

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Professor Dr. med. Bernd Joachim Krause

**Zur Wirkung von S6K- und RSK-Inhibitoren
in Mono- und Docetaxel-Kombinationstherapien
auf die Zelllinie L929 und die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Lukas Nüsken, geb. am 02.09.1995 in Bad Segeberg

aus Schafhaus

Rostock, 30.03.2023

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Bernd Joachim Krause

Einrichtung: Poliklinik und Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsmedizin Rostock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Constantin Lapa

Einrichtung: Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Augsburg

Drittgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke

Einrichtung: Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse, Universitätsmedizin Rostock

Jahr der Einreichung: 2023

Jahr der Verteidigung: 2024

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Maligne Tumoren der Prostata	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Symptome und Diagnostik	2
1.1.3	Therapie und Prognose	4
1.2	Docetaxel.....	5
1.3	Die ribosomale S6 Kinase (S6K) und die p90 ribosomale S6 Kinase (RSK)	7
1.3.1	Die ribosomale S6 Kinase (S6K)	8
1.3.2	Die p90 ribosomale S6 Kinase (RSK).....	10
1.4	S6K- und RSK-Inhibitoren.....	12
1.4.1	Der IC ₅₀ -Wert	12
1.4.2	PF-4708671	13
1.4.3	LY2584702.....	13
1.4.4	AT7867.....	13
1.4.5	LJI308.....	14
1.4.6	BI-D1870.....	14
1.4.7	PDA-66.....	15
1.5	FLT	15
1.6	CXCR4	16
1.7	Zelllinien.....	16
1.8	Fragestellungen der Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Zelllinien.....	19
2.1.2	Geräte.....	19

2.1.3	Verbrauchsmittel	20
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.5	Inhibitoren	22
2.1.6	Ansätze	22
2.1.7	Antikörper.....	23
2.2	Methoden.....	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.2	Verfahren zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung.....	25
2.2.3	Zellüberlebens-Assays.....	26
2.2.4	Charakterisierung mittels nuklearmedizinischer Methoden.....	28
2.2.5	Charakterisierung mit durchflusszytometrischen Methoden.....	32
2.3	Software und statistische Methoden.....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Dosis-Wirkungs-Kurven mit IC ₅₀ -Werten	39
3.1.1	Docetaxel.....	39
3.1.2	PF-4708671	40
3.1.3	LY2584702.....	42
3.1.4	AT7867.....	43
3.1.5	LJI308.....	44
3.1.6	BI-D1870.....	45
3.1.7	PDA-66.....	47
3.2	Kombinierter Einsatz der Inhibitoren mit Docetaxel	48
3.2.1	Kombinierte Wirkung auf die Zelllinie L929.....	48
3.2.2	Kombinierte Wirkung auf die Zelllinie PC-3	51
3.2.3	Kombinierte Wirkung auf die Zelllinie LNCaP	54
3.2.4	Zusammenfassung zu den Kombinations-Untersuchungen	54
3.3	Apoptose-Assay.....	56
3.3.1	Apoptoseinduktion in L929-Zellen	56

3.3.2	Apoptoseinduktion in PC-3-Zellen.....	57
3.4	Zellzyklusversuche	59
3.4.1	Zelllinie L929 nach 24 h.....	59
3.4.2	Zelllinie L929 nach 72 h.....	61
3.4.3	Zelllinie PC-3 nach 24 h.....	62
3.4.4	Zelllinie PC-3 nach 72 h.....	64
3.4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellzyklusversuche	65
3.5	Gesamtprotein-Bestimmung und Phosphorylierungsgrad.....	67
3.5.1	Zelllinie L929	67
3.5.2	Zelllinie PC-3	70
3.6	FLT- Versuche.....	72
3.6.1	Zelllinie L929	72
3.6.2	Zelllinie PC-3	73
3.7	CXCR4- Versuche.....	74
3.7.1	Zelllinie L929	74
3.7.2	Zelllinie PC-3	75
3.7.3	Zusammenfassung der CXR4-Ergebnisse	76
4	Diskussion	77
4.1	Docetaxel-Therapie	77
4.2	Monotherapie mit Inhibitoren.....	79
4.2.1	Monotherapie mit S6K-Inhibitoren	80
4.2.2	Monotherapie mit RSK-Inhibitoren.....	84
4.2.3	Monotherapie mit PDA-66	88
4.3	Kombinationstherapie der Inhibitoren mit Docetaxel	89
4.3.1	Kombination Docetaxel und S6K-Inhibitoren.....	89
4.3.2	Kombination Docetaxel und RSK-Inhibitoren	92
4.3.3	Kombination Docetaxel und PDA-66.....	94
4.4	FLT	94

4.5	CXCR4	95
4.6	Zusammenfassende Beurteilung der untersuchten Therapien	96
5	Literaturverzeichnis.....	100
6	Abbildungsverzeichnis	125
7	Tabellenverzeichnis.....	132
8	Abkürzungsverzeichnis	133
9	Thesenpapier	137
10	Anhang	139
11	Lebenslauf	154
12	Danksagungen	155
13	Eidesstaatliche Erklärung	156

1 Einleitung

1.1 Maligne Tumoren der Prostata

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Maligne Tumoren der Prostata stellen bei Männern weltweit die häufigste Krebserkrankung dar und stehen bei den tödlich verlaufenden Malignomen an sechster Stelle (1). Auch in Deutschland sind maligne Tumoren der Prostata die häufigste Krebsentität bei Männern und stehen hinter Lungentumoren sogar an Platz zwei der tödlich verlaufenden Malignome. 2016 lag die Neuerkrankungsrate in Deutschland bei rund 58.800 Fällen und die altersstandardisierte Erkrankungsrate bei 91,6/100.000. Damit ist fast ein Viertel aller Krebsneuerkrankungen ein Prostatakarzinom. Wie in vielen anderen Industrienationen ist die altersstandardisierte Erkrankungsrate des Prostatakarzinoms nach zwei Jahrzehnten des Anstiegs seit ca. 2003 konstant und seit 2016 sogar rückläufig. Die dennoch in der Vergangenheit zunehmende Zahl an diagnostizierten Prostatakarzinomen wird durch die zunehmende Verbreitung der Messung des Prostata-spezifischen-Antigens (PSA) im Rahmen eines Screenings erklärt. Der seit 2016 beobachtete Rückgang der Erkrankungen korreliert ebenfalls mit einer aktuell rückläufigen Nutzung der Früherkennungsuntersuchung (2). Im Jahr 2016 starben in Deutschland ca. 14.417 Männer an einem Malignom der Prostata. Die standardisierte Mortalität lag bei 19,5/100.000. Das Prostatakarzinom ist eine Erkrankung des alten Mannes. Das mittlere Erkrankungsalter lag in diesem Jahr bei 72 Jahren und das mittlere Sterbealter bei 80 Jahren. Vor dem 50 Lebensjahr tritt das Prostatakarzinom nur sehr selten auf. Das Risiko eines 35-jährigen Mannes in den nächsten 10 Jahren zu erkranken, liegt bei 0,1 %, während es bei einem 75-jährigen auf 5 % ansteigt. Ab dem sechsten Lebensjahrzent steigt die Inzidenz exponentiell an und erreicht seinen Höhepunkt im siebten und achten Lebensjahrzent. Das Lebenszeitrisko beträgt 10,9 % (2). Über 90 % der Malignome der Prostata sind Adenokarzinome, selten kommen neuroendokrine Karzinome, Plattenepithelkarzinome oder Sarkome vor. Fast alle Prostatakarzinome finden sich in der peripheren Zone der Prostata, in der auch 70 % des Drüsengewebes liegt (3). Während die genaue Ätiologie des Prostatakarzinoms nach wie vor unbekannt ist, sind inzwischen mehrere Risikofaktoren identifiziert. Neben dem Alter ist dies vor allem die ethnische Abstammung: so erkranken Männer schwarzafrikanischer Herkunft deutlich häufiger als Europäer, Asiaten hingegen sind seltener betroffen (4). Aber

auch genetische Dispositionen sowie Lebens- und Ernährungsweisen gehören zu den Risikofaktoren: so erhöht das Auftreten eines Prostatakarzinoms bei engen Verwandten das eigene Risiko (5). Ebenso ist bei einer westlichen Ernährung mit beispielsweise viel rotem Fleisch von einer Erhöhung des Risikos auszugehen (6). Ein normales Körpergewicht und kontinuierliche sportliche Aktivität dagegen können das Risiko senken (1, 2, 7). Sexuell übertragbare Krankheiten sind ebenfalls mit einem erhöhten Auftreten assoziiert (8).

1.1.2 Symptome und Diagnostik

Das Prostatakarzinom ist in seinen Frühstadien häufig asymptomatisch. Kommt es dann in fortgeschrittenen Stadien zu Symptomen, betreffen diese in der Regel den Urogenitaltrakt und ähneln häufig den Beschwerden einer Benignen Prostatahyperplasie. Dazu gehören Dysurie, Pollakisurie, Nykturie, Restharnbildung oder Algurie (1, 9). Durch die enge anatomische Beziehung der Prostata zu den pelvinen Nervengeflechten ist bei kapselübergreifendem Wachstum durch Verdrängung oder Infiltration auch mit Störungen der Sexualfunktion zu rechnen, wie Erektionsproblemen oder schmerzhafter Ejakulation (10). Auch Hämaturie und Hämatospermie treten beim Prostatakarzinom auf (9, 10). Dadurch, dass der Primärtumor häufig lange asymptomatisch bleibt, kommt es auch vor, dass erste Symptome bereits die Folge einer Metastasierung sind (11). Das Prostatakarzinom metastasiert am häufigsten in die Knochen, gefolgt von Lunge und Leber, aber auch die Nebennieren werden befallen. Dabei treten die Knochenmetastasen besonders früh im Verlauf der Erkrankung auf und sind im Falle eines metastasierten Prostatakarzinoms in über 80 % der Fälle vorhanden. Die Knochenmetastasierung erfolgt dabei betont in das Stammskelett, am häufigsten werden das Becken und die Wirbelkörper befallen, gefolgt von Rippen, Sternum und Femur (12, 13). Dementsprechend erklären sich die im Falle eines metastasierten Karzinoms häufig vorkommenden Knochenschmerzen bis hin zur pathologischen Fraktur, insbesondere im Bereich des Beckenrings und der Wirbelsäule. Im Falle einer Beteiligung der Wirbelsäule ist außerdem durch Kompression der Medulla spinalis mit neurologischen Symptomen zu rechnen, bis hin zum kompletten Querschnittssyndrom (11). Neben der hämatogenen Metastasierung werden auch Lymphknoten in hohem Maße befallen (14). Die Früherkennung des Prostatakarzinoms erfolgt derzeit vor allem im Rahmen der Vorsorgeuntersuchung, welche allen Männern ab 45 Jahren in Deutschland empfohlen wird. Diese umfasst die digital rektale Untersuchung (DRU) und die Bestimmung des PSA. Bei verdächtigen Befunden kann ergänzend ein

transrektaler Ultraschall (TRUS) durchgeführt werden. Bei begründetem Karzinomverdacht wird eine Stanzbiopsie veranlasst. Hierfür werden unter sonographischer Kontrolle über einen transrektalen Zugang 10-12 Stanzzyylinder mit Gewebeproben genommen und danach histologisch untersucht. Die histologische Einteilung erfolgt dann über den Gleason-Score (15). Dieser beurteilt den histologischen Aufbau des Prostatagewebes nach architektonischen Parametern. Die Grade reichen von 1 (gut differenziert) bis 5 (sehr schlecht differenziert). Für den endgültigen Score wird der höchste mit dem häufigsten im Gewebe vorkommende Grad addiert, z. B. 3+4=7. Damit kann der Score Werte zwischen 2 und 10 annehmen. Je höher der Score, desto größer ist die Abweichung zum gesunden Prostatagewebe und damit die Entdifferenzierung und Malignität (16). Bei Verdacht auf ein fortgeschrittenes Karzinom oder hohem Risiko werden zur weiteren Bestimmung der Ausbreitung – dem Staging – Magnetresonanztomographie (MRT), Skelettszintigraphie und Computertomographie (CT) eingesetzt. Im Falle von Hochrisikokonstellationen kann auch eine Prostataspezifisches Membranantigen (PSMA)/Positronen-Emissions-Tomographie (PET)/CT zur Anwendung kommen (15). Die Tumorausbreitung (Staging) des Prostatakarzinoms wird in der TMN-Klassifikation angegeben. Hierbei steht das T für die Ausdehnung des Tumors, das M für Fern- und das N für die Lymphknotenmetastasierung (17) (Tabelle 1).

<u>Kategorie</u>	<u>Erläuterung</u>	<u>Klinische Einteilung</u>
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor: Weder tast- noch sichtbar	Lokal begrenzt
T2	Auf die Prostata beschränkt, Prostatakapsel intakt	
T3	Extraprostatisches Tumorwachstum, Tumor durchbricht Prostatakapsel	Lokal fortgeschritten
T4	Infiltration von Nachbarorganen (außer der Samenblasen)	
N0	Kein regionärer Lymphknotenbefall	
N1	Regionärer Lymphknotenbefall	Fortgeschritten/Metastasiert
M0	Keine Fernmetastasen	
M1	Fernmetastasen	Fortgeschritten/Metastasiert

Tabelle 1: Vereinfachte Darstellung der TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach 8. Auflage der TNM-Klassifikation (17) inklusive klinischer Einteilung.

1.1.3 Therapie und Prognose

Bei der Therapie des Prostatakarzinoms wird zwischen der abwartenden, der kurativen und der palliativen Intention unterschieden. In die Entscheidung des Therapievorschlags gehen Faktoren wie klinischer Zustand, Alter, Komorbiditäten, Lebenserwartung, Gleason-Score, Ausbreitung nach TMN, Anzahl der positiven Stanzbiopsien und der Patientenwunsch ein. Liegen keine Fernmetastasen vor, sind die radikale Prostatovesikulektomie, meist in Kombination mit einer Lymphadenektomie, oder die externe Bestrahlung mit 74-80 Gray – jeweils mit kurativer Intention – die Therapieoptionen der Wahl. Liegt ein lokal begrenztes Karzinom mit niedrigem Risikoprofil vor, ist die Brachytherapie eine sinnvolle kurative Therapiealternative. Außerdem kann in diesem Fall die Krankheit auch mittels regelmäßiger Kontrollen aktiv überwacht werden (active surveillance), um nur bei eventuellem Fortschreiten eine kurative Therapie einzuleiten. Eine abwartende Haltung ist ebenfalls beim sogenannten „watchful waiting“ möglich. Dieses findet Anwendung, wenn der Patient eine geringe Lebenserwartung (< 10 Jahre) aufweist und von einem nur langsamen Progress des Karzinoms auszugehen ist (15). Sind zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen vorhanden, ist eine kurative Therapie derzeit nicht möglich, weshalb eine palliative Therapie angeboten wird. Primär besteht diese aus einem Hormonentzug der auf Testosteron angewiesenen Tumorzellen. Der Hormonentzug kann entweder medikamentös oder operativ mittels beidseitiger Orchektomie herbeigeführt werden. Die medikamentöse Therapie beinhaltet derzeit die Gabe von GnRH-Analoga wie Buserelin oder GnRH-Blockern wie Abarelix. Idealerweise wird die Therapie mit dem Testosteronsynthesemmer Abirateron oder den Testosteronrezeptorblockern Enzalutamid, alternativ Apalutamid, kombiniert (15). Auch die Kombinationstherapie mit Docetaxel zeigt einen Überlebensvorteil, allerdings unter Inkaufnahme von einem erhöhten Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen (18). Auch entwickeln die meisten Karzinome im Laufe der Therapie eine Resistenz gegen einen Hormonentzug, sie werden „kastrationsresistent“. In diesem Fall ist eine systemische Therapie mit Docetaxel angezeigt. Alternativ kann diese auch mit Abirateron oder Enzalutamid durchgeführt werden. Als Zweitlinientherapie ist die Gabe von Cabazitaxel möglich. Durch Metastasen verursachte Knochenschmerzen können symptomatisch mittels Bisphosphonaten, externer Radiatio oder nuklearmedizinischer Therapie mit Radium-223-dichlorid behandelt werden (15).

Die Fünfjahres-Überlebensrate von Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom beträgt nahezu 100 %. Liegt dagegen bereits ein metastasiertes Karzinom vor, beträgt diese lediglich noch 29 %. Eine schlechte Prognose ist generell mit fortgeschrittenem Tumorstadium, jüngerem Alter, hohem PSA-Wert und einer kurzen PSA-Verdopplungszeit assoziiert (1).

1.2 Docetaxel

Docetaxel ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Taxane. Der erste Wirkstoff, der aus dieser Gruppe Anwendung in der Krebstherapie fand, ist das eng verwandte Paclitaxel. Da Paclitaxel allerdings rein biologisch aus der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) gewonnen wird, gab es bereits frühzeitig Bemühungen, Substanzen zu finden, welche einfacher zugänglich sind. Dies führte zur Entwicklung des Docetaxels, welches halbsynthetisch aus Deacetyl-Baccatin III – einem Taxel der häufiger vorkommenden Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) – hergestellt wird. Docetaxel besitzt außerdem eine im Vergleich zu Paclitaxel höhere pharmakologische Potenz (19). Die Gruppe der Taxane gehört zu den Mikrotubuli-Hemmstoffen. Mikrotubuli sind röhrenförmige, filamentöse und dynamische Proteinkomplexe, welche aus Heterodimeren der Proteine α - und β -Tubulin aufgebaut sind und einen Teil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen ausmachen. Sie sind nicht nur für die Zellintegrität- und -stabilität, sondern auch für den intrazellulären Transport und die Bewegung der Zelle verantwortlich. Darüber hinaus sind sie an der Genexpression und Zellinteraktionen beteiligt. Da der Spindelapparat ebenfalls aus Mikrotubuli besteht, sind Mikrotubuli aufgrund ihrer fundamentalen Bedeutung für die Mitose zu einem interessanten Ziel in der Antitumortherapie geworden. Docetaxel hemmt durch seine Bindung an β -Tubulin die Depolymerisation der Mikrotubuli und induziert durch die folgende Störung der Mitose einen Arrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus (20). Die nachfolgende Hochregulierung von p53, Phosphorylierung von Bcl-2 und Aktivierung weiterer Apoptoseinduktoren führt schließlich zum Zelltod in proliferierenden Zellen (21). Für das kastrationsresistente Prostatakarzinom (CRPC) konnten im Jahr 2004 zwei prospektive randomisierte Studien einen signifikanten Überlebensvorteil der Kombinationstherapien Docetaxel/Prednison und Docetaxel/Estramustin im Vergleich zu Mitoxantron und Prednison von 2,9 Monaten (19,2 Monate vs. 16,3 Monate) (22) bzw. von 1,9 Monaten (17,5 Monate vs. 15,6 Monate) (23) nachweisen. Auch in der Therapie des metastasierten Mammakarzinom (24), Nichtkleinzelligen-Lungenkarzinom (NSCLC) (25), Magenkarzinom (26) und Ovarialkarzinom (27) wird Docetaxel erfolgreich eingesetzt.

Zytostatische Therapien sind immer von einer Reihe unerwünschter Wirkungen begleitet, die häufig therapielimitierend sind. Im Falle von Docetaxel sind dies vor allem eine Myelosuppression mit teilweise ausgeprägter Neutropenie, Pneumonitis bis hin zur Lungenfibrose und häufig irreversiblen Neuropathien sowohl motorischer als auch sensibler Art. Daneben sind auch gastrointestinale Komplikationen von Diarrhö und Emesis über Enterokolitis bis zur Perforation, Fatigue, Epiphora, Nagel- und Hautveränderung, Stomatitis, Epistaxis, Hypersensibilitätssyndrom, periphere Ödeme, Alopezie und Geschmackstörung beschrieben (22, 28). Die Therapie mit Docetaxel wird weiterhin durch eine hohe Rate an Resistenzentwicklungen limitiert. Bis zu 50 % der Prostatakarzinome zeigen bereits zu Therapiebeginn kein Ansprechen auf die Therapie (22, 23). Auch bei initial gutem Ansprechen ist eine Resistenz im Verlauf die Regel. Nach 3 Jahren liegt die Rate der Patienten ohne Progression bei nahezu 0 % und nach 4 Jahren nähert sich die Rate der Überlebenden ebenfalls 0 % an (23). Aufgrund der insgesamt hohen Therapierefraktärität des Prostatakarzinoms gegenüber diversen Chemotherapeutika und dem damit verbundenen Mangel an Therapiealternativen stellt Docetaxel-Resistenz insbesondere beim Prostatakarzinom ein großes Problem dar (29). Die Mechanismen der Docetaxel-Resistenz sind inzwischen gut untersucht. Diskutiert wird hierbei u. a. die Überexpression von multidrug-Transportern wie dem p-Glykoprotein, welches zu einem vermehrten Efflux aus der Zelle führt und in Docetaxel-resistenten Zellen regelhaft erhöht ist. Aktivierung und vermehrte Expression von wichtigen Signalkaskaden und Transkriptionsaktivatoren wie IGF2, Stat1, Stat3, clusterin, heat shock proteins (HSP) oder nuclear factor kappa B (NF- κ B) sind ebenfalls mit Docetaxel-Resistenz assoziiert. Mutationen in den Genloki von Tubulin oder die Expression anderer Isoformen führen zu einer niedrigen Bindung von Docetaxel an seine Zielstruktur. Weiterhin zeigt eine erhöhte Expression von Zytokinen wie Interleukin 6 und 8, chemokine ligand 2 (CCL2), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) und macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) durch Proliferationsförderung und Apoptoseinhibition eine Resistenzförderung (30). In Zellversuchen führt dagegen ein Knockdown von p38, p53 und p21 zu einem besseren Ansprechen gegenüber Docetaxel, was diese Proteine ebenfalls für Resistenzen verantwortlich scheinen lässt (31). Außerdem stellt Autophagie einen fördernden Faktor für Docetaxel-Resistenz dar (32, 33).

1.3 Die ribosomale S6 Kinase (S6K) und die p90 ribosomale S6 Kinase (RSK)

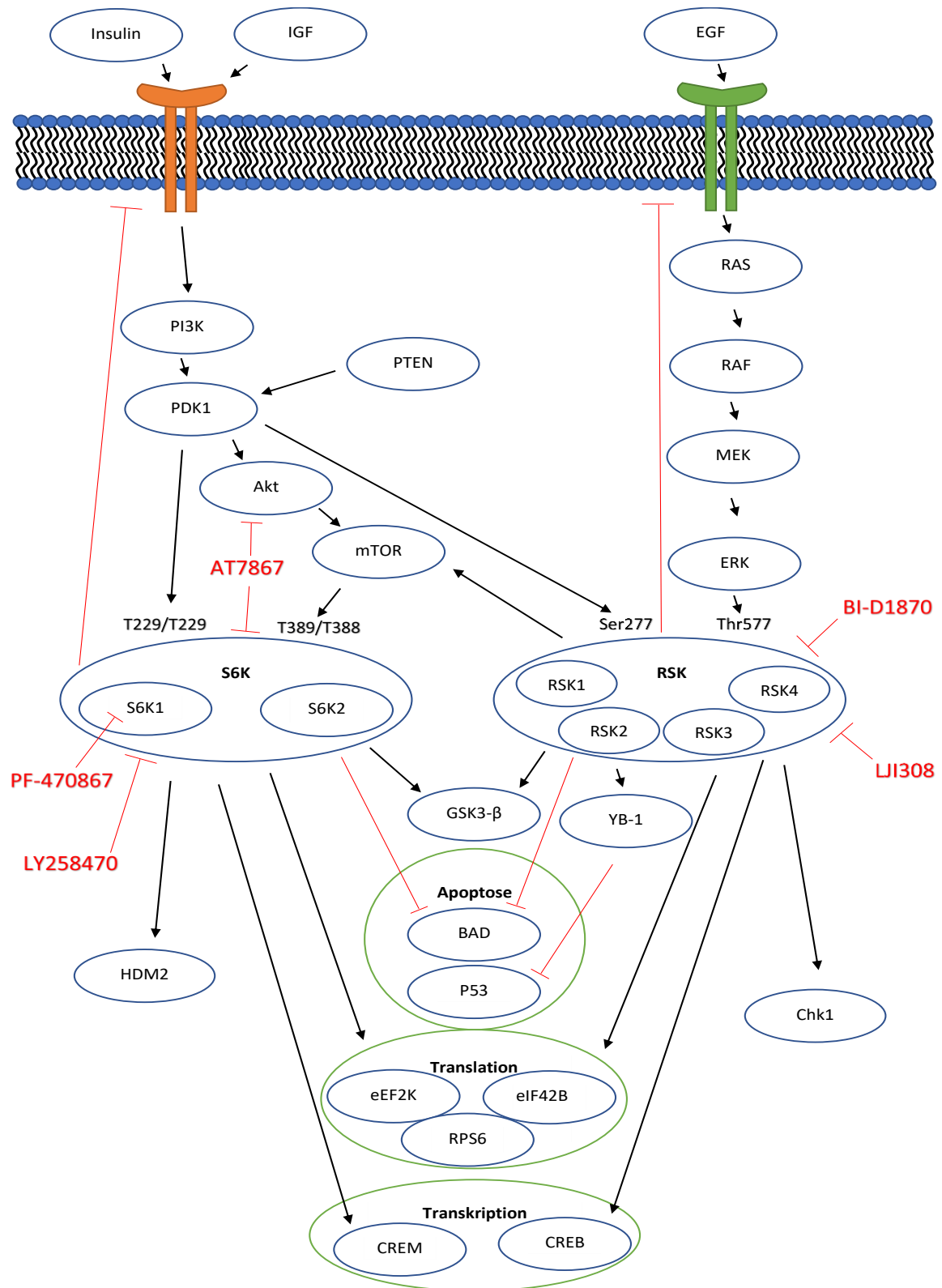


Abbildung 1: Wichtige Signalwege der S6K und der RSK und Ansatzpunkte der im Rahmen dieser Studie untersuchten Inhibitoren. Aktivierung (Schwarz), Hemmung (Rot).

1.3.1 Die ribosomale S6 Kinase (S6K)

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Signalwege sind in Abbildung 1 dargestellt.

Die ribosomale S6 Kinase (S6K) repräsentiert eine Enzymfamilie, welche von 2 Genen kodiert wird: RPS6KB1 (S6K1) und RPS6KB2 (S6K2). Sie gehören zur Gruppe der ACG-Kinasen, welche wiederum Serin-/Threoninkinasen sind. Die Sequenzen S6K1 und S6K2 kodieren jeweils zwei Isoenzyme: S6K1 die 70 kDa schwere Isoform p70S6K1 sowie die mit 85 kDa etwas schwerere Isoform p85S6K1; S6K2 die 54 kDa schwere Isoform p54S6K2 und die mit 56 kDa ähnliche Isoform p56S6K2 (34). S6K1 und S6K2 sind dabei innerhalb ihrer kinase-spezifischen Domänen zu 84 % identisch, während in den N- und C-terminalen Regionen Abweichungen bestehen (43 % und 59 %) (35). S6K2-Isoformen besitzen zudem in der C-terminalen Region ein nucleus localization signal (NLS), wodurch auf eine überwiegend nukleäre Lokalisation innerhalb der Zelle geschlossen werden kann (34). S6K1-Isoformen dagegen kommen sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus vor. Dabei ist die Lokalisation von der Phosphorylierung durch mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) und dem Zellzyklus abhängig. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und in der G1-Phase findet sich die S6K1 gehäuft im Nukleus (36). Diverse Wachstumsfaktoren und Mitogene aktivieren die S6K-Familie. Der am besten untersuchte Signalweg hierbei ist die Insulin/IGF-Achse, welche über PI3K (phosphoinositide 3-kinase), Akt (Proteinkinase B), mTORC1 (mTOR complex 1) und dadurch schlussendlich die S6K-Formen aktiviert (34, 37–39). Eine weitere mögliche Aktivierung erfolgt über den Ras/MAPK (Rat sarcoma)/(mitogen-activated protein kinase)-Weg, welcher unabhängig von PI3K ebenfalls mTORC1 aktivieren kann (34). Im unphosphorylierten Zustand blockiert die C-terminale Region der S6K1 die kinase-spezifische Domäne, indem sie mit der N-terminalen Region interagiert. Indem die C-terminale Region an den Positionen S411, S418, S421 und S424 phosphoryliert wird, wird die kinase-spezifische Domäne freigegeben und kann von mTORC1 an Thr389 phosphoryliert werden. Dies wiederum erlaubt PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase) die Phosphorylierung von Thr229, welches im Ergebnis zur vollständigen Aktivierung der S6K1 führt (40–44). Derzeit geht man davon aus, dass die Phosphorylierung der C-terminalen Region vorwiegend durch Mitglieder des Ras/MAPK-Signalwegs stattfindet (45).

Die S6K2 ist weniger gut untersucht als die S6K1, doch verhält sich ihre Aktivierung entsprechend aktuellen Erkenntnissen sehr ähnlich. Statt vier Phosphorylierungsstellen in der C-terminalen Region besitzt die S6K2 nur drei (S410, S417 und S423). In Analogie zur S6K1 führt die Phosphorylierung zur Exposition der kinase-spezifischen Domäne (T388) gegenüber mTORC1, was PDK1 eine Phosphorylierung an T228 erlaubt (34, 46).

Das Hauptsubstrat sowohl der S6K1 als auch der S6K2 ist entsprechend derzeitigem Kenntnisstand das Ribosomale S6 Protein RPS6, wobei man mittlerweile weiß, dass es diverse weitere Substrate gibt (34, 40, 47–49). Dies sind beispielsweise HDM2 (human double minute 2) als Substrat der S6K1, welches eine wichtige Rolle in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen inne hat (50) und p53 polyubiquitiniert, was schließlich zu dessen Abbau führt und damit eine Apoptoseinhibition zur Folge hat (51) oder der Transkriptionsfaktor CREM (cAMP responsive element modulator) (34). Dazu gehören aber auch die wichtigen Transkriptionsfaktoren eIF4B und eEF2K, das proapoptische Protein BAD (Bcl-2-agonist of cell death) und die GSK3 β (Glykogensynthase-Kinase 3) (52). Die S6K-Achse nimmt damit eine zentrale Rolle in der Regulation der Translation, Transkription, Apoptose, Proliferation und dem Zellzyklus ein und besitzt somit auch eine wichtige Funktion in der Kanzerogenese (34, 40, 48). Entsprechend konnte in verschiedensten Tumorarten wie dem Mammakarzinom (53–55), dem Magenkarzinom (56), dem Kolonkarzinom (57) aber auch dem Prostatakarzinom (58–60) ihre Überexpression nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die S6K im Prostatakarzinom nicht nur überexprimiert, sondern auch mit einer schlechten Prognose verknüpft (58). Selbiges konnte inzwischen auch für das Nichtkleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) (61), das Ovarialkarzinom (62), das Kolonkarzinom (57) und insbesondere das Mammakarzinom gezeigt werden (53, 54, 63). Da die S6K auch Auswirkungen auf das Zytoskelett und die Motilität von Zellen hat (64, 65), konnten Studien des Weiteren nachweisen, dass die S6K1 entscheidend zur Angiogenese sowie zur Ausbildung von Metastasierung beiträgt (66–68). Auch die Entstehung von lokalen Rezidiven wird erheblich durch die S6K1 beeinflusst (66, 69).

Trotz der großen Ähnlichkeiten zwischen S6K1 und S6K2 scheint es doch wichtige Unterschiede in Ihrer Aktivierung zu geben. So sprechen einige Daten dafür, dass die S6K2 deutlich sensibler auf eine Hemmung des Ras/MAPK-Signalwegs reagiert als die S6K1, während eine mTORC1-Hemmung mittels Rapamycin nur eine geringe Hemmung der S6K2

bewirkt (70). Die Phosphorylierung der C-terminalen Region scheint bei der S6K2 in weit größerem Maße vom Ras/MAPK-Signalweg abzuhängen als bei der S6K1 (70, 71). Auch kristallisiert sich heraus, dass die Funktionen der beiden S6K-Formen divergieren, was auf ihre unterschiedliche Lokalisation innerhalb der Zellkompartimente zurückzuführen ist (72). Während die S6K1 eher Zellproliferation, Invasion und Metastasierung zu beeinflussen scheint, hat die S6K2 einen größeren Einfluss auf Zelltod (72) und Zellzyklus (73). Für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass, obwohl sowohl S6K1 als auch S6K2 mit schlechter Prognose einhergehen, S6K1 positiv mit Proliferation, HER2- (human epidermal growth factor rezeptor 2) Status und im Cytoplasma vorliegendem Akt korreliert, während die Überexpression von S6K2 eher einen hohen ER- (Östrogen Rezeptor) Status, niedrige Proliferationsraten und eine Lokalisation des Enzyms Akt im Nukleus bedeuten. Unterschiedliche S6K-Expressionen können somit zu variablem Therapieansprechen führen. Die Expression von S6K1 korreliert negativ mit einem Ansprechen auf Tamoxifen, während die Korrelation mit S6K2 vom Progesteronstatus abhängt (74, 75). Neben der Bedeutung von S6K-Formen bei der Entstehung von Resistenzen von Mammakarzinomzellen wurde beispielsweise auch für Kolonkarzinomzellen eine resistenzfördernde Wirkung der S6K in Bezug auf den IGF-R-Hemmer Selumetinib festgestellt (76). Auch in Zellen der PC-3-Zelllinie führt entsprechende Überexpressionen zu einer Docetaxel-Resistenz, während ein Knockdown der S6K eine erhöhte Docetaxelsensibilität zur Folge hat (77).

1.3.2 Die p90 ribosomale S6 Kinase (RSK)

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Signalwege sind in Abbildung 1 dargestellt.

Die p90 ribosomale S6 Kinase (RSK) beschreibt eine Gruppe aus vier eng verwandten und strukturell sehr ähnlichen Isoenzymen: RSK1-4, welche von vier verschiedenen Genen (RSK1-4) exprimiert werden. Ihre Aktivierung wird durch eine Vielzahl an Hormonen und Wachstumsfaktoren ausgelöst (78). Alle RSK-Isoformen bestehen aus zwei Kinasedomänen, welche durch eine regulatorische Linkersequenz verbunden sind. Die N-terminale Kinasedomäne (NTK) gehört zu der AGC Kinasefamilie und ist für die Phosphorylierung von Substraten zuständig. Die C-terminale Kinasedomäne (CTK) gehört zur Camk-Familie. Ihre Funktion besteht in der Aktivierung der NTK (79). Die RSK wird von ERK aktiviert, indem diese die Linkerregion an Ser389 und die CTK an Thr577

phosphoryliert. Dadurch wird die CTK aktiviert, welche nun wiederum Ser386 in der Linkerregion phosphoryliert. Dies ermöglicht eine Bindungsstelle für PDK1, welches schließlich Ser227 im activation loop der NTK phosphoryliert und diese damit aktiviert (80, 81).

Die Substrate der RSK sind vielfältig und sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden. Zu ihnen gehören beispielsweise YB-1 (Y-box binding protein), welches die Translation und Transkription moduliert (82), das elementar an der Translation beteiligte RPS6 (83, 84), die den Zellzyklus kontrollierende chk1 (checkpoint kinase 1) (85) oder der Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element-binding protein) (80). Dazu gehören aber auch eEF2K und eIF2B (81), BAD (81, 86) und die GSK3 β (81, 87), welche – wie weiter oben beschrieben – auch Substrate der S6K sind. Für die RSK konnte daher in Analogie zur S6K gezeigt werden, dass sie durch Aktivierung oder Inhibierung ihrer Substrate eine Schlüsselrolle im Proteinstoffwechsel, Zellüberleben, Proliferation und Zellmobilität hat (87–90). Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass mittlerweile viele Studien die enge Beziehung der RSK zur Kanzerogenese aufzeigen konnten – Cho *et al.* postulierten sogar eine Schlüsselrolle der RSK2 bei der Entartung von Zellen (91). Für mehrere Tumorentitäten konnte eine Überexpression der RSK gezeigt werden. Hierzu zählen beispielsweise das Mammakarzinom (92), das Medulloblastom (93) aber auch das Prostatakarzinom (94).

