zu erwarten ist, stellt sich trotzdem weiterhin die Frage, warum die Stoffwechselaktivität der rVCaP Zellen unter hyperthermischen Bedingungen so drastisch gesteigert wird.

In einer Studie der Universität Bethesda wurde der Effekt von Testosteron auf die thermische Antwort von Mäusen auf eine Hitzeexposition getestet. Die thermische Antwort wurde anhand der Steigerungsdynamik der Kerntemperatur auf einen Wert von 42,4°C bei einer Hitzeexposition zwischen 39,5-40°C gemessen. Hierfür wurden vier Gruppen unterschieden, eine Kontrollgruppe bestehend aus unkastrierten männlichen Mäusen, weibliche Mäuse, kastrierte Mäuse und kastrierte Mäuse mit nachfolgender Testosteronsubstitution. Die Ergebnisse ergaben eine höhere Empfänglichkeit der männlichen Mäuse für die Entwicklung einer hitzeinduzierten Hyperthermie im Sinne eines schnelleren und größeren Anstiegs der Kerntemperatur im Vergleich zu den weiblichen Mäusen. Dabei wurde gezeigt, dass diese rapidere Reaktion durch eine Kastration der Mäuse gezügelt werden kann, nicht jedoch durch eine Kastration mit nachfolgender Testosterongabe. Diese Ergebnisse suggerieren, dass Testosteron eine wichtige Rolle in der Verstärkung der hyperthermischen Reaktion auf Hitzeexposition spielt. Eine Suppression von Testosteron hingegen scheint die Resistenz der Tiere gegenüber der Ausbildung einer hitzeinduzierten Hyperthermie zu verbessern (Chen und Yu 2018).

Verbindet man also die Annahmen, dass die Präsenz von Testosteron *in vivo* eine verstärkte Reaktion des Gewebes auf Hitze vermittelt und die Umwandlung des MTS-Farbstoffes in Formazan und damit die Stoffwechselaktivitätsmessung durch die Reaktionen während der Glykolyse unter thermischen Stress beeinflusst wird, könnte dies als eine Erklärung für den sehr starken paradoxen Vitalitätsanstieg der Zellreihe rVCaP *in vitro* dienen.

Die umgekehrte Annahme, also dass eine Suppression von Testosteron *in vivo* zu einer langsameren Ausbildung einer hitzeinduzierten Hyperthermie und damit zu einer geringeren Stoffwechselaktivität im MTS-Test führt, deckt sich ebenfalls mit unseren Ergebnissen. In den MTS-Tests der Zellreihe rVCaP zeigte sich sowohl bei den unstimulierten als auch bei den mit Finasterid und Bicalutamid behandelten Zellen ein Anstieg der Stoffwechselaktivität bei Steigerung der Temperatur. Interessant ist, dass bei den MTS-Tests, in denen die Zellen zuvor mit Medikamenten behandelt wurden, die Stoffwechselaktivität der Kontrollgruppe, also der Zellen ohne medikamentöse Stimulation, bei einer Temperatur von 53,9°C abfällt, wohingegen die Stoffwechselaktivität der medikamentös behandelten Zellen bereits bei 51,3°C ihr Maximum erreicht. Das Medikament Finasterid inhibiert als 5 α -Reduktase-Hemmer die Umwandlung von Testosteron in DHT, welches eine zwei - fünffach höhere Bindungsaffinität zum AR aufweist (Vis und Schröder 2009b). Bicalutamid ist ein Antiandrogen, wirkt kompetitiv am AR und minimiert somit die Wirkung von Testosteron/DHT am AR (Nakabayashi et al. 2011). Die Stoffwechselaktivität fällt also in den Testosteron-supprimierten rVCaP Zellen etwas früher ab als in den nicht behandelten rVCaP Zellen und deutet somit ebenfalls daraufhin, dass eine Suppression von Testosteron eine schwächere Reaktion des Stoffwechsels auf Hitzeexposition vermittelt. Gegen diese Annahme spricht allerdings die Tatsache, dass auch die Zellen der Lösungsmittelkontrolle in beiden Versuchen, also sowohl die mit EtOH behandelten Zellen in den MTS-Tests mit Finasterid als auch die mit DMSO behandelten Zellen in den MTS-Tests mit Bicalutamid analog zu den Testosteron-supprimierten Zellen bereits etwas früher einen Verlust der Stoffwechselaktivität aufzeigen als die unstimulierte Kontrollgruppe. Zudem kann die erhöhte Anfälligkeit der Zellen auf thermischen Stress in der FACS-Analyse nicht belegt werden. Im Gegenteil zeigen die Zellen der Zellreihe rVCaP sogar eine höhere Vitalität bei Temperaturen um 60°C als die übrigen Zellreihen ohne Testosteronzugabe und damit eher eine verminderte Anfälligkeit auf thermischen Stress. Des Weiteren erklärt die Zugabe von Testosteron nicht die ebenfalls erhöhte Stoffwechselaktivität der Zellreihe PC-3.

In einer weiteren Studie wurde der Effekt einer Zugabe von Testosteron auf die Expression des HSP 90-Levels in Prostatagewebe untersucht. Hierfür wurden Mäuse mit 3 mg/kg Körpergewicht Testosteron für 14 Tage behandelt. Nachdem die Mäuse getötet wurden, wurde das prostatistische Gewebe mittels Western Blot Analysen auf die Expression von HSP

90 untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression des HSP 90-Levels der mit Testosteron behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche nicht mit Testosteron behandelt wurden (Kim et al. 2018). Diese Studie unterstützt die Annahme, dass die hohe Stoffwechselaktivität in der Zellreihe rVCaP, welche ebenfalls mit Testosteron behandelt wurde, in einer vermehrten Expression und Aktivität von HSP gründet. Diese Vermutung würde auch die höheren Vitalitätswerte in der FACS-Analyse bei 57,8°C und 62,6°C erklären. Sollte die Substitution von Testosteron das HSP-Level erhöhen, könnte dies zu einer vermehrten Thermotoleranz führen, was wiederum in einem reduzierten Abfall der Vitalität der Zellen bei Steigerung der Temperatur resultiert.

Würde man Patienten nun mit Finasterid oder Bicalutamid behandeln und somit suppressierte Testosteronspiegel erzeugen, würde man laut unseren Ergebnissen eine schwächere Antwort der Stoffwechselaktivität auf die Hitze erzeugen. Allerdings zeigt sich diese schwächere Antwort nur in der zuvor mit Testosteron behandelten Zellreihe rVCaP und ist zudem nicht signifikant schwächer als in den Zellen ohne medikamentöse Stimulation. Hängt die erhöhte Stoffwechselaktivität außerdem mit einer vermehrten Expression der HSP durch die vorherige Testosterongabe zusammen, würde durch den Entzug von Testosteron durch eine ADT lediglich der zuvor selbst herbeigeführte Effekt ausgeglichen werden.

4.3.6 Mögliche Auswirkung des paradoxen Stoffwechselaktivitätsanstiegs

Sollte sich die Stoffwechselaktivität in den Zellreihen rVCaP und PC-3 tatsächlich so verhalten, wie unsere Ergebnisse vermuten lassen, würde dies natürlich Auswirkung auf die HIFU-Therapie *in vivo* haben. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 geschildert, erfolgt die Verteilung der Hitze während der HIFU-Therapie exzentrisch.

Werden die Ultraschallwellen in der Indexläsion gebündelt, erreichen sie dort Spitzentemperaturen zwischen 80-100°C (Kennedy 2005). Somit werden in der Umgebung der Indexläsion durch eine geringere Fokussierung der Schallwellen niedrigere Temperaturen erreicht (Nau et al. 2005). Die äußere Grenze der Gewebszerstörung in der HIFU-Therapie ist zwischen 50-54°C definiert (Diederich 2005). Überträgt man nun die Ergebnisse des MTS-Tests und der FACS-Analysen der Zellreihen rVCaP und PC-3 auf die *in vivo* HIFU Anwendung, würden in der Grenzzone der HIFU-Therapie die Prostatazellen durch die Hitzezufuhr eine erhöhte Stoffwechselaktivität aufweisen. Erklärt man sich diese erhöhte Stoffwechselaktivität im Rahmen der Aktivierung der HSP zur Ausbildung einer Thermotoleranz, welche sich in der höheren Vitalität in der FACS-Analyse im Vergleich zu den übrigen Zellreihen widerspiegelt, würde dies wiederum eine Resistenz der PC-3 Zellen und der rVCaP Zellen auf Thermoablationen und ein daraus resultierendes mögliches Therapieversagen bedeuten.

4.4 Limitationen der angewandten Messmethoden

Für die Detektion der Stoffwechselaktivität sowie der Vitalität der Zellen unter hyperthermischen Bedingungen wurden sowohl für die unstimulierten als auch für die stimulierten Zellen der MTS-Test und die FACS-Analyse angewandt. Bevor die Ergebnisse der *in vitro* Versuche mit *in vivo* Studien verglichen werden, sollen zunächst noch einige Vor- und Nachteile der beiden angewandten Messmethoden kurz erläutert werden.

4.4.1 MTS-Test

Der MTT-Test gilt seit seiner Entwicklung im Jahr 1983 durch Mosmann als Goldstandardmessmethode zur Detektion der Viabilität von Zellen (Mosmann 1983). Insbesondere durch die zahlreichen Modifikationen des MTT-Tests in den folgenden Jahren – hierzu zählt der Wegfall von Waschschrritten sowie Entfärbungsverfahren – erreichte der Test eine vereinfachte Anwendbarkeit und wurde als Proliferationstest zunehmend beliebter (Khabar et al. 1996).

4.4.1.1 Fehlender Abfall der Stoffwechselaktivität trotz Thermoablation

In den hier durchgeführten MTS-Tests fällt ein fehlender Abfall der Stoffwechselaktivität trotz thermoablativen Temperaturen auf. Die direkte thermische Zelltoxizität im Sinne eines irreversiblen Zelltodes durch Koagulationsnekrosen tritt auf, wenn die Temperaturen im Gewebe eine Grenze von $> 56^{\circ}\text{C}$ für einen Zeitraum von über einer Sekunde erreichen. Während der HIFU-Therapie können im Fokuspunkt die Temperaturen schnell Grenzwerte $> 80^{\circ}\text{C}$ erreichen, was selbst bei sehr kurzer Expositionsdauer zu einem effektiven Zelltod führen sollte (Kennedy 2005). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden die Zellen den Zieltemperaturen für jeweils zehn Sekunden ausgesetzt. Dies sollte einer genügend langen Expositionszeit für eine Nekrose entsprechen.

Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der MTS-Tests fällt auf, dass die Werte der Stoffwechselaktivität selbst bei $> 90^{\circ}\text{C}$ bei allen Zelllinien $> 2\%$ liegen, bei der Zellreihe rVCaP, VCaP sowie der Zellreihe 22Rv1 sogar $\geq 15\%$ im Vergleich zu deren unerhitzten Kontrollen.