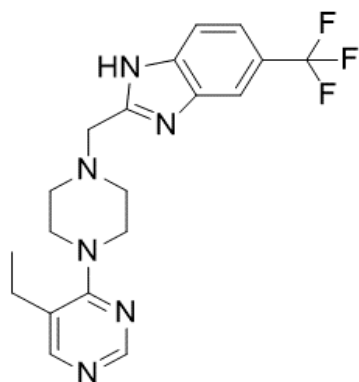
Den verschiedenen Isoformen der RSK kommen dabei nach aktueller Studienlage unterschiedliche Rollen und Prioritäten im Tumorgeschehen zu. So scheinen insbesondere RSK1 und RSK2 die Karzinogenese zu verstärken (88) und in Tumorgewebe die Malignität zu erhöhen. Ray-David *et al.* zeigten in Melanomzellen, dass RSK1 und RSK2 den Zellzyklusarrest und die Apoptose durch Inhibition von Zellzykluskinasen verhindern und die Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapeutika erhöhen (85). RSK3 und RSK4 dagegen scheinen auch antiproliferative Eigenschaften zu besitzen und sind im Tumorgewebe für gewöhnlich seltener zu finden (95). RSK4 wird generell wenig exprimiert und liegt darüber hinaus in unstimuliertem Normalgewebe vollständig aktiviert und phosphoryliert vor (78).

1.4 S6K- und RSK-Inhibitoren

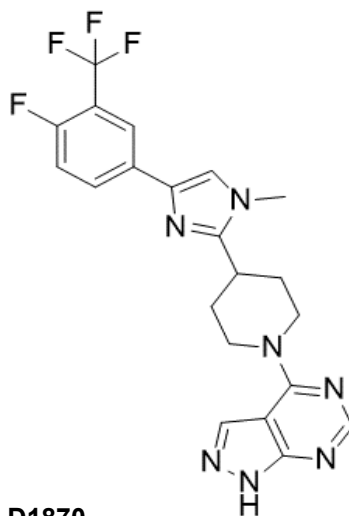
1.4.1 Der IC₅₀-Wert

Zur besseren Vergleichbarkeit der Wirkung verschiedener Substanzen existieren verschiedene pharmakologische Parameter. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert) ist dabei ein gängiges Maß, um die Wirkstärke einer Substanz anzugeben. Sie beschreibt die Substanzkonzentration, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet werden kann. Dies kann sowohl auf die Hemmung eines Enzyms bzw. die katalysierte Reaktion, aber auch für das Wachstum von Zellkulturen oder beispielsweise das Tumorwachstum in Versuchstieren angewendet werden. Folglich ist die Substanz potenter, je kleiner der IC₅₀-Wert ausfällt. Abgeleitet wird sie von Dosis-Wirkungskurven, welche anhand verschiedener Messkonzentrationen mathematisch modelliert werden. In Analogie zum IC₅₀-Wert ist beispielsweise auch die Bestimmung eines IC₂₅- oder IC₇₅-Wertes möglich (96).

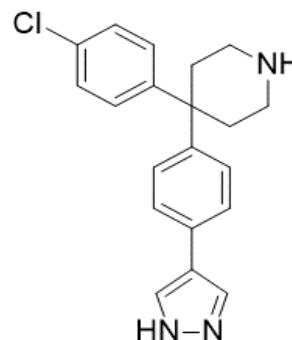
PF-4708671



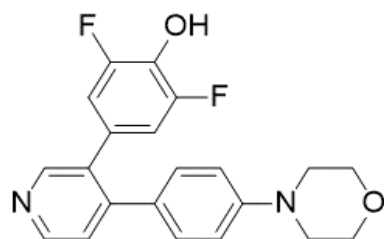
LY2584702



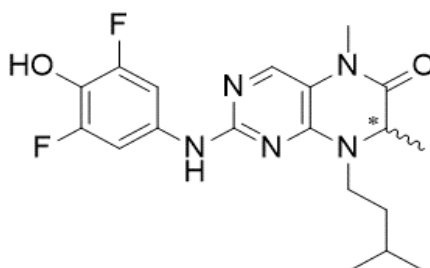
AT7867



LJI308



BI-D1870



PDA-66

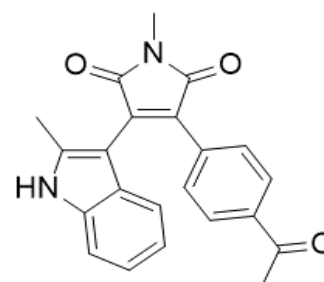


Abbildung 2: Chemische Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Inhibitoren. Die S6K- und RSK-Hemmer nach Sellekchem.com und PDA-66 nach Kretzschmar, Roolf *et al.* 2014 [94].

1.4.2 PF-4708671

PF-4708671 wurde von Pearce *et al.* im Jahr 2010 erstmalig beschrieben. Es handelt sich um ein Piperazinyl-Pyrimidin-Analogon (Abbildung 2), welches mit einem IC₅₀-Wert von 160 nM spezifisch die S6K1 inhibiert, ohne dabei andere AGC-Kinasen oder S6K2 signifikant zu hemmen. Die spezifischen S6K1-Substrate S6P, Rictor (Thr1135) und mTOR (Ser2448) werden in Anwesenheit von PF-4708671 nicht phosphoryliert (97). Es liegen mehrere Studien zum Potential von PF-4708671 in der Therapie von Krebszellen vor. PF-4708671 reduziert die Migration und Invasivität von triple-negativen Mammakarzinomzellen (67), verringert die Lebendanzahl von Akuten Myeloischen Leukämie Zellen (AML-Zellen) (98) und hemmt die Proliferation und Migration von NCSLC- und Prostatakarzinom-Zellen (PC-3 und DU143) (77, 99). Auch Kolonkarzinomzellen zeigen unter PF-4708671 einen Proliferationseinbruch (100).

1.4.3 LY2584702

LY2584702 ist ein selektiver ATP-kompetitiver Inhibitor der S6K mit einem IC₅₀-Wert von 0,004 µM (Abbildung 2). Es inhibiert wie auch PF-4708671 die Phosphorylierung von RPS6. In Xenograftmodellen einer Kolonkarzinomzelllinie (HCT116) sowie einer Glioblastomzelllinie (U87MG) zeigt sich jeweils eine statistisch signifikante Tumorreduktion unter Therapie mit LY2584702. Es wurde im Jahr 2014 erstbeschrieben (101). Studien mit LY2584702 an Zelllinien des NSCLC und des malignem Melanom bestätigen ebenfalls einen antiproliferativen Effekt (61, 102). Dieser zeigt sich dabei auch in MAPK-Inhibitor-resistenten Melanom-Zelllinien A375-DR und A375-TR und LY2584702 führt hier sogar zu einer Überwindung der MAPK-Inhibitor-Resistenz (102).

1.4.4 AT7867

AT7867 wurde im Jahr 2010 von Grimshaw *et al.* als potenter S6K und Akt-Hemmer erstbeschrieben (Abbildung 2). Die Phosphorylierung der Akt-Substrate GSK3β und RPS6 wird durch Therapie mit AT7867 inhibiert und eine große Bandbreite an humanen Tumorzelllinien in ihrem Wachstum gehemmt. Interessanterweise umfasst der IC₅₀-Wert von AT7867 in der zitierten Studie einen Bereich von 1 µM bis 12 µM, während der IC₅₀-Wert für die Hemmung der GSK3β mit 2 µM bis 4,5 µM deutlich weniger variiert. AT7867

führt in den Tumorzellen zu einer starken Apoptoseauslösung und zeigt auch im Mausmodell antitumoröse Aktivität. Der IC_{50} -Wert für Zellen der PC-3-Zelllinie liegt mit ca. 10 μM dabei deutlich über jener anderer Tumorzelllinien. Lediglich die ebenfalls aus Prostatakarzinomgewebe stammende Zelllinie DU143 zeigt mit ca. 12 μM einen noch höheren IC_{50} -Wert (103). Eine Kombination des AT7867 mit dem EGF-Hemmer Lapatinib führt zu einem synergistischen Therapieeffekt in KU-7 Urothelkarzinomzellen und einem deutlichen Anstieg der Apoptoseaktivität (104). Eine AT7867-Therapie führt auch in anderen Zelllinien wie beispielsweise den Kolonkarzinomzelllinien HT-29, DLD1 oder HCT116 zu antiproliferativer Wirkung (105).

1.4.5 LJI308

LJI308 ist ein Difluorphenyl-Pyridin-Analogon, welches die ATP-bindende Domäne der N-terminalen RSK-Kinasedomäne inhibiert und im Jahre 2014 erstmalig von Aronchik *et al.* publiziert wurde (Abbildung 2). Der IC_{50} -Wert für die RSK 1 bis 3 liegt in in-vitro Versuchen zwischen 4 und 14 nM und andere Kinasen werden erst bei >200-fach höheren Konzentrationen gehemmt. LJI308 führt bei Zellen der Zelllinien MDA-MB-231 und H358 zur Proliferationshemmung, zu G1-Arrest sowie zur Apoptoseinduktion. Der IC_{50} -Wert unterscheidet sich allerdings in einem Versuchsaufbau mit nicht adhärenen und einem Aufbau mit adhärenen Zellen mit 0,73 μM und 0,79 μM gegenüber 48 μM und 66 μM um zwei Größenordnungen. Von den RSK-Substraten wird YB-1 in beiden Versuchsaufbauten inhibiert, RPS6 hingegen nur in dem nicht adhärenen (84). In Zellen von TNBC- (106, 107) und AML-Zelllinien (108) zeigt LJI308 ebenfalls antiproliferative und zellschädigende Wirkung.

1.4.6 BI-D1870

Ein weiterer RSK-Hemmer ist das BI-D1870, ein Dihydropteridinon-Derivat, welches mit IC_{50} -Werten kleiner 20 nM (RSK1, RSK2) ebenfalls durch eine hohe RSK-Spezifität gekennzeichnet ist (Abbildung 2). BI-D1870 ist ein kompetitiver ATP-Antagonist. Die Erstpublikation erfolgte im Jahr 2007 durch Sapotka *et al.* (109). Viele Studien adressieren die potenzielle Eignung von BI-D1870 im Rahmen von Tumortherapien. So zeigen sich bereits vielversprechende Ergebnisse in Zellversuchen zum Mammakarzinom (110–112), zu Melanomen (113, 114), zu Lungenkarzinomen (115, 116), zu oralen

Plattenepithelkarzinomen (117), zu Nierenzellkarzinomen (118), zu Leukämieformen (AML (119) und Myelomen (120)), zu Pankreaskarzinomen (121), zu Mantellzelllymphomen (122) sowie zum Prostatakarzinom. Der Zellzyklus von PC-3-Zellen wird durch BI-D1870 in der G2/M-Phase arretiert (123). Weiterhin sind bereits synergistische Effekte mit Trastuzumab, Cisplatin, Vincristin und EGFR-Inhibitoren beschrieben (110, 116, 119, 121).

1.4.7 PDA-66

PDA-66 ist ein Indolylmaleimid, welches im Jahr 2014 von Kretzschmar *et al.* erstmals ausführlicher untersucht wurde (Abbildung 2). Es ist ein Derivat des GSK3 β -Inhibitors SB-216763, weshalb ursprünglich als Wirkungsmechanismus auch eine Hemmung der GSK3 β angenommen wurde (124). Tatsächlich ist die Wirkung aber auf eine Mikrotubulihemmung zurückzuführen (125). PDA-66 zeigt antiproliferative Effekte in ALL- (124), Lymphom- (126), Lungen- (125) und Prostatakarzinomzelllinien (127).

PDA-66 ist kommerziell nicht erhältlich und war im Rahmen eines Kooperationsprojektes für seine Evaluierung in einem präklinischen PC-3-Xenograftmodell zur Verfügung gestellt worden (128). Damit lag es für die Versuchsdurchführungen nur in begrenztem Maße vor, sodass eine vollständige Charakterisierung der Substanz nicht möglich war. Seine Integration in die vorliegende Arbeit diene vor allem dazu das in den präklinischen Versuchen beobachtete Nichtansprechen einer PDA-66-Therapie mittels molekularbiologischer Methoden einzuordnen.

1.5 FLT

3'Desoxy-3'-[¹⁸F]Fluorothymidin (FLT) ist ein Radiopharmakon, welches von der cytosolischen Thymidinkinase 1 (TK1) monophosphoryliert wird. Es kann in seiner phosphorylierten Form die Zellmembran nicht mehr überwinden, wodurch es in der Zelle akkumuliert wird. Die TK1 ist ein Schlüsselenzym in der de-Novo-Synthese von DNA. Da dieses Enzym insbesondere in sich schnell teilenden Zellen aktiv ist, ist die FLT-Aufnahme direkt abhängig von der Proliferation der Zelle (129). Durch Kopplung an ein radioaktives Nuklid wie dem [¹⁸F]Fluor kann diese Aufnahme detektiert und molekularmedizinischer Bildgebung zugänglich gemacht werden

1.6 CXCR4

Der Chemokinrezeptor-4 (CXCR4) gehört zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Transmembranproteine und besitzt als Hauptliganden das Chemokin CXCL12. Unter physiologischen Bedingungen ist er insbesondere für die zielgerichtete Wanderung von Stammzellen an ihren Bestimmungsort und die Zelldifferenzierung während der Haematopoese zuständig. Auch in der Organogenese, beispielweise des Nervensystems, der Angiogenese und der Migration von Leukozyten nimmt er eine wichtige Rolle ein (130, 131). In malignen Zellen führt eine CXCR4-Überexpression zu einer erhöhten Migrations- und Metastasierungsfähigkeit und sichert das Überleben von Zellen an Metastasierungsorten (132). Vor diesem Hintergrund konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des CXCR4 ein unabhängiger negativer prognostischer Faktor für das Prostatakarzinom ist (133). Selbiges gilt auch für weitere Tumorarten wie das Mammakarzinom (134) oder Kolorektalkarzinome (135). Für den CXCR4 konnte weiterhin gezeigt werden, dass seine Aktivierung durch den Liganden CXCL12 zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Docetaxel führt, während eine Kombination des CXCR4-Inhibitors Plerixafor (AMD3100) mit Docetaxel eine gesteigerte Docetaxel-Wirkung besitzt (136, 137). Erklärt wird dies durch die gegensätzliche Wirkung der CXCL12/CXCR4-Achse und Docetaxels auf das Zytoskelett. Mittels der durch radioaktive Markierung von AMD3100 mit ^{99m}Tc entstehenden $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2\text{-AMD3100}$ (AMD) kann der CXCR-4 Status außerdem nuklearmedizinisch dargestellt werden (138). Auch wurde ein Anstieg der CXCR4-Expression auf Prostatakarzinomzellen unter Docetaxel-Therapie nachgewiesen (137).

1.7 Zelllinien

Die Zelllinie LNCaP entstammt ursprünglich einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms eines 50-jährigen kaukasischen Mannes. Sie wurde 1977 etabliert. Die Zelllinie ist Androgenrezeptor positiv, wächst adhärent und bildet häufig Zellaggregate. (139). Die Eigenschaft, im Mausmodell Tumore auszubilden, ist nur sehr schwach ausgeprägt (140).

Die Zelllinie PC-3 wurde 1979 aus der Knochenmetastase eines Grad IV Prostatakarzinoms eines 62-jährigen kaukasischen Mannes isoliert (141). Sie exprimiert keinen

Androgenrezeptor und bildet regelhaft Tumore nach subkutaner Injektion im Mausmodell (140).

Gemeinhin wird die LNCaP-Zelllinie als Modell für das differenzierte und hormonabhängige Prostatakarzinom angesehen, während die PC-3 Zelllinie das fortgeschrittene hormonunabhängige Karzinom repräsentiert.

L929 ist eine murine Zelllinie aus subkutanem Bindegewebe und eine der ältesten dauerhaft in Kultur gehaltenen Zellen überhaupt (142). Sie wird vor allem für Versuche zur Toxizität neuer Substanzen oder Materialien und für Transfektionen im Zellmodell benutzt (143–145). Obwohl ihr Ursprung in normalem Gewebe liegt, weisen mehrere Publikationen auf das tumoröse Verhalten der Zelllinie hin, weshalb sie auch als Sarkomzelllinie bezeichnet wird (146–148).

1.8 Fragestellungen der Arbeit

Während das lokale Prostatakarzinom in vielen Fällen erfolgreich kurativ behandelt werden kann, sind die Therapiemöglichkeiten für das fortgeschrittene und insbesondere für das kastrationsresistente Prostatakarzinom deutlich eingeschränkt. Vor diesem Hintergrund ist der Bedarf an neuen medikamentösen Behandlungsoptionen hoch.

RSK und S6K sind zwei für die Proteinbiosynthese, für die Zellproliferation sowie für das Zellüberleben eminent wichtige Kinasen im zellulären Stoffwechsel. Aufgrund ihrer zentralen Position sind sie regelmäßig in malignen Tumoren überexprimiert, so auch im Prostatakarzinom. Sie bilden daher attraktive Ziele für potenzielle neue Therapeutika. Im Rahmen dieser Arbeit wurden RSK und S6K-Hemmer, welche in Zell- und Tierversuchen zu malignen Erkrankungen bereits vielversprechende Wirkungen zeigen konnten, auf die Wirkung an Prostatakarzinomzelllinien untersucht. Ein wesentliches Problem in der Therapie des Prostatakarzinoms stellt eine nachlassende Wirkung gegenüber einer Docetaxel-Therapie dar. Daher wurde ferner untersucht, inwiefern sich die Wirkung von Docetaxel in einer Kombinationstherapie mit den aufgeführten Inhibitoren steigern lässt. In den Untersuchungen wurde neben den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC-3 auf die Zelllinie L929 zurückgegriffen, welche häufig für Tests zur Zytotoxizität herangezogen wird

und im Vergleich zu den beiden Prostatakarzinomzelllinien durch eine deutlich höhere Docetaxel-Resistenz charakterisiert ist.

Es wurden die IC_{50} -Werte zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert und danach die Wirkung auf Zellzahl, Zellvitalität und Zellvolumen sowohl unter Therapie mit den Einzelsubstanzen als auch unter Kombinationstherapie untersucht. Um ein tieferes Verständnis der molekularbiologischen Wirkung zu erzielen, wurden Apoptose- und Zellzyklusmessungen zu zwei Zeitpunkten für repräsentative Wirkstoffkonzentrationen durchgeführt. Darüber hinaus wurde der Phosphorylierungsstatus der Zielkinasen, der Inhibitoren sowie deren Substrat RPS6 durchflusszytometrisch gemessen. Um die Proliferation unter Therapieeinfluss zu bewerten, wurden darüber hinaus Aufnahmeversuche des Radiopharmakons FLT durchgeführt.

Wegen seiner Bedeutung bei der Metastasierung und für die Ausbildung von Docetaxel-Resistenzen sowie der daraus resultierenden schlechten Prognose im Fall des Prostatakarzinoms galt dem CXCR4 im Rahmen dieser Arbeit ein zusätzliches Interesse. Der mögliche Einfluss der untersuchten Inhibitoren auf den CXCR4-Status sowohl unter Mono- als auch in Kombinationstherapie mit Docetaxel wurde dabei adressiert.

Zusammenfassend sollten im Rahmen dieser Arbeit daher folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Zeigt eine Therapie mit verschiedenen S6K und RSK-Inhibitoren auf Prostatakarzinomzellen antineoplastische Wirkung und wie ist diese im Speziellen charakterisiert?
2. Ist eine Kombination der S6K und RSK-Inhibitoren mit Docetaxel in der Lage, die Wirkung von Docetaxel zu steigern?
3. Welche Wirkung haben die untersuchten Inhibitoren sowohl in der Monotherapie als auch in der Kombination mit Docetaxel auf den CXCR4-Rezeptor?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Spezies</u>	<u>Gewebe</u>	<u>Quelle</u>
L929	murin	Bindegewebe	IEC UMR
PC-3	human	Prostatakarzinom, Knochenmetastase	ATCC, CRL-1435
LNCaP	human	Prostatakarzinom, Lymphknotenmetastase	DSMZ, ACC 256

2.1.2 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Autoklav	VX-55	Systemec, Linden
Brutschrank	Serie BD Avantgarde.Line	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank	Serie BD Avantgarde.Line	Binder GmbH, Tuttlingen
Gammacounter	Wizard ² 2470 Automatic Gamma Counter	PerkinElmer INC., Waltham, USA
Mikroskop	Primo Vert	Carl Zeiss Ag, Jena
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. Kg, Eberstadt
Sterilbank	Lab Gard Class II Biosafety cabinet	NuAire, Plymouth, USA
Wärmebad	VWD 26	VWR International, Leuven, Belgien
Zellzähler	CASY® Cell Counter + Analyzer System Model TT	Roche Innovatis AG, Reutlingen
Zentrifuge (Falcon- Tubes)	Megafuge 16R	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zählkammer	Neubauer CE	Superior, Marienfeld
Absaugpumpe	KNF Laboport®	KNF Neuberger, Trenton, USA
Eismaschine	AF103	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur®	BD Biosciences, San Jose, USA

Vortexer	IKA® MS3	IKA Werke GmbH und Co. KG., Staufen im Breisgau
Kühlschrank	Spezial	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt
Gefrierschrank	Froster	Philipp Kirsch GmbH, Willstätt
Mechanischer Handzähler	-	-
Zentrifuge (Eppendorf Vials)	Pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Elektronische Stoppuhr	-	-
Absaugpumpe	Integra Vacusafe	Integra Bioscience AG, Zizers, Schweiz
Pipetten (10 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl)	Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.3 Verbrauchsmittel

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Pipettenspitze (10 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf Greiner Bio-one International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 150 cm ²)	Cellstar® Greiner Bio-one International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Serologische Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-one International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Deckgläser	Assistent, Glaswarenfabrik, Karl Hecht GmbH & Co.
Mikroreaktionsgefäß (1,5 µl; 2 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Kryoröhrchen	VWR International, Leuven, Belgien
6-Well Platte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

24-Well Platte	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
CASY®-Tube	Roche Innovatis AG, Reutlingen
3,5 mL-Probenröhrchen (Gamma-Counter)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg
Probenröhrchen Durchflusszytometrie	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Fetal Bovine Serum (FKS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicilin/Streptomycin	Gibco® Life Technologies, Darmstadt
RPMI-1640	ATCC, Manassas, USA
DMEM-low glucose D6046	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS 10x	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Trypsin 10x	Biochrom GmbH, Berlin
Trypanblau 0,4%	Gibco® by life Technologies, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PanReac AppliChem ITW Reagents GmbH, Darmstadt
CASY®- Ton	Roche Innovatis AG, Reutlingen
CASY®-Clean	Roche Innovatis AG, Reutlingen
Destilliertes Wasser	H. Kerndl GmbH, Weissenfeld
[¹⁸ F]FLT	Eigenherstellung Radiopharmazie KNuk UMR (siehe 2.2.4.2)
7AAD	BioLegend, San Diego, USA
FITC-Lactadherin	Haematologic Technologies, Essex Junction, USA
BD FACS Flow™ - Trägerflüssigkeit	BD Biosciences, San Joses, USA
70% Isopropanol	Eigenherstellung aus WFI und 2- Propanol, Merck KGaA, Darmstadt
70% Ethanol	PanReac AppliChem ITW Reagents GmbH, Darmstadt

AMPUWA Spüllösungen (steriles Wasser zu Injektionszwecken, WFI)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Cell Stainig Buffer (Artikelnr. 420201)	BioLegend, San Diego, USA
Permeabilization Buffer A	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Inside fix	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
[^{99m} Tc]O ₂ -AMD3100	Eigenherstellung Radiopharmazie KNuk UMR (siehe 2.2.4.2)

2.1.5 Inhibitoren

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Docetaxel (20 mg/ml)	Apotheke der Universitätsmedizin Rostock
LY2584702	Selleckchem.com, Houston, USA
PF-4708671	Selleckchem.com, Houston, USA
AT7867	Selleckchem.com, Houston, USA
PDA-66 (10 nM)	Anahit Pews-Davtyan, Leibniz-Institut für Katalyse e.V. an der Universität Rostock
BI-D1870	Selleckchem.com, Houston, USA
LJI308	Selleckchem.com, Houston, USA

2.1.6 Ansätze

<u>Zellkulturmedium</u>	<u>Zusätze</u>	<u>Zelllinie</u>
DMEM-low glucose D6046	5% Penicilin/Streptomycin 10% FKS _i	L929
RPMI-1640	5% Penicilin/Streptomycin 10% FKS _i	PC-3
RPMI-1640	5% Penicilin/Streptomycin 20% FKS	LNCaP

<u>Substanz</u>	<u>Verdünnung</u>
LY2584702	Lösung von 1 mg in 2.245 ml DMSO (1 µM)
PF-4708671	Lösung von 1 mg in 0.051 ml DMSO (50 µM)
AT7867	Lösung von 1 mg in 0.296 ml DMSO (10 µM)
BI-D1870	Lösung von 1 mg in 0.256 ml DMSO (10 µM)
LJI308	Lösung von 1 mg in 0.0543 ml DMSO (50 µM)
Trypsin 1x	Lösung von 5 ml 10x Trypsin in 45 ml WFI
PBS 1x	Lösung von 5 ml 10x PBS in 45 ml WFI

2.1.7 Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Zielkonzentration</u>	<u>Ordernummer</u>
APC Anti-p70 S6 Kinase	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	1:50	130-112-925
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	1:100	9206S
Recombinant Anti-RSK1 p90	Abcam, Cambridge, UK	1:1000	ab32114
AF488 Phospho-p90RSK (Ser380)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	1:50	13588S
PE Anti-RPS6	BioLegend, San Diego, USA	1:20	691803
PE Anti-S6 pS235/pS236	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	1:11	130-107-522
Anti-IgG2ab-APC, mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	1:50	130-117-523
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam, Cambridge, UK	1:500	ab150077

2.2 Methoden

Die in diesem Abschnitt erläuterten Methoden und Versuchsansätze sind im Anhang in den Übersichten in Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefasst dargestellt. Die dabei in den nachfolgenden Abschnitten referenzierten Inhibitorkonzentrationen sind für L929-Zellen in Tabelle 8, für PC-3-Zellen in Tabelle 9 und für LNCaP-Zellen in Tabelle 10 im Anhang gesammelt aufgeführt.

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Es wurde stets unter der aktivierten Sterilbank (Lab Gard class II Biosafety cabinet) gearbeitet und auf eine sterile Arbeitsweise geachtet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im jeweiligen Zellmedium in Zellkulturflaschen inkubiert. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin geerntet. Weiterhin adhärente Zellen konnten durch mehrmaliges Spülen der Zellkulturflasche mit dem Trypsin sicher gelöst werden. Die Suspension wurde daraufhin mit mindestens 10 ml Medium verdünnt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und das Trypsin für 4 min bei 400 g abzentrifugiert. Die Zugabe von Medium in diesem Schritt stoppt die Aktivität des Trypsins. Das Zellpellet wurde in 4 ml vorgewärmtem Zellmedium resuspendiert und in die neue Zellkulturflasche mit 10 ml vorgelegtem Zellmedium verbracht. Bei L929-Zellen war das gewöhnlich 1 ml, bei PC-3-Zellen 1,5 ml und bei LNCaP-Zellen 2 ml für jede neu angesetzte Zellkulturflasche (150 cm²). Dadurch wurde bis zur nächsten Passage ein ca. 80%-iges konfluentes Wachstum der Zellen erreicht.

2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren der Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurde eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) mit 5 ml 37 °C warmen Zellmedium entsprechend den Bedürfnissen der jeweiligen Zelllinie vorbereitet. Ein die Zellen enthaltendes Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstofftank entnommen und für wenige Sekunden im Wasserbad aufgetaut, bis kein oder nur ein sehr kleines Plättchen zu sehen war. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und

für 2 min bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet in 1 ml angewärmtem Medium aufgenommen, resuspendiert und in die Zellkulturflasche überführt. Nach 48 h erfolgte wahlweise eine Passage auf Zellkulturflaschen (150 cm²) oder bei geringer Konfluenz ein Mediumwechsel.

Das Einfrieren von Zellen wurde vor längeren experimentellen Pausen notwendig. Um Kristallbildung und damit ein Platzen der Zellen beim Gefriervorgang zu verhindern, wurde angewärmtes Zellmedium mit DMSO im Verhältnis 1:9 (10 %) zu einem Einfriermedium gemischt. Die Zellen wurden dann mit PBS gewaschen, mit Trypsin geerntet und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 4 min Zentrifugation bei 400 g wurde der Überstand abgenommen und verworfen und die Zellen in das Einfriermedium überführt und resuspendiert. Jeweils 1 ml Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und diese in ein mit Isopropanol gefülltes Kühlgefäß gestellt. Das Kühlgefäß wurde zunächst für wenige Stunden bei -20 °C und dann bei -80 °C gelagert und nach 24 h in den Stickstofftank überführt.

2.2.2 Verfahren zur Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die IC₅₀-Messungen von LJI308 wurden mit Hilfe der Neubauerzählkammer durchgeführt, ebenso wie die ersten Messungen von PF-4708671. Alle weiteren Versuche in den Zellzählungen und Vitalitätsbestimmungen wurden mit dem CASY® -Zellcounter + Analyzer TT durchgeführt.

2.2.2.1 Neubauerzählkammer

Die Neubauerzählkammer stellt die einfachste Methode dar, um die Anzahl und Vitalität von Zellen zu bestimmen. Dabei wird ein definiertes Volumen der angefärbten Zellsuspension unter einer Glasplatte, welche durch ein Deckglas nach oben begrenzt wird, aufgetragen. Durch in die Grundplatte eingelassene Quadrate ist es möglich, unter Berücksichtigung der Verdünnung die Zellzahl und somit die Zellkonzentration zu bestimmen (149). 20 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl des Farbstoffs Trypanblau gemischt, welcher nicht membrangängig ist und daher nur beschädigte Zellen anfärbt. Das Suspensions-Farbstoff-Gemisch wurde in die Kammer eingebracht und lichtmikroskopisch

bewertet. Alle vier Teilkammern der Neubauerzählkammer, die selbst jeweils in 16 Unterquadranten gegliedert sind, wurden ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

2.2.2.2 CASY® -Zellcounter + Analyzer TT

Der CASY® -Zellcounter + Analyzer TT – nachfolgend CASY® -Zellcounter genannt – ist ein elektronisches Gerät, welches erlaubt, quantitative und qualitative Aussagen über eine Zellsuspension zu treffen. Dafür wird die Zellsuspension mit einer Elektrolytpufferlösung, CASY®-Ton, verdünnt. Mit Hilfe zweier Elektroden wird in der Messkapillare ein elektrisches Feld erzeugt und die Suspension unter gleichbleibendem Fluss durch die Kapillare gezogen. Da Zellgröße und Intaktheit der Zellmembran Einfluss auf den elektrischen Widerstand der Zellen haben, können mit dem CASY®-Zellcounter bei der Passage der Zellen durch die Messkapillare Aussagen zu ihrer Anzahl, Vitalität und Volumen, aber auch zu Zelltrümmern getroffen werden. Jede Probe wird dabei dreifach gemessen (149). Je nach zu erwartender Zellkonzentration wurden 50 µl oder 200 µl Zellsuspension in eine Vorlage aus 10 ml CASY®-Ton in einen CASY®-Tube gegeben und mit einer initial kalibrierten Messesequenz gemessen.

2.2.3 Zellüberlebens-Assays

Um die Wirkung der Inhibitoren auf Proliferation, Vitalität und Volumen der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen 24 h nach Einsaat auf 24-Well-Platten mit aufsteigenden Konzentrationsreihen der Inhibitoren behandelt, nach 24 h, 48 h und 72 h geerntet und entweder in der Neubauerzählkammer oder im CASY®-Zellcounter analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden anschließend anhand der Zellzahl die IC₅₀-Werte bestimmt.

2.2.3.1 Bestimmung des IC₅₀-Wertes

Für die IC₅₀-Wert-Bestimmung wurde mit 24-Well-Platten gearbeitet. Für L929 wurden 30.000 Zellen pro Well, für PC-3 50.000 Zellen pro Well und für LNCaP 40.000 Zellen pro Well ausgesät. Für die Versuche wurden Konzentrationen im Bereich von 0,1 µM und 100 µM gewählt, für Docetaxel 0,1 nM bis 100 nM. Für PF-4708671, LJI308, BI-D1870, Docetaxel und AT7867 wurden pro Konzentration und Zeitpunkt sechs technische Replikate

gewählt, für LY2584702 und PDA-66 jeweils vier.¹ Jeder Versuch wurde mindestens zweifach – in der Regel aber dreifach ausgeführt. Die Verdünnungsstufen der Inhibitoren wurden mit Zellmedium eingestellt.

24 h nach Aussaat der Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und mit dem neuen Medium die Inhibitoren auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h, 48 h oder 72 h wurde jeweils ein Ansatz geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, 1 ml Trypsin pro Well auf die Zellen gegeben und nach 1 min Einwirkzeit die Zellen gelöst. Für die Zellzahl- und Zellvitalitätsbestimmung wurde entweder die Neubauerzählkammer oder der CASY®-Zellcounter benutzt. Für den CASY®-Zellcounter wurde 200 µl Zellsuspension in je einen CASY®-Tube mit 10 ml CASY®-Ton gegeben und gemessen.

Beim Ansetzen der LJI308-Verdünnungsreihen kam es wiederholt zum Ausfällen eines weißen Niederschlages im Ansatz, besonders im Medium für L929-Zellen. Unter dem Mikroskop stellte sich dieser als Aggregation kristalliner Strukturen dar. In der Konsequenz wurden die Ansätze LJI308 für die Versuche deshalb nur in Medium für PC-3-Zellen verdünnt und Proben mit Niederschlag verworfen.

2.2.3.2 Kombinationstherapien aus Inhibitoren und Docetaxel

Um die Wirkung einer Kombinationstherapie der Inhibitoren mit Docetaxel zu analysieren, wurden die Zellen nach 24 h zeitgleich mit dem jeweiligen Inhibitor und Docetaxel behandelt, nach einer 72-stündigen Inkubationsdauer geerntet und die Zellzahl, die Vitalität und das Volumen untersucht. Um eine Aussage über die Stärke der Kombinationstherapie treffen zu können, wurde der Combination Index bestimmt (siehe Kapitel 2.3: „Software und statistische Methoden“). Es wurden Inhibitorkonzentrationen im Bereich ihrer IC₁₀-, IC₂₅- und IC₅₀-Werte gewählt. Die Konzentration an Docetaxel wurde so gewählt (IC₂₀), dass bereits ein Effekt unter Docetaxel-Monotherapie der Zellen zu beobachten war – dieser sich jedoch noch nicht so ausgeprägt darstellte, dass ein vollständiges Zellsterben bereits als Folge der Monotherapie zu erwarten gewesen wäre.

Eine Probenserie – nachfolgend *Ansatz* genannt – beinhaltete jeweils folgendes Behandlungsschema:

¹ Der Unterschied in der Anzahl an technischen Replikaten ergab sich aus der Verfügbarkeit der Substanzen, welche für LY2584702 und PDA-66 jeweils eingeschränkt war.

- Unbehandelte Kontrolle
- Docetaxel 1
- Inhibitor mit Konzentration 1
- Inhibitor mit Konzentration 1 + Docetaxel 1
- Inhibitor mit Konzentration 2
- Inhibitor mit Konzentration 2 + Docetaxel 1
- Inhibitor mit Konzentration 3
- Inhibitor mit Konzentration 3 + Docetaxel 1
- Docetaxel in weiteren Konzentrationen

Der technische Ablauf entsprach jenem der IC₅₀-Wert-Bestimmungen. Auf 24-Well-Platten wurden je 30.000 Zellen/Well (L929) bzw. 50.000 Zellen/Well (PC-3) und 70.000 Zellen/Well (LNCaP) ausgesät. Nach einer 24-stündigen Anwachszeit wurde das Medium durch neues Medium mit den jeweiligen Inhibitoren entsprechend dem Behandlungsschema ersetzt und nach 72 h geerntet. 200 µl der Zellsuspension wurden in einem CASY®-Tube mit 10 ml CASY®-Ton gemischt und mit dem CASY®-Zellcounter ausgezählt. Docetaxel und die Inhibitoren wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen auf die benötigten Konzentrationen eingestellt.

2.2.4 Charakterisierung mittels nuklearmedizinischer Methoden

2.2.4.1 Messung der Aktivität mit dem Gamma-Counter

Der Wizard² 2470 Automatic Gamma Counter ist ein Messgerät zur Bestimmung des Gehalts an Radionukliden niedriger Konzentration in einer Matrix. Hierzu werden Proben in geeignete Probenröhrchen überführt und mittels NaI-(Tl)-Detektors vermessen. Dabei wird zu Messbeginn ein Messprogramm gewählt, durch welches das detektierte Signal entsprechend den physikalischen Eigenschaften des konkreten Radionuklids und den geometrischen Gegebenheiten des Messsystems in den Signalausgabewert als Zählwert pro Zeiteinheit (counts per minute, cpm, oder counts per second, cps) überführt wird. Auch wird eine Halbwertszeitkorrektur automatisiert durchgeführt, sodass alle erhaltenen Signale bezüglich eines definierten Zeitpunktes – dem Inkubationsbeginn – ausgegeben werden. Die Messdauer jedes Messpunktes betrug stets 60 s. Um einen Zählwert pro Zeiteinheit in eine Aktivität zu überführen, muss der sogenannte Bohrlochfaktor für eine Nuklid-

Messgerätkombination durch eine externe Kalibrierung ermittelt werden. Darauf wurde im Rahmen der Arbeit verzichtet, da hier stets relative Aktivitätsaufnahmen zwischen einer Probe gegenüber ihren Kontrollen betrachtet wurden.

2.2.4.2 Herstellung von FLT und AMD

Die in den Versuchsserien eingesetzten Radiopharmaka FLT und AMD wurden unter GMP-Bedingungen (good manufacturing practice) im Reinraum der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin hergestellt. Dem Herstellungsprozess im Reinraum schließt sich ein Qualitätskontrollprozess an, bei dem die (radio-)chemische Reinheit und Identität mittels chromatographischer Methoden sowie weitere pharmazeutische Parameter überprüft werden.

Bei der Herstellung des FLT werden 20 mg des Precursors (3-N-Boc-5'-O-Dimethoxytrityl-3'-O-nosyl-thymidin (Art.-Nr. 1176840, GE Healthcare)) mit [18F]Fluor zur Reaktion gebracht. Anschließend werden alle Schutzgruppen entfernt und das sekundäre Amin sowie die Hydroxidgruppe des Endproduktes regeneriert. Das bei der Reaktion eingesetzte [18F]Fluor wird an dem hausinternen Zyklotron (PETrace, 9,6 MeV, GE Healthcare) durch Bestrahlung von [18O]Wasser mit Protonen erzeugt und in eine Heißzelle, in welcher sich das Herstellungsmodul befindet, transferiert. Die Synthese erfolgt PC gesteuert mit Hilfe des Synthesemoduls FASTlab2 der Firma GE Healthcare. Zum Einsatz kommt dabei ein zum Modul kompatibles Kassettensystem (Art.-Nr. 1176840, GE Healthcare). Zu Beginn der Synthese wird das [18F]fluorhaltige [18O]Wasser in das Synthesemodul über eine Anionenaustauscherkartusche transferiert, sodass [18F]Fluor auf dieser zurückgehalten (getrappt) wird. Ein Gemisch aus wässrig gelöstem Tetrabutylammoniumhydrogencarbonat (TBA-HCO₃) und Acetonitril dient zur Elution des [18F]Fluors in das Reaktionsgefäß. Dort wird dieses unter Unterdruck und einem schwachen Stickstoffstrom azeotrop getrocknet. Nach dem Trocknungsprozess wird der in Acetonitril gelöste Precursor in das Reaktionsgefäß überführt. In der sich anschließenden nukleophilen Substitution dient das TBA als Phasentransferkatalysator. Diese findet in einem zeitlichen Temperaturgradienten von 120 °C auf 65 °C über eine Zeitdauer von 15 min statt. Anschließend erfolgt eine saure Hydrolyse für 7 min bei 115 °C. Anschließend erfolgen die Neutralisation und Aufreinigungsschritte durch erneutes Trapping und wasserbasierten Waschschritten auf Kartuschen. Von diesen erfolgt die finale Elution mit einer Ethanol/Wasserlösung. Diese

Lösung wird über einen Sterilfilter (Sterifix PAED, 4099354, PZN 11865861, B. BRAUN) in ein steriles Endproduktgefäß (8700.0020W, ABX) überführt und anschließend einer Qualitätskontrolle unterzogen.

Bei der Herstellung des AMD wird AMD3100-Octahydrochloridhydrat (Sigma-Aldrich, A5602) mit ^{99m}Tc -pertechnetat in Anwesenheit von SnCl_2 -Lösung und Natriumcitratdihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) zur Reaktion gebracht. Nach initialer Vorlage der SnCl_2 -Lösung und Natriumcitratdihydrat erfolgt die Zugabe der AMD3100-Lösung und des ^{99m}Tc -pertechnetat. Nach gelegentlichem Schwenken und einer Reaktionszeit von insgesamt 20 min ergibt sich schließlich die fertige Endproduktlösung, welche einer Qualitätskontrolle unterzogen wird.

2.2.4.3 FLT-Aufnahme-Messung

Um die Proliferation der Zellen quantifizieren zu können, wurden FLT-Aufnahme-Messungen (Aufnahme-Messungen) vorgenommen. Der Versuchsaufbau folgte dem Schema der Kombinationsversuche aus 2.2.3.2, wobei aus Kapazitätsgründen statt drei Inhibitorkonzentrationen nur zwei untersucht wurden.² Ein Ansatz beinhaltete jeweils folgendes Behandlungsschema:

- unbehandelte Kontrolle
- Docetaxel in Konzentration 1
- Inhibitor in Konzentration 1
- Inhibitor in Konzentration 1 + Docetaxel in Konzentration 1
- Inhibitor in Konzentration 2
- Inhibitor in Konzentration 2 + Docetaxel in Konzentration 1
- weitere Konzentrationen Docetaxel
- Leerwert

Jeder Inhibitor wurde in zwei Konzentrationen getestet, wobei jede Konzentration in der Einzeltherapie und in der Kombination mit Docetaxel gemessen wurde. Um auch die FLT-Aufnahme unter Monotherapie mit Docetaxel genauer zu quantifizieren, wurden drei weitere Konzentrationen an Docetaxel in den Versuchsaufbau integriert. Zusätzlich wurden Leerwerte bestimmt, welche ausschließlich Medium (ohne Zellen) in der

² Die erforderliche Synchronisation der Aufarbeitungsschritte der Aufnahmeversuche und der Messungen mit dem CASY®-Zellcounter limitierte die Anzahl an Proben in einem einzelnen Durchlauf.

Versuchsdurchführung enthielten. Es wurde auf 6-Well-Platten unter Einbezug von je drei technischen Replikaten gearbeitet und jeder Versuch dreifach ausgeführt. Je Well wurden 70 000 Zellen (L929) bzw. 120 000 Zellen (PC-3) in 2 mL Medium ausgesät.³ Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und mit dem neuen Medium auch die Therapie auf die Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen 72 h Stunden im Brutschrank inkubiert. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurde ein erneuter Mediumwechsel (1 ml/Well) durchgeführt. Die Aktivitätskonzentration des Radiopharmakons (FLT) wurde mit Medium eingestellt. FLT wurde anschließend auf die Proben gegeben. In einem Vorversuch zeigte sich eine lineare Abhängigkeit der FLT-Aufnahme von der Konzentration in beiden untersuchten Zelllinien, weshalb aus Verfügbarkeitsgründen in zwei Durchläufen 0,79 MBq/Well und in einem 1,5 MBq/Well gewählt und für insgesamt 80 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde. Nach 60 Minuten wurde jede Platte einmal geschwenkt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Proben zweifach mit jeweils 1 ml kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml warmen Trypsin geerntet und entsprechend dem oben beschriebenen Verfahren mit dem CASY®-Zellcounter ausgewertet. 50 µl der Zelllösungen wurden hierzu aus jeder Probe entnommen, während die verbleibenden 950 µl in ein Gamma-Counter-Probenröhrchen zur Aktivitätsbestimmung überführt wurden. Die Zellzahlbestimmung und die Gamma-Countermessungen konnten somit parallel durchgeführt werden.

In der Auswertung der Aktivitätsbestimmung wurden die ermittelten Leerwerte von den zellulären Aufnahme-Werten subtrahiert und mit diesen und den bestimmten Zellzahlen die Aufnahme/Zelle probenindividuell bestimmt.

2.2.4.4 Bestimmung des CXCR4-Status mit [^{99m}Tc]O₂-AMD3100

Das Bicyklam AMD3100 ist ein Inhibitor des CXCR4 und kann mit [^{99m}Tc]Technetium radiomarkiert werden (131). Somit kann der CXCR4-Status durch Aufnahmemessungen mit [^{99m}Tc]O₂-AMD3100 (AMD) ermittelt werden. Der grundsätzliche Ablauf der Aufnahmeversuche entsprach jenem, wie er für die FLT-Aufnahme beschrieben ist. Eine Abweichung gegenüber diesem bestand in der Auswahl der untersuchten Proben. Hier lag das Augenmerk auf der Docetaxel-Konzentration und einer potenziellen Erhöhung des CXCR4-Status unter der Docetaxel-Therapie und deren Beeinflussung durch den Inhibitor.

³Aufgrund des zeitlichen Rahmens der Arbeit wurde auf die Untersuchung von LNCaP-Zellen ab diesem Versuchsteil verzichtet.

Daher wurde nur eine Inhibitor-Konzentration bei zwei Docetaxel-Konzentrationen in nachfolgendem Ansatz untersucht:

- unbehandelte Kontrolle
- Docetaxel in Konzentration 1
- Docetaxel in Konzentration 2
- Inhibitor in Konzentration 1
- Inhibitor in Konzentration 1 + Docetaxel in Konzentration 1
- Inhibitor in Konzentration 1 + Docetaxel in Konzentration 2
- Docetaxel in zwei weiteren Konzentrationen
- Leerwert

Da die CXCR4-Expression auf nativen PC-3-Zellen grundsätzlich gering ist (150) und daher auch die zelluläre Aufnahme von CXCR4-spezifischen Radiopharmaka nur gering ausfällt, spielen die Leerwerte in dieser Versuchsdurchführung eine besondere Rolle. Es wurde in Vorversuchen beobachtet, dass sich die Leerwerte leerer Wells deutlich erhöht gegenüber Leerwerten konfluenter Wells darstellten. Da ein leeres Well jedoch nicht der Versuchssituation entspricht, wurde bei der Durchführung der AMD-Aufnahmemessungen auf Leerwert-Messungen, welche mit konfluenten Wells ermittelt wurden, zurückgegriffen. Hierbei wurden im ersten Schritt der Probenaufarbeitung nach dem Inkubationsstopp alle Zellen vom Well entfernt und alle Folgeaufarbeitungsschritte analog zur Probenaufarbeitung durchgeführt. Die Arbeitskonzentration AMD lag bei 0,5 MBq/Well für alle Replikate und Wiederholungen.

2.2.5 Charakterisierung mit durchflusszytometrischen Methoden

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen mit hoher Geschwindigkeit an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die Ablenkung des Laserstrahls an jeder einzelnen Zelle wird gemessen und quantifiziert. Dabei hängt das Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) von dem Volumen der Zelle ab, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) eine Aussage über die Granularität der Zelle zulässt. Des Weiteren ist es möglich, Zielstrukturen der Zellen durch fluoreszenzfarbstoffmarkierte, spezifische Substanzen – wie beispielsweise Antikörper – zu adressieren und somit durch die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts mit der Durchflusszytometrie Rückschlüsse auf molekularbiologische zelluläre

Eigenschaften zu ziehen. Die Versuche dieser Arbeit wurden mit dem BD FACSCalibur® Durchflusszytometer durchgeführt.

2.2.5.1 Apoptose-Assay

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 24 h und 72 h nach Therapiebeginn die Zellen auf das Vorliegen von Apoptose untersucht. Dies geschah im Rahmen eines Lactadherin-7AAD-Assays. Lactadherin ist ein Protein, welches in der Lage ist, Ca^{2+} -unabhängig und hochaffin an das Zellmembranlipid Phosphatidylserin zu binden. Phosphatidylserin ist in lebenden Zellen ATP-abhängig auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Bei Eintreten apoptotischer Prozesse kommt es bereits in einem frühen Stadium bei noch intakter Zellmembran zu einer Umverteilung des Phosphatidylserins an die Zellaußenseite. Lactadherin ist damit ein Marker der frühen Apoptose (151). 7-Actinomycin (7AAD) ist ein Peptid, welches in die DNS, genauer zwischen Guanin und Cytosin, interkaliert. Dabei verändert es seine Fluoreszenzeigenschaften. Da 7AAD die intakte Zellmembran nicht überwinden kann, werden nur spät-apoptotische Zellen mit beschädigter Zellmembran und bereits tote Zellen angefärbt (152). Somit kann man durch einen kombinierten Einsatz von 7AAD und Lactadherin innerhalb eines Versuchs vitale Zellen (ohne Färbung) neben früh-apoptotischen Zellen (Lactadherin +/7AAD -) und spät-apoptotischen Zellen (Lactadherin +/7AAD +) quantifizieren.

Ansatz nach 24-stündiger Inkubationsdauer:

- unbehandelte Kontrolle
- Docetaxel in Konzentration 1
- Docetaxel in Konzentration 2
- Inhibitor in Konzentration 1
- Inhibitor in Konzentration 1 + Docetaxel in Konzentration 1
- Inhibitor in Konzentration 2
- Inhibitor in Konzentration 2 + Docetaxel in Konzentration 2
- Zwei weitere Docetaxel-Konzentrationen

Ansatz nach 72-stündiger Inkubationsdauer:

- unbehandelte Kontrolle
- Docetaxel in Konzentration 1
- Inhibitor in Konzentration 1

- Inhibitor in Konzentration 1 + Docetaxel in Konzentration 1
- Zwei weitere Docetaxel-Konzentrationen

<u>Inkubationsdauer</u>	<u>Ausgesäte Zellzahl/Well (t₀)</u>	<u>Inkubierte Wells</u>
24 h	400 000 (L292) 500 000 (PC-3)	2
72 h	70 000 (L292) 120 000 (PC-3)	3

Tabelle 2: Versuchsparameter Apoptose-Assays

Um für die Messung jeweils ca. 1 Million Zellen zu erhalten, wurden für die Versuche nach 24 h pro Inhibitorkonzentration auf 6-Well-Platten jeweils 2 Wells und nach 72 h auf 6-Well-Platten jeweils 3 Wells mit den in Tabelle 2 aufgeführten Zellzahlen inkubiert. 24 h nach Einsaat erfolgte ein Mediumwechsel und mit dem neuen Medium die Zugabe des Inhibitors. Nach Abschluss der Inkubationsdauer wurden die Zellen geerntet. Um potenziell von der Zellkulturschale abgelöste Zellen nicht zu verlieren, wurde das Medium bei der Aufarbeitung abpipettiert und ebenfalls aufgearbeitet. Die adhärenen Zellen wurden jeweils mit PBS (1 ml/Well) gewaschen und trypsiniert (1 ml/Well). Die gelösten Wells einer Inhibitorkonzentration einer Zelllinie wurden zusammengeführt und mit dem alten Medium in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen 500 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eiskaltem PBS (1ml) resuspendiert und 1:1 gesplittet. Jeweils eine Hälfte der Probe wurde für den Apoptose-Assay und die andere für die Zellzyklus-Analyse verwendet. Für die Analyse im Apoptose-Assay wurden die Proben erneut zentrifugiert (400 g, 7 min) und das Zellpellet jeweils in 46 µl FACSTTM-Färbepuffer resuspendiert. Zu jeder Probe (ca. 5*10⁵ Zellen) wurden 4 µl einer 1:8-Verdünnung aus Lactadherin hinzugegeben (Endkonzentration 0,16 µM) und die Proben 20 min unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (300 g, 10 min) und eine Resuspension in 250 µl des FACSTTM-Färbepuffers. Die Zellen wurden in 5 ml-FACSTTM-Röhrchen überführt und jeweils 2,5 µl des 7AAD hinzugegeben (Endkonzentration 0,05 µg/ml). Nach 5-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurden die Proben im Durchflusszytometer gemessen. Eine Messung wurde nach 20.000 Events automatisch beendet.

In einem ersten Schritt der softwaregestützten Auswertung der Messdaten wurde dafür FSC und SSC gegeneinander aufgetragen und ein Gate über die Probe gelegt, um Zellen von Zelldebris zu unterscheiden. Anschließend wurde ein Vierfelder-Gate über die

Zellpopulation gelegt, um die Zellen wie oben beschrieben nach positiver und negativer Fluoreszenz bzgl. der eingesetzten Farbstoffe zu unterscheiden. Da in den meisten Proben aber keine aussagekräftigen Ergebnisse für die Unterscheidung zwischen früher und später Apoptose zu erzielen waren, wurden die Daten in der Endauswertung nur bzgl. vorhandener Apoptose und nach Anteil der Zelltrümmer analysiert und die entsprechenden Quadranten des Vierfelder-Gates zusammengefasst. Beispielgrafiken für L929-Zellen (Abbildung 43 und Abbildung 44) und für PC-3-Zellen (Abbildung 45 und Abbildung 46) befinden sich im Anhang.

2.2.5.2 Zellzyklus-Analyse

Der Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle ist von mehreren Phasen geprägt. Während die Zelle in der G1-Phase wächst und ein vollständiger Chromosomensatz vorliegt, erfolgt in der S-Phase die Replikation der DNS, sodass in der G2-Phase schließlich ein doppelter Chromosomensatz vorliegt. Die eigentliche Teilung erfolgt in der M-Phase, an deren Ende die Chromosomen wieder einzeln vorliegen.

Verschiedene Reagenzien, wie auch das im Rahmen dieser Arbeit benutzte 7AAD, haben die Eigenschaft, doppelsträngige DNA zu binden. Hierdurch ist es möglich, die DNS anzufärben. Da sich die Fluoreszenz proportional zu dem DNS-Gehalt der Zelle verhält, kann durchflusszytometrisch ein Rückschluss auf die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen getätigt werden (153). Hierfür müssen die Zellen allerdings zunächst analysiert werden, um 7AAD in das Zellinnere transferieren zu können.

Die Zellen wurden – wie weiter oben unter Apoptose-Assay beschrieben – eingesät, behandelt und geerntet. Proben, welche der Zellzyklus-Analyse zugeführt wurden, wurden zentrifugiert (350 g, 5 min) und anschließend der Überstand verworfen. Unter beständigem Vortexen wurde tropfenweise eiskaltes Ethanol (70 %, 1 ml) zu den Zellen gegeben und resuspendiert. Die Proben wurden unter Lichtausschluss inkubiert (30 min, 4 °C) und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Vor dem Messen wurde die Probe mit PBS verdünnt (4 ml) und zentrifugiert (770 g, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen (3 ml) und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet (ca. $5 \cdot 10^5$ Zellen) wurde in 495 µl BD FACS Flow™- Trägerflüssigkeit

aufgenommen, daraufhin mit 5 µl des 7AAD versetzt (Endkonzentration 10 µg/ml), unter Lichtausschluss inkubiert (5 min) und anschließend gemessen.

In einem ersten Schritt der softwaregestützten Auswertung der Messdaten wurden die Zellen und der Zelldebris durch ein Gate in der FSC/SSC-Auftragung identifiziert. Anschließend erfolgte ein Dupletten-Gate, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. Schließlich wurde mit einer Flussrate von 400 Events/s eine Zellzyklusanalyse der Probe durchgeführt. Beispielgrafiken für L929-Zellen (Abbildung 39 und Abbildung 40) und für PC-3-Zellen (Abbildung 41 und Abbildung 42) befinden sich im Anhang.

2.2.5.3 Totalproteinbestimmung und Phosphorylierungsgrad

Um eine Aussage über die Wirkung der Inhibitoren auf molekularer Ebene treffen zu können, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen mit Fluoreszenz-Antikörpern durchgeführt. Untersucht wurde die Gesamtmenge der RSK, S6K und des RPS6 (Totalprotein) sowie der Anteil an ihren phosphorylierten Formen in nativen und mit den Inhibitoren behandelten Zellen. Dies wurde für je zwei Inhibitor- und eine Docetaxel-Konzentration untersucht.

Die Vorbereitung der Proben erfolgte auf 6-Well-Platten. Je 400.000 Zellen (L929) bzw. 500.000 Zellen (PC-3) wurden in 2 ml Medium eingesät. Es wurden für jede untersuchte Inhibitorkonzentration mehrere Wells vorbereitet, sodass nach ihrer Vereinigung ungefähr 2 Millionen Zellen in einer Probe enthalten waren. Nach der Anwachszeit (24 h) wurde – wie oben bereits beschrieben – das Medium gegen Inhibitor haltiges Medium in der Zielkonzentration ausgetauscht. Im Anschluss an die Inkubationszeit (24 h) wurden die Zellen geerntet (2.2.5.1). Die trypsinierten Zellen wurden gemeinsam mit dem abpipettierten Medium zentrifugiert (500 g, 5 min) und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde in 250 µl warmem PBS suspendiert und mit 250 µl des Inside-fix gemischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur (10 min) erfolgte eine erneute Zentrifugation (500 g, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Pellet in kaltem (-20 °C) Permeabilization Puffer A (1 ml) resuspendiert, gevortext und auf Eis inkubiert (30 min). Es erfolgte ein Waschschrift mit Pufferlösung (1 ml) sowie ein Zentrifugationsschritt (500 g, 4 min). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die Zellen wurden in 190 µl Färbe-Puffer suspendiert und die Probe zur Durchführung der Totalprotein- und

Phosphoproteinmessungen gesplittet. Die jeweils drei Antikörper (pRSK, pRPS6 und pS6K, bzw. RSK, RPS6 und S6K) wurden der Probe hinzugegeben und unter Lichtausschluss inkubiert (30 min). Anschließend wurde erneut mit Puffer (1 ml) gewaschen und zentrifugiert (500 g, 5 min). Die Sekundärantikörper wurden hinzugegeben und ebenfalls unter Lichtausschluss inkubiert (30 min). Erneut folgte ein Waschschritt mit Puffer (1 ml) und eine Zentrifugation (500 g, 5 min). Die Zellpellets wurden in 250 µl Puffer aufgenommen, gevortext und am Durchflusszytometer gemessen. Jede Versuchsreihe wurde dreifach ausgeführt.

Die softwaregestützte Auswertung fokussierte den Median der Fluoreszenzintensität der Proben. Anschließend wurden die Messwerte auf die unbehandelte Kontrolle normiert und die Signalstärke der mit Phospho- und der mit Totalprotein-Antikörpern inkubierten Proben bestimmt, um eine Aussage über Aktivierung der Proteine zu erhalten. Beispielgrafiken für L929-Zellen (Abbildung 47 und Abbildung 48) und für PC-3-Zellen (Abbildung 49 und Abbildung 50) befinden sich im Anhang.

2.2.5.4 *Bestimmung des Combination Index*

Um den Effekt einer Kombinationstherapie quantitativ beurteilen und klassifizieren zu können, wurde der Combination Index (CI) angewendet. Dieser wurde 2006 von Chou publiziert und ordnet den verschiedenen Effektstärken Zahlenwerte zu (154). Wenn die Gesamtwirkung einer Kombinationstherapie die Summe der Einzelwirkungen ist, so ist der Effekt additiv und liegt bei $CI = 1$. Wenn die Summe der Einzelwirkungen von der Gesamtwirkung übertroffen wird, handelt es sich um einen synergistischen Effekt ($CI < 1$). Liegt die Summe der Einzelwirkungen unter jener der Gesamtwirkung, so ist von einem antagonistischen Effekt auszugehen ($CI > 1$). Um eine genauere Abstufung der Effekte vorzunehmen, wurde eine Unterteilung vorgenommen, wie in Tabelle 3 dargestellt.

Beschreibung	CI-Wert
stark synergistisch	0,10 - 0,30
synergistisch	0,30 - 0,70
moderat synergistisch	0,70 - 0,85
leicht synergistisch	0,85 - 0,90
additiv	0,90 - 1,10
leicht antagonistisch	1,10 - 1,20
moderat antagonistisch	1,20 - 1,45
antagonistisch	1,45 - 3,30
stark antagonistisch	3,30 – 10

Tabelle 3: Tabelle der CI-Werte nach Chou 2006 (154).

2.3 Software und statistische Methoden

Die Erstellung der in dieser Arbeit gezeigten Graphiken sowie die Berechnungen der IC₅₀-Werte erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism® 5.0. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichungen. Zur Versuchsplanung und -auswertung stand Microsoft Excel Version 2015 zur Verfügung. Als Textbearbeitungsprogramm wurde Microsoft Word Version 2015 und als Programm zur Literaturorganisation Citavi manual 6 genutzt. Die Berechnung der CI-Werte erfolgte mit dem Programm CompusSyn der Firma Combosyn Incorporated. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten durchflusszytometrischer Messungen wurden mit der Software FlowJo™ v10.7 ausgewertet und bearbeitet.

Jedes Experiment wurde mehrfach in unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden die ermittelten Werte in GraphPad Prism® 5.0 mit dem Student's t-test für unabhängige Paarvergleiche auf Signifikanz untersucht (155). Im Falle von mehrfachen Vergleichen in einem Datensatz wurde das Signifikanzniveau mittels der Bonferroni-Holms-Methode durch den Excelkalkulator von Gaetano (156) adjustiert, um eine Alphafehlerkumulierung zu vermeiden. Diese würde ansonsten bei multiplen Vergleichen innerhalb eines Datensatzes die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses erhöhen. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Dosis-Wirkungs-Kurven mit IC₅₀-Werten

Zur Charakterisierung der Wirkung der Inhibitoren wurden die verschiedenen Zelllinien über einen Zeitraum von 24/48/72 h mit den jeweiligen Inhibitoren inkubiert und die Zellzahl, die Vitalität und das Zellvolumen bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde mit Hilfe der Zellzahl der IC₅₀-Wert bestimmt.

3.1.1 Docetaxel

Im Rahmen dieser Arbeit kam dem Standardtherapeutikum von Prostatakarzinomen, Docetaxel – sowohl als Referenzsystem für Monotherapien als auch als Teil einer Kombinationstherapie mit den untersuchten Inhibitoren – eine besondere Bedeutung zu. Die inhibitorische Wirkung in Monotherapie (72 h) ist in Abbildung 3 dargestellt. Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse weiterer Inkubationsdauern (24 h und 48 h) befinden sich im Anhang (Abbildung 27 und Abbildung 28). Für die LNCaP-Zelllinie wurden diese Untersuchungen nur für zwei Inkubationszeiträume (48 h und 72 h) durchgeführt.⁴

Grundsätzlich ist ein um drei Größenordnungen empfindlicheres Ansprechen der untersuchten Zelllinien auf eine Docetaxel-Behandlung gegenüber den in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren festzustellen. Darüber hinaus stellen sich beide Prostatakarzinomzelllinien mit IC₅₀-Werten von 3,4/1,6/0,8 nM (PC-3) und 1,7/0,8 nM (LNCaP) gegenüber der Zelllinie L929 mit 21,2/15/10,3 nM als deutlich Docetaxel-sensibler dar. Auch zeigt sich für alle drei Zelllinien eine signifikante Steigerung des Ansprechvermögens mit ansteigender Therapiedauer. Der Verlauf der konzentrationsabhängigen Vitalitätskurven hingegen ist für die drei untersuchten Zelllinien jeweils nur durch einen leichten Abfall gekennzeichnet, wobei dieser für LNCaP (72 h) am stärksten ausfällt. Umgekehrt zeigen LNCaP-Zellen keine konzentrationsabhängige Änderung ihres Zellvolumens, während dieses für PC-3-Zellen leicht ansteigt. Markanter fällt die Volumenzunahme von L929-Zellen aus, welche bei einer Docetaxel-Konzentration von 10 nM durch einen sprunghaften Anstieg auf das 3,5-fache gegenüber der unbehandelten

⁴ Da keine weiteren Versuche mit der Zelllinie LNCaP nach 24 h durchgeführt wurden, entfiel die Bestimmung des IC₅₀-Wertes nach 24 h.

Kontrolle charakterisiert ist. Während sich die Zunahme des zellulären Volumens für PC-3-Zellen unabhängig von der Inkubationsdauer darstellt, schwellen L929-Zellen nach einer 72-stündigen Inkubation deutlich mehr an als bei kürzeren Inkubationsdauern.

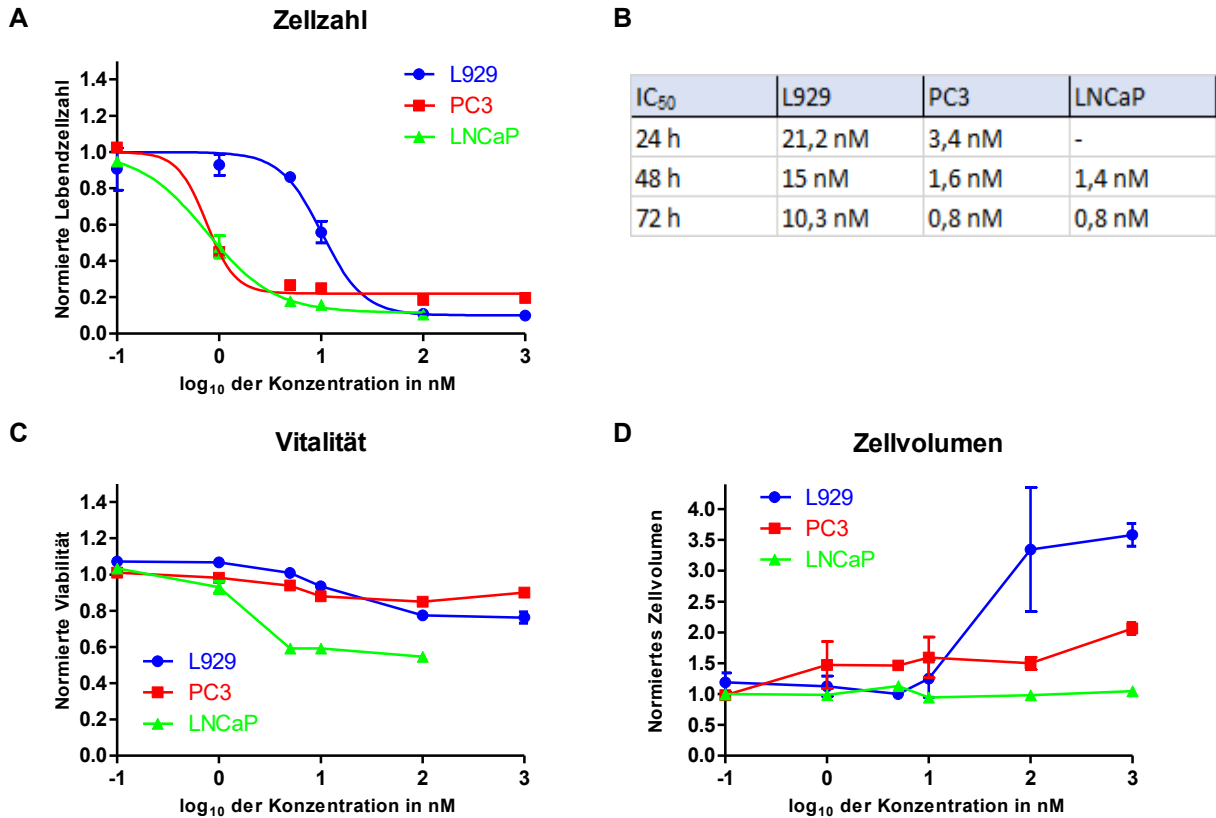


Abbildung 3: Dosis-Wirkungskurven für Docetaxel nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC₅₀-Werte nach $t_1 = 24$ h, 48 h und 72 h.

3.1.2 PF-4708671

Die inhibitorische Wirkung von PF-4708671 (72 h) ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Darstellungen der Ergebnisse weiterer Inkubationsdauern (24 h und 48 h) befinden sich im Anhang (Abbildung 29 und Abbildung 30)

Während die IC₅₀-Werte der Zelllinien L929 und PC-3 mit 20 μ M und 17,3 μ M (48 h) bzw. 17,1 μ M und 14,8 μ M (72 h) jeweils durch geringe Unterschiede in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer charakterisiert sind (Δ IC₅₀ \sim 3 μ M), weicht der frühe IC₅₀-Wert von 35,9 μ M (L929) bzw. 21,9 μ M (PC-3) nach 24 h deutlich von diesen ab. Demgegenüber ist das Wachstum von Zellen der LNCaP-Zelllinie schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen gehemmt; mit einem IC₅₀-Wert von etwa 4,3 μ M (72 h) liegt dieser bei

einem Viertel jener der anderen beiden Zelllinien. Mit Blick auf das Zellüberleben zeigen sich Zellen der Zelllinie L929 am unempfindlichsten, der Zelllinie PC-3 intermediär und der Zelllinie LNCaP am empfindlichsten gegenüber einer Inkubation mit PF-4708671. Weniger ausgeprägt sind Unterschiede in der Zellvitalität, welche für alle drei Zelllinien durch einen ähnlich starken Abfall für Konzentrationen oberhalb von 30 μM PF-4708671 charakterisiert sind und welche sich mit fortschreitender Therapiedauer verstärken. Für Zellen der Zelllinie LNCaP stellt sich ab einer Dosis von 10 μM eine Abnahme des Zellvolumens dar, während sich dieses bei Zellen der Zelllinien PC-3 und L929 durch ein Aufblähen der Zellen für niedrige und mittlere Inhibitorkonzentrationen äußert. So ist im Bereich zwischen 10 μM und 100 μM zunächst eine leichte Volumenzunahme, welche bei weiter steigenden Konzentrationen in eine deutliche Volumenabnahme übergeht, zu verzeichnen. Diese Volumenreduktion ist für die beiden Prostatakarzinomzelllinien nach 72 h mit Werten unter 0,5 im Vergleich zur Kontrolle besonders ausgeprägt.

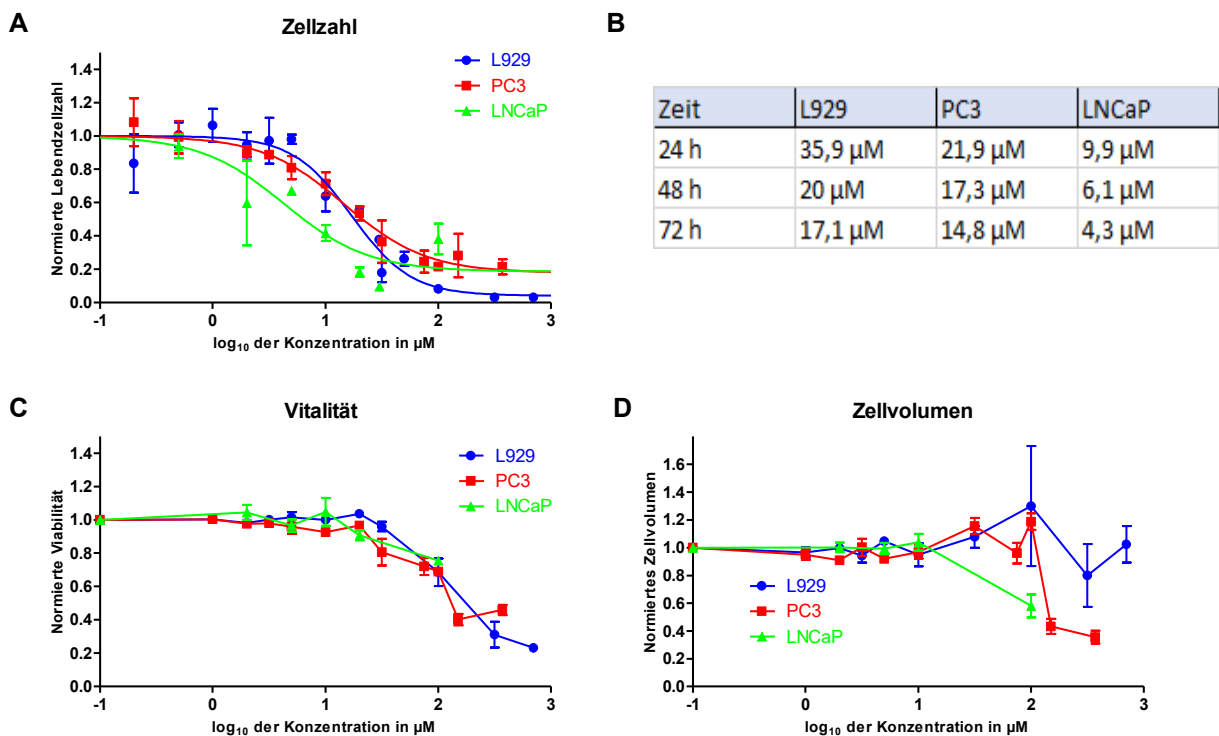


Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurven für PF-4708671 nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC_{50} -Werte nach $t_1 = 24$ h, 48 h und 72 h.