Eine Erklärung hierfür könnte in der Biochemie des MTS-Tests liegen: Wie bereits in Kapitel 2.2.4 ausführlich beschrieben beruht der auf Tetrazolium basierende MTT-Test auf der enzymatischen Umwandlung in Formazan. Diese Umwandlung erfolgt in verschiedenen Zellorganellen wie den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum (Stockert et al. 2012). Es wurde bewiesen, dass verschiedene Faktoren ebenfalls zu einer Aktivierung der enzymatischen Katalyse des Farbstoffes und somit zu einer falsch-hoch oder falsch-niedrig gemessenen Zellvitalität führen können (Sylvester 2011). So konnte gezeigt werden, dass

der Glukosegehalt des Mediums, in welchem die Zellen in der Zellkultur gehalten werden, einen Einfluss auf die Formazan Produktion in verschiedenen Tumoren hat. Sowohl der Grad des zellulären Transportes von Glukose als auch der Glukosestoffwechsel der Zellen selbst nimmt Einfluss auf die Reduktion des MTT-Farbstoffes und damit auf das Ergebnis der gemessenen Zellviabilität. Eine erhöhte Konzentration von Glukose im Medium geht mit einer erhöhten Aktivität des Zellstoffwechsels im MTT-Test einher (Vistica et al. 1991). Die Zellreihen BPH-1, VCaP, 22Rv1 und PC-3 wurden in DMEM gehalten, die Zellreihe rVCaP in DMEM versetzt mit Testosteron (1 nMol). Das verwendete DMEM enthielt 4,5 g/l Glukose und zählt damit zu einem Medium mit hohem Glukosegehalt. DMEM reduziert als glukosehaltiges Medium den MTT-Farbstoff nachweislich stärker als andere Zellkulturmedien wie RPMI (Rosewell Parl Memorial Institute) oder F12. Da der MTS-Farbstoff dem Salz des MTT-Farbstoffes ähnelt und beide als Substrat für das gleiche Enzym dienen wird vermutet, dass der MTS-Farbstoff ebenfalls vermehrt mit DMEM interagiert (Talorete et al. 2006). In den MTS-Testungen dieser Arbeit wurden jeweils zwei Leerproben aus reinem Medium mitgeführt und im Anschluss an die Tests von den untersuchten Proben abgezogen, um das Medium als potenzielle Fehlerquelle auszuschließen. Allerdings wurde diese Leerprobe nicht erhitzt, sondern bei 37°C im Inkubator gelagert. Somit wurde von den erhitzten Zellproben nicht eine ebenfalls auf dieselbe Temperatur erhitzte Leerprobe des Mediums abgezogen. Dies könnte eine Erklärung für die Tatsache sein, dass die Stoffwechselaktivität im MTS-Test auch bei höheren Temperaturen in Bereichen zwischen 2-16% bleiben.

Neben dem Medium kann auch die Wahl des Lösungsmittels für Medikamente die Ergebnisse des MTS-Tests beeinflussen. Für das Medikament Finasterid wurde EtOH als Lösungsmittel genutzt, für das Medikament Bicalutamid wurde DMSO als Lösungsmittel genutzt. Mehrere Arbeitsgruppen haben festgestellt, dass DMSO als Lösungsmittel für den MTT-Test gut geeignet ist. Es bietet eine bessere Löslichkeit des Formazan und eine daraus resultierende bessere Stabilität und Ablesbarkeit in der Messung der optischen Dichte des umgewandelten Formazans im MTT-Test (Twentyman und Luscombe 1987). Um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, wurden in den hier durchgeführten MTS-Tests jeweils Lösungsmittelkontrollen mitgeführt; dies kann somit als potenzielle Fehlerquelle im MTS-Test ausgeschlossen werden.

4.4.1.2 Unterschiedliche Stoffwechselaktivität bei 37°C Inkubator vs. Thermozykler

Eine weitere Auffälligkeit im MTS-Test ist die unterschiedliche Stoffwechselaktivität der Zellen bei 37°C im Thermozykler bezogen auf die Zellen der 37°C Inkubator Kontrolle. Hier lässt sich kein einheitliches Muster identifizieren. Während die Zellreihen BPH-1 und PC-3

sowohl in den MTS-Tests ohne medikamentöse Stimulation also auch in den Tests mit medikamentöser Stimulation nahezu die gleiche metabolische Aktivität wie die Zellen der Inkubator-Kontrolle aufweisen, zeigen sich in den Zellreihen rVCaP, VCaP und 22Rv1 teils höhere und teils geringere Stoffwechselaktivitäten im Vergleich zur jeweiligen Inkubator-Kontrolle.

Die Zellen der Kontrolle befanden sich während der Erhitzung der übrigen Zellen im Inkubator und wurden dort bei einer konstanten Temperatur von 37°C gelagert. Die Zellen, die im Thermozykler auf 37°C erhitzt wurden, wurden während der Erhitzung der anderen Zellen auf höhere Temperaturen bei Raumtemperatur gelagert und damit teilweise bis zu über einer Stunde hypothermischen Bedingungen ausgesetzt. Wie bereits im Vorfeld diskutiert, könnte die unterschiedliche Stoffwechselaktivität der Zellreihen bei Hyperthermie mit einer unterschiedlichen Expression von HSP zusammenhängen. Milder Kältestress (zwischen 25-35°C) und Hitzeschock induzieren teilweise ähnliche Anpassungsreaktionen auf Zellen (Neutelings et al. 2013). Es wurde bereits eine Vielzahl an Kälteschockproteinen (CSP) beschrieben, worunter das RBM3 (*RNA Binding Motif Protein 3*) sorgfältig charakterisiert wurde. Die Expression des Proteins wird bei einer milden Hypothermie drastisch hochreguliert und scheint dadurch eine Schlüsselrolle in Adaptionsmechanismen der Zellen in hypothermischen Stresssituationen einzunehmen (Dresios et al. 2005).

Die mit 37°C im Thermozykler erhitzten Zellen wurden, nachdem sie für die Zeit der Erhitzung der anderen Zellen bei Raumtemperatur gelagert wurden, mit dem MTS-Farbstoff versetzt und anschließend bis zur Messung vier Stunden bei 37°C im Inkubator aufbewahrt. Auch ein Wiederaufwärmen der Zellen nach milder Hypothermie kann nachweislich in Prostatagewebe Genexpressionen und die Proliferationsrate der Zellen erhöhen (Kaija et al. 2015).

In einer Studie aus den USA wurden Genexpressionsprofile der Zellreihe LNCaP und PC-3 als Antwort auf milden hyperthermischen Stress angefertigt. In der androgensensitiven LNCaP Zellreihe zeigten sich 216 dysregulierte Gene, in der androgeninsensitiven Zellreihe PC-3 158 dysregulierte Gene. Von diesen dysregulierten Genen teilten sich die beiden Zellreihen 54 und deutet damit auf teilweise gleiche Anpassungsreaktionen auf thermischen Stress der Zellreihen hin. Unter diesen 54 gemeinsamen Genen befanden sich auch HSP und CSP. HSP wurden teils stärker in der PC-3, teils stärker in der LNCaP heraufreguliert. Auch unter den CSP fanden sich Unterschiede im Ausmaß der Herunterregulierung (Zeng et al. 2009). Die Mehrheit der Gene stimmen also nicht überein und selbst die gemeinsamen Gene werden in einem unterschiedlichen hohen Maß als Antwort auf Stress in den beiden Zellreihen exprimiert. Somit wundert es nicht, dass sich die Stoffwechselaktivität der fünf Zellreihen bei 37°C unterscheiden, wenn man davon ausgeht, dass die Zellen bei

37°C im Thermozykler im Vergleich zu den 37°C im Inkubator durch die Temperaturschwankungen vermehrten Stress ausgesetzt wurden und jede Zellreihe mit ihrem Metabolismus individuell auf diesen Stress reagiert. Auch ergab sich durch ein routinierteres Vorgehen in später durchgeführten Experimenten ein Unterschied in der Zeitdauer, in welcher die Zellen hypothermischen Stress ausgesetzt waren. Man kann also annehmen, dass die Zellreihen unterschiedliche Genprofile aufweisen und sich sowohl im Maß der HSP- also auch der CSP-Expression als Antwort auf Stress unterscheiden. In Zusammenschau mit der variablen Dauer der Temperaturschwankungen könnten diese Tatsachen als Erklärung dienen, dass sich die Stoffwechselaktivität der Zellreihen, welche bei 37°C im Thermozykler erhitzt wurden, von der Stoffwechselaktivität der Inkubator-Kontrolle unterscheiden und sich kein einheitliches Muster identifizieren lässt.

4.4.2 FACS-Analyse

Die Durchflusszytometrie ist eine Messmethode, bei welcher Zellen durch Streulichter nach Größe, Form und intrazellulärer Komplexität sowie durch fluoreszierende Anfärbungen in diverse weitere Charakteristika sortiert und analysiert werden können. Die Durchflusszytometrie ist ein wertvolles Instrument mit Anwendungen in vielen Disziplinen wie der Onkologie, der Immunologie und der Mikrobiologie (McKinnon 2018).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie mit den fluoreszierenden Proteinen Annexin V und Pi kombiniert, um vitale Zellen von apoptotischen und nekrotischen Zellen nach der Exposition verschiedener Temperaturen zu unterscheiden und eine mögliche Auswirkung auf die Vitalität der Zellen unter medikamentöser Vorbehandlung mit Finasterid oder Bicalutamid festzustellen. Wie bereits im MTS-Test zeigt sich hier kein Unterschied der Hitzesensitivität der fünf Zellreihen unter medikamentöser Vorbehandlung.

Die Ergebnisse bezüglich der Einleitung der Apoptose decken sich gut mit den in der Literatur beschriebenen Daten. Die zelluläre Homöostase kann bis zu Temperaturen von 45°C aufrechterhalten werden. Zwischen 45-60°C verkürzt sich die Länge der Hitzeexposition bis zum Auftreten einer Zellschädigung. Ab einer Temperatur von 60-100°C tritt dann der nahezu sofortige Zelltod ein (Goldberg et al. 2000). Diese Abstufung entspricht gut den hier erfassten Daten.

Bei der Zellreihe BPH-1 findet zwischen 57,8°C und 62,6°C ein Abfall von $\geq 20\%$ auf $\leq 5\%$ der Vitalität statt, bei den Zellreihen VCaP und 22Rv1 zwischen 57,8°C und 62,6°C ein Abfall von 10-15% auf 1%. Bei der Zellreihe PC-3 geschieht ein Abfall zwischen 62,6°C und 65°C von 9-10% auf $< 1\%$. Lediglich bei der Zellreihe rVCaP konnte bei 62,6°C weiterhin eine höhere Vitalität zwischen 16-22% nachgewiesen werden, welche bereits ausführlich in vorherigen Kapiteln erläutert wurde.

Trotz der weitreichenden Nutzung der Durchflusszytometrie hat auch diese einige Nachteile. Ein nicht automatisiertes Vorgehen kann zu potenziellen Fehlerquellen führen. Die Handhabung der Proben und des Instrumentensetups sollte von Experten durchgeführt werden (Maecker et al. 2012). Die Kalibrierung des Gerätes und der benötigten Spannungen für unsere Versuche wurden von einer für die Durchflusszytometrie geschulten Fachkraft durchgeführt.

4.4.2.1 Manuelles Gating

Wichtig zu erwähnen ist das manuelle Gating (siehe Abbildung 7: *FSC-/SSC-Diagramm*). Wie bereits im Material und Methodenteil beschrieben wurden die Zellen anhand des *FSC* und des *SSC* zu einer Population gegatet und die beschädigten Zellen und Zellbestandteile aussortiert. Das Ziel war die intakten Zellen einer jeder Krebszellreihe zu detektieren, um anhand dieses Vorsortierens die weitere Analyse zu optimieren. Im „Human Immune Genome Project“ konnte gezeigt werden, dass das manuelle Gating eine der größten Variablen im Outcome der FACS-basierten Experimente darstellt. Die Analyse der Populationen, die von Interesse sind, sollten zentral von einem oder mehreren koordinierten Experten oder von automatisierten Gating-Algorithmen durchgeführt werden (Finak et al. 2016; Maecker et al. 2012). Während des manuellen Gatings werden die Grenzen zur Auswahl einer Population subjektiv festgelegt. Zudem werden lediglich ein- bis zweidimensionale Plots betrachtet. Dies vernachlässigt die hohe Dimensionalität der FACS-Daten und sorgt somit für eine Enthaltung wichtiger Informationen (Montante und Brinkman 2019). Jedes manuelle Gating stützt sich zudem auf die Erfahrung des Forschers und kann eine Tendenz zu den erwarteten Resultaten fördern (Mair et al. 2016). Ein automatisiertes Verfahren führt zu einem gleichen bzw. genaueren Ergebnis als die Analyse durch einen menschlichen Experten in diesem Gebiet (Aghaeepour et al. 2013).