3.1.3 LY2584702

Die inhibitorische Wirkung von LY2584702 (72 h) ist in Abbildung 5 dargestellt. Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse weiterer Inkubationsdauern (24 h und 48 h) befinden sich im Anhang (Abbildung 31 und Abbildung 32).

Die Ergebnisse der Versuche mit LY2584702 ähneln jenen mit PF-4708671. So fällt die Zellvitalität bei allen drei Zelllinien ebenfalls erst bei Inhibitorkonzentrationen oberhalb 10 μM ab. Jedoch stellt sich dieser Abfall steiler dar. Ein ebenso gegenüber den PF-4708671-Serien ähnliches Bild ergibt sich für den konzentrationsabhängigen Verlauf des Zellvolumens: Während LNCaP-Zellen hier durch einen Abfall bei Inhibitorkonzentrationen oberhalb 10 μM charakterisiert sind, nimmt bei PC-3- und L929-Zellen das Zellvolumen zu. Sowohl Effekte in der Vitalität als auch im Zellvolumen nehmen bei längerer Inkubationsdauer in allen drei Zelllinien zu. Unabhängig von der Inkubationsdauer scheint eine Verringerung des Zellvolumens um ca. 10-20 % der L929-Zellen im Konzentrationsbereich unterhalb 10 μM zu sein. Von der Inkubationsdauer unabhängig stellt sich der IC_{50} -Wert von 10 μM für L929-Zellen dar. Hingegen ist für die Prostatakarzinomzelllinien mit 15,8/12,7/10,4 μM (PC-3) und 7,6/7,6/4,6 μM (LNCaP) eine Reduktion in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer (24/48/72 h) festzustellen. Während L929-Zellen und PC-3-Zellen auf eine 72-stündige Inkubationsdauer mit einer ähnlich starken Wachstumshemmung reagieren, zeigen LNCaP-Zellen auch gegenüber diesem Inhibitor die höchste Empfindlichkeit.

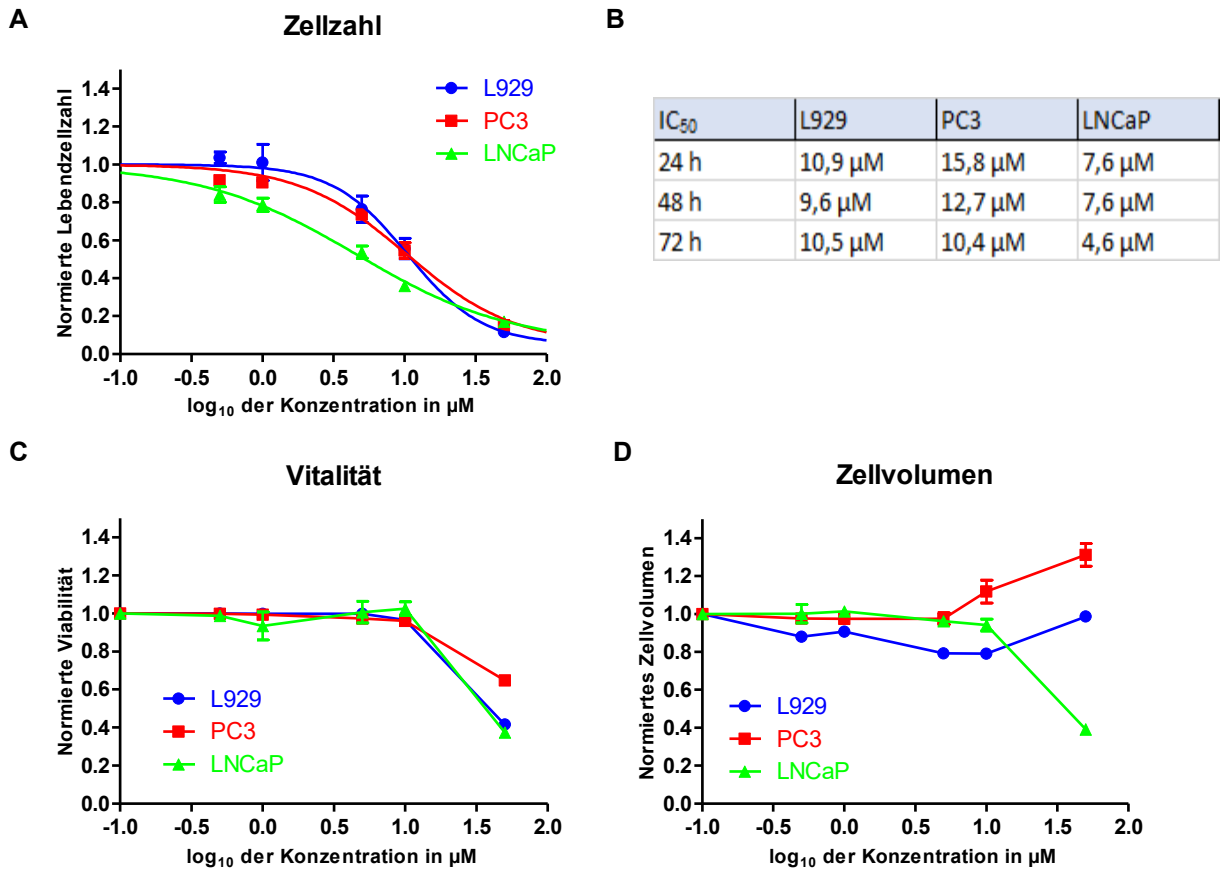


Abbildung 5: Dosis-Wirkungskurven für LY2584702 nach Inkubationsdauer (t_i) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC₅₀-Werte nach $t_i = 24$ h, 48 h und 72 h.

3.1.4 AT7867

Die inhibitorische Wirkung von AT7867 (72 h) ist in Abbildung 6 dargestellt. Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse weiterer Inkubationsdauern (24 h und 48 h) befinden sich im Anhang (Abbildung 33 und Abbildung 34).

Alle drei Zelllinien reagieren sehr empfindlich auf eine Inkubation mit AT7867, wobei auch bei diesem Inhibitor ein Effekt gegenüber der Therapiedauer zu erkennen ist: So sind L929-Zellen durch IC₅₀-Werte von 4,4 µM (24 h) und 0,9 µM (48 h, 72 h) charakterisiert. LNCaP-Zellen hingegen werden innerhalb der ersten 24 h nahezu dreimal so stark inhibiert (1,7 µM), weisen aber nach 72 h mit 0,7 µM einen nur noch um 0,2 µM niedrigeren Wert gegenüber den L929-Zellen auf. Auch PC-3-Zellen werden in ihrem Wachstum durch eine Inkubation mit AT7867 unterdrückt, aber im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Zelllinien erst bei deutlich höheren IC₅₀-Werten: 6,1 µM (24 h), 4,5 µM (48 h) und 2,3 µM (72 h). Des Weiteren zeigen die Dosis-Wirkungskurven der L929- und LNCaP-Zellen im Unterschied

zu den PC-3-Zellen einen steileren Gradienten. Während L929- und PC-3-Zellen bei Konzentrationen oberhalb von 1 μM beständig in ihrer Vitalität sinken, ist ein ähnlicher Effekt für LNCaP-Zellen erst oberhalb von 10 μM zu erkennen. Alle drei Zelllinien zeigen bis zu einer Konzentration von 10 μM einen Anstieg im Zellvolumen, welcher bei größeren Inhibitorkonzentrationen wieder abfällt. Dieser Effekt ist bei den beiden Prostatakarzinomzelllinien deutlich ausgeprägter als bei L929-Zellen. PC-3-Zellen zeigen sich nach einer 72-stündigen Inkubation doppelt und LNCaP-Zellen mehr als doppelt so voluminös gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

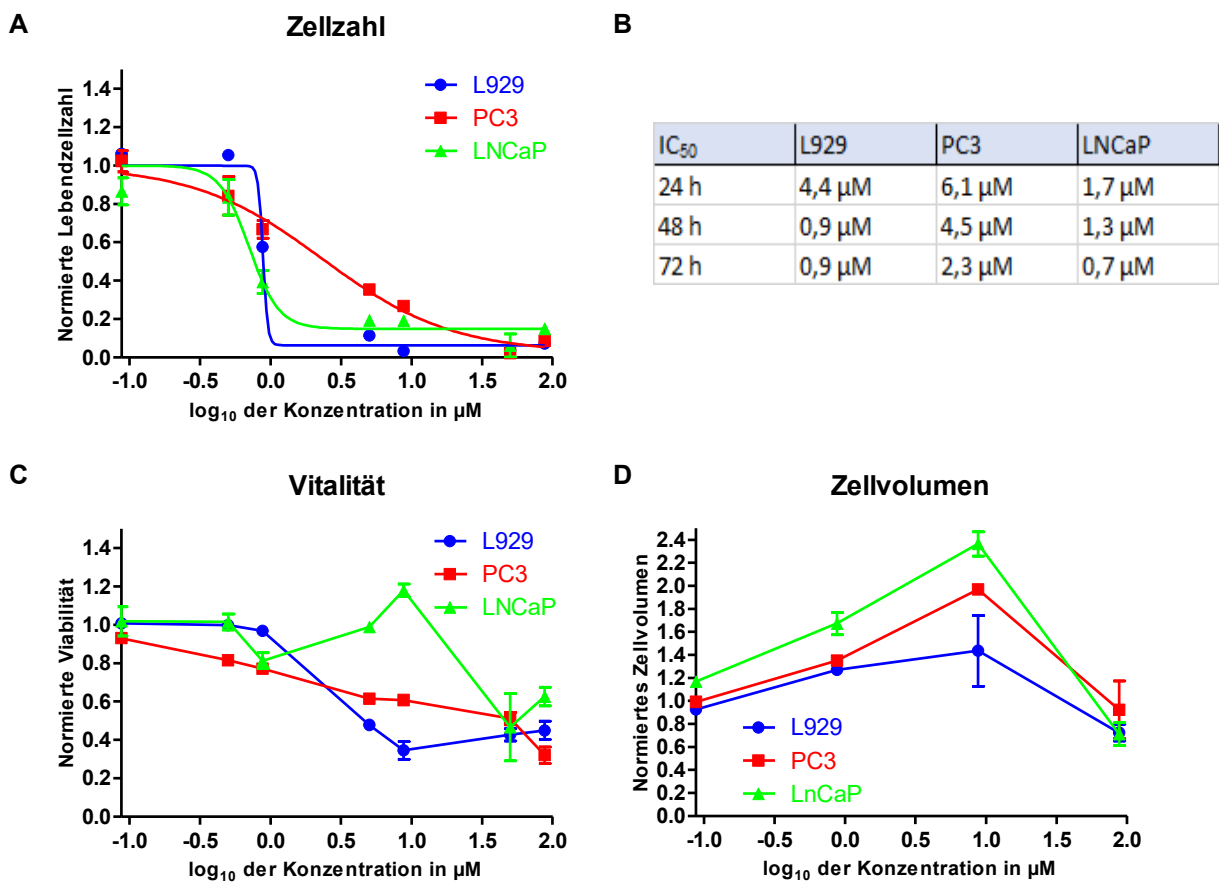


Abbildung 6: Dosis-Wirkungskurven für AT7867 nach Inkubationsdauer (t_i) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC_{50} -Werte nach $t_i = 24$ h, 48 h und 72 h.

3.1.5 LJI308

Die inhibitorische Wirkung von AT7867 (72 h) ist in Abbildung 7 dargestellt. Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse weiterer Inkubationsdauern (24 h und 48 h) befinden sich im Anhang (Abbildung 35 und Abbildung 36).

Die Werte für LJI308 wurden mit der Neubauerzählkammer erfasst, weshalb nur die Zellzahl und Vitalität, nicht aber das Zellvolumen ermittelt werden konnten. Die Berechnung eines IC_{50} -Wertes ist auf Basis der erhobenen Daten nicht möglich, da nach 24 h im untersuchten Konzentrationsbereich kaum Hemmung der Zelllinien festzustellen ist und sich auch erst nach 48 h bzw. 72 h bei Konzentrationen oberhalb von $50 \mu\text{M}$ eine Wachstumsverringering um ca. 50 % (PC-3, LNCaP) bzw. um ca. 40 % (L929) zeigt. Aufgrund des hohen Substanzverbrauchs für eine Rasterung im ermittelten relevanten Konzentrationsbereich zur Bestimmung eines IC_{50} -Wertes konnten keine höheren Werte untersucht werden. Für Folgeversuche wurden Konzentrationen im gerasterten Bereich unabhängig von einem IC_{50} -Wert festgelegt. Die Vitalität der Zellen nach LJI308-Inkubation stellt sich für alle untersuchten Konzentrationsbereiche und unabhängig von der Therapiedauer als konstant dar.

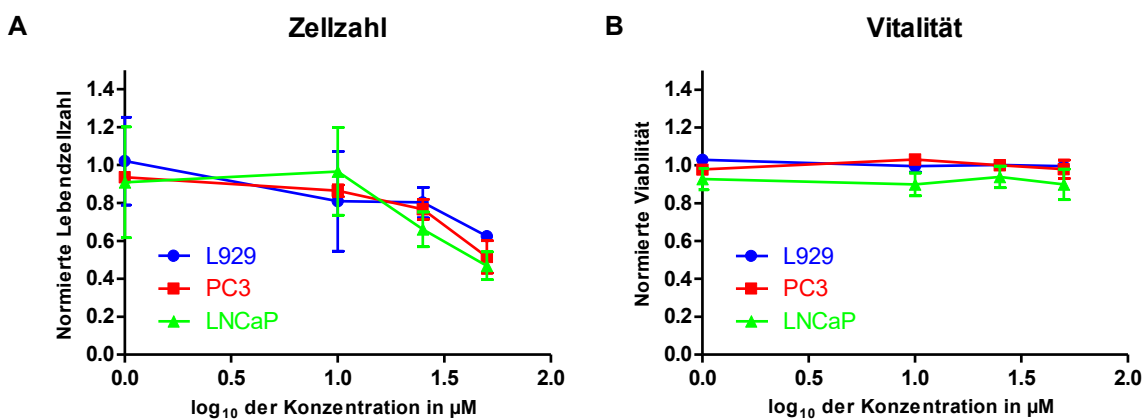


Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurven für LJI308 nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

3.1.6 BI-D1870

Die inhibitorische Wirkung von BI-D1870 (72 h) ist in Abbildung 8 dargestellt. Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse weiterer Inkubationsdauern (24 h, 48 h) befinden sich im Anhang (Abbildung 37 und Abbildung 38).

Auf eine Behandlung mit BI-D1870 reagieren L929-Zellen deutlich weniger sensibel als die Prostatakarzinomzelllinien. So liegt ihr IC_{50} -Wert mit $10,7 \mu\text{M}$ (24 h), $6,4 \mu\text{M}$ (48 h) und $6,6 \mu\text{M}$ (72 h) bei dem doppelten bzw. dem dreifachen Wert im Vergleich mit den Prostatakarzinomzelllinien. Für alle drei Zelllinien wird eine Sensibilitätssteigerung gegenüber BI-D1870 durch eine Verlängerung der Therapiedauer von 24 h zu 48 h erreicht,

während eine weitere Verlängerung auf 72 h bei den Prostatakarzinomzelllinien den IC_{50} -Wert nur noch geringfügig senkt und dieser bei L929-Zellen konstant bleibt. Die zelluläre Vitalität nimmt bei allen Zelllinien ab einer individuellen Schwellwert-Konzentration ab, wobei dieser Effekt bei Zellen der Zelllinie L929 ungefähr eine Zehnerpotenz später als bei den Prostatakarzinomzellen einsetzt. Auch Änderungen im Zellvolumen stellen sich für diese ausgeprägter dar. Während für BI-D1870-Konzentrationen bis ca. $10 \mu\text{M}$ eine Zunahme zu verzeichnen ist, sinkt das Zellvolumen bei höheren Konzentrationen wieder auf den Ausgangswert. Dieser Effekt ist bei L929-Zellen weniger ausgeprägt – bestenfalls als Trend – ähnlich zu erkennen. Zusammenfassend festzustellen ist, dass PC-3- gegenüber LNCaP-Zellen durch ein etwas sensibleres Ansprechen auf eine BI-D1870-Inkubation charakterisiert sind. Zellen der Zelllinie L929 zeigen hingegen eine geringere Sensibilität.

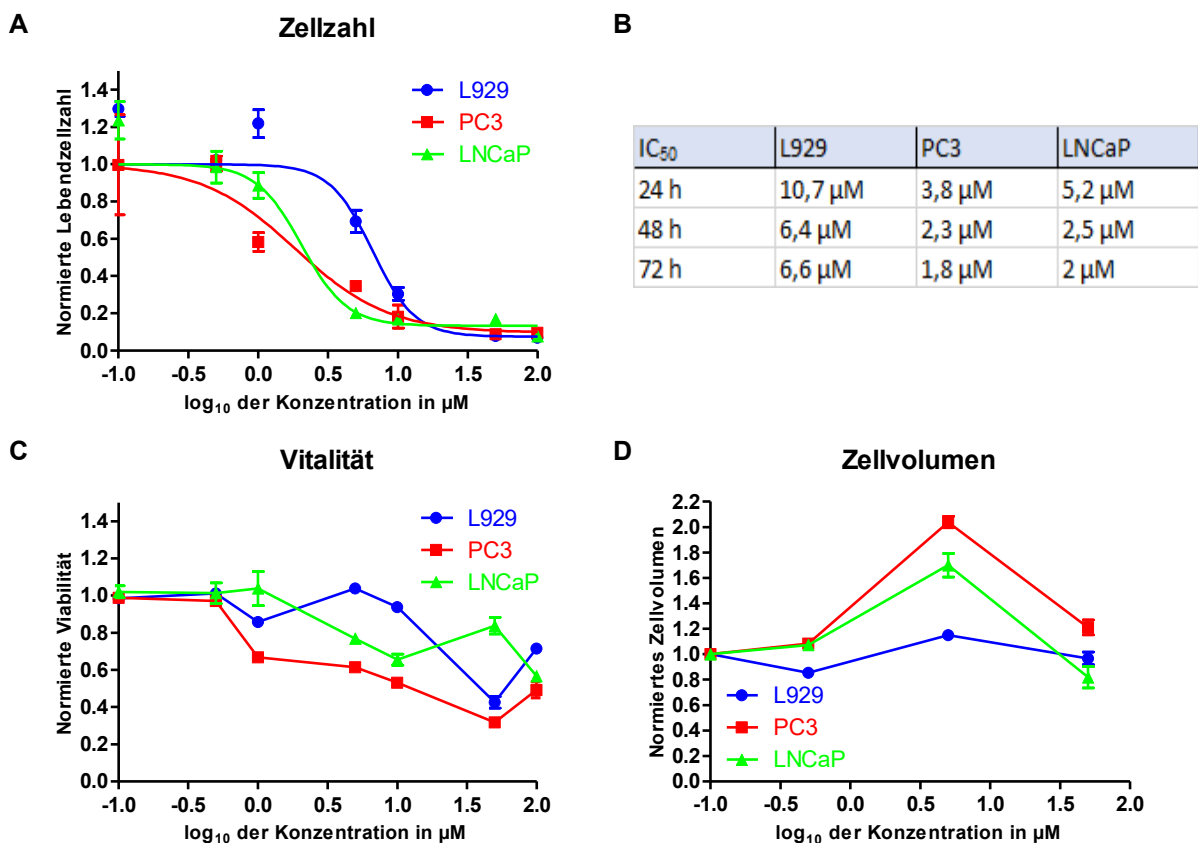


Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurven für BI-D1870 nach Inkubationsdauer (t_i) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC_{50} -Werte nach $t_i = 24$ h, 48 h und 72 h.

3.1.7 PDA-66

Repräsentative Daten zur inhibitorischen Wirkung von PDA-66 (72 h) sind in Abbildung 9 dargestellt.

Diese wurde als Vergleichssubstanz aufgrund seiner eingeschränkten Verfügbarkeit nur bei einer einzigen Inkubationsdauer (72 h) untersucht, weshalb keine Aussage über den Einfluss der Therapiedauer getroffen werden kann. Grundsätzlich ähneln sich die Wachstumskurven aller drei untersuchten Zelllinien. Dies spiegelt sich auch in vergleichbaren IC_{50} -Werten wieder: 1,5 μ M (L929), 1,2 μ M (PC-3) und 2,4 μ M (LNCaP). Steigende PDA-66-Konzentrationen bewirken zudem eine kontinuierliche Vitalitätsabnahme. Während Zellen der Zelllinien L929 und PC-3 durch eine Inhibitor induzierte, konzentrationsabhängige Volumenvergrößerung charakterisiert sind, ist für Zellen der Zelllinie LNCaP eine Volumenreduktion zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich die höchste PDA-66-Sensibilität bei Zellen der Zelllinie LNCaP feststellen, wobei die für diese beobachtete zelluläre Volumenreduktion auffällig ist.

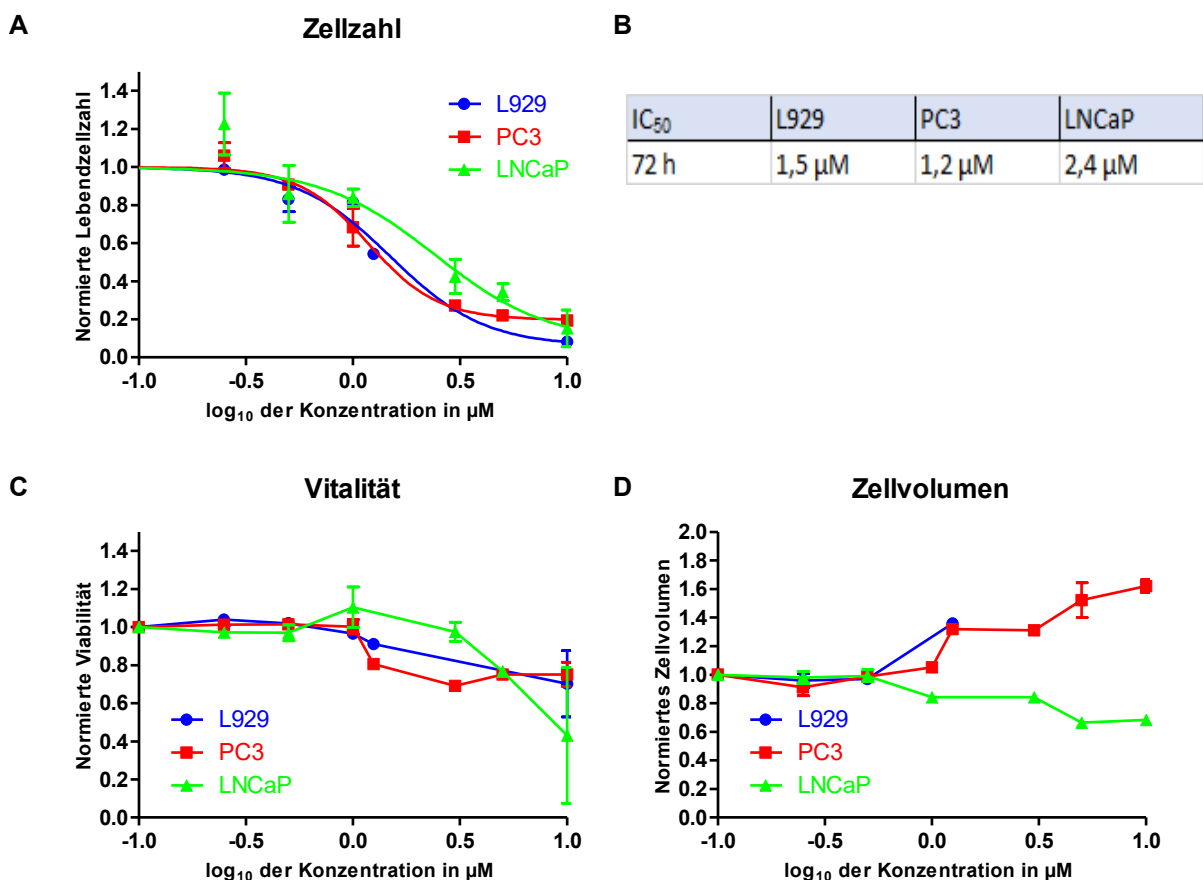


Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurven für PDA-66 nach Inkubationsdauer (t_i) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC_{50} -Werte nach $t_i = 72$ h.

3.2 Kombiniertes Einsatz der Inhibitoren mit Docetaxel

Je drei Inhibitorkonzentrationen wurden für die Zelllinien PC-3 und L929 in Kombination mit je einer Docetaxel -Konzentration getestet. Die Inhibitorkonzentrationen wurden dabei im Bereich ihrer IC₁₀-, IC₂₀- und IC₅₀-Werte (72 h) gewählt. Die Docetaxel-Konzentration wurde in allen Versuchen in der Nähe ihres IC₂₀-Wertes bei 5 nM (L929) bzw. 0,6 nM (LNCaP) eingestellt. Für PC-3-Zellen zeigte sich entgegen den vorherigen Versuchen keine ausreichende Hemmung bei dem ermittelten IC₂₀-Wert, daher wurde hier die Konzentration auf 1 nM hochgesetzt, womit eine entsprechende Inhibition im Bereich von 20 % erzielt werden konnte. Untersucht wurden analog zu den Monotherapien die Lebendzellzahl, die Vitalität, sowie das zelluläre Volumen. Die Klassifikation der therapeutischen Wirkung erfolgte mittels Combination Index (Tabelle 3, Ergebnisse Tabelle 4) und wurde auf Signifikanz getestet.

3.2.1 Kombinierte Wirkung auf die Zelllinie L929

Die Kombinationstherapien von Docetaxel mit LY2584702 oder mit PF-4708671 zeigen für die Zelllinie L929 jeweils signifikante Unterschiede gegenüber den entsprechenden Monotherapien in allen der drei gemessenen Parametern: Die Zellzahl und die Vitalität nahmen jeweils deutlich ab, das Volumen der Zellen dafür deutlich zu (Abbildung 10). Dies spiegelt sich ebenfalls in den CI-Werten wider (Tabelle 4), welche für LY2584702 mit 0,87/0,6/0,72 im leicht synergistischen bis synergistischen Bereich und für PF-4708671 mit 0,94/0,78/0,6 im synergistischen bis additiven Bereich liegen. Für kombinierte AT7867-Behandlungen ergibt sich hingegen nur für die niedrigste untersuchte Konzentration eine synergistische Abnahme der Zellzahl, während für höhere Konzentrationen moderat antagonistische bis antagonistische Wirkungen vorliegen. Die Zellvitalität ist in allen untersuchten Kombinationen geringfügig erniedrigt. Eine Änderung des Zellvolumens wird nicht beobachtet. Eine Kombination von Docetaxel mit BI-D1870 zeigt für L929-Zellen überwiegend additive bis synergistische Wirkung. Während die Vitalität hierbei deutlich reduziert wird, nimmt das Zellvolumen stark zu (Abbildung 11). Eine Kombination von Docetaxel mit LJI308 ergibt für die Zellzahl leicht antagonistische bis moderat antagonistische Effekte. Die Vitalität nimmt nur unwesentlich und dabei nicht signifikant ab; das Zellvolumen bleibt von der Therapiekombination unbeeinflusst (Abbildung 11). Eine Kombination von Docetaxel mit PDA-66 ergibt additiv bis moderat synergistische Effekte

bei der Betrachtung der Zellzahlen. Die Vitalität nimmt bei der höchsten InhibitorKonzentration signifikant ab und das Zellvolumen bleibt unbeeinflusst (Abbildung 11).

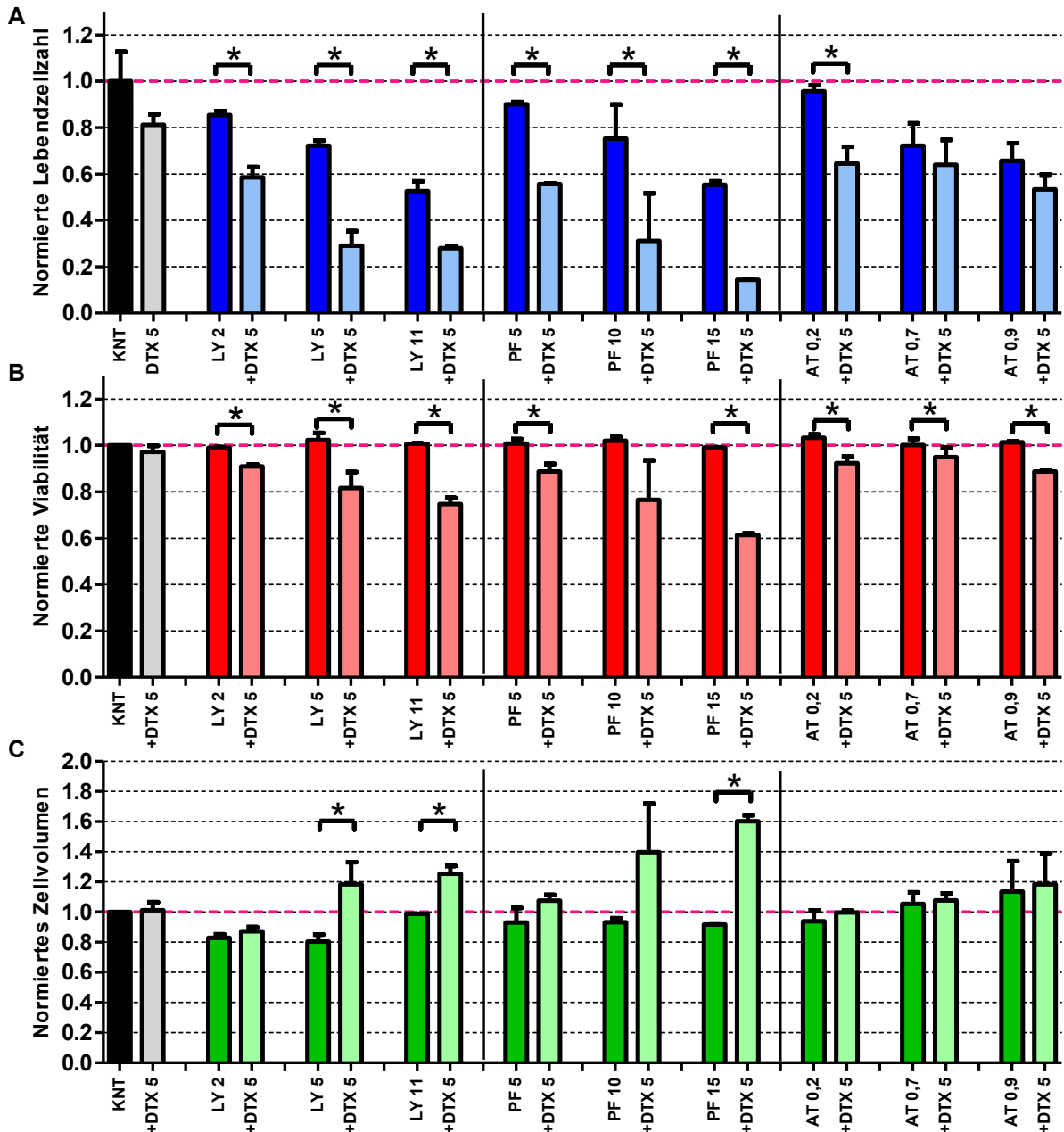


Abbildung 10: Auswirkung einer Kombinationstherapie von LY2584702 (LY), PF-4708671 (PF) und AT7867 (AT) mit Docetaxel (DTX) auf die Zelllinie L929; normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Untersuchte Konzentrationen sind als Ziffer im Namen angegeben: Inhibitoren in μM , DTX in nM . (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen. Unbehandelte Kontrolle (KNT, Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Signifikante Unterschiede der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

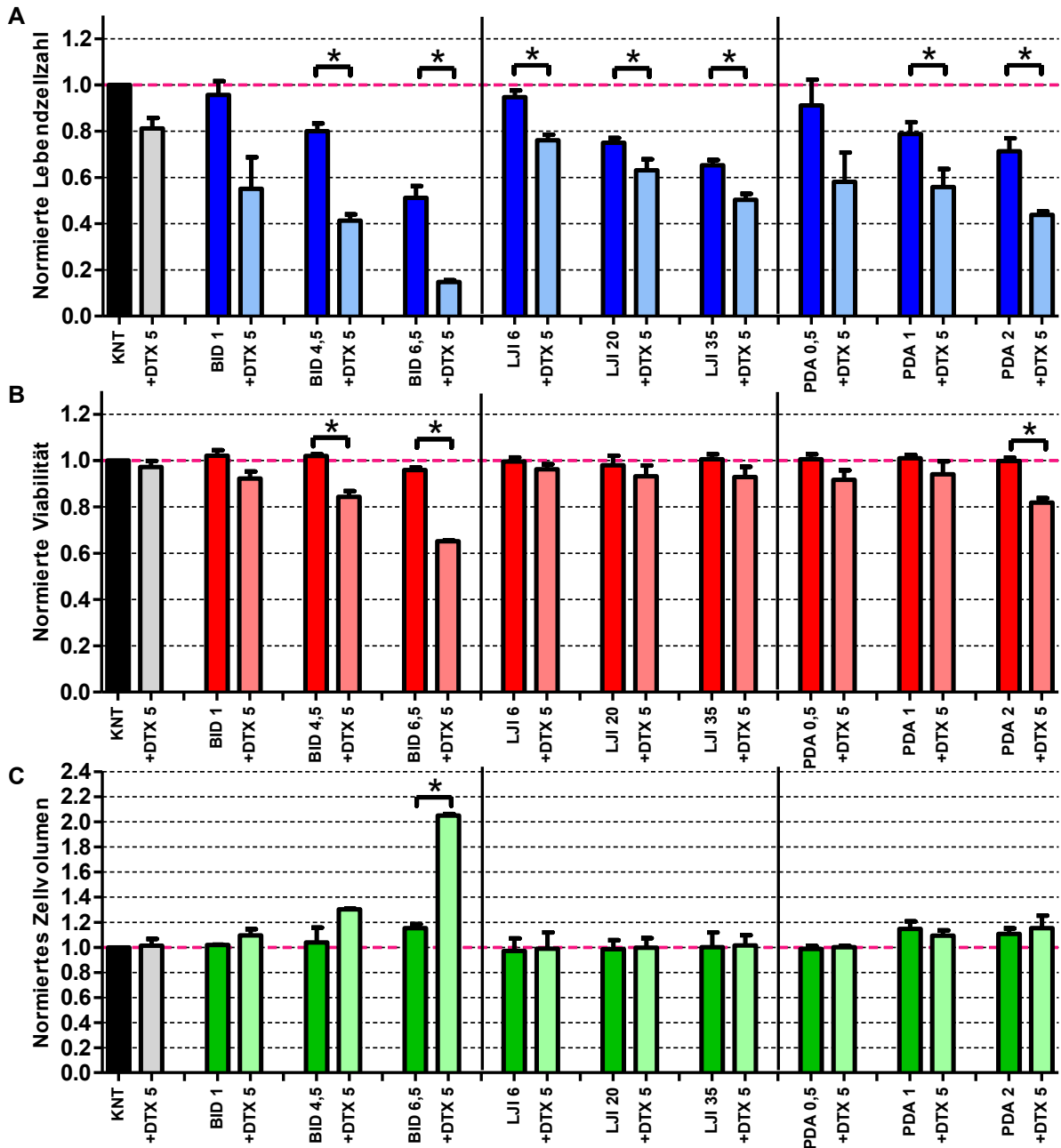


Abbildung 11: Auswirkung einer Kombinationstherapie von BI-D1870 (BID), LJI 308 (LJI) und PDA-66 (PDA) mit Docetaxel (DTX) auf die Zelllinie L929; normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Untersuchte Konzentrationen sind als Ziffer im Namen angegeben: Inhibitoren in μM , DTX in nM. (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen. Unbehandelte Kontrolle (KNT, Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Signifikante Unterschiede der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

3.2.2 Kombinierte Wirkung auf die Zelllinie PC-3

Eine Kombination von Docetaxel mit LY2584702 ergibt überwiegend leicht antagonistische bis additive Effekte für das Zellüberleben. In einer kombinierten PF-4708671-Behandlung liegen additiv bis synergistische Effekte vor, welche nur in niedrigster Konzentration nicht signifikant sind. Eine Kombination mit AT7867 zeigt moderat antagonistische bis antagonistische Wirkung (Abbildung 12, Tabelle 4). Für BI-D1870 liegen entsprechend additive bis moderat antagonistische Effekte vor, wobei nur die additiven Unterschiede signifikant sind. Eine Kombinationstherapie aus Docetaxel mit LJI308 führt zu additiven bis antagonistischen Effekten, wobei der antagonistische Effekt signifikant ist. PDA-66 zeigt nicht signifikante moderat antagonistische bis antagonistische Wirkung (Tabelle 4). Untersuchungen zur Vitalität weisen nur in der Kombinationstherapie mit LY2584702 signifikante und gleichzeitig dennoch nur geringe Unterschiede auf. Das Zellvolumen hingegen nimmt in allen Kombinationsbehandlungen (teilweise signifikant) gegenüber der Monotherapie zu, allerdings immer in dem Maße, in dem es auch durch eine Einzelinkubation mit Docetaxel ansteigt (Abbildung 13).

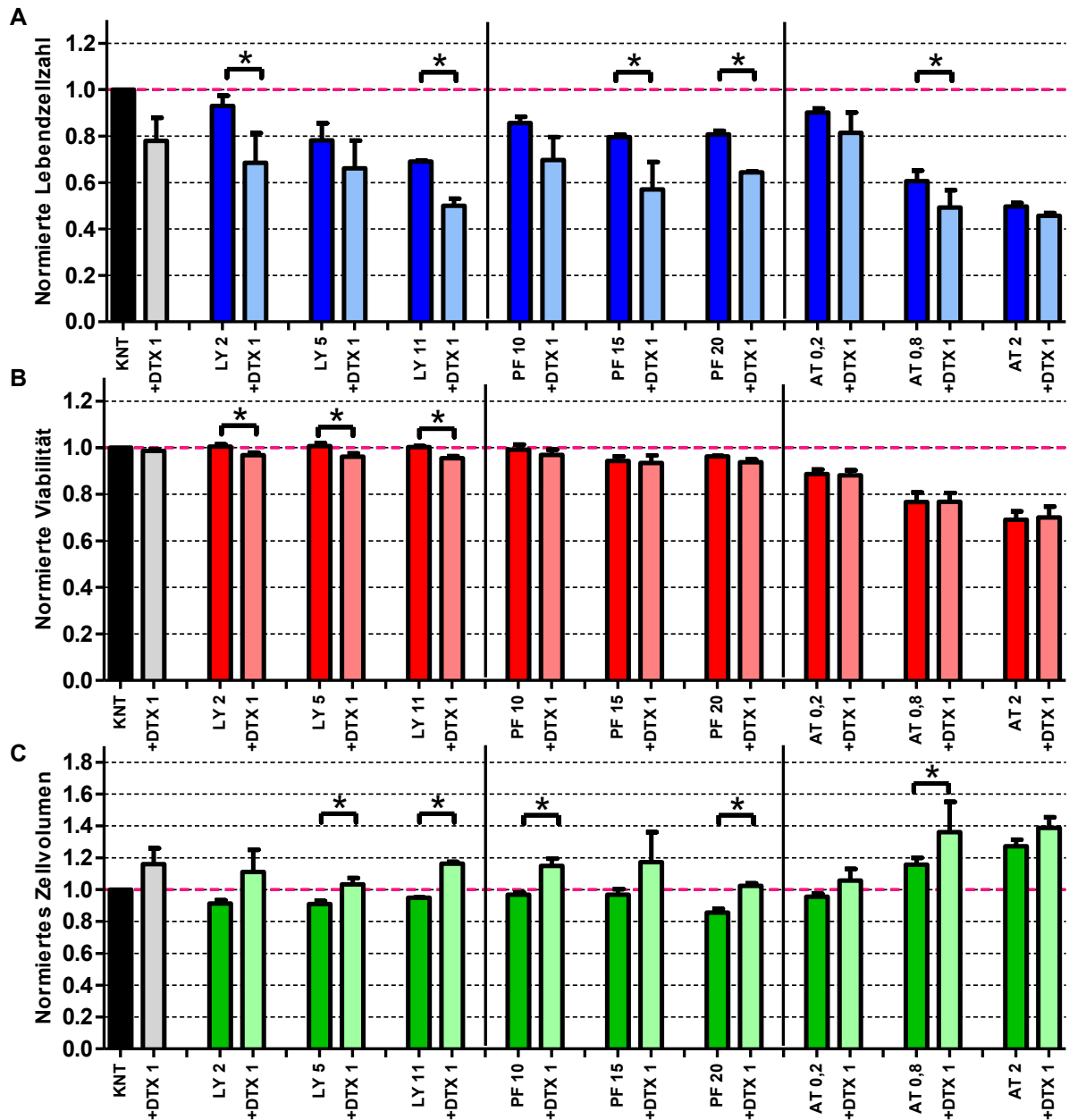


Abbildung 12: Auswirkung einer Kombinationstherapie von LY2584702 (LY), PF-4708671 (PF) und AT7867 (AT) mit Docetaxel (DTX) auf die Zelllinie PC-3; normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Untersuchte Konzentrationen sind als Ziffer im Namen angegeben: Inhibitoren in μM , DTX in nM. (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen. Unbehandelte Kontrolle (KNT, Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Signifikante Unterschiede der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

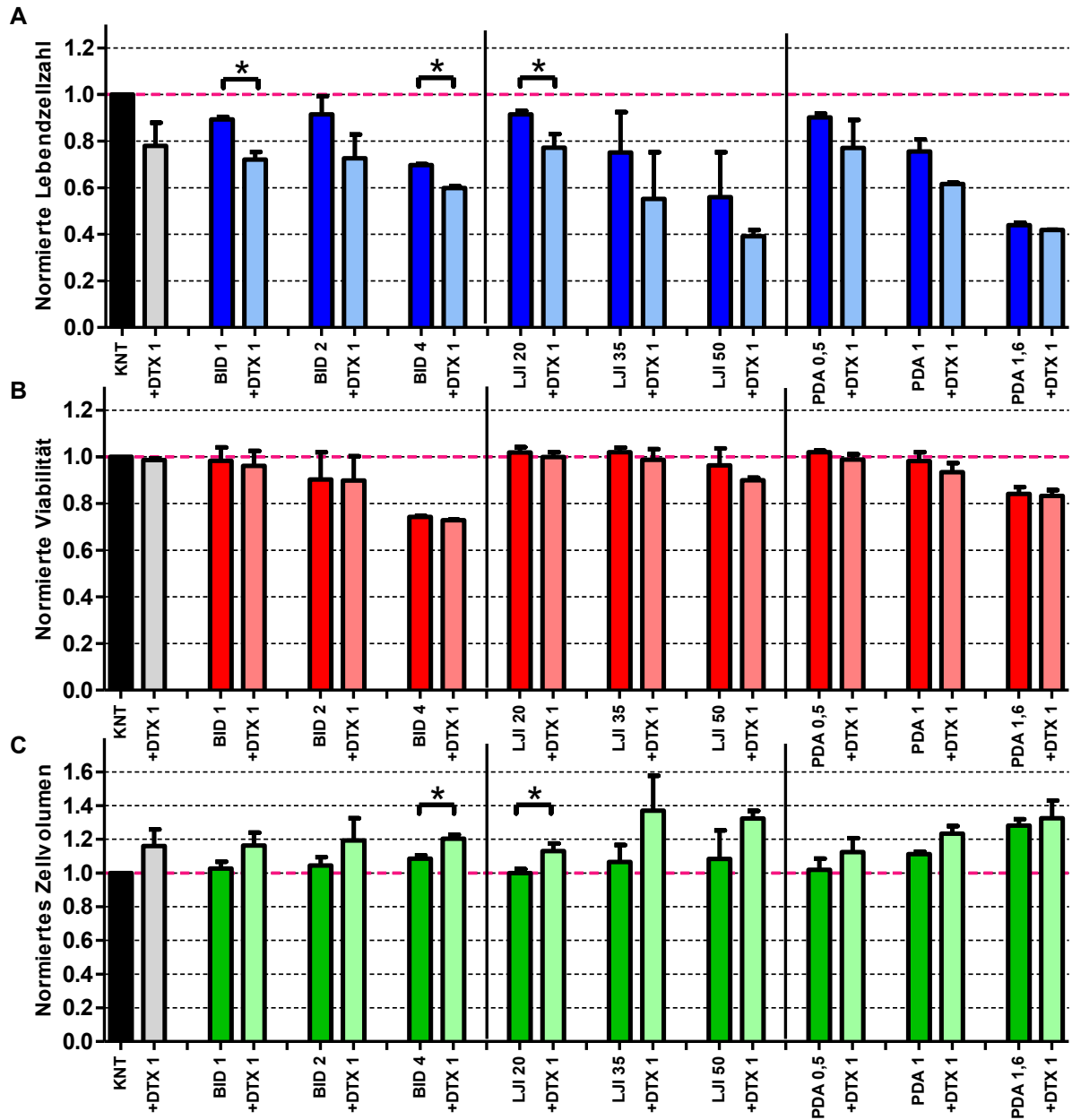


Abbildung 13: Auswirkung einer Kombinationstherapie von BI-D1870 (BID), LJI 308 (LJI) und PDA-66 (PDA) mit Docetaxel (DTX) auf die Zelllinie PC-3; normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Untersuchte Konzentrationen sind als Ziffer im Namen angegeben: Inhibitoren in μM , DTX in nM . (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen. Unbehandelte Kontrolle (KNT, Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Signifikante Unterschiede der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

3.2.3 Kombinierte Wirkung auf die Zelllinie LNCaP

Der Umfang des Messprogramms für LNCaP-Zellen wurde wegen ihrer schwierigen Handhabung reduziert.⁵ Daher wurden für jeden Inhibitor eine niedrige und eine hohe Konzentration mit einer Docetaxel-Konzentration (0,6 nM) getestet. Für diese Zelllinie sind in diesem Versuchsaufbau ausschließlich die Ergebnisse der Lebendzellzahl auswertbar, da das Zellvolumen und die Vitalität durch sehr große Streuungen charakterisiert sind. Auch die Zellzahl ist durch eine vergleichsweise hohe Streuung gekennzeichnet, weshalb keine Signifikanzen erreicht werden (Abbildung 14). Eine trotz fehlender Signifikanz erfolgte Auswertung der CI-Werte ergibt für eine Docetaxel-Kombinationstherapie mit PF-4708671 moderat synergistische, mit LY2584702 additive bis leicht antagonistische, mit AT7867 moderat antagonistische, mit BID-1870 leicht antagonistische, mit LJI308 moderat antagonistische und mit PDA-66 leicht synergistische Effekte (Tabelle 4).

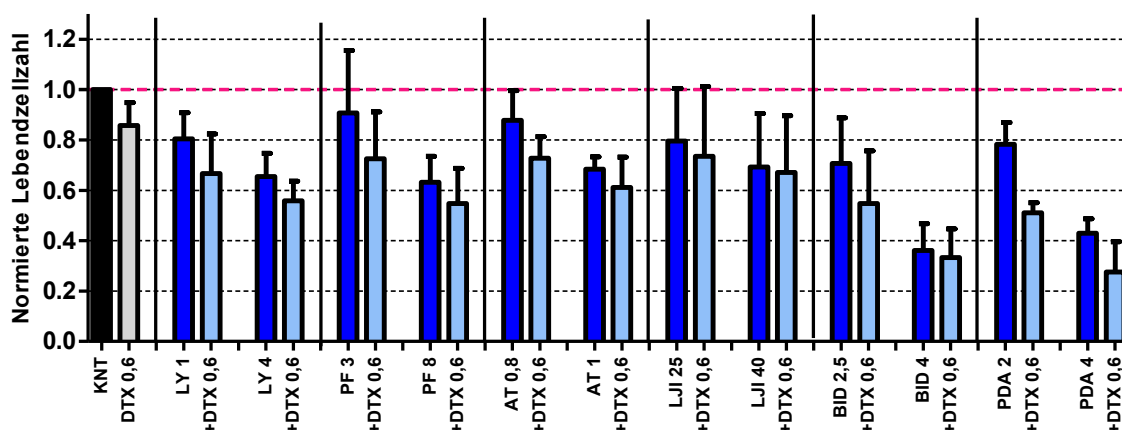


Abbildung 14: Auswirkung einer Kombinationstherapie von LY2584702 (LY), PF-4708671 (PF), AT7867 (AT), BID1870 (BID), LJI 308 (LJI) und PDA-66 (PDA) mit Docetaxel (DTX) auf die Lebendzellzahl von LNCaP. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung, die Konzentrationen für die Inhibitoren sind in μM und für DTX in nM angegeben. Unbehandelte Kontrolle (Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Keine signifikanten Unterschiede der Kombination gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$).

3.2.4 Zusammenfassung zu den Kombinations-Untersuchungen

Die S6K-Hemmer LY2584702 und PF-4708671 zeigen in Docetaxel-Kombinationstherapien der Zelllinie L929 synergistische Wirkung, während die beiden untersuchten Prostatakarzinomzelllinien hier durch einen additiven Effekt charakterisiert sind. Dabei scheint PF-4708671 Zellen der PC-3-Zelllinie und LY2584702 Zellen der

⁵ Die LNCaP-Zellen waren charakterisiert durch schnelle und ungleichmäßige Proliferation, eine ausgeprägte Neigung zur Agglomeration und nur gering ausgeprägte Adhärenz zur Zellkulturschale.

LNCaP-Zelllinie besser zu inhibieren. Für das sowohl die S6K- als auch die Akt-Achse adressierende AT7867 sowie den RSK-Inhibitor LJ1308 werden für alle drei untersuchten Zelllinien nahezu ausschließlich antagonistische Effekte in Docetaxel-Kombinationstherapien festgestellt. Hingegen zeigt der RSK-Inhibitor BI-D1870 in der Zelllinie L929 synergistische und in den Prostatakarzinomzelllinien additive bis leicht antagonistische Ergebnisse. Das Tubulin-hemmende PDA-66 zeigt ein heterogenes Bild: während es in der L929- und der LNCaP-Zelllinie für die Docetaxel-Kombinationstherapie additiv bis leicht synergistische Wirkung besitzt, ist diese für die PC-3-Zelllinie antagonistischer Natur.

L929			PC3			LNCaP		
+ DTX 5 nM			+ DTX 1 nM			+ DTX 0,6 nM		
Konz.	CI-Wert	p-Werte	Konz.	CI-Wert	p-Werte	Konz.	CI-Wert	p-Werte
LY2584702 (S6K)								
2 µM	0,87	+	2 µM	0,94	+	1 µM	0,76	-
5 µM	0,6	+	5 µM	1,14	-	4 µM	0,84	-
11 µM	0,72	+	11 µM	0,98	+			
PF-4708671 (S6K)								
5 µM	0,94	+	10 µM	0,95	-	3 µM	1,06	-
10 µM	0,78	+	15 µM	0,64	+	8 µM	1,17	-
15 µM	0,6	+	20 µM	0,9	+			
AT7868 (S6K/Akt)								
0.2 µM	0,94	+	0.2 µM	1,68	-	0,8 µM	1,42	-
0.7 µM	1,48	-	0,8 µM	1,35	+	1 µM	1,36	-
0.9 µM	1,35	-	2 µM	1,42	-			
BI-D1870 (RSK)								
1 µM	0,75	-	1 µM	1,02	+	2,5 µM	1,15	-
4,5 µM	0,91	+	2 µM	1,26	-	4 µM	1,15	-
6,5 µM	0,53	+	4 µM	1,04	+			
LJ1308 (RSK)								
6 µM	1,16	+	20 µM	1,58	+	25 µM	1,34	-
20 µM	1,27	+	35 µM	1,2	-	40 µM	1,4	-
35 µM	1,25	+	50 µM	1,08	-			
PDA-66 (Tubulin)								
0,5 µM	0,8	-	0,5 µM	1,56	-	2 µM	0,89	-
1 µM	0,91	+	1 µM	1,43	-	4 µM	0,9	-
2 µM	0,87	+	1,6 µM	1,26	-			

Tabelle 4: Konzentrationen, Signifikanzen und CI-Werte der Kombinationstherapien der drei Zelllinien. Farblich markiert der CI-Effekt: synergistisch (Grün), additiv (Gelb), antagonistisch (Rot). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem + gekennzeichnet, nicht signifikante mit einem -. In den Klammern stehen die postulierten Zielstrukturen der Inhibitoren.

3.3 Apoptose-Assay

Um neben der Vitalität einen weiteren Parameter für eine zellschädigende Wirkung der Inhibitoren zu haben und diese Wirkung gleichzeitig weiter zu spezifizieren, wurden Messungen zur Apoptoseinduktion unter Mono- und Kombinationstherapie der Inhibitoren und Docetaxel durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Zelldebris in den Proben gemessen. Dies geschah nach 24 h mit jeweils zwei Konzentrationen der Inhibitoren und nach 72 h mit jeweils einer. Die Wirkung der Einzelinkubation gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Einzelinkubation wurde auf Signifikanz getestet.

3.3.1 Apoptoseinduktion in L929-Zellen

Abbildung 15 zeigt den relativen Anteil von sich in Apoptose befindenden Zellen bzw. von Zelldebris entsprechend der Inkubationsdauer (24 h, 72 h) des jeweiligen Inhibitors.

Für L929-Zellen besteht die unbehandelte Kontrolle zu etwa 97 % aus intakten Zellen, von denen etwa 8 % durch Apoptose charakterisiert sind. In den Proben mit Docetaxel zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg, allerdings weniger stark ausgeprägt als in PC-3 Zellen und nur nach 24 h in der höchsten Konzentration von 100 nM signifikant. Insgesamt ergeben sich für L929-Zellen unter Monotherapie mit den Inhibitoren wenig erhöhte Apoptoseraten. Nach einer 24-stündigen Inkubation ist lediglich bei AT7867 und BID-1870 ein signifikanter Anstieg zu erkennen. Für BI-D1870 zeigt sich nach 72 h zusätzlich eine signifikante Zunahme der Apoptoserate. Der Zelldebris-Anteil dagegen steigt nur wenig bis gar nicht an.

In der Kombinationstherapie ist nach 24 h unter Inkubation mit PF-4708671, LY2584702 und BI-D1870 in höherer Konzentration ein signifikanter Anstieg der Apoptose zu erkennen. Nach 72 h zeigt sich bei LY2584702 auch unter der niedrigeren Konzentration ein signifikanter Anstieg. Der Zelldebris steigt in Analogie dazu an, wobei hier auch signifikante Unterschiede in den niedrigen Konzentrationen PF-4708671, LY2584702 und BI-D1870 zu erkennen sind, sowohl nach 24-stündiger als auch nach 72- stündiger Inkubation. Außer einem Anstieg des Zelldebris nach 24 h unter Therapie mit 0,7 µM AT7867 zeigen die

Kombinationstherapien mit AT7867, LJI308 und PDA-66 hingegen keine Unterschiede gegenüber der jeweiligen Inhibitormonotherapie.

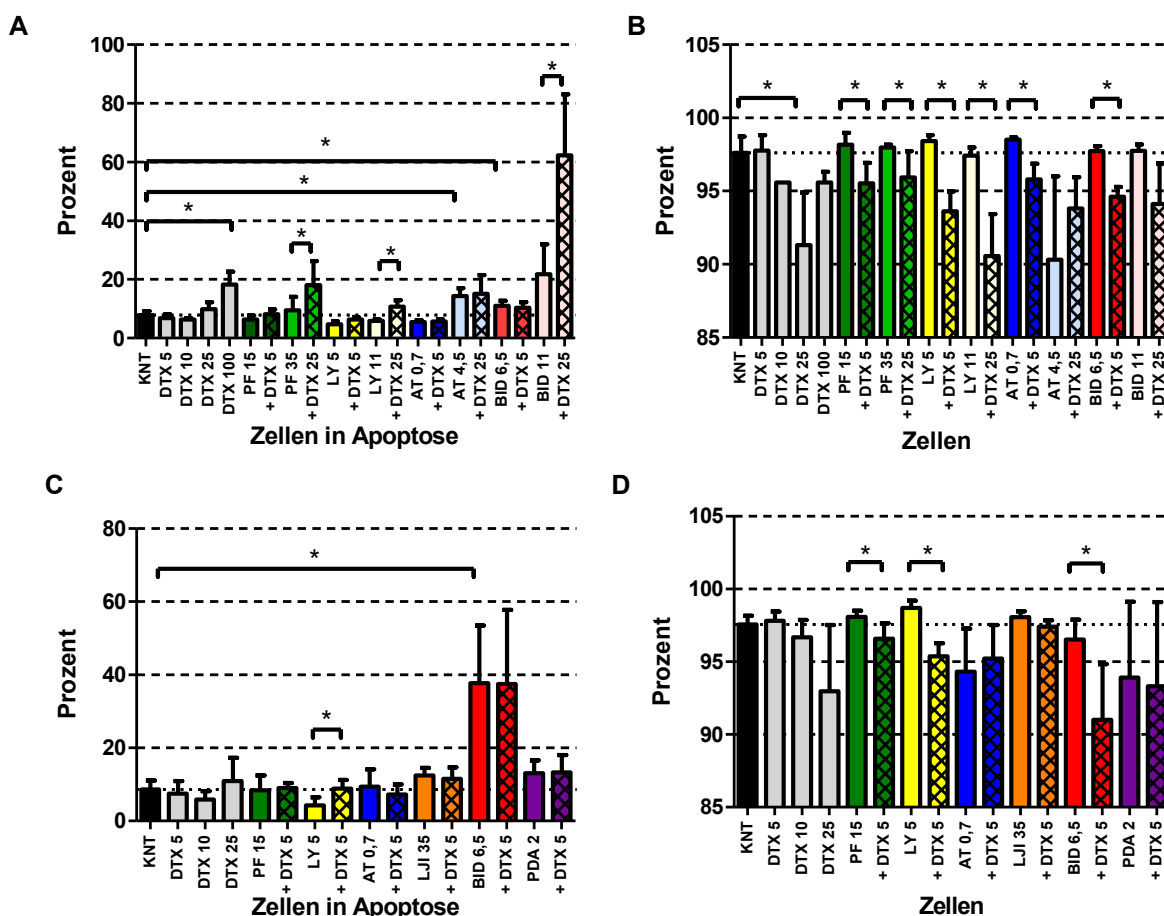


Abbildung 15: Anzahl der L929 Zellen nach Gating des Zelldebris und Apoptoserate der Zellen in Prozent. (A) Apoptoserate nach 24 h, (B) Debrisgating nach 24 h, (C) Apoptoserate nach 72 h, (D) Debrisgating nach 72 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7868 (Rot), LJI308 (Blau), BI-D1870 (Violett) und PDA-66 (Orange). Dunkel ist die niedrigere Konzentration dargestellt und hell die höhere. Signifikante Unterschiede der Monotherapien gegenüber der Kontrolle und der Kombinationstherapien gegenüber der Monotherapie sind mit * dargestellt ($p < 0,05$). Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM.

3.3.2 Apoptoseinduktion in PC-3-Zellen

Abbildung 16 zeigt den relativen Anteil von sich in Apoptose befindenden Zellen bzw. von Zelldebris entsprechend der Inkubationsdauer (24 h, 72 h) des jeweiligen Inhibitors.

Für PC-3-Zellen besteht die unbehandelte Kontrolle zu etwa 90 % aus intakten Zellen, von denen etwa 5 % durch Apoptose charakterisiert sind. Auch stellt sich für die Kontrolltherapie, die Docetaxel-Behandlung, ein konzentrationsabhängiger Anstieg Apoptosepositiver Zellen zu beiden Zeitpunkten dar. Dieser geht mit einer Zunahme der Zelltrümmer

einher. Weniger ausgeprägt, im Vergleich zu den L929-Zellen aber deutlich stärker, ist die Wirkung der übrigen Inhibitoren. Hier lässt sich nach einer Inkubationsdauer von 24 h ein wesentlicher Anstieg der Apoptoserate für eine hohe AT7867-Konzentration (signifikant) sowie unter Therapie mit BID-1870 (nicht signifikant) erkennen. Für beide Inhibitoren steigt der Zelldebris-Anteil – dies auch für die geringere AT7867-Konzentration, bei der noch keine Apoptose nachzuweisen ist. Eine Inkubationsdauer von 72 h führt bei allen Inhibitoren außer dem LY2584702 zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate, welcher bei BID1870 am ausgeprägtesten ist. Dieser ist für die Inhibitoren Docetaxel, AT7867, BI-D1870 und PF-4708671 von einer erheblichen Zunahme an Zelldebris begleitet. Hingegen weisen die Inhibitoren LJI308 und PDA-66 trotz leicht erhöhter Apoptoseraten eine nahezu unveränderte Zelldebris-Rate auf.

Docetaxel-Kombinationstherapien mit den Inhibitoren führen außer für AT7867 und LJI308 zu jeweils leicht erhöhten Apoptoseraten im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie des Inhibitors. Eine signifikante Wirkung ergibt sich jedoch nur für eine hohe LY2584702-Konzentration nach 24 h sowie für eine hohe PDA-66-Konzentration nach 72 h. Mit einer signifikanten Reduktion der Apoptose wird ein gar gegenläufiger Effekt für eine AT7867-Behandlung in niedriger Konzentration (0,8 μ M, 24 h) beobachtet, welcher jedoch bei längerer Inkubationsdauer (72 h) in den allgemeinen Trend übergeht.

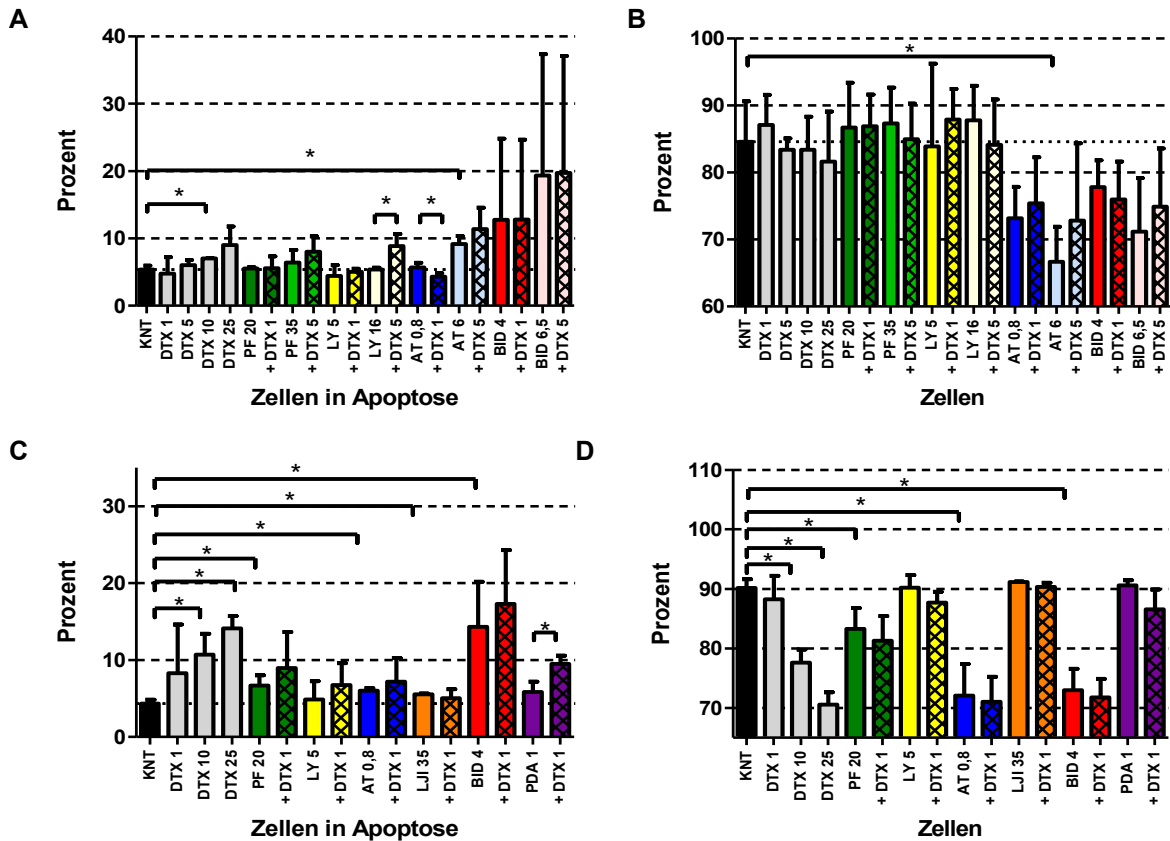


Abbildung 16: Anzahl der PC-3 Zellen nach Gating des Zelldebris und Apoptoserate der Zellen in Prozent. (A) Apoptoserate nach 24 h, (B) Debrisingating nach 24 h, (C) Apoptoserate nach 72 h, (D) Debrisingating nach 72 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Rot), LJI308 (Blau), BI-D1870 (Violett) und PDA-66 (Orange). Dunkel ist die niedrigere Konzentration dargestellt und hell die höhere. Signifikante Unterschiede der Monotherapien gegenüber der Kontrolle und der Kombinationstherapien gegenüber der Monotherapie sind mit * dargestellt ($p < 0,05$). Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM .

3.4 Zellzyklusversuche

Um genauere Aussagen über die Proliferation der Zelllinien treffen und die molekulare Wirkung der Inhibitoren weiter spezifizieren zu können, wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Untersucht wurde die Menge der Zellen in der G1-/S-/G2-Phase. Die Versuchszeitpunkte und Konzentrationen wurden in Analogie zu den Apoptosemessungen gewählt. Die Einzelinkubationen wurden gegenüber der Kontrolle und die Kombination gegenüber der Einzelinkubationen auf Signifikanz getestet.

3.4.1 Zelllinie L929 nach 24 h

Abbildung 17 zeigt die Verteilung der Zellen auf die G1-/S-/G2-Phase des Zellzyklus nach 24-stündiger Inkubationsdauer mit dem jeweiligen Inhibitor.

In der Kontrollgruppe der L929-Zellen (unbehandelt) befinden sich 49 % in der G1-, 35% in der S- und 16 % in der G2-Phase. Für die Docetaxel-Inkubationen stellt sich ein konzentrationsabhängiger G2-Arrest dar. Während G1- und S-Phase abnehmen, sind in einer Konzentration von 100 nM Docetaxel 95 % der Zellen in der G2-Phase. PF-4708671 und LY2584702 zeigen einen Anstieg der G1-Phase (nicht signifikant). Während AT7867 in der niedrigen Konzentration zu keiner Änderung im Zellzyklus führt, kommt es in der höheren Konzentration (4,5 μ M) zu einem ausgeprägten G2-Arrest (signifikant). Die Ergebnisse mit BI-D1870 lassen in beiden Konzentrationen einen ausgeprägten signifikanten G1-Arrest erkennen, bei gleichzeitig abnehmender S-Fraktion.

In der Kombination mit Docetaxel zeigen alle Konzentrationen von PF-4708671, LY2584702 und BI-D1870 einen ausgeprägten, signifikanten G2-Arrest mit Abnahme der G1-Fraktion. Mit einer Kombination von Docetaxel und AT7867 dagegen lässt sich der schon bestehende G2-Arrest nur unwesentlich verstärken (nicht signifikant).

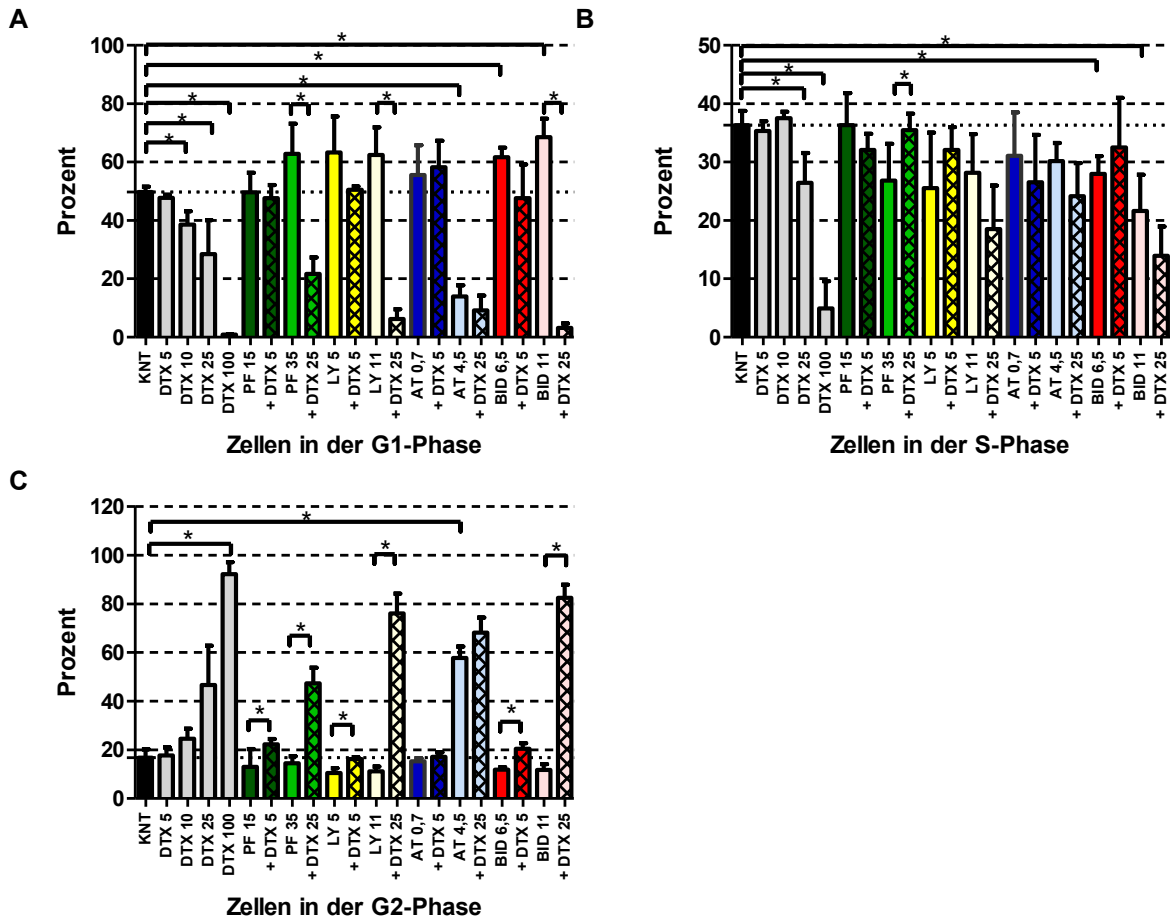


Abbildung 17: Verteilung der L929 auf G1-/S-/G2-Phase nach 24 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Blau) und BI-D1870 (Rot) jeweils in zwei Konzentrationen (Dunkel/Hell) in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 5 nM und 25 nM (Schraffiert). Signifikante Unterschiede der Monotherapie gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Monotherapie sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05). (A) G1-Phase, (B) S-Phase, (C) G2-Phase. Inhibitoren in µM und Docetaxel in nM.