4.4.2.2 Zellzahl

Bei der Durchführung des MTS-Tests wurden zur Vorbereitung Konzentrationen zwischen $1,5 - 4 \times 10^5$ Zellen/ml verwendet, um nach 48 Stunden eine Zellzahl von $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml zu erreichen. Bei der FACS-Analyse waren deutlich höhere Zellzahlen pro Versuch nötig. Es wurden $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät um bei der Durchführung der Analyse Konzentrationen von $1 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml zu erreichen.

Folglich lag bei den FACS-Analysen eine sehr hohe Zelldichte in den PCR-Streifen vor, in welchen die Zellen im Thermozykler erhitzt wurden. Die Frage ist nun, ob diese hohe Zelldichte die Wirkung der Hitzeexposition beeinflusst. In einer Veröffentlichung über ein *in-*

in vitro Testsystem für Chemo- und Thermosensibilität von Ewing-Sarkom-Zellreihen wurde als optimale Zelldichte 10.000 Zellen/Loch für die Durchführung eines Proliferationstestes nach Hitzeexposition beschrieben (Debes et al. 2002). In unseren Versuchen wurde jedes Loch mit 2 ml der Zellsuspension befüllt, dies entspricht beim MTS-Test $2 \times 1,5 - 4 \times 10^5$ Zellen, bei der FACS-Analyse $2 \times 5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen pro Loch, somit also einer deutlich höheren Zellzahl.

4.5 Vergleich *in vitro* Ergebnisse mit klinischen Studien

In diesem experimentellen Aufbau zeigen die Ergebnisse der MTS-Testung sowie der FACS-Analyse der Zellreihen nach medikamentöser Vorbehandlung klar, dass eine Stimulation mit Finasterid oder Bicalutamid keinen signifikanten Einfluss auf die Hitzesensitivität der Prostatakrebszellen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 bewirkt.

Dieses Resultat deckt sich mit einer klinischen Studie aus Tokio, welche den Effekt einer neoadjuvanten ADT auf das Outcome des lokal begrenzten Prostatakarzinoms nach HIFU-Therapie untersuchte. Zwischen 1999 und 2005 wurden 250 Patienten untersucht. 154 der Patienten erhielten eine ADT über einen Zeitraum von zwei bis sieben Monaten vor der HIFU-Therapie, 96 Patienten erhielten nur die HIFU-Behandlung. Patientenalter, Krankheitsstadium und Gleason-Score vor Behandlung waren gleich in beiden Patientengruppen. Patienten der ADT Gruppe hatten ein signifikant höheres PSA-Level sowie ein geringeres Prostatavolumen im Vergleich zur Patientenkohorte ohne ADT vor Therapiebeginn. Das primäre Outcome wurde gemessen am Therapieversagen, welches als Präsenz eines Prostatakarzinoms in einer sechs Monate nach der HIFU-Therapie durchgeführten TRUS-gesteuerten Prostatabiopsie definiert wurde. Die Ergebnisse erbrachten ein im TRUS gleichermaßen reduziertes Prostatavolumen der mit und ohne ADT behandelten Patienten nach der HIFU-Therapie. In den Prostatabiopsien erbrachten 80/250 Biopsien ein positives Ergebnis für Prostatakrebs (32%). Das Therapieversagen war in der mit ADT neoadjuvant behandelten Gruppe etwas geringer, dieses Ergebnis war statistisch jedoch nicht signifikant (31% vs. 34%). Diskutiert wurden in dieser Studie der insgesamt höhere PSA-Ausgangswert in der mit ADT vorbehandelte Patientengruppe, welcher mit einem fortgeschrittenen Krankheitsbild einhergehen könnten. Des Weiteren stellt sich die pathologische Analyse der Prostatabiopsien von vorbehandeltem Gewebe schwieriger dar als die Analyse von nicht behandeltem Gewebe und könnte eine potentielle Fehlerquelle bei der Detektion von karzinomatösen Residuen in der Prostata sein (Uchida et al. 2006). Ein Follow-Up dieser Studie wurde bis dato nicht veröffentlicht. Trotz allem lässt die Studie ebenfalls auf keinen Einfluss einer ADT auf die HIFU-Therapie schließen und deckt sich somit in den Ergebnissen mit den hier durchgeführten MTS-Tests und FACS-Analysen.

Eine weitere japanische Studie untersuchte den Einfluss einer neoadjuvanten ADT auf die HIFU-Therapie beim nicht-metastasierten Prostatakarzinom an einer Gruppe von 530 Patienten. 270 Patienten erhielten eine neoadjuvante Therapie, 202 davon ein LHRH-Analogon mit Antiandrogen, 68 Patienten nur ein LHRH-Analogon, 260 Patienten wurden ausschließlich mit einer HIFU-Therapie behandelt. Die ADT wurde innerhalb von 6 Monaten vor der HIFU-Therapie durchgeführt. Die Gruppe mit neoadjuvanter ADT zeigte einen höheren PSA-Ausgangswert sowie ein höheres Risikoprofil als die Kohorte ohne ADT. Das primäre Outcome wurde gemessen anhand des krankheitsfreien Überlebens, welches sich aus einem fehlenden PSA-Anstieg > 2 ng/ml ausgehend vom niedrigsten gemessenen PSA-Wert (PSA-Nadir), negativen Prostatabiopsien sowie das Fehlen von Fernmetastasen zusammensetzte. Der PSA-Wert wurde alle ein bis drei Monate während des ersten Jahres nach HIFU-Therapie gemessen und danach alle zwei bis sechs Monate während des Follow-Up. Die postoperative Prostatabiopsie wurde sechs bis zwölf Monate nach der HIFU-Therapie durchgeführt. Die Ergebnisse erbrachten keinen signifikanten Unterschied im PSA-Wert zwölf Monate nach der HIFU-Therapie zwischen beiden Patientengruppen. Der PSA-Nadir wiederum war vier Monate nach HIFU-Behandlung in den mit einer neoadjuvanten ADT behandelten Patientengruppe signifikant geringer. Ebenso zeigte sich eine signifikant geringere Rate an negativen Prostatabiopsien in der ADT Gruppe (84,4%) im Vergleich zu Patienten ohne ADT (77,2%). Die biochemische Versagensrate, gemessen anhand eines PSA-Anstiegs > 2 ng/ml, war in der ADT-Gruppe ebenfalls signifikant geringer (16,3%) im Vergleich zu den Patienten ohne ADT (28,5%), insbesondere in den Intermediär- und Hochrisikogruppen. Insgesamt wurde ein Versagen der HIFU-Therapie bei 31,5% der Patienten ohne ADT und 18,5% der Patienten mit ADT bestimmt. In Zusammenschau konnte eine signifikant bessere Drei-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit Intermediär- und Hochrisikoprofil in der mit einer neoadjuvanten ADT behandelten Kohorte im Vergleich zur nur mit HIFU-Therapie behandelten Kohorte gezeigt werden (Sumitomo et al. 2008).

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Ergebnissen der Studie von Uchida et al. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte der Einschluss von Patienten mit weiter fortgeschrittenen Erkrankungen in der Studie von Sumitomo et al. sein, da die Verbesserung der Drei-Jahres-Überlebensrate insbesondere in den Intermediär- und Hochrisiko Patienten aufgezeigt wurde. Außerdem wurden in beiden Studien unterschiedliche Definitionen für ein HIFU-Versagen gewählt. In der Studie von Uchida et al. wurde ein Therapieversagen mit einer positiven Prostatabiopsie gleichgesetzt. Übereinstimmend hierzu konnte auch in der Studie von Sumitomo et al. kein Unterschied in den positiven Prostatabiopsieraten und der Drei-Jahres-Überlebensrate ohne Krankheit in den Niedrig- und Intermediär Risikogruppen gezeigt werden (Sumitomo et al. 2008; Uchida et al. 2006). Zudem gab es in der Studie von Sumitomo et al. keine Patientenkohorte, welche nur mit einer ADT behandelt wurden. Es

sollte also auch diskutiert werden, ob die verbesserte Drei-Jahres-Überlebensrate der Intermediär- und Hochrisikogruppen lediglich auf die ADT zurückzuführen ist, unabhängig von der zusätzlich durchgeführten HIFU-Therapie.

Die beiden Veröffentlichungen zeigen in jedem Fall, dass weitere Studien mit einem längeren Follow-Up, einer genauen Kategorisierung der Patientenkohorten sowie einer exakteren Definition bezüglich des Therapieversagens notwendig sind, um eine klare Aussage über den Nutzen einer neoadjuvanten ADT vor einer HIFU-Therapie treffen zu können.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die thermischen Behandlungen - als Paradebeispiel exemplarisch an die HIFU-Therapie angelehnt - *in vitro* zu simulieren und eine mögliche Auswirkung auf die Hitzesensitivität der fünf Prostatakrebszellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 durch die Kombination einer hyperthermischen Behandlung mit einer ADT zu detektieren. Zur Erzeugung der Androgendeprivation wurden die Medikamente Finasterid und Bicalutamid gewählt.

Die Simulation der HIFU-Therapie erfolgte über einen Thermozykler. Hiermit wurden lediglich die thermischen, nicht aber die mechanischen Effekte der HIFU-Therapie berücksichtigt. Die gewählten Temperaturen, die Hitzeexpositionsdauer sowie die Rampenrate in unseren *in vitro* Versuchen beziehen jedoch die Rahmenbedingungen einer HIFU-Therapie *in vivo* mit ein. Somit wurde ein annähernd vergleichbares *in vitro* Modell der thermischen Effekte einer HIFU-Therapie geschaffen.

Sowohl in den MTS-Tests als auch in den FACS-Analysen konnte kein signifikanter Einfluss einer Androgendeprivation durch Finasterid und Bicalutamid auf die Hitzesensitivität der Prostatakrebszellreihen BPH-1, rVCaP, VCaP, 22Rv1 und PC-3 gezeigt werden. In vergleichbaren Studien konnte bereits bei normothermischen Bedingungen ein fehlender Effekt auf die Proliferation der Zellreihen durch die beiden Medikamente, wie sie in Dosierung und Stimulationsdauer in dieser Arbeit eingesetzt wurden, nachgewiesen werden. Die Hyperthermie als mögliche Ursache einer Androgenresistenz macht eine Wirkung der Medikamente auf die Zellreihen unter Hitzeeinwirkung unwahrscheinlich und bekräftigt unsere Ergebnisse.

Interessanterweise zeigte sich bei den Zellreihen rVCaP und PC-3 ein paradoxer Anstieg der metabolischen Aktivität im Bereich zwischen 46-52°C. Dieser könnte im Zusammenhang mit einer vermehrten Expression von HSP als zytoprotektive Maßnahme durch den thermischen Stress stehen. Studien haben bereits eine stärkere HSP-Expression der Zellreihe

PC-3 unter hyperthermischen Bedingungen im Vergleich zu anderen Prostatakrebszellreihen nachgewiesen. Der positive Einfluss auf die Hochregulierung von HSP durch Testosteron verstärken diese Hypothese auch für die Zellreihe rVCaP. Die Ausbildung einer hitzeinduzierten Hyperthermie durch Testosteron könnte ebenfalls als Grund für die vermehrte Stoffwechselaktivität in der Zellreihe rVCaP dienen.