3.4.2 Zelllinie L929 nach 72 h

Abbildung 18 zeigt die Verteilung der Zellen auf die G1-/S-/G2-Phase des Zellzyklus nach 72-stündiger Inkubationsdauer mit dem jeweiligen Inhibitor.

In der Kontrollgruppe der L929-Zellen (unbehandelt) befinden sich 61 % in der G1-, 26 % in der S- und 13 % in der G2-Phase. Auch nach 72 h Inkubation mit Docetaxel lässt sich ein konzentrationsabhängiger G2-Arrest erkennen (nicht signifikant), bei Abnahme der G1-Phase (signifikant). PF-4708671 und LY2584702 zeigen ebenfalls, wie nach 24 h in der Monotherapie, einen nicht signifikanten Anstieg der G1-Phase zu Lasten der S-Phase-Fraktion, gleiches gilt für einen G2-Arrest bei AT7867 (nicht signifikant). Zu keinen wesentlichen Unterschieden gegenüber der Kontrolle führt die Inkubation mit BI-D1870. Die Ergebnisse mit LJI308 weisen hingegen eine ausgeprägte Streuung auf, weshalb eine

Aussage zu der Verteilung der Zellzyklus-Phasen nicht sinnvoll zu tätigen ist. Mit PDA-66 wurde nur eine Messung ausgeführt, diese deutet aber auf einen G2-Arrest hin.

Die Kombination von Docetaxel und PF-4708671, LY2584702 (beide nicht signifikant) und BI-D1870 (signifikant) führt wie auch zum früheren Zeitpunkt zu einem G2-Arrest bei abnehmender G1-Fraktion. AT7867 und LJI308 zeigen hingegen in der Kombination mit Docetaxel keine wesentlichen Unterschiede zur Monotherapie. Soweit beurteilbar, wird der G2-Arrest durch PDA-66 von Docetaxel etwas erhöht.

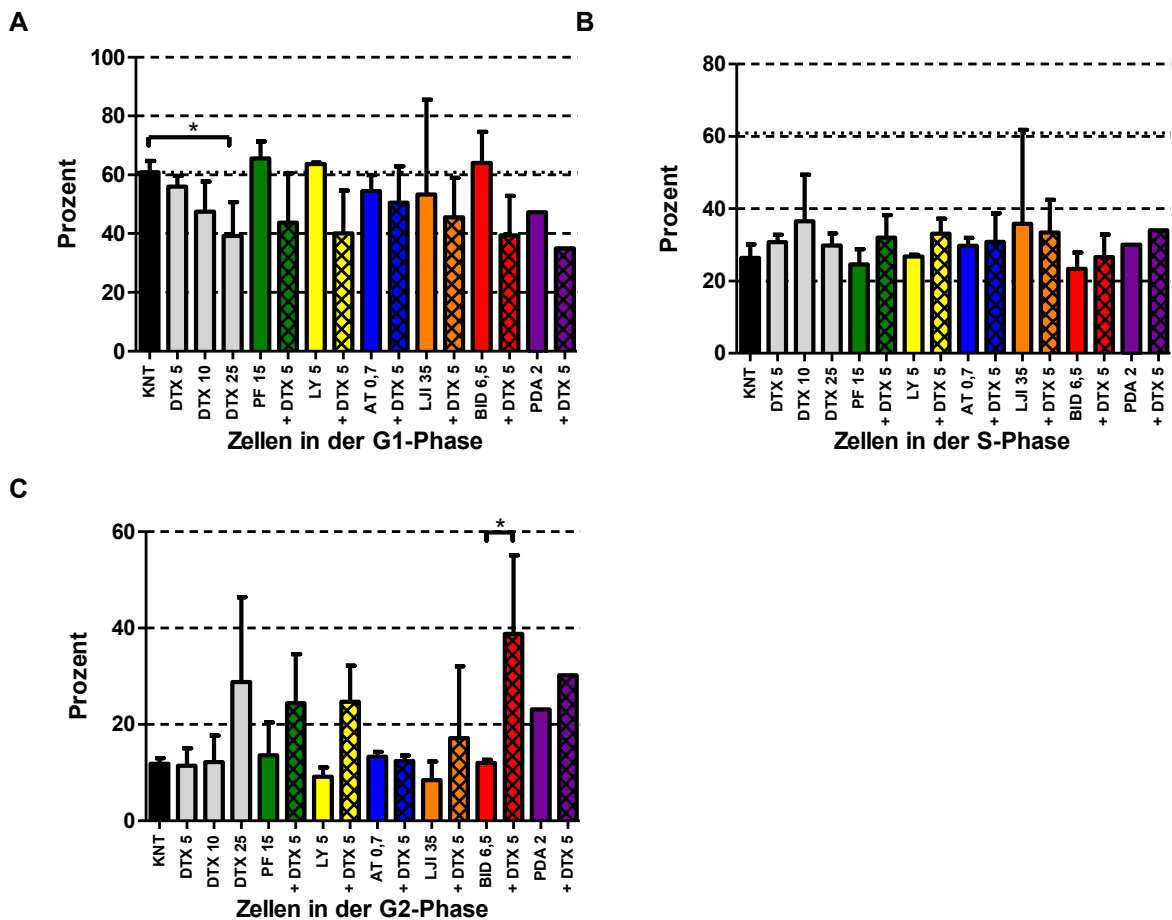


Abbildung 18: Verteilung der L929 auf G1-/S-/G1-Phase nach 72 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Rot), LJI308 (Blau), BI-D1870 (Violett) und PDA-66 (Orange) jeweils in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 5 nM (Schraffiert). Signifikante Unterschiede der Monotherapie gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Monotherapie sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). (A) G1-Phase, (B) S-Phase, (C) G2-Phase. Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM.

3.4.3 Zelllinie PC-3 nach 24 h

Abbildung 19 zeigt die Verteilung der Zellen auf die G1-/S-/G2-Phase des Zellzyklus nach 24-stündiger Inkubationsdauer mit dem jeweiligen Inhibitor.

In der Kontrollgruppe der PC-3-Zellen (unbehandelt) befinden sich 44 % in der G1-, 34 % in der S- und 22 % in der G2-Phase. Für die Docetaxel-Inkubationen stellt sich ein konzentrationsabhängiger G2-Arrest dar (signifikant) mit Abnahme von G1- und S-Fraktion. PF-4708671 und LY2584702 führen zu einem leichten Anstieg der Zellen in der G1-Phase, wobei dieser nur bei LY2584702 signifikant ausfällt. Während AT7867 in niedriger Konzentration (0,8 μ M) keinen Unterschied zur Kontrolle zeigt, führt eine Konzentration von 6 μ M zu einem deutlichen G2-Arrest der Zellen (signifikant). Die Ergebnisse einer Inkubation der PC-3-Zellen mit BI-D1870 lassen im Gegensatz zu den Ergebnissen der L929-Zellen auf einen deutlichen G2-Arrest schließen.

Während eine Kombination mit Docetaxel und hohen Konzentrationen PF-4708671 und LY2584702 zu einem G2-Arrest führt (signifikant), sind für AT7867 und BI-D1870 keine Änderungen zur Einzelinkubation zu erkennen.

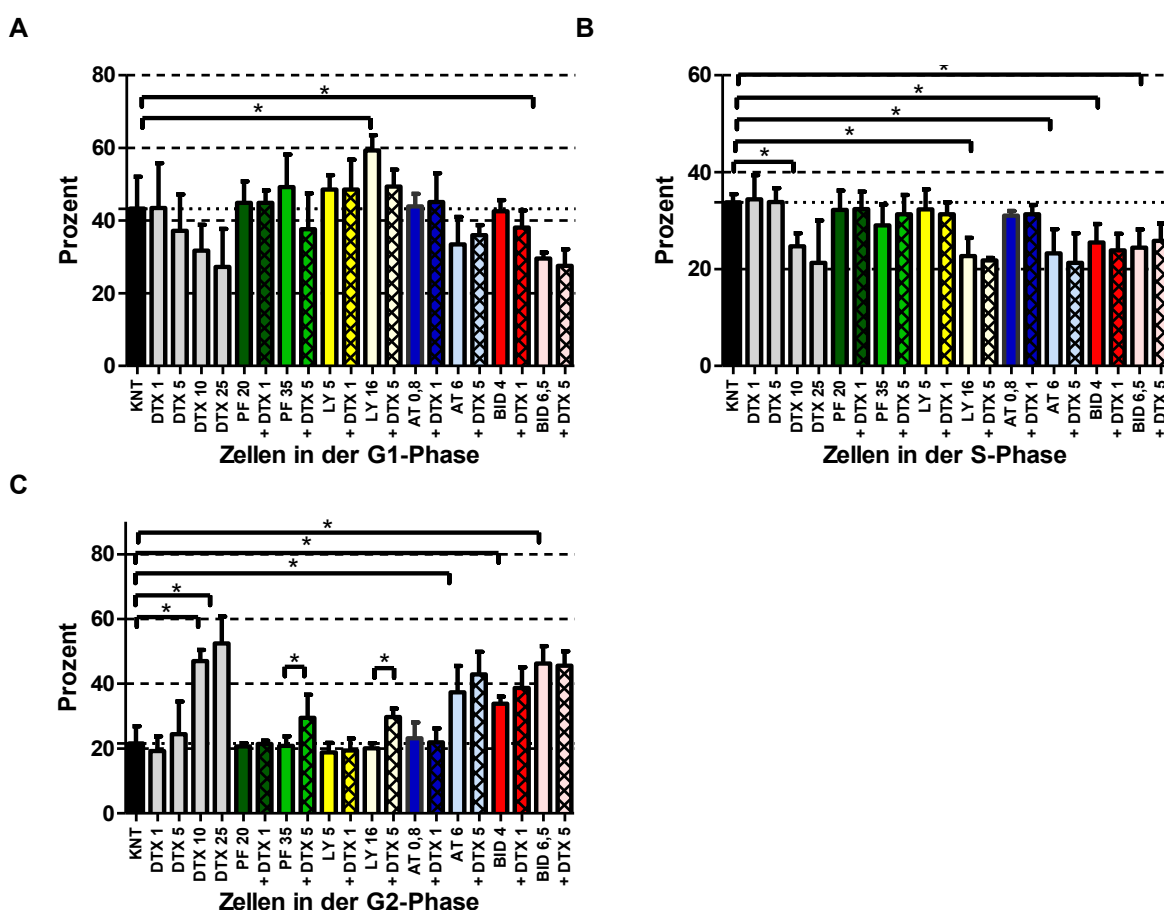


Abbildung 19: Verteilung der PC-3 auf G1-/S-/G2- Phase nach 24 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Blau) und BI-D1870 (Rot) jeweils in zwei Konzentrationen (Dunkel/Hell) in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 1 nM und 5 nM (Schraffiert). Signifikante Unterschiede der Monotherapie gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Monotherapie sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05). (A) G1-Phase, (B) S-Phase, (C) G2-Phase. Inhibitoren in μ M und Docetaxel in nM.

3.4.4 Zelllinie PC-3 nach 72 h

Abbildung 20 zeigt die Verteilung der Zellen auf die G1-/S-/G2-Phase des Zellzyklus entsprechend der Inkubationsdauer (72 h) des jeweiligen Inhibitors.

In der Kontrollgruppe der PC-3-Zellen (unbehandelt) befinden sich 48 % in der G1-, 34 % in der S- und 18 % in der G2-Phase. Die Ergebnisse stützen die Daten nach 24 h Inkubation. Eine Docetaxel-Inkubation ergibt einen signifikanten G2-Arrest, ebenso eine Inkubation mit AT7867. Während eine Behandlung mit PF-4708671 nur zu einem minimalen G1-Arrest führt (nicht signifikant), fällt dieser bei LY2584702 deutlich aus (signifikant). BI-D1870 zeigt wie auch nach 24 h im Gegensatz zu den Beobachtungen für die Zelllinie L929 einen G2-Arrest. LJI308 und PDA-66 wurden nur nach 72 h getestet. Die Daten von LJI308 lassen auf einen G1-Arrest schließen, während PDA-66 – wie auch in L929-Zellen – einen G2-Arrest bewirkt (beide nicht signifikant).

Die Kombination mit Docetaxel führt wie auch zum früheren Zeitpunkt in PF-4708671 und LY2584702 zu G2-Arresten in Form einer signifikanten G1-Phasen-Abnahme. AT7867, BI-D1870, LJI308 und PDA-66 dagegen zeigen in Kombination mit Docetaxel keine wesentliche Änderung des Zellzyklus gegenüber der Einzelinkubation.

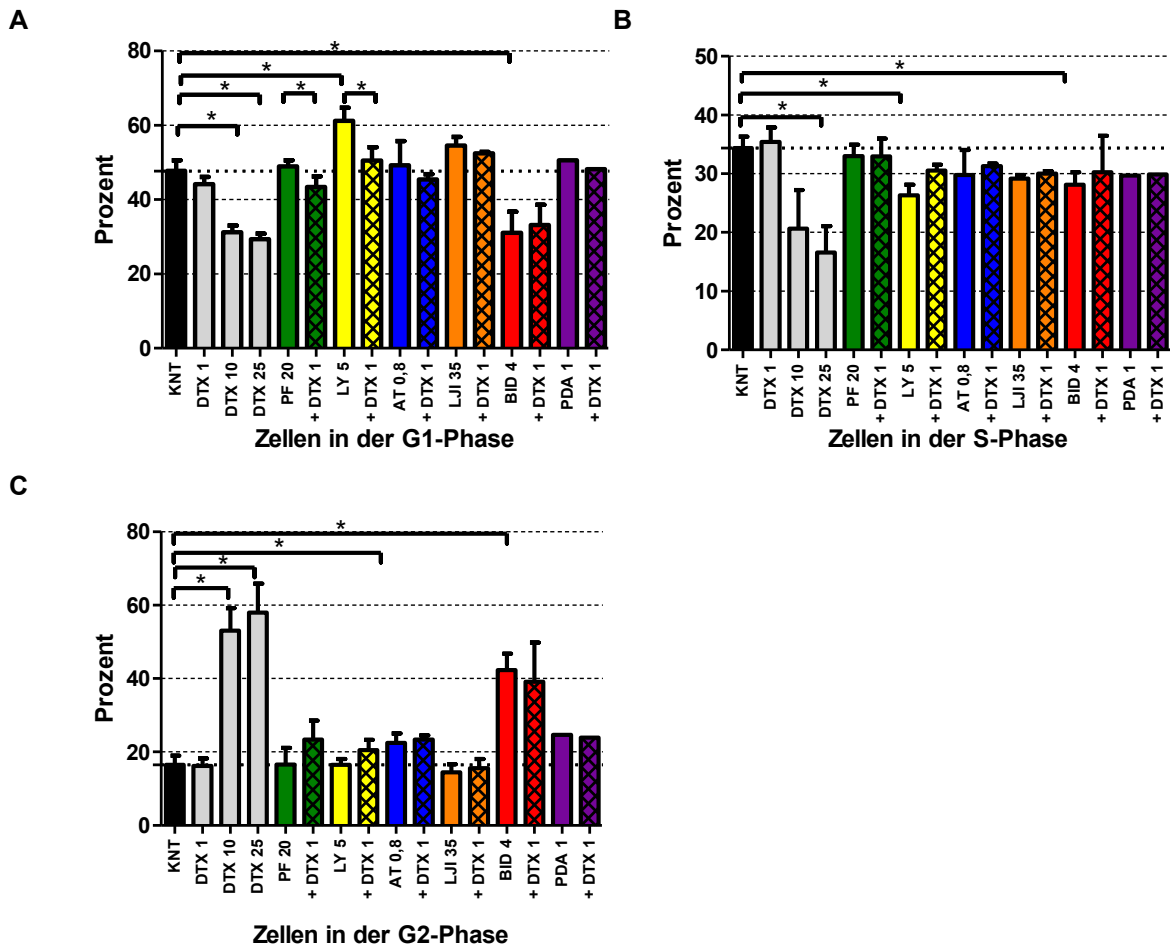


Abbildung 20: Verteilung der PC-3 auf G1-/S-/G2- Phase nach 72 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Rot), LJI308 (Blau), BI-D1870 (Violett) und PDA-66 (Orange) jeweils in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 1 nM (Schraffiert). Signifikante Unterschiede der Monotherapie gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Monotherapie sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). (A) G1-Phase, (B) S-Phase, (C) G2-Phase. Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM.

3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellzyklusversuche

Native Zellen beider Zelllinien unterscheiden sich in dem Muster ihrer Zellzyklusphasen-Anteile. Das Verteilungsmuster (G1-/S-/G2-Phase) der Kontrollgruppe (unbehandelte Zellen) nach einer 24- und 72-stündigen Wachstumsphase ergibt für die Zelllinien L929 49%/35%/16% und nach 72 h 61%/26%/13% und für die Zelllinie PC-3 nach 24 h 44%/34%/22% und nach 72 h 48%/34%/18%.

Eine Docetaxel-Monotherapie führt sowohl für L929-Zellen als auch in der Prostatakarzinomzelllinie PC3 zu einem konzentrationsabhängigen G2-Arrest, wobei dieser für PC-3 bereits bei niedrigeren Konzentrationen auftritt. Im zeitlichen Verlauf zeigt sich keine wesentliche Verstärkung dieses Effekts – sowohl nach 24 h als auch nach 72 h Inkubationsdauer ist dieser Arrest feststellbar.

Eine Behandlung mit PF-4708671 löst in beiden Zelllinien in allen untersuchten Konzentrationen eine nicht signifikante Erhöhung der G1-Fraktion aus. Eine Docetaxel-Kombinationstherapie mit PF-4708671 hingegen führt zu einem deutlichen G2-Arrest. Während sich die beobachteten Effekte bei kurzer Inkubationsdauer (24 h) und hoher Konzentration als signifikant darstellen, ist dies bei längerer Inkubationsdauer (72 h) und niedrigerer Konzentration nicht mehr der Fall.

Die Wirkung einer LY2584702-Behandlung ähnelt jener der PF-4708671-Behandlung, wobei sich die Änderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle quantitativ stärker darstellen. Der Inhibitor LJ308 konnte nur zu einem Inkubationszeitpunkt untersucht werden (72 h). Für eine Therapie von PC-3-Zellen mit diesem wird der nicht signifikante Trend einer zunehmenden G1-Fraktion beobachtet, welche in einer Kombinationstherapie mit Docetaxel unverändert vorliegt.

Eine Behandlung mit AT7867 führt in beiden Zelllinien über den untersuchten Konzentrationsbereich zu einem G2-Arrest. Auch hier zeigt die kombinierte Anwendung mit Docetaxel keine wesentliche Änderung der Zellverteilung.

Auch der Inhibitor PDA-66 konnte nur zu einem Inkubationszeitpunkt (72 h) und in nur einer Konzentration untersucht werden. In beiden Zelllinien deuten die Ergebnisse einer Behandlung mit diesem auf die Ausbildung eines G2-Arrestes hin. Dieser Effekt wird jedoch nur in einer Variante der Docetaxel-Kombinationstherapie – jener der L929-Zellen – und auch nur leicht, verstärkt.

Der Einsatz des Inhibitors BI-D1870 ergibt ein heterogenes Bild. Während in PC-3-Zellen eine BI-D1870-Therapie zu einem ausgeprägten G2-Arrest führt und dieses kaum durch eine Docetaxel-Kombinationstherapie verändert wird, ist für die Zelllinie L929 ein leichter G1-Arrest zu beobachten. Dieser wird in der Kombination mit Docetaxel in einen ebenfalls ausgeprägten G2-Arrest überführt.

Für alle Inhibitoren ist in den Fällen, in denen eine zeitliche Komponente untersucht worden ist, festzustellen, dass die beobachteten Effekte nach einer 72-stündigen Inkubationsdauer stärker ausgeprägt sind als nach einer 24-stündigen Inkubationsdauer, wobei PC-3-Zellen einem stärkeren zeitlichen Einfluss unterliegen als L929-Zellen.

3.5 Gesamtprotein-Bestimmung und Phosphorylierungsgrad

Um auf molekularer Ebene Aussagen über die Wirkung der Inhibitoren auf die untersuchten Zelllinien tätigen zu können, wurde die Fluoreszenz der Gesamtproteine und der phosphorylierten Form der Kinasen S6K und RSK und des RPS6 nach 24-stündiger Inkubationszeit mittels Durchflusszytometrie gemessen und damit eine Aussage über die vorhandene Menge der Proteine getroffen.

Da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung für die adressierten molekularen Zielstrukturen nicht einheitlich humane Antikörper kommerziell erwerblich waren, musste auf verschiedene Spezies zurückgegriffen werden (2.1.7 Antikörper (Material)). L929-Zellen sind murinen und PC-3-Zellen humanen Ursprungs. Zum Ausgleichen genereller Messschwankungen wurden alle erhobenen Daten zunächst auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normiert. Somit ist ein quantitativer Vergleich sowohl innerhalb einer Zelllinie als auch zwischen den Zelllinien möglich.

3.5.1 Zelllinie L929

Abbildung 21 gibt einen Überblick über die Untersuchungen der Zelllinie L929.

RSK-Status: Eine Behandlung mit PF-4708671, LY2584702 oder AT7867 führt zu einer deutlichen Reduktion der RSK-Expression. Dies trifft auch für LIJ308 in hohen Konzentrationen zu, wobei eine Behandlung mit geringerer LIJ308-Konzentration zunächst einen Expressionsanstieg zeigt. Dieser wird ebenso bei einer Behandlung mit BI-D1870 für alle Konzentrationen beobachtet. Hingegen hat Docetaxel keinen Einfluss auf die RSK-Expression. Die Untersuchungen der Zelllinie L929 auf den relativen Anteil phosphorylierter RSK nach Inkubation mit den Inhibitoren ergibt keine signifikanten Unterschiede oder Trends. Lediglich bei AT7867 lässt sich in beiden Konzentrationen eine etwas erhöhte Phosphorylierung beobachten.

RPS6-Status: Die Untersuchungen zu dem Protein RPS6 sowie dessen Phosphorylierungsgrad ergeben außer für die Kontrolltherapie mit Docetaxel signifikante Unterschiede für alle weiteren Inhibitoren und Konzentrationsstufen. Dabei ist auffällig, dass unter Therapie mit LY2584702 und PF-4708671 sowohl Gesamtprotein als auch das

phosphorylierte Protein stark reduziert werden. Unter Therapie mit AT7867 dagegen ist die Hemmung des Gesamtproteins weniger ausgeprägt, selbes gilt für BI-D1870 und LJI308.

S6K-Status: Die Experimente ergeben für die S6K-Hemmer PF-4708671, LY2584702 und AT7867 eine tendenzielle Zunahme der Phosphorylierung, wobei keine Signifikanz erreicht wird, bei gleichzeitiger tendenzieller Abnahme des Gesamtproteins. Für die RSK-Hemmer und Docetaxel zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede in der Expression und der Phosphorylierung.

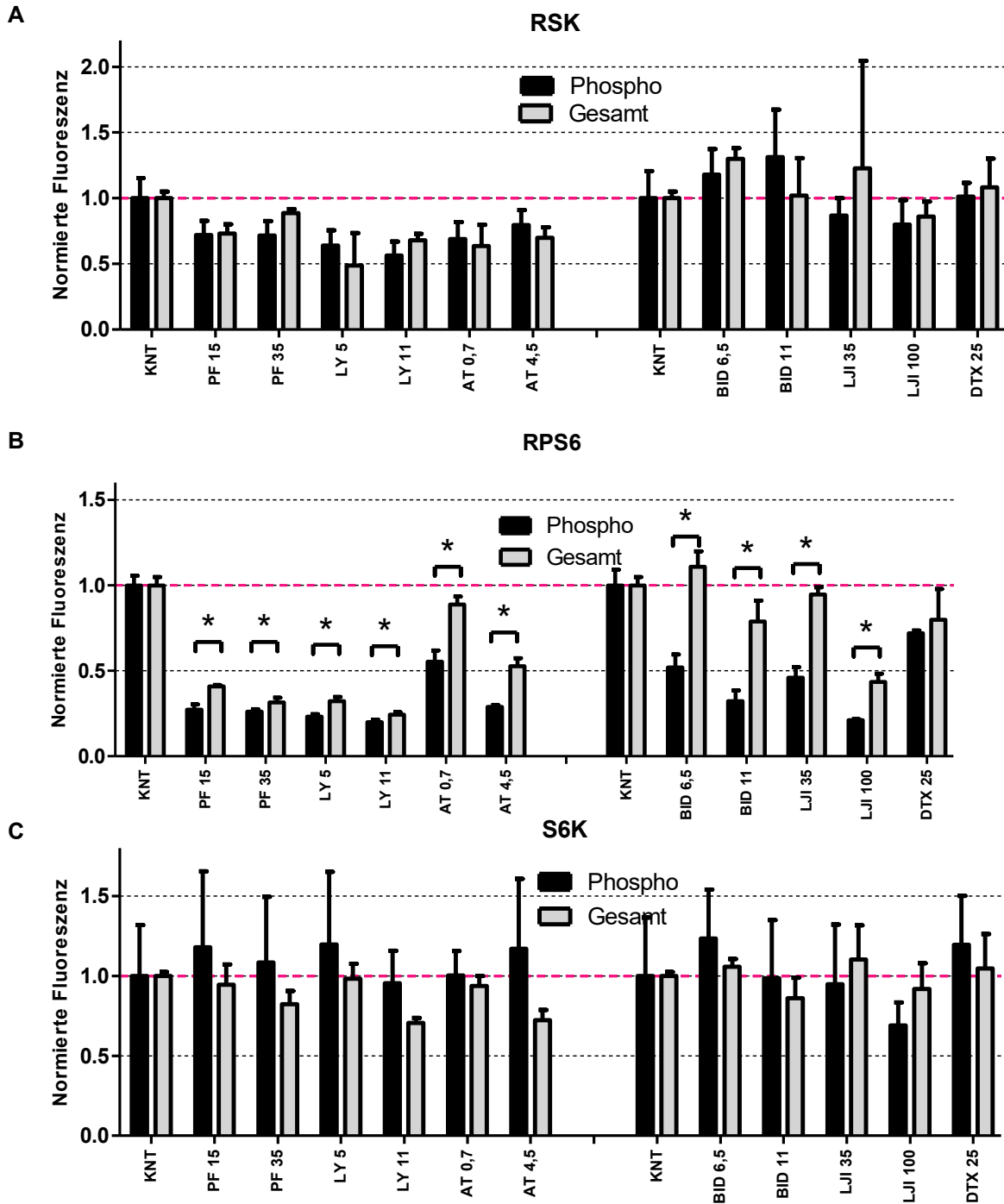


Abbildung 21: Fluoreszenz der Gesamt- und phosphorylierten Proteine S6K, RSK und RPS6 in L929-Zellen. Dargestellt ist die auf die Kontrolle normierte Medianfluoreszenz aus drei unabhängigen Messungen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die phosphorylierte Form ist in Schwarz dargestellt und die Gesamtproteinmenge in Grau. Signifikante Unterschiede zwischen Gesamt- und phosphoryliertem Protein sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$). (A) RSK, (B) RPS6, (C) S6K. Docetaxel in nM, Inhibitoren in μM .

3.5.2 Zelllinie PC-3

Abbildung 22 gibt einen Überblick über die Untersuchungen der Zelllinie PC-3.

RSK-Status: Die Untersuchungen zu dem Enzym RSK ergeben eine leichte Abnahme des Gesamtproteins unter der Therapie mit den Inhibitoren. Die Phosphorylierung zeigt bei LY2584702 (nicht signifikant), PF-4708671 und AT7867 (beide signifikant) eine Abnahme in der niedrigen Konzentration, während in der hohen Konzentration keine Abnahme zu beobachten ist. Unter Inkubation mit BI-D1870 und LJI308 hingegen kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Phosphorylierung, auch über das Maß der Kontrolle hinaus.

RPS6-Status: Mit Ausnahme von Docetaxel und LY2584702 in hoher Konzentration (16 μM) führen alle Behandlungen zu einer deutlichen Erhöhung des Gesamtproteins. Gleichzeitig nimmt die Phosphorylierung für alle Inhibitoren signifikant ab. Mit Ausnahme der niedrigen Konzentrationen von AT7867 (0,8 μM) und BI-D1870 (4 μM) stellt sich diese Abnahme sehr ausgeprägt dar. LY2584702, PF-4708671 und LJI308 zeigen in niedriger Konzentration bereits einen ähnlich starken Effekt wie in hoher Konzentration. Docetaxel zeigt keine Unterschiede im Grad der Phosphorylierung.

S6K-Status: Wie auch die RSK nimmt das Gesamtprotein der S6K in allen Inhibitorbehandlungen ab, hierbei ist eine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten. LY2584702, PF-4708671 und AT7867 führen zu einer Zunahme des Phosphorylierungsgrads (signifikant), auch über das Maß der Kontrolle hinaus. LJI308, BI-D1870 und Docetaxel dagegen zeigen keine Veränderung im Grad der Phosphorylierung.

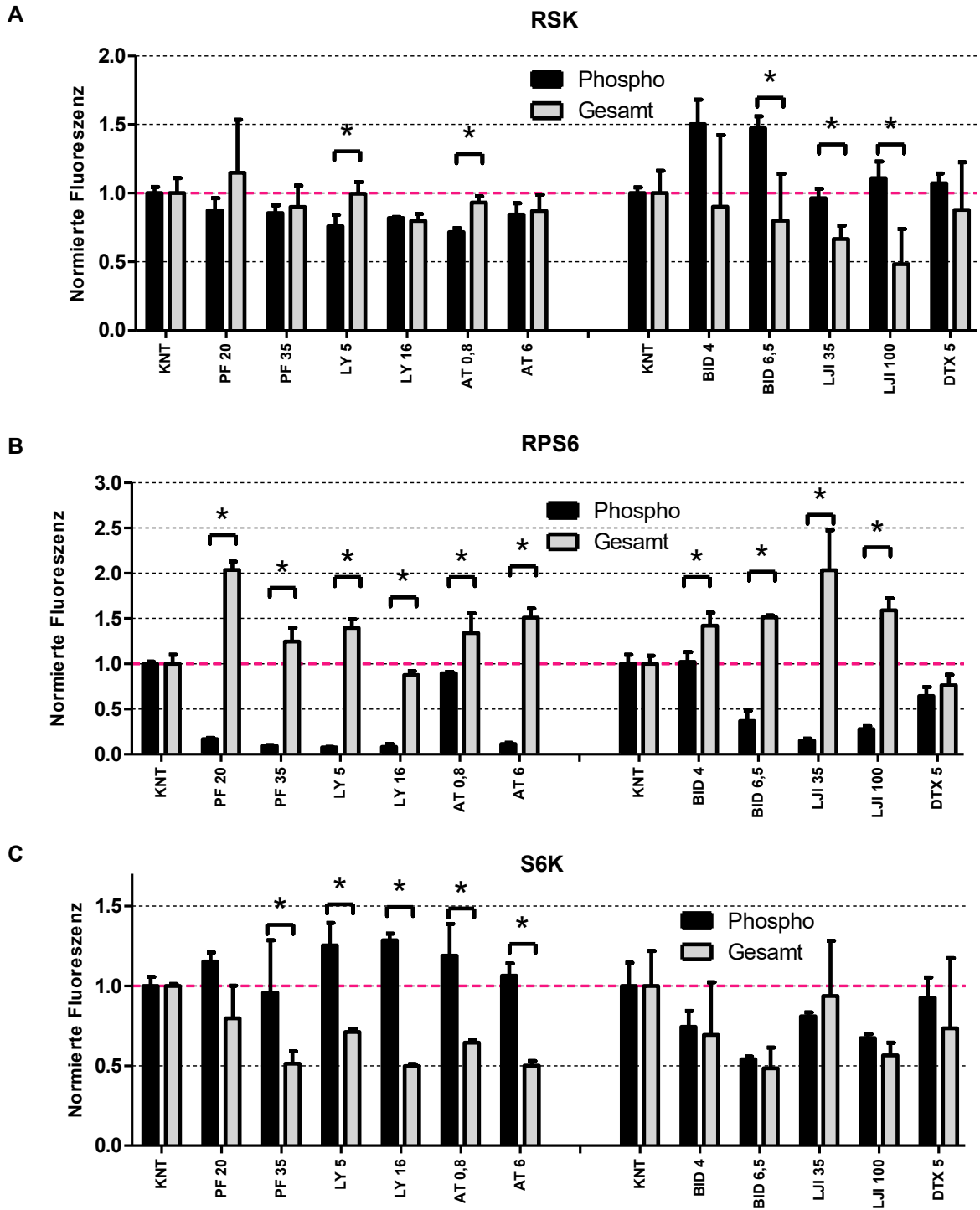


Abbildung 22: Fluoreszenz der Gesamt- und phosphorylierten Proteine S6K, RSK und RPS6 in PC-3-Zellen. Dargestellt ist die auf die Kontrolle normierte Medianfluoreszenz aus drei unabhängigen Messungen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die phosphorylierte Form ist in Schwarz dargestellt und die Gesamtproteinmenge in Grau. Signifikante Unterschiede zwischen Gesamt- und phosphoryliertem Protein sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$) (A) RSK, (B) RPS6, (C) S6K. Docetaxel in nM, Inhibitoren in μM .

3.6 FLT- Versuche

Zur weiteren Charakterisierung der Proliferation der Zellen wurden FLT-Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde mit zwei Konzentrationen der Inhibitoren gearbeitet, welche sich an den Ergebnissen der IC₅₀-Wert-Versuche orientierten. Die Therapiekonzentration des Docetaxel wurde in Analogie zu den vorherigen Versuchen für PC-3-Zellen auf 1 nM und für L929 auf 5 nM festgelegt. Die Einzelinkubationen wurden gegen die Kontrolle und die Kombinationen gegen die Einzelinkubationen auf Signifikanz getestet.

3.6.1 Zelllinie L929

Abbildung 23 zeigt die relative FLT-Aufnahme pro Zelle für Zellen der L929-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren.

Für alle Inhibitoren zeigt sich eine Abnahme der FLT-Aufnahme bei Inkubation mit zunehmender Inhibitorkonzentration. Außerdem ist die Aufnahme für Zellen der Kombinationstherapie immer geringer als jener von Zellen einer Monotherapie mit dem jeweiligen Inhibitor. Während die Aufnahme der mit niedrigeren Konzentrationen fast aller Inhibitoren behandelten Zellen sich jeweils kaum gegenüber jener der Kontrollen unterscheidet, ist die Aufnahme von mit LJI308 behandelten Zellen bereits bei geringer Konzentration signifikant erniedrigt. Eine Reduktion der FLT-Aufnahme wird außerdem bei Einsatz hoher Inhibitorkonzentrationen unter Monotherapie für LY2584702, AT7867 und PDA-66 (nicht signifikant) sowie BI-D1870 und LJI308 (signifikant) beobachtet. Eine ausschließliche Behandlung mit Docetaxel zeigt für alle untersuchten Konzentrationen keine Minderung der FLT-Aufnahme. Hingegen führen alle Kombinationstherapien der jeweils höheren Inhibitorkonzentration mit Docetaxel zu einer signifikanten Reduktion der FLT-Aufnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

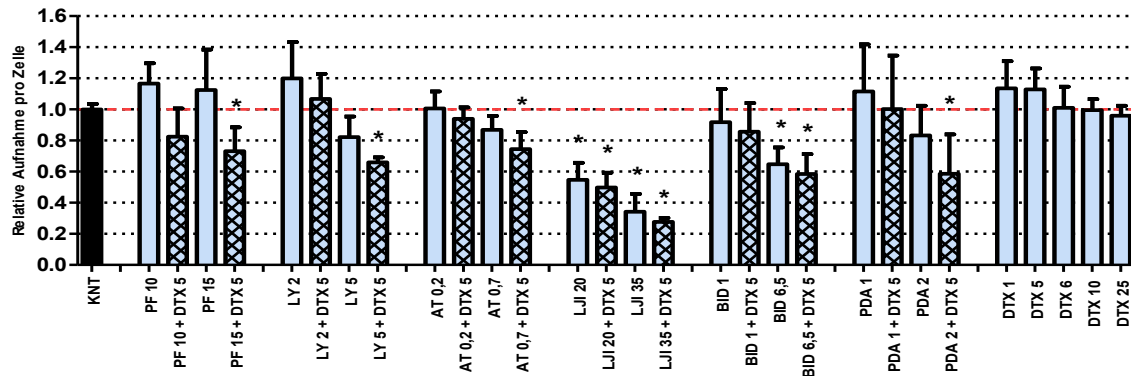


Abbildung 23: FLT-Aufnahme pro Zelle L929; normiert auf die Kontrolle (Schwarz). Alle Inhibitoren (Blau) wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet, jeweils in Monotherapie und in Kombination mit 5 nM Docetaxel (Schraffiert). Die Einheiten der Inhibitoren sind in μM angegeben, die von Docetaxel in nM. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$).