Die Annahme, dass eine vermehrte HSP-Expression die Ursache für die Stoffwechselaktivitätssteigerung ist und damit eine verstärkte Zytoprotektion initiiert wird, deckt sich zudem mit der prolongierten Thermotoleranz, welche für die beiden Zellreihen rVCaP und PC-3 in den FACS-Analysen gemessen wurde. Insbesondere die Zellreihe rVCaP zeigt bei 60°C deutlich höhere Vitalitätswerte als die Zellreihen BPH-1, VCaP und 22Rv1. Diese prolongierte Thermotoleranz könnte eine wichtige Rolle in der HIFU-Therapie *in vivo* spielen, da Temperaturen > 55°C häufig als Grenzbereich der HIFU-Therapie definiert wird. Wären die Zellen in diesem Bereich noch vital, würde dies einem Therapieversagen gleichkommen. In diesem Kontext lohnt es sich, weitere Studien über die notwendigen Temperaturen zum Erreichen eines definitiven Zelltodes durchzuführen. Somit könnte der Temperaturbereich in der Nutzung der Thermoablation weiter optimiert werden. Hierbei sollte das Temperaturminimum zum Erreichen eines sicheren Zelltodes eingehalten werden, zur Schonung des umliegenden Gewebes könnte dementsprechend auf unnötig hohe Temperaturen verzichtet werden.

In zukünftigen Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen ADT und HIFU-Therapie sollte sich bei der Simulation der HIFU-Therapie *in vitro* noch mehr an das klinische Vorbild der HIFU-Therapie *in vivo* angenähert werden. Die Induktion einer Androgenresistenz durch eine Hyperthermiebehandlung sollte vor einer Dosiserhöhung oder einer Verlängerung der Stimulationszeiten der Medikamente der ADT genauer analysiert werden. Ein interessantes Gebiet, das im Zusammenhang mit dieser Arbeit weiter untersucht werden könnte, ist die Rolle der HSP unter hyperthermischen Bedingungen in den untersuchten Zellreihen. Ein Vergleich der HSP-Expressionslevel bei Normothermie sowie deren Veränderung bei Hitzeexposition wäre erstrebenswert. Ebenfalls sollte die Rolle des Testosterons in Bezug auf die HSP-Expression unter Hyperthermie näher betrachtet werden. Der zusätzliche Einsatz von HSP-Inhibitoren könnte erwogen werden.

Die HIFU-Behandlung als fokale Therapieoption wird in Zukunft eine immer wichtigere Rolle in der Therapie des Prostatakarzinoms als Mittelweg zwischen Active Surveillance und definitiven Therapieoptionen wie Operation und Bestrahlung einnehmen. Unter Berücksichtigung dieses Trends ist es wichtig, eine mögliche medikamentöse Beeinflussung der

Hitzesensitivität der Zellen durch Medikamente der Androgendeprivation, der Chemotherapie oder auch aus dem Bereich der HSP-Inhibitoren weiter zu erforschen sowie den optimalen Temperaturbereich zum Erreichen eines sicheren Zelltodes festzulegen.

5 Anhang

Tabelle 17: Mittelwerte und Standardfehler

Zellreihe	Temperatur	Stimulation	Mittelwert	Standardfehler
BPH-1	37°C	Pi	0,002	0,001
		Annexin V + Pi	0,077	0,006
		Annexin V	0,060	0,019
		ungefärbt	0,862	0,024
	57,8°C	Pi	0,005	0,001
		Annexin V + Pi	0,313	0,049
		Annexin V	0,377	0,072
		ungefärbt	0,304	0,081
	62,6°C	Pi	0,005	0,001
		Annexin V + Pi	0,708	0,021
		Annexin V	0,248	0,037
		ungefärbt	0,038	0,017
	92,7°C	Pi	0,001	0,001
		Annexin V + Pi	0,987	0,003
		Annexin V	0,012	0,003
		ungefärbt	0,000	0,000
BPH-1 Finasterid	37°C	Pi	0,001	0,001
		Annexin V + Pi	0,084	0,008
		Annexin V	0,073	0,028
		ungefärbt	0,841	0,031
	57,8°C	Pi	0,007	0,002
		Annexin V + Pi	0,412	0,026
		Annexin V	0,362	0,084
		ungefärbt	0,220	0,072
	62,6°C	Pi	0,009	0,004
		Annexin V + Pi	0,793	0,038
		Annexin V	0,154	0,011
		ungefärbt	0,045	0,031
	92,7°C	Pi	0,000	0,000
		Annexin V + Pi	0,985	0,004

		Annexin V	0,014	0,004
		ungefärbt	0,000	0,000
BPH-1 Bicalutamid	37°C	Pi	0,002	0,001
		Annexin V + Pi	0,105	0,011
		Annexin V	0,071	0,025
		ungefärbt	0,823	0,029
	57,8°C	Pi	0,016	0,005
		Annexin V + Pi	0,436	0,025
		Annexin V	0,310	0,080
		ungefärbt	0,239	0,080
	62,6°C	Pi	0,014	0,012
		Annexin V + Pi	0,824	0,023
		Annexin V	0,128	0,020
		ungefärbt	0,034	0,022
	92,7°C	Pi	0,001	0,001
		Annexin V + Pi	0,986	0,002
		Annexin V	0,012	0,002
		ungefärbt	0,001	0,000
rVCaP	37°C	Pi	0,002	0,000
		Annexin V + Pi	0,023	0,002
		Annexin V	0,061	0,007
		ungefärbt	0,914	0,007
	57,8°C	Pi	0,029	0,005
		Annexin V + Pi	0,254	0,018
		Annexin V	0,233	0,023
		ungefärbt	0,484	0,011
	62,6°C	Pi	0,022	0,004
		Annexin V + Pi	0,484	0,014
		Annexin V	0,277	0,030
		ungefärbt	0,216	0,015
	92,7°C	Pi	0,020	0,008
		Annexin V + Pi	0,978	0,009
		Annexin V	0,002	0,001
		ungefärbt	0,000	0,000

rVCaP Finasterid	37°C	Pi	0,002	0,000
		Annexin V + Pi	0,029	0,007
		Annexin V	0,065	0,008
		ungefärbt	0,904	0,011
	57,8°C	Pi	0,021	0,007
		Annexin V + Pi	0,268	0,036
		Annexin V	0,248	0,039
		ungefärbt	0,463	0,005
	62,6°C	Pi	0,014	0,002
		Annexin V + Pi	0,555	0,057
		Annexin V	0,276	0,037
		ungefärbt	0,155	0,032
	92,7°C	Pi	0,003	0,002
		Annexin V + Pi	0,994	0,002
		Annexin V	0,003	0,001
		ungefärbt	0,000	0,000
rVCaP Bicalutamid	37°C	Pi	0,002	0,001
		Annexin V + Pi	0,029	0,004
		Annexin V	0,084	0,018
		ungefärbt	0,886	0,018
	57,8°C	Pi	0,020	0,006
		Annexin V + Pi	0,303	0,028
		Annexin V	0,246	0,032
		ungefärbt	0,431	0,003
	62,6°C	Pi	0,022	0,006
		Annexin V + Pi	0,520	0,038
		Annexin V	0,283	0,049
		ungefärbt	0,176	0,006
	92,7°C	Pi	0,011	0,006
		Annexin V + Pi	0,984	0,009
		Annexin V	0,004	0,002
		ungefärbt	0,000	0,000
VCaP	37°C	Pi	0,003	0,001
		Annexin V + Pi	0,127	0,029

		Annexin V	0,061	0,002	
		ungefärbt	0,808	0,027	
	57,8°C	Pi	0,016	0,004	
		Annexin V + Pi	0,527	0,030	
		Annexin V	0,310	0,012	
		ungefärbt	0,148	0,030	
	62,6°C	Pi	0,006	0,001	
		Annexin V + Pi	0,762	0,031	
		Annexin V	0,218	0,028	
		ungefärbt	0,014	0,003	
	92,7°C	Pi	0,001	0,000	
		Annexin V + Pi	0,987	0,002	
		Annexin V	0,011	0,002	
		ungefärbt	0,000	0,000	
	VCaP Finasterid	37°C	Pi	0,001	0,001
			Annexin V + Pi	0,104	0,012
Annexin V			0,075	0,008	
ungefärbt			0,819	0,020	
57,8°C		Pi	0,021	0,013	
		Annexin V + Pi	0,569	0,054	
		Annexin V	0,287	0,055	
		ungefärbt	0,123	0,020	
62,6°C		Pi	0,003	0,002	
		Annexin V + Pi	0,848	0,012	
		Annexin V	0,142	0,017	
		ungefärbt	0,007	0,003	
92,7°C		Pi	0,000	0,000	
		Annexin V + Pi	0,987	0,004	
		Annexin V	0,012	0,004	
		ungefärbt	0,000	0,000	
VCaP Bicalutamid	37°C	Pi	0,003	0,002	
		Annexin V + Pi	0,132	0,047	
		Annexin V	0,067	0,006	
		ungefärbt	0,798	0,046	

	57,8°C	Pi	0,024	0,013
		Annexin V + Pi	0,527	0,036
		Annexin V	0,314	0,026
		ungefärbt	0,135	0,034
	62,6°C	Pi	0,010	0,007
		Annexin V + Pi	0,793	0,029
		Annexin V	0,184	0,029
		ungefärbt	0,013	0,005
	92,7°C	Pi	0,002	0,001
		Annexin V + Pi	0,982	0,005
		Annexin V	0,015	0,005
		ungefärbt	0,001	0,000
22Rv1	37°C	Pi	0,005	0,002
		Annexin V + Pi	0,125	0,005
		Annexin V	0,176	0,028
		ungefärbt	0,694	0,032
	57,8°C	Pi	0,008	0,001
		Annexin V + Pi	0,588	0,016
		Annexin V	0,305	0,021
		ungefärbt	0,099	0,013
	62,6°C	Pi	0,006	0,004
		Annexin V + Pi	0,753	0,027
		Annexin V	0,235	0,023
		ungefärbt	0,006	0,002
	92,7°C	Pi	0,006	0,003
		Annexin V + Pi	0,930	0,027
		Annexin V	0,062	0,029
		ungefärbt	0,002	0,001
22Rv1 Finasterid	37°C	Pi	0,004	0,000
		Annexin V + Pi	0,151	0,012
		Annexin V	0,141	0,013
		ungefärbt	0,704	0,014
	57,8°C	Pi	0,013	0,002
		Annexin V + Pi	0,618	0,038

		Annexin V	0,249	0,039	
		ungefärbt	0,120	0,009	
		62,6°C	Pi	0,008	0,003
			Annexin V + Pi	0,768	0,035
			Annexin V	0,214	0,037
			ungefärbt	0,010	0,001
		92,7°C	Pi	0,004	0,003
			Annexin V + Pi	0,947	0,020
	Annexin V		0,047	0,018	
	ungefärbt		0,002	0,001	
	22Rv1 Bicalutamid	37°C	Pi	0,003	0,000
			Annexin V + Pi	0,166	0,029
Annexin V			0,199	0,018	
ungefärbt			0,631	0,024	
57,8°C		Pi	0,014	0,006	
		Annexin V + Pi	0,622	0,073	
		Annexin V	0,260	0,065	
		ungefärbt	0,104	0,014	
62,6°C		Pi	0,010	0,005	
		Annexin V + Pi	0,792	0,065	
		Annexin V	0,191	0,065	
		ungefärbt	0,007	0,003	
92,7°C		Pi	0,000	0,000	
		Annexin V + Pi	0,955	0,021	
		Annexin V	0,044	0,020	
		ungefärbt	0,001	0,000	
PC-3	37°C	Pi	0,002	0,001	
		Annexin V + Pi	0,087	0,017	
		Annexin V	0,058	0,006	
		ungefärbt	0,852	0,012	
	57,8°C	Pi	0,003	0,001	
		Annexin V + Pi	0,675	0,102	
		Annexin V	0,226	0,041	
		ungefärbt	0,097	0,064	

	62,6°C	Pi	0,001	0,000
		Annexin V + Pi	0,822	0,083
		Annexin V	0,172	0,083
		ungefärbt	0,004	0,001
	92,7°C	Pi	0,000	0,000
		Annexin V + Pi	0,979	0,004
		Annexin V	0,020	0,004
		ungefärbt	0,001	0,000
PC-3 Finasterid	37°C	Pi	0,003	0,002
		Annexin V + Pi	0,108	0,017
		Annexin V	0,072	0,003
		ungefärbt	0,816	0,016
	57,8°C	Pi	0,003	0,002
		Annexin V + Pi	0,714	0,087
		Annexin V	0,180	0,027
		ungefärbt	0,104	0,061
	62,6°C	Pi	0,002	0,001
		Annexin V + Pi	0,852	0,066
		Annexin V	0,141	0,064
		ungefärbt	0,005	0,001
	92,7°C	Pi	0,000	0,000
		Annexin V + Pi	0,980	0,003
		Annexin V	0,019	0,003
		ungefärbt	0,001	0,000
PC-3 Bicalutamid	37°C	Pi	0,003	0,002
		Annexin V + Pi	0,114	0,011
		Annexin V	0,076	0,005
		ungefärbt	0,807	0,017
	57,8°C	Pi	0,002	0,000
		Annexin V + Pi	0,721	0,139
		Annexin V	0,185	0,065
		ungefärbt	0,093	0,076
	62,6°C	Pi	0,002	0,000
		Annexin V + Pi	0,874	0,060

		Annexin V	0,120	0,060
		ungefärbt	0,004	0,000
	92,7°C	Pi	0,001	0,000
		Annexin V + Pi	0,970	0,004
		Annexin V	0,028	0,004
		ungefärbt	0,002	0,000

6 Literaturverzeichnis

Abate-Shen C, Shen MM (2000): Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14, 2410–2434

Adlercreutz H (1990): Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 201, 3–23

Aghaeepour N, Finak G, Hoos H, Mosmann TR, Brinkman R, Gottardo R, Scheuermann RH (2013): Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat Methods* 10, 228–238

Ahmed HU, Dickinson L, Charman S, Weir S, McCartan N, Hindley RG, Freeman A, Kirkham AP, Sahu M, Scott R et al. (2015): Focal Ablation Targeted to the Index Lesion in Multifocal Localised Prostate Cancer: a Prospective Development Study. *Eur Urol* 68, 927–936

Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D (2006): DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Letters* 580, 2294–2300

Alkhorayef M, Mahmoud MZ, Alzimami KS, Sulieman A, Fagiri MA (2015): High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) in Localized Prostate Cancer Treatment. *Pol J Radiol* 80, 131–141

Arora JS, Murad HY, Ashe S, Halliburton G, Yu H, He J, John VT, Khismatullin DB (2016): Ablative Focused Ultrasound Synergistically Enhances Thermally Triggered Chemotherapy for Prostate Cancer in Vitro. *Mol Pharm* 13, 3080–3090

Asare EA, Grubbs EG, Gershenwald JE, Greene FL, Aloia TA (2019): Setting the "stage" for Surgical Oncology fellows: Pierre Denoix and TNM staging. *J Surg Oncol* 119, 823

Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR (2004): Steroid hormonal regulation of growth, prostate specific antigen secretion, and transcription mediated by the mutated androgen receptor in CWR22Rv1 human prostate carcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 222, 121–132

Auchus RJ (2004): The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol Metab* 15, 432–438

Azad AA, Zoubeidi A, Gleave ME, Chi KN (2015): Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol* 12, 26–36

Balk SP, Knudsen KE (2008): AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal* 6, e001

Barkin J (2011): High intensity focused ultrasound (HIFU). *Can J Urol* 18, 5634–5643

- Beckmann RP, Lovett M, Welch WJ (1992): Examining the function and regulation of hsp 70 in cells subjected to metabolic stress. *J Cell Biol* 117, 1137–1150
- Bertero L, Massa F, Metovic J, Zanetti R, Castellano I, Ricardi U, Papotti M, Cassoni P (2018): Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: An overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why? *Virchows Arch* 472, 519–531
- Beyer DC, Brachman DG (2000): Failure free survival following brachytherapy alone for prostate cancer: comparison with external beam radiotherapy. *Radiother Oncol* 57, 263–267
- Bill-Axelson A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H, Stark JR, Busch C, Nordling S, Häggman M, Andersson S-O, Bratell S et al. (2011): Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* 364, 1708–1717
- Boeker M, França F, Bronsert P, Schulz S (2016): TNM-O: ontology support for staging of malignant tumours. *J Biomed Semantics* 7, 64
- Bologna M, Vicentini C, Muzi P, Pace G, Angelucci A (2011): Cancer multitarget pharmacology in prostate tumors: Tyrosine kinase inhibitors and beyond. *Curr Med Chem* 18, 2827–2835
- Boustead G, Edwards SJ (2007): Systematic review of early vs deferred hormonal treatment of locally advanced prostate cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BJU Int* 99, 1383–1389
- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM (1997): Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase. *J. Biol. Chem.* 272, 26159–26165
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424
- Brooke GN, Bevan CL (2009): The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression. *Curr Genomics* 10, 18–25
- Bruchovsky N, Wilson JD (1999): Discovery of the role of dihydrotestosterone in androgen action. *Steroids* 64, 753–759
- Budha NR, Frymoyer A, Smelick GS, Jin JY, Yago MR, Dresser MJ, Holden SN, Benet LZ, Ware JA (2012): Drug absorption interactions between oral targeted anticancer agents

and PPIs: Is pH-dependent solubility the Achilles heel of targeted therapy? *Clin Pharmacol Ther* 92, 203–213

Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC (1993): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunological Methods* 157, 233–240

Chapelon JY, Cathignol D, Cain C, Ebbini E, Kluiwstra JU, Sapozhnikov OA, Fleury G, Berriet R, Chupin L, Guey JL (2000): New piezoelectric transducers for therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 26, 153–159

Chaussy CG, Thüroff S (2010): Robot-assisted high-intensity focused ultrasound in focal therapy of prostate cancer. *J Endourol* 24, 843–847

Chaussy CG, Thüroff S (2011): Transrectal high-intensity focused ultrasound for local treatment of prostate cancer: current role. *Arch Esp Urol* 64, 493–506

Chaussy CG, Thüroff S (2017): High-Intensity Focused Ultrasound for the Treatment of Prostate Cancer: A Review. *J Endourol* 31, S30-S37

Chen X, Cvetkovic D, Ma C-M, Chen L (2012): Quantitative study of focused ultrasound enhanced doxorubicin delivery to prostate tumor in vivo with MRI guidance. *Med Phys* 39, 2780–2786

Chen Y, Yu T (2018): Testosterone mediates hyperthermic response of mice to heat exposure. *Life Sci* 214, 34–40

Chhipa RR, Halim D, Cheng J, Zhang HY, Mohler JL, Ip C, Wu Y (2013): The direct inhibitory effect of dutasteride or finasteride on androgen receptor activity is cell line specific. *Prostate* 73, 1483–1494

Chin JL, Billia M, Relle J, Roethke MC, Popeneciu IV, Kuru TH, Hatiboglu G, Mueller-Wolf MB, Motsch J, Romagnoli C et al. (2016): Magnetic Resonance Imaging-Guided Transurethral Ultrasound Ablation of Prostate Tissue in Patients with Localized Prostate Cancer: A Prospective Phase 1 Clinical Trial. *Eur Urol* 70, 447–455

Choi S, Lee AK (2011): Efficacy and safety of gonadotropin-releasing hormone agonists used in the treatment of prostate cancer. *Drug Healthc Patient Saf* 3, 107–119

Chopra R, Colquhoun A, Burtnyk M, N'djin WA, Kobelevskiy I, Boyes A, Siddiqui K, Foster H, Sugar L, Haider MA et al. (2012): MR imaging-controlled transurethral ultrasound therapy for conformal treatment of prostate tissue: Initial feasibility in humans. *Radiology* 265, 303–313

- Chopra R, Tang K, Burtnyk M, Boyes A, Sugar L, Appu S, Klotz L, Bronskill M (2009): Analysis of the spatial and temporal accuracy of heating in the prostate gland using transurethral ultrasound therapy and active MR temperature feedback. *Phys Med Biol* 54, 2615–2633
- Chu KF, Dupuy DE (2014): Thermal ablation of tumours: Biological mechanisms and advances in therapy. *Nat Rev Cancer* 14, 199–208
- Ciocca DR, Calderwood SK (2005): Heat shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 10, 86–103
- Cockshott ID (2004): Bicalutamide: Clinical pharmacokinetics and metabolism. *Clin Pharmacokinet* 43, 855–878
- Copelan A, Hartman J, Chehab M, Venkatesan AM (2015): High-Intensity Focused Ultrasound: Current Status for Image-Guided Therapy. *Semin Intervent Radiol* 32, 398–415
- Cordeiro ER, Cathelineau X, Thüroff S, Marberger M, Crouzet S, La Rosette JJMCH de (2012): High-intensity focused ultrasound (HIFU) for definitive treatment of prostate cancer. *BJU Int* 110, 1228–1242
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ et al. (1998): Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 280, 969–974
- Das CJ, Razik A, Netaji A, Verma S (2020): Prostate MRI-TRUS fusion biopsy: A review of the state of the art procedure. *Abdom Radiol (NY)*
- Debes A, Rommel F, Breise M, Willers R, Göbel U, Wessalowski R (2002): In vitro test-system for chemo- and thermosensitivity: An analysis of survival fractions and cell-cycle distributions in human Ewing's sarcomas as a model for tumors in pediatric oncology. *Klin Padiatr* 214, 223–229
- Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ (2008): Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res* 68, 5469–5477
- Dehm SM, Tindall DJ (2011): Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocr Relat Cancer* 18, R183-96
- Denham JW, Steigler A, Lamb DS, Joseph D, Turner S, Matthews J, Atkinson C, North J, Christie D, Spry NA et al. (2011): Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial. *Lancet Oncol* 12, 451–459

- Dennis LK, Dawson DV (2002): Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology* 13, 72–79
- Dennis LK, Lynch CF, Torner JC (2002): Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology* 60, 78–83
- DENOIX PF (1953): Présentation d'une nomenclature classification des cancers basee sur un atlas. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 9, 769–771
- Dewey WC (2009): Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *Int J Hyperthermia* 25, 3–20
- Dewhurst MW, Viglianti BL, Lora-Michiels M, Hanson M, Hoopes PJ (2003): Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 19, 267–294
- Dickinson L, Arya M, Afzal N, Cathcart P, Charman SC, Cornaby A, Hindley RG, Lewi H, McCartan N, Moore CM et al. (2016): Medium-term Outcomes after Whole-gland High-intensity Focused Ultrasound for the Treatment of Nonmetastatic Prostate Cancer from a Multicentre Registry Cohort. *Eur Urol* 70, 668–674
- Diederich CJ (2005): Thermal ablation and high-temperature thermal therapy: Overview of technology and clinical implementation. *Int J Hyperthermia* 21, 745–753
- Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, Mauro VP (2005): Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1865–1870
- Droz J-P, Balducci L, Bolla M, Emberton M, Fitzpatrick JM, Joniau S, Kattan MW, Monfardini S, Moul JW, Naeim A et al. (2010): Management of prostate cancer in older men: recommendations of a working group of the International Society of Geriatric Oncology. *BJU Int* 106, 462–469
- Eastham JA (2008): Editorial comment on: First analysis of the long-term results with transrectal HIFU in patients with localized prostate cancer. *Eur Urol* 53, 1202–1203
- Edwards J, Bartlett JMS (2005): The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways. *BJU Int* 95, 1327–1335
- Eichler K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachmann LM, Kleijnen J (2006): Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review. *The Journal of Urology* 175, 1605–1612

Epstein JI (2010): An update of the Gleason grading system. *The Journal of Urology* 183, 433–440

Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL (2005): The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29, 1228–1242

Epstein JI, Amin MB, Reuter VE, Humphrey PA (2017): Contemporary Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: An Update With Discussion on Practical Issues to Implement the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 41, e1-e7

Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA (2016): The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol* 40, 244–252