3.6.2 Zelllinie PC-3

Abbildung 24 zeigt die relative FLT-Aufnahme pro Zelle für Zellen der PC-3-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren.

Diese ist bei Einsatz keines Inhibitors reduziert. Sowohl die Monotherapien in zwei verschiedenen untersuchten Konzentrationen als auch die Kombinationstherapien mit Docetaxel zeigen keinen Unterschied zur unbehandelten Kontrolle. Im Falle der Monotherapie mit Docetaxel kam es außerdem zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der zellulären FLT-Aufnahme.

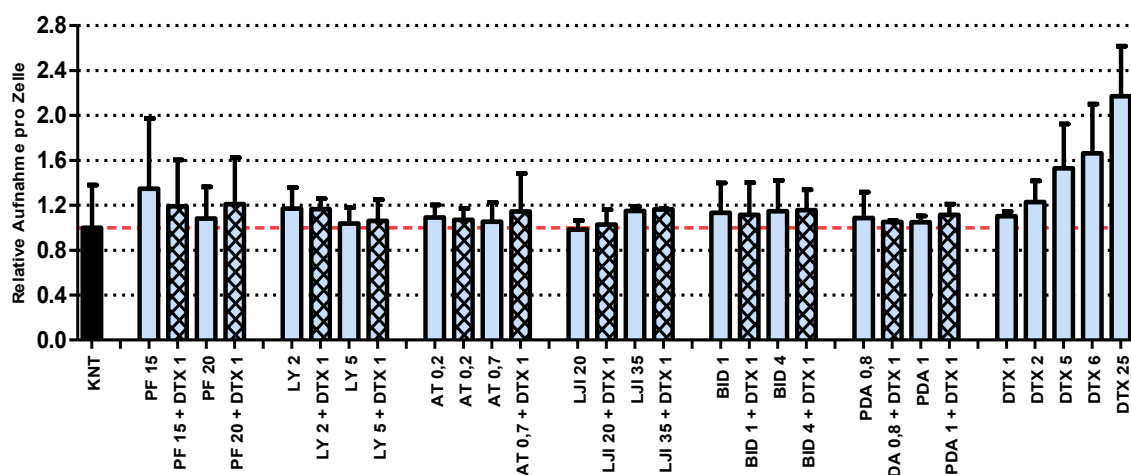


Abbildung 24: FLT-Aufnahme pro Zelle PC-3; normiert auf die Kontrolle (Schwarz). Alle Inhibitoren (Blau) wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet, jeweils in Monotherapie und in Kombination mit 1 nM Docetaxel (Schraffiert). Die Einheiten der Inhibitoren sind in μM angegeben, die von Docetaxel in nM. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

3.7 CXCR4- Versuche

Um eine Aussage über den Expressionsstatus des CXCR4-Rezeptors unter Mono- und Kombinationstherapie der Inhibitoren zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit CXCR4-Aufnahme-Versuche durchgeführt. Dabei wurde mit einer hohen Konzentration der Inhibitoren aus den vorherigen Versuchen gearbeitet und für Docetaxel jeweils einmal der Wert der vorherigen Versuche nach 72 h und – als Ergebnis interner Vorversuche – auch eine einheitliche Konzentration von 25 nM gewählt. Die Einzelinkubationen wurden gegen die Kontrolle und die Kombinationstherapien gegen eine Monotherapie mit entsprechender Docetaxel-Konzentration auf Signifikanz getestet.

3.7.1 Zelllinie L929

Abbildung 25 zeigt die relative AMD-Aufnahme pro Zelle für Zellen der L929-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren.

Die Inkubation mit Docetaxel zeigt für alle untersuchten Konzentrationen keine Minderung der AMD-Aufnahme, hingegen ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der AMD-Aufnahme zu erkennen. Außer für LJI308 zeigt sich für alle Inhibitoren ebenfalls eine leichte Erhöhung der Aufnahme gegenüber der unbehandelten Kontrolle, für BI-D1870 fällt diese signifikant aus. In der Kombination der Inhibitoren und Docetaxel zeigt sich ein ähnlicher Trend. Sowohl für 5 nM Docetaxel als auch für 25 nM Docetaxel kommt es bei jedem der Inhibitoren zu einer Zunahme der AMD-Aufnahme, allerdings fällt nur die Kombination von 6,5 μ M BI-D1870 mit 5 nM Docetaxel signifikant aus.

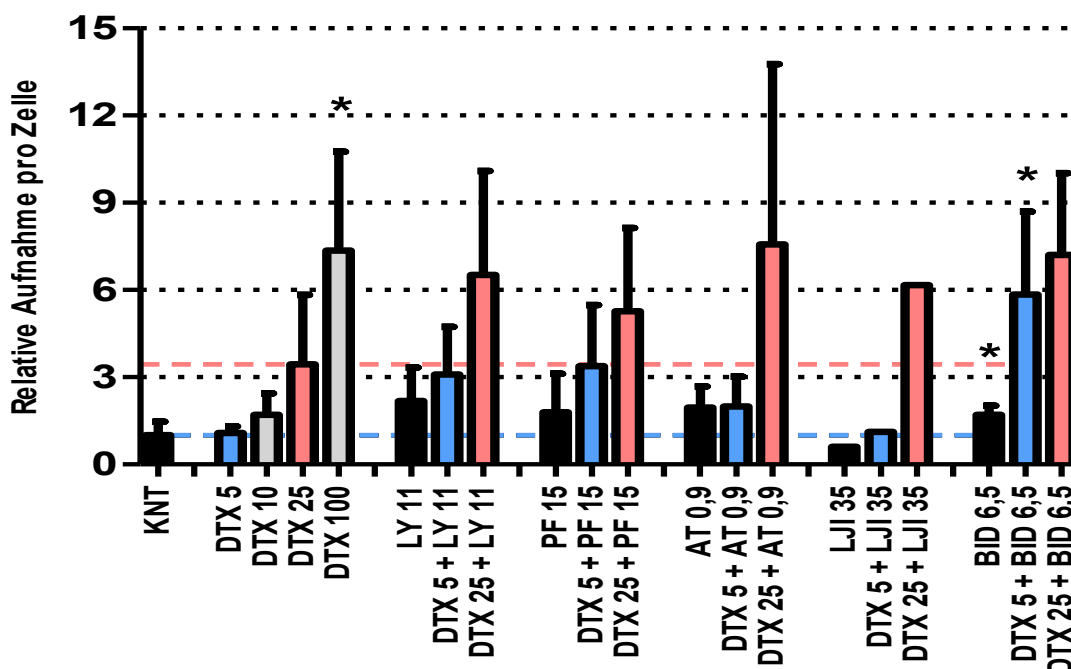


Abbildung 25: $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2\text{-AMD3100}$ -Aufnahme pro Zelle; L929 normiert auf die Kontrolle. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 1 nM und 25 nM gemessen. In Schwarz sind die Monotherapien und die unbehandelte Kontrolle dargestellt, in Blau die Varianten mit Docetaxel 1 nM und in Rot die Varianten mit Docetaxel 25 nM. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle oder der Monotherapie mit Docetaxel sind mit * gekennzeichnet.

3.7.2 Zelllinie PC-3

Abbildung 26 zeigt die relative AMD-Aufnahme pro Zelle für Zellen der PC-3-Zelllinie nach 72-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren.

Auch hier führt Docetaxel zu einem signifikanten Anstieg der AMD-Aufnahme, wobei diese für 10 nM Docetaxel gegenüber den Ergebnissen der L929-Zellen doppelt so hoch ausfällt (relative Aufnahme pro Zelle: 3,5 für L929-Zellen und 1,7 für PC-3-Zellen), für höhere Konzentrationen allerdings nur noch wenig weiter steigt. Wie auch bei L929-Zellen beobachtet, führt die Monoinkubation der Inhibitoren mit Ausnahme von LJI308 zu nicht signifikanten Anstiegen der AMD-Aufnahme. Gleiches gilt für die Kombination der Inhibitoren mit Docetaxel, wobei die Kombination der niedrigeren Konzentration von LY2584702, AT7867 und BI-D1870 mit 1 nM Docetaxel zu signifikanten Anstiegen führt.

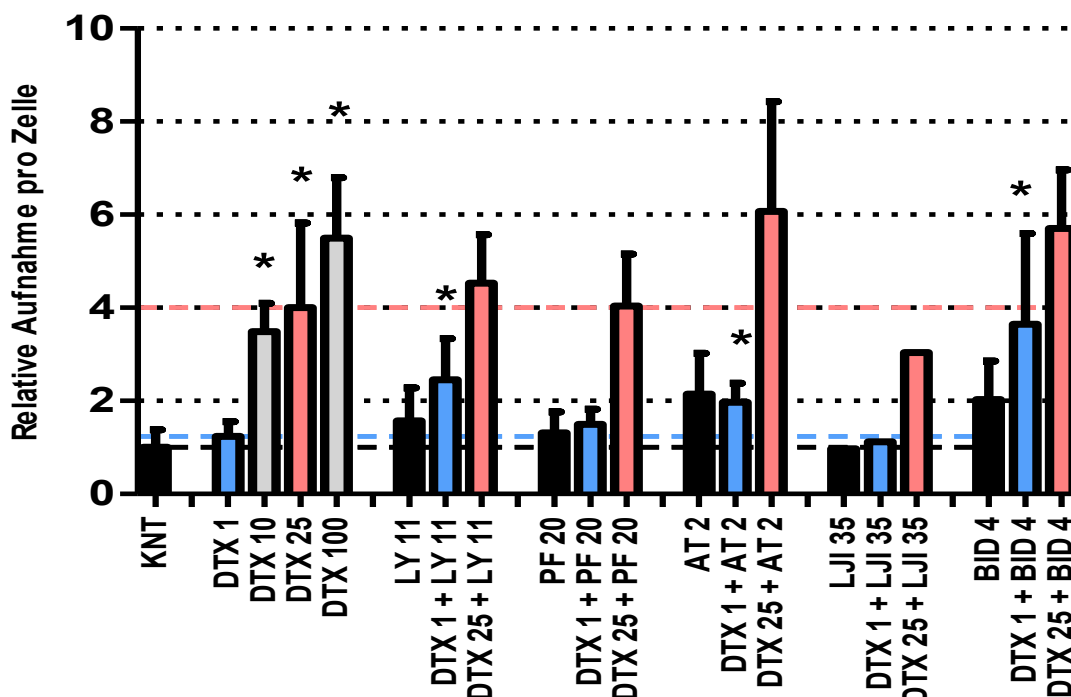


Abbildung 26: $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2\text{-AMD3100}$ -Aufnahme pro Zelle PC-3; normiert auf die Kontrolle. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel (1 nM und 25 nM) gemessen. In Schwarz sind die Monotherapien und die unbehandelte Kontrolle dargestellt, in Blau die Varianten mit Docetaxel 1 nM und in Rot die Varianten mit Docetaxel 25 nM. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle oder der Monotherapie mit Docetaxel sind mit * gekennzeichnet

3.7.3 Zusammenfassung der CXR4-Ergebnisse

Für beide Zelllinien (PC-3, L929) zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der AMD-Aufnahme unter Docetaxel-Therapie. Außer für LJI308, welches nur einfach getestet wurde, wird auch für alle Monotherapien mit den übrigen Inhibitoren ein Anstieg festgestellt, wobei – mit Ausnahme des BI-D1870 in L929-Zellen – sich alle ermittelten Anstiege als nicht signifikant darstellen. Die Kombination von Docetaxel mit den Inhibitoren zeigt außer bei LJI308 ebenfalls einen Anstieg der Aufnahme in beiden Zelllinien. In der niedrigen BI-D1870 Konzentration wird dabei in beiden Zelllinien Signifikanz erreicht, während in der niedrigen Konzentration von AT7867 und LY2584702 nur für Zellen der PC-3-Zelllinie Signifikanz erreicht wird.

4 Diskussion

4.1 Docetaxel-Therapie

Bei Docetaxel handelt es sich um einen Mitosehemmstoff, der durch Bindung an β -Tubulin die Depolymerisation der Mikrotubuli hemmt (20). Die Therapie mit Docetaxel stellt aktuell die gängige zytostatische Therapie des fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinoms dar (15). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher in einem ersten Schritt die Wirkung von Docetaxel auf die Prostatakarzinomzelllinien PC3 und LNCaP vergleichend zur Wirkung auf die Zelllinie L929 untersucht. Dies geschah im Rahmen dieser Arbeit durch Analyse der Proliferation, Vitalität, Apoptose und des Zellzyklus nach Inkubation mit Docetaxel.

In Übereinstimmung mit Literaturdaten zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Docetaxel ein ausgesprochen potentes Chemotherapeutikum ist (19, 157). Insbesondere die Prostatakarzinomzellen zeigen sich hochsensitiv gegenüber einer Behandlung mit Docetaxel, was die Konsequenz einer systemischen Therapie mit dem Wirkstoff beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom unterstreicht (15). Der IC_{50} -Wert nach 48 h liegt für die Zelllinien LNCaP und für PC-3 bei $\sim 1,4$ nM bzw. bei $\sim 1,6$ nM. Ähnlich führt eine Inkubation von 72 h ebenfalls zu nahezu gleichen IC_{50} -Werten (0,8 nM). Für die PC-3-Zellen musste allerdings in den folgenden Versuchen die Arbeitskonzentration auf 1 nM erhöht werden, da mit dem ursprünglich ermittelten IC_{20} -Wert keine ausreichende Hemmung in den Hauptversuchen verzeichnet werden konnte. Eine mögliche Ursache für diese Abweichungen könnte in den biologischen Replikaten oder unterschiedlichen Passagen der Zellen begründet sein. Im direkten Vergleich zwischen den beiden Prostatakarzinomzelllinien stellen sich die LNCaP-Zellen gegenüber einer Behandlung mit Docetaxel als etwas sensibler als PC-3-Zellen dar. Ebenso ist ihre Zellvitalität niedriger als jene der PC-3-Zellen. Dies wurde bereits von Liu *et al.* beschrieben, welche zeigen konnten, dass unter Docetaxel-Therapie das Zellüberleben von LNCaP reduziert und ihre Apoptoserate gegenüber PC-3-Zellen erhöht ist (158). Ein möglicher Erklärungsansatz dafür wird mit der unterschiedlichen Expression des Tumorsuppressors p53 in beiden Zelllinien gegeben: während LNCaP p53 exprimieren, ist dies für PC-3 nicht der Fall (159). Das Protein p53 ist in Abwesenheit von Zytostatika wenig exprimiert und liegt in der Zelle als murine double minute 2-protein (mdm2)-p53 zytoplasmatisch vor (160). Als Reaktion

auf Zellstress, wie er durch Chemotherapeutika hervorgerufen wird, dissoziiert der Komplex, p53 wird phosphoryliert und in den Zellkern transloziert, wo es durch Induktion von Genen wie BAX (Bcl-2-associated X protein) oder p21 einen Zellzyklusstopp und die Apoptose auslöst (161). Die Wirkung der Docetaxel-Therapie auf PC-3-Zellen wurde zusätzlich mittels Apoptose- und Zellzyklusmessungen untersucht. Die Untersuchungsergebnisse bestätigen die Apoptose-induzierende Wirkung des Docetaxels auf die Zellen, indem sowohl nach 24 h als auch nach 72 h ein signifikanter und konzentrationsabhängiger Anstieg der Apoptose festzustellen ist, begleitet von einem gleichzeitigen Anstieg der Zelldebris in den Proben. Darüber hinaus wird in den Untersuchungen dieser Arbeit der aus der Literatur bekannte G2-Phasen-Arrest von PC-3-Zellen unter Docetaxel-Therapie bestätigt und dessen Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen.

Zellen der Zelllinie L929 zeigen mit einem IC_{50} -Wert von $\sim 10,3$ nM nach 72 h im Vergleich zu den Prostatakarzinomzelllinien ungefähr 10-fach größere Docetaxel-Toleranz. Bereits frühere Studien, in denen L929-Zellen mit murinen Makrophagen P388D₁ (162) oder humanen Kolonkarzinomzellen HT-29 (163) verglichen wurden, kamen zu einem ähnlichen Befund. In einer Studie von Suzuki *et al.* wurde die Vitalität der Zellen nach einer 24-stündigen Docetaxel-Therapie mittels MTT-Assay und Hoechst-33342-Färbung gemessen, welche bei einer Docetaxel-Konzentration von ca. 10 ng/ml (umgerechnet $\sim 12,4$ nM) deutlich abnahm (164). Im selben Konzentrationsbereich kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Proliferationshemmung detektiert werden. Auch für die Zelllinie L929 wurden im Rahmen dieser Arbeit durchflusszytometrische Apoptose- und Zellzyklusmessungen durchgeführt. Der für PC-3-Zellen beobachtbare G2-Phasen-Arrest wird dabei ungefähr 10-fach weniger stark ausgeprägt auch für L929-Zellen festgestellt (nach 24 und 72 h mit 25 nM nicht signifikant, nach 24 h mit 100 nM signifikant). Gleichzeitig stellt sich die Apoptoserate unter Docetaxel-Therapie als kaum messbar dar: lediglich eine Inkubationsdauer von 24 h bei der höchsten gewählten Docetaxel-Konzentration (100 nM) führt zu ihrem signifikanten Anstieg, begleitet von einem ebenfalls signifikant erhöhten Anteil an Zelldebris (24 h, 25 nM). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen im Jahr 2013 Yu, Liu *et al.*: in ihren Versuchen zeigten sie, dass L929-Zellen unter Therapie mit Pseudolarinsäure B (PAB) zwar mit einem G2-Arrest reagieren, dieser allerdings nicht in Apoptose gipfelt, sondern über Autophagie in Seneszenz mündet (165, 166). PAB ist ein Mikrotubuli-Hemmstoff und damit vom Wirkprofil vergleichbar mit Docetaxel (167),

sodass ein Vergleich der Literaturdaten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zum Postulat einer Docetaxel-stimulierten Autophagie und Seneszenz von L929-Zellen führt. Eine Eigenschaft Taxan-resistenter Prostatakarzinomzellen ist die protektive Autophagie, welche in der Lage ist, Apoptose zu inhibieren und die Zellen dadurch am Leben zu halten (168, 169). Durch die deutlich höhere Toleranz von L929-Zellen gegenüber Docetaxel in Bezug auf Wachstumshemmung, Zellzyklusarrest und Apoptoserate im Vergleich zu den Docetaxel-sensibleren PC-3- und LNCaP-Zellen und der gleichzeitig bekannten erhöhten Neigung zu Autophagie unter Therapie mit Mikrotubuliinhibitoren zeigen L929-Zellen viele relevante Ähnlichkeiten zu Taxan-resistenten Prostatakarzinomzellen. Daher wird für diese ein ähnliches Verhalten auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Therapien postuliert.

4.2 Monotherapie mit Inhibitoren

<u>Inhibitor</u>	<u>Zelllinie</u>	<u>Apoptose</u>	<u>G1</u>	<u>G2</u>	<u>Via.</u>	<u>Vol.</u>	<u>p- RSK</u>	<u>p- S6K</u>	<u>p- RPS6</u>	<u>Akt [Lit.]</u>
PF-4708671	L929	↔	↑	↓	↓	↑	↔	↑	↓	-
	PC-3	↑	↑	↓	↓	↑	↔	↑	↓	
LY2584702	L929	↔	↑	↓	↓	↑	↔	↑	↓	-
	PC-3	↑	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	
AT7867	L929	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↓
	PC-3	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	
BI-D1870	L929	↑	↑	↓	↓	↑	↔	↑	↓	↓
	PC-3	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↔	↓	
LJI308	L929	↑	↔	↔	↔	-	↔	↓	↓	↑
	PC-3	↑	↑	↔	↔	-	↑	↔	↓	
PDA-66	beide	↑	↓	↑	↓	↑	-	-	-	-
Docetaxel	beide	↑	↓	↑	↓	↑	↔	↔	↔	-

Tabelle 5: Wirkung der Inhibitoren auf verschiedene Parameter der untersuchten Zelllinien L929 (Blau), PC-3 (Rot) oder beide (Weiß). Großer Pfeil = starke und signifikante Wirkung. Kleiner Pfeil = nicht signifikante oder schwache Wirkung. Querpfeil = keine wesentliche Veränderung. - = nicht untersucht oder nicht beschrieben. Via. = Vitalität, Vol. = Zellvolumen, Lit. = Literatur.

4.2.1 Monotherapie mit S6K-Inhibitoren

Eines der Ziele dieser Arbeit war, die Eignung von S6K und RSK-Hemmern für den Einsatz in der Therapie des Prostatakarzinoms zu untersuchen. Sowohl die Monotherapie als auch die Kombinationstherapie mit Docetaxel wurden dafür getestet. Um möglichst viele Aspekte einer solchen Therapie auf die Zellen beurteilen zu können, wurden wie auch für die Monotherapie mit Docetaxel Proliferation, Vitalität, Apoptose, Zellzyklus, Zellvolumen und molekularer Status der Kinasen untersucht. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse der analysierten Parameter qualitativ in Tabelle 5 gesammelt dargestellt.

In der Gruppe der S6K-Inhibitoren wurden PF-4708671, LY2584702 und AT7867 einer Betrachtung unterzogen. Während PF-4708671 in der Literatur als sehr spezifischer Inhibitor der S6K1, genauer der p70S6K1, beschrieben wird (97), ist LY2584702 verschieden klassifiziert. Während bei Tolcher *et al.* und Hollebecque *et al.* von einer spezifischen p70S6K1-Inhibition die Rede ist (101, 170), wird LY2584702 bei Chen *et al.* und Madala *et al.* als pan-S6K-Inhibitor beschrieben (171, 172). Durchflusszytometrische Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergeben für beide Substanzen, jeweils für beide der getesteten Konzentrationen, sowohl für PC-3- als auch für L929-Zellen eine signifikante Hemmung der Phosphorylierung des RPS6. Dies ist sowohl für PF-4708671 (97) als auch für LY2584702 (173) beschrieben und steht somit im Einklang mit der in der Literatur postulierten Wirkung der Inhibitoren. Die Zelllinien L929 und PC-3 zeigen mit IC_{50} -Werten von 15 μ M bzw. 17 μ M (PF-4708671) und 11 μ M bzw. 10 μ M (LY2584702) insgesamt ein sehr ähnliches Ansprechen auf die beiden S6K-Inhibitoren nach einer 72-stündigen Inkubation. Analog ähneln sich die Ergebnisse kürzerer Inkubationszeiten. Für LNCaP-Zellen dagegen liegen die IC_{50} -Werte für LY2584702 ($\sim 4 \mu$ M) und für PF-4708671 ($\sim 5 \mu$ M) insgesamt niedriger. Für alle drei Zelllinien gleich verhält sich die Vitalität, welche erst in sehr hohen Bereichen deutlich abnimmt, wobei in Analogie zu Zellzahl und Zellvolumen die Vitalität bei PF-4708671 erst bei höheren Werten als bei LY2584702 abfällt. Damit ist von einer primär proliferationshemmenden Wirkung der beiden S6K-Inhibitoren auszugehen, während der Zelltod erst in hohen Konzentrationen in größerem Maße ausgelöst wird. Passend zu dieser These lässt sich für L929-Zellen in den getesteten Konzentrationen kein und für PC-3-Zellen lediglich ein kleiner Anstieg der Apoptose nach 72 h nachweisen. Die Proliferationshemmung kann durch einen G1-Phasen-Arrest erklärt werden, welcher für LY2584702 insgesamt deutlicher als für PF-4708671 ausfällt. Diese Ergebnisse passen zu

jenen von Zhi-Xin, Rong-Fei *et al.*, welche für verschiedene NSCLC-Zelllinien unter PF-4708671-Inkubation in Konzentrationen bis 10 μ M ebenfalls einen G1-Phasen-Arrest und nur geringe Apoptoseinduktion nachweisen konnten (99). Auch für LY2584702 wird an NSCLC-Zelllinien ein G1-Phase-Arrest und nur geringe bis keine Apoptoseinduktion beschrieben (61).

Die S6K ist durch ihre zentrale Rolle in der Regulation der Ribosomen entscheidend an der Proteinbiosynthese beteiligt und steuert so auch Zellwachstum und Zellzyklusprogression. Da ein großer und wichtiger Teil des Zellwachstums und der Proteinbiosynthese in der G1-Phase des Zellzyklus abläuft, hat die S6K insbesondere Einfluss auf die G1-Progression (174, 175). Vor diesem Hintergrund erklärt sich auch ein G1-Phasen-Arrest bei reduzierter S6K-Funktion. Wie einleitend dargelegt (Kapitel 1.3.1), zeichnet sich auch im Ergebnis der vorliegenden Arbeit ab, dass der S6K1 eine größere Bedeutung als der S6K2 für das Zellwachstum zukommt, was mit der beobachteten proliferationshemmenden Wirkung des PF-4708671 korrespondieren würde. Da der S6K2 eine höhere Bedeutung im Kontext des Zelltods zugesprochen wird als der S6K1 (72), erklärt die fehlende Hemmung der S6K2 durch PF-4708671 auch die ausbleibende Apoptoseinduktion. LY2584702 wird in der Literatur teilweise als S6K1 und S6K2-Hemmer beschrieben. Daher wäre bei LY2584702 neben der proliferationshemmenden Wirkung auch eine vermehrt zytotoxische Wirkung zu erwarten. Diese lässt sich im Rahmen der vorliegenden Ergebnisse nicht beobachten, weshalb nicht von einer relevanten S6K2-Hemmung auszugehen ist. Auf der anderen Seite stellt sich die Auswirkung einer Inkubation von LY2584702 im Vergleich zu PF-4708671 auf den Zellzyklus beider Zelllinien ausgeprägter dar, sodass eine partielle S6K2-Hemmung vermutet werden kann. Dafür spricht zusätzlich die im Vergleich zu PF-4708671 höhere Potenz der Wirkung von LY2584702 auf die untersuchten Parameter Zellzahl, Zellvolumen und Zellvitalität. Allerdings ist hierbei auch die höhere in-vitro Potenz von LY2584702 gegenüber PF-4708671 (IC_{50} -Wert: 4 nM vs. 160 nM) zu berücksichtigen, welche ebenfalls für diesen Effekt verantwortlich sein könnte (97, 101). Während PF-4708671 nicht nur in NSCLC-Zellen, sondern auch in Studien mit Mammakarzinomzellen, Kolonkarzinomzellen und AML-Zellen Wirkung zeigt (67, 98, 100), konnte eine andere Studie, welche die Wirkung von PF-4708671 in humanen Hypophysenkarzinomzellen analysierte, in einer Konzentration von 10 μ M keinen hemmenden Einfluss auf die untersuchten Karzinomzellen feststellen (176). Eine S6K1-Hemmung scheint also nicht in allen Malignomzellen eine nennenswerte Hemmung zu erzielen. Für das Prostatakarzinom hingegen deuten die

vorhandenen Daten klar auf eine Hemmung hin. So stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Einklang mit den Ergebnissen von Amaral *et al.*, die zeigten, dass PF-4708671 in einer Konzentration von 10 μM zu einer signifikanten Proliferationshemmung in PC-3-luc-Zellen führt. Sie beschreiben außerdem eine negative Wirkung eines S6K-Knockdowns auf die Zellvitalität. Im Einklang mit der Literatur und der niedrigen Apoptoserate in den vorliegenden Ergebnissen hatte das Ausschalten der S6K2 einen deutlich höheren toxischen Effekt als das Ausschalten der S6K1 (77). Für eine S6K-Inhibition konnten andere Arbeitsgruppen außerdem im Tiermodell von Mamma- und Bronchialkarzinomen bereits eine Verhinderung der Metastasierung und von Rückfällen zeigen (67–69), weshalb eine Wirkung über die einzelne Zelle hinaus beim Prostatakarzinom ebenfalls wahrscheinlich erscheint. Auf der anderen Seite zeigte eine erste Phase-I-Studie mit LY2584702 an Patienten mit soliden Tumoren keine ausreichenden tumorhemmenden Effekte (101). Während PF-4708671 bereits mehrfach im Kontext anderer Fragestellungen an Rattenmodellen mit Konzentrationsspiegeln bis 100mg/kgKG (177) – aber noch nicht am Menschen – getestet wurde, liegen zu LY2584702 bereits Phase-I-Studien vor. Neben der bereits zitierten Studie (101) liegt eine weitere Ib-Phase vor, in welcher untersucht wurde, ob eine Kombination mit dem mTor-Hemmer Everolimus oder dem EGFR-Hemmer Erlotinib einen therapeutischen Effekt hat, da präklinische Studien einen vielversprechenden Therapieeffekt indizierten. Allerdings stellt sich die Kombination mit Erlotinib als sehr schlecht verträglich und die Kombination mit Everolimus als nur wenig erfolgreich dar. Zudem kommt es unter der kombinierten Anwendung mit beiden Substanzen zu einem unerwarteten Auftreten von Gerinnungskomplikationen. (170).

Im Gegensatz zu PF-4708671 und LY2584702 hemmt AT7867 nicht nur die S6K, sondern auch die PKA und Akt. Damit stellt AT7867 ein deutlich unspezifischer und weiter stromaufwärts in den Signalkaskaden der Zelle eingreifendes Pharmakon dar (103). Erwartungsgemäß sind daher die IC_{50} -Werte aller drei Zelllinien deutlich niedriger als für die anderen beiden S6K-Inhibitoren. Im Unterschied zu den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werten für PC-3-Zellen (72h, $\sim 2,3 \mu\text{M}$) beträgt bei Grimshaw *et al.* der IC_{50} -Wert für PC-3-Zellen nach 72 h Inkubationszeit $\sim 10,4 \mu\text{M}$ (103). Allerdings erfolgte die Auswertung bei Grimshaw *et al.* mit der Alamarblue-Methode und nicht mit einem automatischen Zellzähler, was der Grund für die Differenzen sein könnte. Interessanterweise sind sowohl PC-3-Zellen als auch DU145-Zellen (IC_{50} -Wert $\sim 11,9 \mu\text{M}$) als Repräsentanten des Prostatakarzinoms in dieser Studie unter allen getesteten Zellenentitäten durch die

höchste Proliferationstoleranz gegenüber AT7867 gekennzeichnet (103). Diese Ergebnisse decken sich mit dem in der vorliegenden Arbeit beobachteten doppelt so hohen IC_{50} -Wert der PC-3-Zellen (72 h, $\sim 2,3 \mu\text{M}$) im Vergleich zu den L929-Zellen (72 h, $\sim 0,9 \mu\text{M}$). Anders verhält es sich jedoch mit LNCaP-Zellen, die sich (72 h, $\sim 0,7 \mu\text{M}$) ähnlich sensibel wie die L929-Zellen verhalten. Während LNCaP-Zellen Eigenschaften eines gut differenzierten Adenokarzinoms der Prostata repräsentieren, sind DU145- und PC-3-Zellen als Vertreter eines undifferenzierten und deutlich aggressiveren Prostatakarzinoms durch ein hohes Metastasierungspotential und fehlende Androgensensitivität charakterisiert, was die beobachteten Unterschiede erklären könnte. Sowohl in PC-3- als auch in L929-Zellen lässt sich nach Inkubation mit AT7867 Apoptose nachweisen. Dies steht im Einklang mit dem Verlauf der Vitalitätskurve der beiden Zelllinien, welche nur minimal zur Kurve der Proliferationshemmung verschoben ist und damit ebenfalls auf eine zellschädigende Wirkung hindeutet. In anderen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Inkubation der Glioblastomzelllinie U87MG mit AT7867 die proapoptotischen Akt-Substrate FKHR (forkhead in rhabdomyosarcoma) und FKHL (forkhead in rhabdomyosarcoma ligand) nicht mehr phosphoryliert werden und dadurch Apoptose induziert wird (103). In einer weiteren Arbeit konnte darüber hinaus belegt werden, dass AT7867 in HT-29-Zellen (Kolonkarzinom) unabhängig von S6K und Akt auch die Sphingosin Kinase 1 (SphK1) hemmt und dadurch ebenfalls die Apoptose induziert wird (105). Ergebnisse aus Zellzyklusmessungen der vorliegenden Arbeit lassen insbesondere für hohe AT7867-Konzentrationen nach 24 h (L929-Zellen $4,5 \mu\text{M}$ und PC-3-Zellen $6 \mu\text{M}$) einen deutlichen G2-Phasen-Arrest erkennen. Für Akt-Inhibitoren ist ein solcher G2-/M-Arrest bereits für NSCLC- oder orale Plattenepithelkarzinomzellen beschrieben (178, 179). Zwar lässt sich ebenso wie für die anderen beiden S6K-Inhibitoren eine signifikante Hemmung der RPS6-Phosphorylierung feststellen, allerdings stehen die Ergebnisse mit AT7867 insgesamt im Widerspruch zu denen mit PF-4708671 und LY2584702, in welchen ein G1-Phasen-Arrest und nur wenig Apoptose detektiert werden kann. Dies impliziert, dass AT7867 einen Großteil seiner Wirkung nicht über die Hemmung der S6K entfaltet, sondern über die Inhibition der übergeordneten Enzyme Akt und PKA oder die Auswirkung der S6K-Inhibition zumindest gegenüber der von PKA und Akt zu vernachlässigen ist.

Für alle drei S6K-Hemmer kann eine Erhöhung der Phosphorylierung der p70S6K1 an Position Thr389 nach entsprechender Inkubation dargestellt werden, (L929-Zellen nicht signifikant, PC-3-Zellen signifikant). Die Phosphorylierung an dieser Position korreliert

gemäß den Untersuchungen von Pearson *et al.* dabei eng mit der Aktivität der p70S6K1 (180). Dies steht im vermeintlichen Widerspruch zur postulierten Hemmung dieser durch die Inhibitoren. Für alle drei S6K-Inhibitoren kann allerdings eine suffiziente Hemmung der Phosphorylierung des RPS6 als wichtigem Substrat der p70S6K1 detektiert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorhergehenden Studien zu PF-4708671 und LY2584702, in denen sich ein ähnliches Bild zeigte (97, 173, 176). Als Erklärung wird in den genannten Arbeiten postuliert, dass ein negativer Feedbackmechanismus der Substrate der S6K auf diese existiert. Wird die S6K gehemmt, fällt diese negative Rückkopplung weg und die S6K wird vermehrt phosphoryliert, bleibt aber weiterhin inhibiert. Für Rapamycin und andere mTORC1-Inhibitoren in Kombination mit den S6K-Inhibitoren PF-4708671 und LY2584702 konnte eine suffiziente Verhinderung dieser S6K-Phosphorylierung gezeigt werden (97, 173). Als Erklärung wird eine direkte Interaktion der gehemmten S6K mit mTORC1 postuliert und mTORC1 daher als entscheidend für diese Phosphorylierung angesehen. Diese Ergebnisse werden indirekt durch die Daten mit AT7867 der vorliegenden Arbeit unterstützt, da eine S6K-Phosphorylierung auch nach einer Inkubation der Zellen mit AT7867 auftritt. Diese Erkenntnis ist insofern bemerkenswert, als dass AT7867 mit Akt und PKA zwei wichtige Enzyme stromaufwärts der S6K ebenfalls inhibiert und diese damit für einen Feedbackmechanismus nicht in Frage kommen.