Escoffre J-M, Novell A, Smet M de, Bouakaz A (2013): Focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: In-vitro characterization and validation. *Phys Med Biol* 58, 8135–8151

Evans RM (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895

Falk MH, Issels RD (2001): Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia* 17, 1–18

Faus H, Haendler B (2006): Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60, 520–528

Ficarra V, Antonioli SZ, Novara G, Parisi A, Fracalanza S, Martignoni G, Artibani W (2006): Short-term outcome after high-intensity focused ultrasound in the treatment of patients with high-risk prostate cancer. *BJU Int* 98, 1193–1198

Filson CP, Boer B, Curry J, Linsell S, Ye Z, Montie JE, Miller DC (2014): Improvement in clinical TNM staging documentation within a prostate cancer quality improvement collaborative. *Urology* 83, 781–786

Finak G, Langweiler M, Jaimes M, Malek M, Taghiyar J, Korin Y, Raddassi K, Devine L, Obermoser G, Pekalski ML et al. (2016): Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Sci Rep* 6, 20686

Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, Özgüroğlu M, Ye D, Feyerabend S, Protheroe A et al. (2017): Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 377, 352–360

Ford OH, Gregory CW, Kim D, Smitherman AB, Mohler JL (2003): Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *The Journal of Urology* 170, 1817–1821

Fütterer JJ, Briganti A, Visschere P de, Emberton M, Giannarini G, Kirkham A, Taneja SS, Thoeny H, Villeirs G, Villers A (2015): Can Clinically Significant Prostate Cancer Be Detected with Multiparametric Magnetic Resonance Imaging? A Systematic Review of the Literature. *Eur Urol* 68, 1045–1053

Galalae RM, Martinez A, Mate T, Mitchell C, Edmundson G, Nuernberg N, Eulau S, Gustafson G, Gribble M, Kovács G (2004): Long-term outcome by risk factors using conformal high-dose-rate brachytherapy (HDR-BT) boost with or without neoadjuvant androgen suppression for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 1048–1055

Gelet A, Chapelon JY, Poissonnier L, Bouvier R, Rouvière O, Curiel L, Janier M, Vallancien G (2004): Local recurrence of prostate cancer after external beam radiotherapy: early experience of salvage therapy using high-intensity focused ultrasonography. *Urology* 63, 625–629

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

Goldberg SN, Gazelle GS, Mueller PR (2000): Thermal ablation therapy for focal malignancy: A unified approach to underlying principles, techniques, and diagnostic imaging guidance. *AJR Am J Roentgenol* 174, 323–331

Gomez CR (2014): Disorders of body temperature. *Handb Clin Neurol* 120, 947–957

Grabbert M, Buchner A, Butler-Ransohoff C, Kretschmer A, Stief CG, Bauer RM (2018): Long-term functional outcome analysis in a large cohort of patients after radical prostatectomy. *Neurourol Urodyn* 37, 2263–2270

Graham SJ, Chen L, Leitch M, Peters RD, Bronskill MJ, Foster FS, Henkelman RM, Plewes DB (1999): Quantifying tissue damage due to focused ultrasound heating observed by MRI. *Magn Reson Med* 41, 321–328

Grossmann M, Cheung AS, Zajac JD (2013): Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27, 603–616

Guillaumier S, Peters M, Arya M, Afzal N, Charman S, Dudderidge T, Hosking-Jervis F, Hindley RG, Lewi H, McCartan N et al. (2018): A Multicentre Study of 5-year Outcomes Following Focal Therapy in Treating Clinically Significant Nonmetastatic Prostate Cancer. *Eur Urol* 74, 422–429

- Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, Chen H, Kong X, Melamed J, Tepper CG et al. (2009): A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res* 69, 2305–2313
- Gupta AK, Charrette A (2014): The efficacy and safety of 5 α -reductase inhibitors in androgenetic alopecia: A network meta-analysis and benefit-risk assessment of finasteride and dutasteride. *J Dermatolog Treat* 25, 156–161
- Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, La Roza G de (2008): The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol* 15, 3866–3871
- Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, Davis M, Peters TJ, Turner EL, Martin RM et al. (2016): 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med* 375, 1415–1424
- Han G, Buchanan G, Ittmann M, Harris JM, Yu X, Demayo FJ, Tilley W, Greenberg NM (2005): Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1151–1156
- Hara T, Miyazaki J, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, Miyamoto M (2003): Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res* 63, 149–153
- 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, 14–24
- Hempel CR, Hall TL, Cain CA, Fowlkes JB, Xu Z, Roberts WW (2011): Histotripsy fractionation of prostate tissue: local effects and systemic response in a canine model. *The Journal of Urology* 185, 1484–1489
- Herman TS, Gerner EW, Magun BE, Stickney D, Sweets CC, White DM (1981): Rate of heating as a determinant of hyperthermic cytotoxicity. *Cancer Res* 41, 3519–3523
- Hildebrandt B (2002): The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 43, 33–56
- Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, Han M, Partin AW, Vessella RL, Isaacs WB et al. (2009): Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 69, 16–22
- Huggins C (1941): STUDIES ON PROSTATIC CANCER. *Arch Surg* 43, 209

- Huggins C, Hodges CV (2002): Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *The Journal of Urology* 168, 9–12
- Hugosson J, Roobol MJ, Månsson M, Tammela TLJ, Zappa M, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Carlsson SV, Talala KM et al. (2019): A 16-yr Follow-up of the European Randomized study of Screening for Prostate Cancer. *Eur Urol* 76, 43–51
- Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA (1969): Cell Sorting: Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence. *Science* 166, 747–749
- Hurwitz MD, Hansen JL, Prokopios-Davos S, Manola J, Wang Q, Bornstein BA, Hynynen K, Kaplan ID (2011): Hyperthermia combined with radiation for the treatment of locally advanced prostate cancer: Long-term results from Dana-Farber Cancer Institute study 94-153. *Cancer* 117, 510–516
- Hynynen K, Freund WR, Cline HE, Chung AH, Watkins RD, Vetro JP, Jolesz FA (1996): A clinical, noninvasive, MR imaging-monitored ultrasound surgery method. *Radiographics* 16, 185–195
- Ilic D, Djulbegovic M, Jung JH, Hwang EC, Zhou Q, Cleves A, Agoritsas T, Dahm P (2018): Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: A systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)* 362
- Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M, Dahm P (2013): Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004720
- Issels RD (2008): Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer* 44, 2546–2554
- Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem B-C, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner C-M et al. (2010): Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: A randomised phase 3 multicentre study. *The Lancet Oncology* 11, 561–570
- Iversen P, Johansson J-E, Lodding P, Kylmälä T, Lundmo P, Klarskov P, Tammela TLJ, Tasdemir I, Morris T, Armstrong J (2006): Bicalutamide 150 mg in addition to standard care for patients with early non-metastatic prostate cancer: updated results from the Scandinavian Prostate Cancer Period Group-6 Study after a median follow-up period of 7.1 years. *Scand J Urol Nephrol* 40, 441–452
- Iversen P, Tammela TLJ, Vaage S, Lukkarinen O, Lodding P, Bull-Njaa T, Viitanen J, Hoisaeter P, Lundmo P, Rasmussen F et al. (2002): A randomised comparison of bicalutamide ('Casodex') 150 mg versus placebo as immediate therapy either alone or as adjuvant to

standard care for early non-metastatic prostate cancer. First report from the Scandinavian Prostatic Cancer Group Study No. 6. *Eur Urol* 42, 204–211

Iversen P, Tyrrell CJ, Kaisary AV, Anderson JB, van Poppel H, Tammela TL, Chamberlain M, Carroll K, Melezinek I (2000): Bicalutamide monotherapy compared with castration in patients with nonmetastatic locally advanced prostate cancer: 6.3 years of followup. *The Journal of Urology* 164, 1579–1582

James ND, Bono JS de, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Ritchie AWS, Amos CL, Gilson C, Jones RJ et al. (2017): Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N Engl J Med* 377, 338–351

James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, Ritchie AWS, Parker CC, Russell JM, Attard G et al. (2016): Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): Survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *The Lancet* 387, 1163–1177

Jankevicius F, Miller SM, Ackermann R (2002): Nutrition and risk of prostate cancer. *Urol Int* 68, 69–80

Jin Y, Penning TM (2001): Steroid 5alpha-reductases and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: Key enzymes in androgen metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15, 79–94

Johns LE, Houlston RS (2003): A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int* 91, 789–794

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979): Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16–23

Kaija H, Pakanen L, Kortelainen M-L, Porvari K (2015): Hypothermia and rewarming induce gene expression and multiplication of cells in healthy rat prostate tissue. *PLoS ONE* 10, e0127854

Kalamida D, Karagounis IV, Mitrakas A, Kalamida S, Giatromanolaki A, Koukourakis MI (2015): Fever-range hyperthermia vs. hypothermia effect on cancer cell viability, proliferation and HSP90 expression. *PLoS ONE* 10, e0116021

Kandil S, Lee KY, Davies L, Rizzo SA, Dart DA, Westwell AD (2019): Discovery of deshydroxy bicalutamide derivatives as androgen receptor antagonists. *Eur J Med Chem* 167, 49–60

Kandori S, Kojima T, Nishiyama H (2019): The updated points of TNM classification of urological cancers in the 8th edition of AJCC and UICC. *Jpn J Clin Oncol* 49, 421–425

- Kennedy JE (2005): High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nat Rev Cancer* 5, 321–327
- Khabar KS, al-Zoghaibi F, Dzimir M, Taha M, al-Tuwaijri A, al-Ahdal MN (1996): MTS interferon assay: A simplified cellular dehydrogenase assay for interferon activity using a water-soluble tetrazolium salt. *J Interferon Cytokine Res* 16, 31–33
- Kim H-T, Kim Y-J, Park S-R, Ryu S-Y, Jung J-Y (2018): NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 silencing aggravates hormone-induced prostatic hyperplasia in mice. *Andrologia* 50
- Kim S, Ma E (2009): Synthesis of pregnane derivatives, their cytotoxicity on LNCap and PC-3 cells, and screening on 5alpha-reductase inhibitory activity. *Molecules* 14, 4655–4668
- Kita K, Shiota M, Tanaka M, Otsuka A, Matsumoto M, Kato M, Tamada S, Iwao H, Miura K, Nakatani T et al. (2017): Heat shock protein 70 inhibitors suppress androgen receptor expression in LNCaP95 prostate cancer cells. *Cancer Sci* 108, 1820–1827
- Klotz L (2013): Active surveillance, quality of life, and cancer-related anxiety. *Eur Urol* 64, 37–39
- Klotz L, Pavlovich CP, Chin J, Hatiboglu G, Koch M, Penson D, Raman S, Oto A, Fütterer J, Serrallach M et al. (2021): Magnetic Resonance Imaging-Guided Transurethral Ultrasound Ablation of Prostate Cancer. *The Journal of Urology* 205, 769–779
- Knudsen KE, Penning TM (2010): Partners in crime: Deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* 21, 315–324
- Korenchuk S, Lehr JE, MClean L, Lee YG, Whitney S, Vessella R, Lin DL, Pienta KJ (2001): VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *In Vivo* 15, 163–168
- Koukourakis MI, Kakouratos C, Kalamida D, Mitrakas A, Pouliliou S, Xanthopoulou E, Papadopoulou E, Fasoulaki V, Giatromanolaki A (2018): Comparison of the effect of the anti-androgen apalutamide (ARN-509) versus bicalutamide on the androgen receptor pathway in prostate cancer cell lines. *Anticancer Drugs* 29, 323–333
- Kramer G, Steiner GE, Gröbl M, Hrachowitz K, Reithmayr F, Paucz L, Newman M, Madersbacher S, Gruber D, Susani M et al. (2004): Response to sublethal heat treatment of prostatic tumor cells and of prostatic tumor infiltrating T-cells. *Prostate* 58, 109–120
- Kuban DA, Tucker SL, Dong L, Starkschall G, Huang EH, Cheung MR, Lee AK, Pollack A (2008): Long-term results of the M. D. Anderson randomized dose-escalation trial for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70, 67–74
- Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM (2008): Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 497–511

- Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, Reuther AM, Carlson TP, Klein EA (2004): Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 25–33
- Le HC, Lupu M, Kotedia K, Rosen N, Solit D, Koutcher JA (2009): Proton MRS detects metabolic changes in hormone sensitive and resistant human prostate cancer models CWR22 and CWR22r. *Magn Reson Med* 62, 1112–1119
- Lee SU, Cho KH (2017): Multimodal therapy for locally advanced prostate cancer: the roles of radiotherapy, androgen deprivation therapy, and their combination. *Radiat Oncol J* 35, 189–197
- Lindquist S, Craig EA (1988): The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22, 631–677
- Liss MA, Thompson IM (2018): Prostate cancer prevention with 5-alpha reductase inhibitors: Concepts and controversies. *Curr Opin Urol* 28, 42–45
- Liu W, Laitinen S, Khan S, Vihinen M, Kowalski J, Yu G, Chen L, Ewing CM, Eisenberger MA, Carducci MA et al. (2009): Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat Med* 15, 559–565
- Lu Y, Zhang Z, Yu H, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J, Sun J (2011): Functional annotation of risk loci identified through genome-wide association studies for prostate cancer. *Prostate* 71, 955–963
- Lynch HT, Kosoko-Lasaki O, Leslie SW, Rendell M, Shaw T, Snyder C, D'Amico AV, Buxbaum S, Isaacs WB, Loeb S et al. (2016): Screening for familial and hereditary prostate cancer. *Int J Cancer* 138, 2579–2591
- Madersbacher S, Gröbl M, Kramer G, Dirnhofer S, Steiner GE, Marberger M (1998): Regulation of heat shock protein 27 expression of prostatic cells in response to heat treatment. *Prostate* 37, 174–181
- Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R (2012): Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 12, 191–200
- Mair F, Hartmann FJ, Mrdjen D, Tosevski V, Krieg C, Becher B (2016): The end of gating? An introduction to automated analysis of high dimensional cytometry data. *Eur J Immunol* 46, 34–43
- McCall P, Gemmell LK, Mukherjee R, Bartlett JMS, Edwards J (2008): Phosphorylation of the androgen receptor is associated with reduced survival in hormone-refractory prostate cancer patients. *Br J Cancer* 98, 1094–1101

- McKinnon KM (2018): Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 120, 5.1.1-5.1.11
- McLeod DG, Iversen P, See WA, Morris T, Armstrong J, Wirth MP (2006): Bicalutamide 150 mg plus standard care vs standard care alone for early prostate cancer. *BJU Int* 97, 247–254
- Middleman MN, Lush RM, Figg WD (1996): The mutated androgen receptor and its implications for the treatment of metastatic carcinoma of the prostate. *Pharmacotherapy* 16, 376–381
- Mitsuzuka K, Arai Y (2017): Metabolic changes in patients with prostate cancer during androgen deprivation therapy. *Int J Urol*
- Miyamoto H, Messing EM, Chang C (2004): Androgen deprivation therapy for prostate cancer: current status and future prospects. *Prostate* 61, 332–353
- Montante S, Brinkman RR (2019): Flow cytometry data analysis: Recent tools and algorithms. *Int J Lab Hematol* 41 Suppl 1, 56–62
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63
- Mu Z, Ma C-M, Chen X, Cvetkovic D, Pollack A, Chen L (2012): MR-guided pulsed high intensity focused ultrasound enhancement of docetaxel combined with radiotherapy for prostate cancer treatment. *Phys Med Biol* 57, 535–545
- Nair B, Wilt T, MacDonald R, Rutks I (2002): Early versus deferred androgen suppression in the treatment of advanced prostatic cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003506
- Naji L, Randhawa H, Sohani Z, Dennis B, Lautenbach D, Kavanagh O, Bawor M, Banfield L, Profetto J (2018): Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Fam Med* 16, 149–154
- Nakabayashi M, Werner L, Oh WK, Regan MM, Kantoff PW, Taplin M-E (2011): Secondary hormonal therapy in men with castration-resistant prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 9, 95–103
- Nau WH, Diederich CJ, Ross AB, Butts K, Rieke V, Bouley DM, Gill H, Daniel B, Sommer G (2005): MRI-guided interstitial ultrasound thermal therapy of the prostate: A feasibility study in the canine model. *Med Phys* 32, 733–743
- Negri-Cesi P, Colciago A, Poletti A, Motta M (1999): 5alpha-reductase isozymes and aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *Prostate* 41, 224–232

- Neutelings T, Lambert CA, Nusgens BV, Colige AC (2013): Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS ONE* 8, e69687
- Nyberg M, Hugosson J, Wiklund P, Sjöberg D, Wilderäng U, Carlsson SV, Carlsson S, Stranne J, Steineck G, Haglind E et al. (2018): Functional and Oncologic Outcomes Between Open and Robotic Radical Prostatectomy at 24-month Follow-up in the Swedish LAPPRO Trial. *Eur Urol Oncol* 1, 353–360
- Pajonk F, van Ophoven A, McBride WH (2005): Hyperthermia-induced proteasome inhibition and loss of androgen receptor expression in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 65, 4836–4843
- Paner GP, Stadler WM, Hansel DE, Montironi R, Lin DW, Amin MB (2018): Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *Eur Urol* 73, 560–569
- Parker C (2004): Active surveillance: towards a new paradigm in the management of early prostate cancer. *Lancet Oncol* 5, 101–106
- Penning TM, Jin Y, Rizner TL, Bauman DR (2008): Pre-receptor regulation of the androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 281, 1–8
- Perner S, Schmidt FH, Hofer MD, Kuefer R, Rubin M (2007): Die TMPRSS2-ETS-Genfusion beim Prostatakarzinom. *Urologe A* 46, 754–760
- Ponce AM, Vujaskovic Z, Yuan F, Needham D, Dewhirst MW (2006): Hyperthermia mediated liposomal drug delivery. *Int J Hyperthermia* 22, 205–213
- Ponguta LA, Gregory CW, French FS, Wilson EM (2008): Site-specific androgen receptor serine phosphorylation linked to epidermal growth factor-dependent growth of castration-recurrent prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 283, 20989–21001
- Pretlow TG, Wolman SR, Micale MA, Pelley RJ, Kursh ED, Resnick MI, Bodner DR, Jacobberger JW, Delmoro CM, Giaconia JM (1993): Xenografts of primary human prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85, 394–398
- Price CP, Allard J, Davies G, Dawnay A, Duffy MJ, France M, Mandarino G, Ward AM, Patel B, Sibley P et al. (2001): Pre- and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer. *Ann Clin Biochem* 38, 188–216
- Puccini S, Bär N-K, Bublat M, Kahn T, Busse H (2003): Simulations of thermal tissue coagulation and their value for the planning and monitoring of laser-induced interstitial therapy (LITT). *Magn Reson Med* 49, 351–362

- Qaseem A, Barry MJ, Denberg TD, Owens DK, Shekelle P (2013): Screening for prostate cancer: a guidance statement from the Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. *Ann Intern Med* 158, 761–769
- Qian S, Shen H, Cao Q, Zhang L, Chen Y, Qi J (2015): Bicalutamide 150 mg as secondary hormonal therapy for castration-resistant prostate cancer. *Int Urol Nephrol* 47, 479–484
- Quarby VE, Beckman WC, Cooke DB, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS (1990): Expression and localization of androgen receptor in the R-3327 Dunning rat prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 50, 735–739
- Renfer LG, Schow D, Thompson IM, Optenberg S (1995): Is ultrasound guidance necessary for transrectal prostate biopsy? *The Journal of Urology* 154, 1390–1391
- Repasky EA, Evans SS, Dewhirst MW (2013): Temperature matters! And why it should matter to tumor immunologists. *Cancer Immunol Res* 1, 210–216
- Resnick MJ, Koyama T, Fan K-H, Albertsen PC, Goodman M, Hamilton AS, Hoffman RM, Potosky AL, Stanford JL, Stroup AM et al. (2013): Long-term functional outcomes after treatment for localized prostate cancer. *N Engl J Med* 368, 436–445
- Rischmann P, Gelet A, Riche B, Villers A, Pasticier G, Bondil P, Jung J-L, Bugel H, Petit J, Toledano H et al. (2017): Focal High Intensity Focused Ultrasound of Unilateral Localized Prostate Cancer: A Prospective Multicentric Hemiablation Study of 111 Patients. *Eur Urol* 71, 267–273
- Roach M, Hanks G, Thames H, Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, Sandler H (2006): Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65, 965–974
- Rosenhammer B, Ganzer R, Zeman F, Näger T, Fritsche H-M, Blana A, Burger M, Bründl J (2019): Oncological long-term outcome of whole gland HIFU and open radical prostatectomy: A comparative analysis. *World J Urol* 37, 2073–2080
- Rossmanna C, Haemmerich D (2014): Review of temperature dependence of thermal properties, dielectric properties, and perfusion of biological tissues at hyperthermic and ablation temperatures. *Crit Rev Biomed Eng* 42, 467–492
- Rouvière O, Souchon R, Salomir R, Gelet A, Chapelon J-Y, Lyonnet D (2007): Transrectal high-intensity focused ultrasound ablation of prostate cancer: Effective treatment requiring accurate imaging. *Eur J Radiol* 63, 317–327

- Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD (1993): The Frequency of Carcinoma and Intraepithelial Neoplasia of the Prostate in Young Male Patients. *The Journal of Urology* 150, 379–385
- Sampson N, Neuwirt H, Puhr M, Klocker H, Eder IE (2013): In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 20, R49-64
- Scheble VJ, Braun M, Beroukhim R, Mermel CH, Ruiz C, Wilbertz T, Stiedl A-C, Petersen K, Reischl M, Kuefer R et al. (2010): ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. *Mod Pathol* 23, 1061–1067
- Schmitz-Dräger BJ, Eichholzer M, Beiche B, Ebert T (2001): Nutrition and prostate cancer. *Urol Int* 67, 1–11
- Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV (2003): Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 9, 437–448
- Shapple WV, Kenfield SA, Kasperzyk JL, Qiu W, Stampfer MJ, Sanda MG, Chan JM (2009): Prospective study of determinants and outcomes of deferred treatment or watchful waiting among men with prostate cancer in a nationwide cohort. *J Clin Oncol* 27, 4980–4985
- Sharkey J, Cantor A, Solc Z, Huff W, Chovnick SD, Behar RJ, Perez R, Otheguy J, Rabinowitz R (2005): 103Pd brachytherapy versus radical prostatectomy in patients with clinically localized prostate cancer: a 12-year experience from a single group practice. *Brachytherapy* 4, 34–44
- Siddiqui K, Chopra R, Vedula S, Sugar L, Haider M, Boyes A, Musquera M, Bronskill M, Klotz L (2010): MRI-guided transurethral ultrasound therapy of the prostate gland using real-time thermal mapping: Initial studies. *Urology* 76, 1506–1511
- Sieber PR, Keiller DL, Kahnoski RJ, Gallo J, McFadden S (2004): Bicalutamide 150 mg maintains bone mineral density during monotherapy for localized or locally advanced prostate cancer. *The Journal of Urology* 171, 2272-6, quiz 2435
- Siedek F, Yeo SY, Heijman E, Grinstein O, Bratke G, Heneweer C, Puesken M, Persigehl T, Maintz D, Grüll H (2019): Magnetresonanz-gesteuerter hochintensiver fokussierter Ultraschall (MR-HIFU): Technische Aspekte und Überblick über die etablierten Applikationen (Teil 1). *Rofo* 191, 522–530
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A (2021): Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 71
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2017): Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67, 7–30
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2020): Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 70, 7–30

- Simard J, Dumont M, Soucy P, Labrie F (2002): Perspective: prostate cancer susceptibility genes. *Endocrinology* 143, 2029–2040
- Sirotnak FM, She Y, Lee F, Chen J, Scher HI (2002): Studies with CWR22 xenografts in nude mice suggest that ZD1839 may have a role in the treatment of both androgen-dependent and androgen-independent human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 8, 3870–3876
- Smet M de, Heijman E, Langereis S, Hijnen NM, Grüll H (2011): Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: An in vivo proof-of-concept study. *J Control Release* 150, 102–110
- Sölétormos G, Semjonow A, Sibley PEC, Lamerz R, Petersen PH, Albrecht W, Bialk P, Gion M, Junker F, Schmid H-P et al. (2005): Biological variation of total prostate-specific antigen: a survey of published estimates and consequences for clinical practice. *Clin Chem* 51, 1342–1351
- Sountoulides P, Theodosiou A, Finazzi-Agró E (2012): The current role of high-intensity focused ultrasound for the management of radiation-recurrent prostate cancer. *Expert Rev Med Devices* 9, 401–408
- Sramkoski RM, Pretlow TG, Giaconia JM, Pretlow TP, Schwartz S, Sy MS, Marengo SR, Rhim JS, Zhang D, Jacobberger JW (1999): A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 403–409
- Steinkamp MP, O'Mahony OA, Brogley M, Rehman H, Lapensee EW, Dhanasekaran S, Hofer MD, Kuefer R, Chinnaiyan A, Rubin MA et al. (2009): Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res* 69, 4434–4442
- Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Dotan ZA, Bianco FJ, Lilja H, Scardino PT (2006): Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol* 24, 3973–3978
- Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A (2012): MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem* 114, 785–796
- Strober W (2015): Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 111, A3.B.1-3
- Studer UE, Whelan P, Albrecht W, Casselman J, Reijke T de, Hauri D, Loidl W, Isorna S, Sundaram SK, Debois M et al. (2006): Immediate or deferred androgen deprivation for patients with prostate cancer not suitable for local treatment with curative intent: European

- Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Trial 30891. *J Clin Oncol* 24, 1868–1876
- Sumitomo M, Hayashi M, Watanabe T, Tsugawa M, Noma H, Yamaguchi A, Nagakura K, Hayakawa M, Uchida T (2008): Efficacy of short-term androgen deprivation with high-intensity focused ultrasound in the treatment of prostate cancer in Japan. *Urology* 72, 1335–1340
- Sweeney CJ, Chen Y-H, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, Wong Y-N, Hahn N, Kohli M, Cooney MM et al. (2015): Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med* 373, 737–746
- Sylvester PW (2011): Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol* 716, 157–168
- Tacklind J, Fink HA, MacDonald R, Rutks I, Wilt TJ (2010): Finasteride for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD006015
- Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang C-Z, Huang J (2011): PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* 71, 1668–1679
- Talorete TPN, Bouaziz M, Sayadi S, Isoda H (2006): Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology* 52, 189–198
- Teng Y, Ngoka L, Mei Y, Lesoon L, Cowell JK (2012): HSP90 and HSP70 proteins are essential for stabilization and activation of WASF3 metastasis-promoting protein. *J Biol Chem* 287, 10051–10059
- Tepper CG, Boucher DL, Ryan PE, Ma A-H, Xia L, Lee L-F, Pretlow TG, Kung H-J (2002): Characterization of a novel androgen receptor mutation in a relapsed CWR22 prostate cancer xenograft and cell line. *Cancer Res* 62, 6606–6614
- ter Haar G (2015): Ultrasound bio-effects and safety considerations. *Front Neurol Neurosci* 36, 23–30
- Thelen P, Heinrich E, Bremmer F, Trojan L, Strauss A (2013): Testosterone boosts for treatment of castration resistant prostate cancer: an experimental implementation of intermittent androgen deprivation. *Prostate* 73, 1699–1709
- Thigpen AE, Silver RI, Guileyardo JM, Casey ML, McConnell JD, Russell DW (1993): Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 92, 903–910

- Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes RD, Atkins JN, Lippman SM et al. (2003): The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 349, 215–224
- Thüroff S, Chaussy C, Vallancien G, Wieland W, Kiel HJ, Le Duc A, Desgrandchamps F, La Rosette JJMCH de, Gelet A (2003): High-intensity focused ultrasound and localized prostate cancer: Efficacy results from the European multicentric study. *J Endourol* 17, 673–677
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R et al. (2005): Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644–648
- Tsakiris P, Thüroff S, La Rosette J de, Chaussy C (2008): Transrectal high-intensity focused ultrasound devices: a critical appraisal of the available evidence. *J Endourol* 22, 221–229
- Türkeri L, Tarcan T, Biren T, Küllü S, Akdaş A (1995): Transrectal ultrasonography versus digitally guided prostate biopsies in patients with palpable lesions on digital rectal examination. *Br J Urol* 76, 184–186
- Twentyman PR, Luscombe M (1987): A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 56, 279–285
- Tyrrell CJ, Iversen P, Tammela T, Anderson J, Björk T, Kaisary AV, Morris T (2006): Tolerability, efficacy and pharmacokinetics of bicalutamide 300 mg, 450 mg or 600 mg as monotherapy for patients with locally advanced or metastatic prostate cancer, compared with castration. *BJU Int* 98, 563–572
- Uchida T, Illing RO, Cathcart PJ, Emberton M (2006): The effect of neoadjuvant androgen suppression on prostate cancer-related outcomes after high-intensity focused ultrasound therapy. *BJU Int* 98, 770–772
- Uchida T, Tomonaga T, Kim H, Nakano M, Shoji S, Nagata Y, Terachi T (2015): Improved outcomes with advancements in high intensity focused ultrasound devices for the treatment of localized prostate cancer. *The Journal of Urology* 193, 103–110
- Valerio M, Ahmed HU, Emberton M, Lawrentschuk N, Lazzeri M, Montironi R, Nguyen PL, Trachtenberg J, Polascik TJ (2014): The role of focal therapy in the management of localised prostate cancer: A systematic review. *Eur Urol* 66, 732–751
- Valerio M, Cerantola Y, Eggener SE, Lepor H, Polascik TJ, Villers A, Emberton M (2017): New and Established Technology in Focal Ablation of the Prostate: A Systematic Review. *Eur Urol* 71, 17–34

- van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS (2003): Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 57, 205–225
- van der Poel H, Klotz L, Andriole G, Azzouzi A-R, Bjartell A, Cussenot O, Hamdy F, Graefen M, Palma P, Rivera AR et al. (2015): Role of active surveillance and focal therapy in low- and intermediate-risk prostate cancers. *World J Urol* 33, 907–916
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C (2000): Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods* 243, 167–190
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184, 39–51
- Vis AN, Schröder FH (2009a): Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 1: the androgen receptor and steroidogenic pathways. *BJU Int* 104, 438–448
- Vis AN, Schröder FH (2009b): Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 2: the androgen receptor and 5alpha-reductase. *BJU Int* 104, 1191–1197
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR (1991): Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 51, 2515–2520
- Wang K, Jin S, Fan D, Wang M, Xing N, Niu Y (2017): Anti-proliferative activities of finasteride in benign prostate epithelial cells require stromal fibroblasts and c-Jun gene. *PLoS ONE* 12, e0172233
- Wang L, Lei Y, Gao Y, Cui D, Tang Q, Li R, Wang D, Chen Y, Zhang B, Wang H (2020): Association of finasteride with prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 99, e19486
- Wang M, Zhou Y (2016): Simulation of non-linear acoustic field and thermal pattern of phased-array high-intensity focused ultrasound (HIFU). *Int J Hyperthermia* 32, 569–582
- Wargovich MJ (1999): Nutrition and cancer: the herbal revolution. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2, 421–424
- Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, Kim K, Sawyers CL (2010): Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16759–16765

- Weisser H, Krieg M (1998): In vitro inhibition of androstenedione 5 α -reduction by finasteride in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67, 49–55
- Weisser H, Tunn S, Debus M, Krieg M (1994): 5 α -reductase inhibition by finasteride (Proscar) in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. *Steroids* 59, 616–620
- Wilt TJ, MacDonald R, Hagerty K, Schellhammer P, Kramer BS (2008): Five- α -reductase Inhibitors for prostate cancer prevention. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007091
- Wu H, Zhang L, Gao X, Zhang X, Duan J, You L, Cheng Y, Bian J, Zhu Q, Yang Y (2017): Combination of sorafenib and enzalutamide as a potential new approach for the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Lett* 385, 108–116
- Wu Y, Chhipa RR, Zhang H, Ip C (2011): The antiandrogenic effect of finasteride against a mutant androgen receptor. *Cancer Biol Ther* 11, 902–909
- Xu Z, Hall TL, Fowlkes JB, Cain CA (2007): Effects of acoustic parameters on bubble cloud dynamics in ultrasound tissue erosion (histotripsy). *J Acoust Soc Am* 122, 229–236
- Yin L, Hu Q (2014): CYP17 inhibitors--abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents. *Nat Rev Urol* 11, 32–42
- Yu S, Wang M-W, Yao X, Chan FL (2009): Establishment of a novel immortalized human prostatic epithelial cell line stably expressing androgen receptor and its application for the functional screening of androgen receptor modulators. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 756–761
- Yun D-K, Lee J, Keum Y-S (2013): Finasteride Increases the Expression of Hemoxygenase-1 (HO-1) and NF-E2-Related Factor-2 (Nrf2) Proteins in PC-3 Cells: Implication of Finasteride-Mediated High-Grade Prostate Tumor Occurrence. *Biomol Ther (Seoul)* 21, 49–53
- Zagar TM, Oleson JR, Vujaskovic Z, Dewhirst MW, Craciunescu OI, Blackwell KL, Prosnitz LR, Jones EL (2010): Hyperthermia combined with radiation therapy for superficial breast cancer and chest wall recurrence: A review of the randomised data. *Int J Hyperthermia* 26, 612–617
- Zeng Y, Kulkarni P, Inoue T, Getzenberg RH (2009): Down-regulating cold shock protein genes impairs cancer cell survival and enhances chemosensitivity. *J Cell Biochem* 107, 179–188
- Zhou Y, Gao XW (2013): Variations of bubble cavitation and temperature elevation during lesion formation by high-intensity focused ultrasound. *J Acoust Soc Am* 134, 1683–1694

Zhou Y-F (2011): High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation. *World J Clin Oncol* 2, 8–27

Ziglioli F, Baciarello M, Maspero G, Bellini V, Bocchialini T, Cavalieri D, Bignami EG, Maestroni U (2020): Oncologic outcome, side effects and comorbidity of high-intensity focused ultrasound (HIFU) for localized prostate cancer. A review. *Ann Med Surg (Lond)* 56, 110–115

Zorbas G, Samaras T (2015): A study of the sink effect by blood vessels in radiofrequency ablation. *Comput Biol Med* 57, 182–186

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lutz Trojan, Dr. med. Valentin Popeneciu sowie meiner Ko-Betreuerin PD Dr. rer. nat. Petra Krause für die Ermöglichung der Promotion sowie die Unterstützung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht zudem an PD Dr. rer. nat. P. Thelen, der mir zu Beginn der Arbeit sehr viel fachliche Hilfestellung leistete und durch welchen ich einen kleinen Einblick in die Welt der Mikrobiologie erlangen durfte. Zudem möchte ich herzlich Marion Striepe danken, die mich mit viel Geduld in die Laborarbeit eingeführt hat und stets ein offenes Ohr für meine zahlreichen Fragen hatte.

Der größte Dank gilt Dr. med. Oliver Hahn, der die Durchführung der vorliegenden Arbeit ermöglichte und mich während der gesamten Zeit mit viel Engagement unterstützt hat. Vielen Dank für die stete Ansprechbarkeit, die Kritik sowie die zahlreichen Ratschläge.