4.2.2 Monotherapie mit RSK-Inhibitoren

Neben den S6K-Hemmern wurden die RSK-Hemmer LJI308 und BI-D1870 auf ihre Wirkung gegenüber Prostatakarzinomzellen hin untersucht. Die IC₅₀-Werte für BI-D1870 liegen nach 72 h bei ~ 2 µM (LNCaP-Zellen) und ~1,8 µM (PC-3-Zellen) und damit deutlich niedriger als für die L929-Zellen (~6,6 µM). Auch nach 24 h und 48 h reagieren die L929-Zellen weniger sensibel auf eine Behandlung mit BI-D1870 als die beiden Prostatakarzinomzelllinien. Während sich für PC-3-Zellen ein ausgeprägter G2-Arrest nach Inkubation mit BI-D1870 feststellen lässt, zeigen die Daten zu den L929-Zellen einen G1-Arrest. In der Literatur ist die Bedeutung der RSK sowohl für den G2/M-Übergang als auch für den G1/S-Übergang beschrieben. So ist die RSK in der Lage, den Myelin Transcription Factor 1 (MYT1) zu inhibieren, welcher den für den M-Phasen-Eintritt wichtigen Cdk1/Cyclin B-Komplex inhibiert (181). Wu *et al.* und Wang *et al.* konnten außerdem an *Xenopus* Oozyten, Humanen-embryonic kidney-Zellen (HEK293) und PC-3-Zellen zeigen, dass RSK2 sowohl Cdc25A als auch Cdc25B und Cdc25C phosphoryliert. Diese aktivieren

ebenfalls den Cdk1/Cyclin B-Komplex durch Dephosphorylierung und entlassen damit die Zelle in die M-Phase (123, 182). Die RSK-Hemmer SL0101 und BI-D1870 führen daher auch in PC-3-Zellen zu einem G2-/M-Arrest (123). Auch in NSCLC- Mantelzelllymphom- und humanen oralen Plattenepithelkarzinomzellen führt BI-D1870 zu G2-Arresten (115, 117, 122). Schließlich ist auch für AML-Zellen bekannt, dass eine Behandlung mit BI-D1870 zu einem G2-Arrest – genauer zwischen Metaphase und Anaphase – führt. Als Ursache wird ebenfalls die verminderte Phosphorylierung von Cyclin B und zusätzlich noch von Securin (durch eine Hemmung der Inaktivierung des Spindle assembly checkpoint (SAC) diskutiert (119). Auf der anderen Seite fördert der MAPK-Weg – und damit auch die Wirkung der RSK – durch eine erhöhte Expression von Cyclin D den Eintritt von Zellen aus der G1- in die S-Phase (183). In einer Studie von Fan *et al.* führte eine RSK4-Überexpression in Nierenzellkarzinomzellen zu einer erniedrigten G1- und erhöhten S-Phase. Durch einen Knockdown der RSK4 wurde ein G1-Phasen-Arrest initiiert (118). Es wäre also möglich, dass durch eine gegenüber PC-3-Zellen vermehrte RSK4-Expression in L929-Zellen die Auswirkung einer RSK-Inhibition durch BI-D1870 eher auf einem G1/S-Übergang anstatt einem G2/M-Übergang beruht. Alternativ könnte eine unterschiedliche Expression der beteiligten Zellzykluskinasen wie cdk1 oder Cyclin D zu diesen verschiedenen Resultaten führen. Beide Mechanismen münden im Zelltod, da sich in allen drei Zelllinien konzentrationsabhängig ein Vitalitätsabfall und zusätzlich sowohl in L929- als auch in PC-3-Zellen Apoptose nachweisen lässt. Im Einklang dazu wurde in früheren Arbeiten bereits Apoptoseinduktion durch RSK2-Knockdown in Osteosarkomzellen (184) durch bcl-2 Runterregulation nach RSK-Hemmung in Plattenepithelzellen und pulmonalen Adenokarzinomzellen (115, 117) und durch mitotischen Arrest in NSCLC-Zellen (119) festgestellt. Für BI-D1870 werden neben einer proliferationshemmenden und apoptotischen Wirkung bereits auch antimigratorische Effekte beschrieben (113, 115, 185), was eine antimetastatische und eine rückfallverhindernde Wirkung in Aussicht stellt. Außerdem hemmt BI-D1870 den VEGF daran über die RSK den proangionetischen Faktor mdm2 an Serin 166 zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (186). Passend dazu zeigten Hammoud *et al.* eine Angiogenese-Hemmung und ein signifikantes Überleben im Mausmodell an LL-2 Bronchialkarzinomzellen (187). In PC-3-Zellen ist nach Inkubation mit BI-D1870 eine vermehrte Phosphorylierung der RSK zu verzeichnen, was ähnlich der S6K auf eine negative Rückkopplung der RSK stromaufwärts schließen lässt. L929-Zellen zeigen diesen Effekt hingegen nicht. In der Erstpublikation von BI-D1870 wurde beschrieben, dass die Substanz in Rat-2-Zellen, nicht aber in HEK293-Zellen, zu einer

reaktiven ERK-Aktivierung – jedoch ohne erhöhte RSK-Aktivität – führt und damit einen Rückkopplungsmechanismus auslöst (109). Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gut vereinbar und implizieren, dass der angenommene Rückkopplungsmechanismus in unterschiedlichen Zelllinien sehr unterschiedlich ausgeprägt zu sein scheint. Auch vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Wirkung von BI-D1870 auf den Zellzyklus der untersuchten Zelllinien deutet sich an, dass BI-D1870 neben der RSK-Hemmung und der Apoptoseinduktion je nach Zelllinie verschiedene weitere und unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte bewirkt. In den meisten der in der Literatur bekannten Studien zu BI-D1870 liegen die benutzten Konzentrationen im Bereich bis ca. 10 μM , was sich mit den Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit deckt. Da sich in beiden Zelllinien in einem Bereich von 6,5 μM auch eine suffiziente Hemmung des RPS6 nachweisen lässt, ist bei darüberhinausgehender Konzentration eine weitere Zunahme der RSK-Inhibition nicht zu erwarten. In hohen Konzentrationsbereichen auftretende Wirkungen sollten daher unter dem Aspekt einer dann zunehmend unspezifischen zellartindividuellen Beeinflussung des Zellstoffwechsels beurteilt werden.

Der zweite im Rahmen dieser Studie untersuchte RSK-Hemmer LJI308 zeigt ganz andere Ergebnisse als BI-D1870. So kann kein IC_{50} -Wert für die drei Zelllinien festgelegt werden, da in einem Dosisbereich bis 100 μM keine ausreichende Hemmung des Zellwachstums feststellbar ist. Ähnlich konnte in einer Arbeit von Maier *et al.* nach einer Inkubation von Magenkarzinomzellen mit 5 μM LJI308 ebenfalls keine Proliferationshemmung festgestellt werden (188). Im Widerspruch dazu wird in der Erstpublikation der Substanz eine potente und sehr spezifische Hemmung der RSK1-4 ohne nennenswerte Hemmung weiterer Kinasen bei in-vitro IC_{50} -Werten von 0,004 bis 0,013 $\mu\text{mol/ml}$ beschrieben (84), was eine starke Wirkung des LJI308 auf vitale Zellen vermuten lässt. Daher wurde durch dieselbe Autorengruppe die Inhibition durch LJI308 und vergleichend durch das chemisch sehr eng verwandte LJH685 auf Zellen untersucht, die durch MAPK-Signalwegmutationen durch eine überaktive RSK charakterisiert waren. Hierbei konnten die Autoren feststellen, dass die Hemmung der RSK nur in wenigen Zelllinien und auch nur in einem nicht adhärenen Zellmodell mit der Proliferationshemmung korreliert. Im Fall einer beobachteten Korrelation liegt der IC_{50} -Wert bei Werten im Bereich von 0,73 μM - 3 μM . Im adhärenen Versuchsaufbau liegt der IC_{50} -Wert hingegen zwischen 48 $\mu\text{M/l}$ - 66 $\mu\text{M/l}$ (84) und damit in einem Bereich, in dem auch in der vorliegenden Arbeit der IC_{50} -Wert vermutet und Konzentrationen für Folgeversuche festgelegt wurden. Aronchik *et al.* konnten des Weiteren

im adhärennten Versuchsaufbau keine Apoptose und keinen Einfluss auf den Zellzyklus feststellen (84). Passend dazu wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein merklicher Abfall der Vitalität detektiert. Die durch LJI308 induzierte Apoptoserate ist in der Zelllinie PC-3 zwar signifikant, aber analog der L929-Zelllinie nur minimal erhöht. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der großen Bedeutung von RSK-Substraten wie RPS6 oder yb-1 für die Zellintegrität und der auch im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen suffizienten Hemmung der RSK durch die verminderte Phosphorylierung von RPS6 durch LJI308. Maier *et al.* konnten in ihrer Arbeit allerdings zeigen, dass die Inhibition der RSK mit LJI308 zu einer reaktiven Aktivierung des Akt-Signalweges führt und postulierten, dass diese Aktivierung zu einer Aufhebung der Wirkung der RSK-Hemmung führt (188). Ein ähnlicher Mechanismus erscheint daher im Rahmen der Ergebnisse dieser Arbeit auch möglich. Aronchik *et al.* fanden im Rahmen ihrer Versuche einen im haftungsabhängigen Versuchsaufbau vermehrten Einfluss der S6K im Vergleich zur RSK auf das RPS6 (84). Diese These stützend zeigen die S6K-Inhibitoren in dieser Arbeit ebenfalls eine stärkere Hemmung der Phosphorylierung des RPS6 als LJI308 und BI-D1870. Denkbar wäre daher auch eine nur im adhärennten Versuchsaufbau vorhandene, reaktive Aktivierung von Akt, welche durch Aktivierung der S6K dann zu einer vermehrten RPS6-Phosphorylierung führt. Für PC-3- und L929-Zellen kann jedoch keine wesentliche Aktivierung der S6K nachgewiesen werden. Zusätzliche Versuche mit LJI308 sollten daher ein Augenmerk auf weitere Kinasen des Akt/S6K-Signalweges legen. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse von LJI308 und BI-D1870 liefern diese Überlegungen aber nicht, da eine RSK-Hemmung durch beide gesichert ist. Neuere Studien adressieren daher die durch BI-D1870 hervorgerufene Inhibition einer ganzen Reihe weiterer Kinasen neben der RSK. Zu ihnen gehören beispielsweise die Polo-like Kinasen (PLK1 und PLK3), Aurora Kinase B (84), Lymphocyte oriented kinase (Lok), STE20-Like Kinase (Slk) und Macrophage Stimulating 1 (Mst1) (189). Gleichzeitig konnten Edgar *et al.* in murinen dendritischen Zellen auch eine Hemmung von Akt feststellen (189), ein Phänomen, was bereits in Insulin stimulierten 3T3-L1 Adipozyten nach BI-D1870 Behandlung beschrieben wurde (190). BI-D1870 selbst bindet nicht an Akt, wie die Daten von Aronchik *et al.* zeigten. Allerdings ist es in der Lage, die katalytische Gamma-Untereinheit der Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat-3-Kinase zu inhibieren (84), was durch die damit einhergehende Hemmung der Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) eine Aktivierung von Akt verhindern kann. In den humanen embryonalen Nierenzellen NIH3T3 und HEK-293 ist eine Akt-Hemmung allerdings nicht

nachweisbar (190). Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Untersuchungen zu dem Aktivitätsstatus der Akt durchgeführt. Sollte es aber durch eine RSK-Hemmung zu einer Akt-vermittelten S6K-Aktivierung kommen, könnte die Hemmung von Akt durch BI-D1870 im Gegensatz zu LJI308 eine Erklärung für die beobachteten großen Wirkungsunterschiede beider Substanzen darstellen. Gleichzeitig muss aber auch diskutiert werden, ob die von BI-D1870 hervorgerufenen Effekte nicht den zahlreichen weiteren gehemmten Kinasen neben der RSK zuzuschreiben sind.

4.2.3 Monotherapie mit PDA-66

Neben den S6K- und RSK-Hemmern wurde mit PDA-66 auch ein Indolylmaleimid untersucht. Ursprünglich als Hemmer der GSK3 β , einem Substrat der RSK und S6K, beschrieben, ist mittlerweile mehrfach publiziert, dass PDA-66 seine Wirkung über andere Mechanismen als eine GSK3 β -Hemmung verursachen muss, da im Zellmodell keine signifikante Hemmung der GSK3 β nachgewiesen werden konnte (124, 125). PDA-66 hemmt allerdings die Tubulin-Depolymerisation (125), was zu einem mitotischen Arrest und schlussendlich zum mitotischen Tod oder Apoptose führt (127).

In den eigenen Untersuchungen ist für PDA-66 mit IC_{50} -Werten deutlich unter 2,5 μ M eine potente Hemmung des Zellwachstums beobachtet worden. Ähnliche Werte konnten sowohl Liu *et al.* an caninen Lymphom-Zellen (126) und anderen Gruppen für humane Lymphomzellen und Bronchialkarzinomzelllinien nachweisen (124, 125). Der in den eigenen Untersuchungen mit PDA-66 beobachtete nur geringe Abfall der Vitalität korreliert mit einer ebenso beobachteten geringen Apoptosezunahme. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit des PDA-66 konnten Versuche zur Zellzyklusanalyse nur einmalig durchgeführt werden, sodass keine Aussagen zur Signifikanz der Ergebnisse möglich sind. Allerdings deutet sich für die untersuchten Zelllinien L929 und PC-3 ein PDA-66-induzierter G2-/M-Arrest an. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls einen G2-/M-Arrest nachwiesen – allerdings begleitet von einer signifikanten Apoptoseinduktion (124–126). Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte sein, dass eine signifikante Apoptoseinduktion in L929- und PC-3-Zellen höherer als im Rahmen dieser Arbeit getesteter PDA-66-Konzentrationen (1 μ M/PC-3-Zellen, 2 μ M/ L929-Zellen) bedarf. Diese Vermutung wird durch die experimentelle Beobachtung gestützt, dass bei einer Inkubation mit 10 μ M PDA-66 (72 h) ein Vitalitätsabfall beobachtet worden ist.

Übereinstimmend beobachteten Schille *et al.* nach ähnlichen Untersuchungen wie den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten ebenfalls über eine Proliferationshemmung, verbunden mit einem G2-/M-Arrest im niedrigen einstelligen μM -Bereich. Für PC-3-Zellen wurde passend zu den Überlegungen zum möglichen Vorliegen einer Apoptoseinduktion ab $1 \mu\text{M}$ ein signifikanter Unterschied nachgewiesen. Für die LNCaP-Zellen begann dieser Bereich ab $2,5 \mu\text{M}$ (127). Schille *et al.* führten außerdem morphologische Untersuchungen durch, mit dem Ziel, nachzuweisen, dass einem gewissen Teil der Zellen neben der apoptotischen Fraktion durch Polyploidie ein mitotischer Schlupf gelingt (127). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Volumenabnahme bei LNCaP-Zellen gegenüber der für PC-3- und den L929-Zellen beobachteten Volumenzunahme könnte einen Hinweis auf eine für LNCaP-Zellen vorliegende Tendenz hin zu einer apoptotischen Reaktion gegenüber einer erhöhten Tendenz von PC-3- und L929-Zellen hin zur Bildung von Polyploidien und damit vergrößertem Zelleib als eine Reaktion auf eine PDA-66-Inkubation darstellen.

Somit lässt sich im Rahmen dieser Arbeit keine Erklärung für die im Xenograftmodell von Schwarzenböck *et al.* fehlende Wirkung von PDA-66 finden (128), da die auf zellulärer Ebene bereits beschriebenen antiproliferativen Effekte im Wesentlichen bestätigt werden können. Zwar stellt der diskutierte mitotische Schlupf in PC-3-Zellen in Analogie zu Docetaxel-Resistenz einen Resistenzmechanismus und damit potenziellen Erklärungsansatz für das fehlende Ansprechen der Tumoren im Xenograftmodell dar, allerdings wäre dann auch eine entsprechende Resistenz im PC-3-Zellmodell oder ein primär zumindest teilweises Ansprechen im Xenograftmodell erwartbar. Daher ist die fehlende Wirkung von PDA-66 in der Arbeit von Schwarzenböck *et al.* (128) sehr wahrscheinlich auf pharmakologische Aspekte der Substanz und nicht auf mangelnde zytostatische Eigenschaften zurückzuführen.

4.3 Kombinationstherapie der Inhibitoren mit Docetaxel

4.3.1 Kombination Docetaxel und S6K-Inhibitoren

Trotz der hohen chemotherapeutischen Potenz von Docetaxel und seiner Rolle als Standardmedikament in der Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms kommt es unter Monotherapie mit Docetaxel fast regelhaft zu einer Resistenzentwicklung, was den langfristigen Erfolg der Therapie deutlich einschränkt (30). Vor dem Hintergrund dieser Tatsache ist die Suche nach neuen Therapeutika zur Behandlung des Prostatakarzinoms und

der Entwicklung neuer Kombinationstherapien zur Verhinderung und Überwindung der Docetaxel-Resistenz von großem therapeutischen Interesse. Unterschiedliche Studien adressieren dabei in der Entstehung von Chemotherapieresistenzen zunehmend die Rolle des Proteins mTOR (191–193). Auch in kastrationsresistenten Prostatakarzinomzellen kann durch eine Hemmung von mTOR Docetaxel-Resistenz überwunden werden (194). Da mTOR die übergeordnete Kinase der S6K ist, liegt es nahe, dieser auch eine tragende Rolle in der Resistenzentstehung zuzuschreiben. Tatsächlich konnten Daten von Amaral *et al.* passend dazu zeigen, dass der Knockdown der S6K in PC-3 Zellen die Sensibilität gegenüber Docetaxel erhöht (77). Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, Versuche zu der Kombination von Docetaxel mit S6K-Inhibitoren durchzuführen.

Diese ergeben im Kontext der vorliegenden Arbeit für die Prostatakarzinomzellen eine überwiegend im additiven Bereich vorliegende Proliferationshemmung. Während PF-4708671 dabei in PC-3-Zellen eher eine synergistische Wirkung zeigt, wird diese ebenso für LY2584702 in LNCaP-Zellen beobachtet. LY2584702 zeigt in allen drei Dosierungsstufen eine zwar geringe, aber dennoch signifikante Abnahme der Vitalität der PC-3-Zellen. Dazu passend ist bei hoher Dosierung zusätzlich eine vermehrte Apoptose zu verzeichnen. Diese Beobachtungen implizieren eine Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie. Der verstärkte G2-Phasen-Arrest unter Kombinationstherapie spricht für eine Erhöhung der Wirkung des Docetaxels durch die S6K-Inhibitoren. Für L929-Zellen zeigt sich dieser Effekt jeweils deutlich ausgeprägter. Die CI-Werte für PF-4708671 und LY2584702 indizieren – mit Ausnahme für 5 μ M PF-4708671, welches durch eine additive Wirkung charakterisiert ist – durchweg synergistische bis stark synergistische Effekte. Auch der G2-Phasen-Arrest fällt bei L929-Zellen stärker als für PC-3-Zellen beobachtet aus. Darüber hinaus ist ein deutlicher Anstieg des Zellvolumens der L929-Zellen unter Kombinationstherapie zu beobachten. Auffälliger ist der begleitende Vitalitätsabfall, welcher von einer zunehmenden Apoptose flankiert wird. Vor dem Hintergrund der weiter oben beschriebenen Fähigkeit von L929-Zellen, auf Mikrotubulihemmstoffe mit Autophagie zu reagieren und damit dem Zelltod zu entgehen, ist diese Erkenntnis besonders interessant, da die S6K-Hemmer anscheinend in der Lage sind, in den Zellen die Apoptoseinduktion durch Docetaxel wieder zu ermöglichen. Eine 2021 publizierte Studie beleuchtete die prominente Rolle der S6K1 in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autophagie in Prostatakarzinomzellen. Entsprechend der Erkenntnisse dieser führt das Ausschalten der S6K durch eine gezielte Transfektion zu einer Autophagieinhibition in PC-3-Zellen. Gleiche

Resultate wurden durch eine Inkubation mit 10 μM PF-4708671 erreicht (195), was einen möglichen Erklärungsansatz für den Effekt der Kombinationstherapie bietet. Die Ergebnisse mit Docetaxel reihen sich ein in Versuchsserien mit anderen Substanzen, welche ebenfalls eine erfolgreiche Kombinationstherapie in der Zellkultur mit PF-4708671 zeigten. Dazu gehören Kombinationstherapien von PF-4708671 mit dem Pyruvatkinaseinhibitor Dichloracetat in Mammakarzinomzellen (196), mit dem Proteasomhemmer Bortezomib in AML-Zellen (98), dem EGFR-Hemmer Osimertinib in NSCLC-Zellen (197) und mit dem MEK-Hemmer Selumetinib und IGF-1R Hemmern in Kolonkarzinomzellen (76, 100, 198). LY2584702 wiederum führt in früheren Kombinationsstudien mit TAM-Inhibitoren zu vielversprechenden Ergebnissen (173). Eine Inhibition der S6K mit PF-4708671 oder LY2584702 zeigt also in verschiedensten malignen Zellkulturen und in Kombination mit diversen Antiproliferativen oder kinaseinhibierenden Pharmaka gute Ergebnisse. Dies unterstreicht das chemotherapeutische Potential von S6K-Inhibitoren in der Antitumortherapie.

Für AT7867 sind in der Kombinationstherapie mit Docetaxel – mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration (0,2 μM) in L929-Zellen – für beide Zelllinien durchgehend antagonistische Wirkungen zu verzeichnen. Passend dazu zeigen sich weder ein vermehrter Vitalitätsverlust noch eine Apoptoseinduktion oder eine Zellzyklusarretierung. Für PC-3-Zellen stellt sich die Apoptose nach einer 72-stündigen Behandlungszeit mit der AT7867-Docetaxel-Kombination sogar rückläufig dar. Vor dem Hintergrund der vielversprechenden Ergebnisse der beiden anderen S6K-Hemmer (PF-4708671 und LY2584702) erscheint diese Tatsache sehr interessant und führt zu der Vermutung, dass die bei AT7867 vorhandene Wirkung auf Akt, ähnlich wie auch für die Unterschiede in der Monotherapie, für die unterschiedlichen Wirkungen in der Kombinationstherapie verantwortlich sein könnte. Andererseits liegen zwei Studien zu EGFR-Inhibitoren vor, die für Lapatinib und AT7867 in humanen endozervikalen Adenokarzinomzellen (KU-7) einen synergistischen Therapieeffekt mit einem deutlichen Anstieg der Apoptose (104) und für Gefitinib in der Kombination mit einem MEK-Hemmer und AT7867 in TNBC-Zellen mit ähnlichen Effekten zu den KU-7-Zellen zeigen konnten (199). Beide Publikationen führen diese Wirkung auf eine durch Akt-Hemmung induzierte Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs zurück, welche durch die Kombination mit einem EGFR- oder einem MEK-Inhibitor aufgehoben werden konnte. Da von Docetaxel keine MEK/ERK-Hemmung bekannt ist, könnte eine Aktivierung dieses Signalweges durch AT7867 die fehlende

Wirkungssteigerung der Kombinationstherapie erklären. Allerdings wäre in diesem Fall durch eine vermehrte Aktivierung des MEK/ERK-Signalwegs auch eine vermehrte Aktivierung der RSK zu erwarten gewesen, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit für PC-3-Zellen gar nicht und für L929-Zellen nur leicht ausgeprägt ermittelt worden ist.

4.3.2 Kombination Docetaxel und RSK-Inhibitoren

Eines der Substrate der RSK, insbesondere der RSK1 und der RSK 2, ist YB-1 (200–202). YB-1 ist ein pleiotroper Faktor, welcher die Y-box Sequenz (5'-ATTGG-3') im Nukleus bindet und dadurch die Translation moduliert (82, 203). YB-1 ist über diesen Mechanismus unter anderem ein Regulator von p-gp (p-Glykoprotein), Clusterin und β III-Tubulin, von denen gezeigt werden konnte, dass sie Taxenresistenz fördern (204, 205). Paclitaxel – ein Taxan – wiederum führt über eine reaktive Aktivierung des Raf-1/ERK/RSK-Signalwegs zu einer Aktivierung von YB-1 und damit zur Resistenzinduktion (206). Konsequenterweise führt daher eine Inkubation mit dem RSK-Inhibitor SL0101 zu einer verminderten Phosphorylierung und damit zu einer Hemmung der Aktivierung von YB-1 und zeigt in der Folge eine Synergie mit Paclitaxel im Prostatakarzinom-Zellmodell (206). Insofern war eine weitere Frage dieser Arbeit, ob die Kombination von RSK-Hemmern mit Docetaxel ebenfalls einen verstärkten Effekt auf Prostatakarzinomzellen oder L929-Zellen hat und so eine Möglichkeit darstellt, Docetaxel-Resistenz zu begegnen.

Andere Zellmodell-Studien zeigten, dass BI-D1870 verstärkende Effekte in der Kombination mit Trastuzumab beim Mammakarzinom (110), mit EGFR-Hemmern beim Pankreaskarzinom (121) und diversen Kinasehemmern beim multiplen Myelom und Mantellzelllymphom (120, 122) hervorruft. Analoge Studien zur Kombination des BI-D1870 mit Docetaxel sind nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit zeigt eben diese Kombination für PC-3-Zellen in verschiedenen Konzentrationen zweimal additive und einmal moderat antagonistische und für LNCaP-Zellen leicht antagonistische Effekte. Zudem führt eine Kombinationstherapie der PC-3-Zellen im Vergleich zur Monotherapie zu keiner erhöhten Apoptoseinduktion oder einer Zellzyklusarretierung. Während Shiota *et al.* mit SL0101 und Paclitaxel additiv bis moderat synergistische Werte detektierten und einen signifikanten G2/M-Phasen-Arrest unter dieser Kombination zeigten (206), fallen die Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit damit deutlich weniger prägnant aus. Mittlerweile sind für BI-D1870 allerdings, wie weiter oben bereits diskutiert, diverse weitere

Kinasen als Wirkungsorte beschrieben und auch für SL1010 sind ähnliche Effekte bereits publiziert (207). Dies könnte eine Erklärung für die Unterschiede zwischen den beiden Inhibitoren sein, weshalb hier weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die quantitative Wirkung einer reinen RSK-Hemmung auf YB-1 und Taxanresistenz zu untersuchen. Hingegen führt eine Kombination aus BI-D1870 und Docetaxel in L929-Zellen zu den niedrigsten CI-Werten dieser Arbeit und damit zu eindeutig synergistischen Werten. Hier ist auch eine deutliche Apoptoseinduktion und ein ausgesprochen starker G2-Phasen-Arrest zu verzeichnen, was dafürspricht, dass BI-D1870 den Zellen die Möglichkeit nimmt, gegenüber Docetaxel Abwehrmechanismen zur Geltung zu bringen. Studien zeigten in den humanen Adenokarzinomzellen A549, dass eine Kombination von BI-D1870 mit Cisplatin ebenfalls zu einer Apoptoseerhöhung und Zellzyklusarrest – insbesondere aber zu einer Autophagieinhibition – führt (116). Für AML-Zellen wurde außerdem beschrieben, dass BI-D1870 den inhibierenden Einfluss der RSK auf SAC hemmt. SAC kann daraufhin Zellen unter dem Einfluss Mikrotubuli-angreifender Substanzen wie Docetaxel länger im Mitose-Arrest halten, sodass diese anstatt durch Mitose-Schlupf, gefolgt von Autophagie, dem Zelltod zu entgehen, in die Apoptose eintreten (119). Da diese Eigenschaft auch für L929-Zellen beschrieben ist, weisen die vorliegenden Ergebnisse daraufhin, dass BI-D1870 in diesen unter Inkubation mit Docetaxel erfolgreich Apoptose anstatt Autophagie auslöst.

Der zweite im Rahmen dieser Studie untersuchte RSK-Hemmer LJI308 zeigt im Vergleich zu BI-D1870 wie auch in der Monotherapie sehr unterschiedliche Ergebnisse in seiner Kombination mit Docetaxel. Für L929-Zellen ergeben sich leicht bis moderat antagonistische Effekte, für PC-3-Zellen reicht die Wirkung von antagonistisch bis additiv. Die beobachteten Wirkungen nehmen mit erhöhter InhibitorKonzentration zu. Für LNCaP-Zellen liegen moderat antagonistische Effekte vor. Weder für L929- noch für PC-3-Zellen werden eine gesteigerte Apoptose oder signifikante Veränderungen im Zellzyklus im Vergleich zur Kontrolle detektiert. Wie bereits oben diskutiert, kann LJI308 zu einer reaktiven Aktivierung von Akt führen. Akt besitzt eine zentrale Rolle in der Zellproliferation und dem Zellüberleben und inhibiert eine ganze Reihe von proapoptotischen Proteinen, weshalb der zugehörige Signalweg – inklusive der S6K im Prostatakarzinom – immer wieder mit Therapieversagen in Verbindung gebracht wird (208). Für die Therapie des Prostatakarzinoms mit Docetaxel ist bereits beschrieben, dass eine Aktivierung oder Überexpression von Akt zu Therapieresistenz führt (209, 210). Analog zur Monotherapie mit LJI308 könnte also auch in der Kombination mit Docetaxel eine begrenzte

Kompensation der RSK-Hemmung durch eine reaktive Aktivierung von Akt eine Erklärung darstellen.

4.3.3 Kombination Docetaxel und PDA-66

Die Kombination von Docetaxel und PDA-66 zeigt in den Zelllinien ein unterschiedliches Bild. Während die CI-Werte in L929- und LNCaP-Zellen einen leichten Synergismus nahelegen, zeigt sich für PC-3-Zellen ein Antagonismus. In L929-Zellen ist zusätzlich ein Vitalitätsabfall in der höchsten Konzentration der Kombination (2 μ M PDA-66) zu beobachten, obgleich eine erhöhte Apoptose nicht nachweisbar ist. Hingegen ist für PC-3-Zellen eine signifikante Apoptosezunahme zu vermerken. Der Zellzyklus beider Zelllinien scheint jedoch nur gering durch die Kombination beeinflusst zu werden. Damit lässt sich in keiner der Zelllinien ein in mehreren Methoden nachweisbarer starker Kombinationseffekt nachweisen. Vielmehr stellen sich Teilergebnisse widersprüchlich dar. Vor dem Hintergrund des gleichen Wirkungsmechanismus von PDA-66 und Docetaxel – durch Tubulinhemmung (20, 125) – ist eine synergistische Wirkung auch nicht zu erwarten. Eher ist davon auszugehen, dass in allen drei Zelllinien zu der Hemmung der Mikrotubuli durch Docetaxel die Hemmung durch PDA-66 additiv dazu wirkt. Dies würde auch eine Erklärung für die in hoher PDA-66-Konzentration nicht mehr steigerbare Wirkung der Kombination mit Docetaxel in PC-3-Zellen darstellen, da die Zellen bereits durch einen der beiden Inhibitoren maximal gehemmt werden.

4.4 FLT

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FLT-Aufnahme-Versuche zur Bewertung der Zellproliferation zeigen für die Zelllinie L929 nach Inkubation mit jedem der untersuchten Inhibitoren sowie nach Kombinationstherapie eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation in Form einer reduzierten zellulären FLT-Aufnahme, wobei diese nicht wesentlich mit den CI-Werten korreliert. Lediglich unter Docetaxel-Monotherapie zeigt sich auch in der höchsten untersuchten Konzentration (25 nM) keine Abnahme der zellulären FLT-Aufnahme. Ein signifikanter Unterschied stellt sich für PC-3-Zellen dar: Für diese ist in keiner Therapieform eine entsprechende Reduktion nachzuweisen. Vielmehr führt die Monotherapie mit Docetaxel zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der zellulären FLT-Aufnahme. Während sich also die Proliferationshemmung für die Zelllinie L929

sowohl für die einzelnen Inhibitoren als auch für die Kombinationstherapien darstellen lässt, ist dies analog für PC-3-Zellen nicht möglich, eher zeigt sich das Gegenteil. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen Dittmanns *et al.*. Die Autoren dieser Studie wiesen ebenfalls einen Anstieg der zellulären FLT-Aufnahme nach Inkubation mit Docetaxel in Konzentrationsbereichen der IC_{75} für Brustkrebszellen nach. Analog verzeichneten Diercks *et al.* für Mammakarzinomzellen nach Paclitaxel-Therapie ebenso einen Anstieg der zellulären FLT-Aufnahme (211, 212). Von den Autoren werden als Grund für dieses Phänomen entweder eine vermehrte Aktivität der TK1 (*Tyrosin-Kinase 1*) in der G2/M-Phase oder eine Induktion der TK1 diskutiert, wie es z. B. auch für Therapien mit 5-Fluoruracil gezeigt werden konnte (213). Eine vermehrte Tumorprogression ergibt sich aus diesen Phänomenen nicht, wie Schelhaas *et al.* in einer klinischen Studie über das Kolonkarzinom zeigten, nach initialem FLT-Anstieg nach Therapie zeigten sich die Tumoren im Verlauf gut regredient (214). Studien, in denen die Wirkung von RSK- oder S6K-Inhibitoren mittels FLT-Aufnahme an Prostatakarzinomzelllinien untersucht wurden, sind nicht bekannt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten allerdings an, dass die Beeinflussung der FLT-Aufnahme – und damit mutmaßlich der zugrundeliegenden TK1-Expression – vielmehr eine Abhängigkeit zum (gestressten) Zellmodell als zu den unterschiedlichen Inhibitoren besitzt. Für das Zellmodell des Prostatakarzinoms jedenfalls scheint die zelluläre FLT-Aufnahme als isolierter Proliferationsmarker nur bedingt aussagekräftig zu sein.

4.5 CXCR4

Da der CXCR4 durch Aktivierung verschiedener Signalwege wesentlich am Überleben von Prostatakarzinomzellen beteiligt ist und gleichzeitig auch wesentliche Bedeutung für ihre Metastasierungsfähigkeit besitzt (131, 132), bietet sich dieser als Ziel einer antitumorösen Therapie an. Daten von Domanska *et al.* zeigten, dass im Prostatakarzinom-Mausmodell der CXCR4 nach Docetaxel-Therapie gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ist (137). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Hatano *et al.* (215). Eine Erhöhung von CXCR4 nach Therapie mit antitumorösen Substanzen oder Strahlentherapie ist auch durch weitere Studien bekannt (216, 217). Dies impliziert eine potenzielle erhöhte Metastasierungsfähigkeit und Aggressivität der überlebenden Zellen unter Docetaxel-Therapie. Gleichzeitig zeigten Conley-LaComb *et al.*, dass Akt in Prostatakarzinomzellen den CXCR4 reguliert (218), was eine S6K-Inhibition als Möglichkeit der Intervention erscheinen lässt. Insofern ist die Frage,

ob eine Therapie mit S6K- oder RSK-Inhibitoren ebenfalls zu einer Veränderung des CXCR4-Status führt und wie sich dieser in einer Kombinationstherapie verhält, von Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Fragestellung mittels AMD-Aufnahme-Versuchen nachgegangen. Für Docetaxel-Monotherapien wird dabei in Analogie zu Domanska *et al.* auch eine erhöhte Expression des CXCR4 nach Docetaxelinkubation nachgewiesen. Für die Inhibitoren und die Kombinationstherapie lässt sich hingegen keine Verringerung des Rezeptorstatus erkennen. Im Gegenteil, insbesondere bei der Therapie mit BI-D1870 und der Kombinationstherapie mit LY2584702 und AT7867 ist eine weitere Expressionssteigerung zu beobachten. Dies könnte mit einer weiteren Aggressivitätssteigerung überlebender Zellen einhergehen. Allerdings ist jüngst eine Studie publiziert worden, welche die Relevanz des CXCR4 zumindest im frühen Prostatakarzinom generell als niedrig einstuft, da aufgrund von Microarray-Untersuchungen an 276 Patientenproben nur eine geringe Oberflächenexpression nachgewiesen werden konnte (219). Diese Ergebnisse stützend, zeigten Schwarzenböck *et al.* mittels FACS-Analyse ebenfalls eine geringe Oberflächenexpression des CXCR4 in nativen PC-3-Zellen (220). Schwarzenböck *et al.* wiesen allerdings nach, dass der CXCR4 dafür in größeren Mengen internalisiert vorliegt (220) und folglich von den gängigen Antikörpern und Radiopharmaka nicht erreicht werden kann. Die Relevanz des CXCR4 in Tumorprogression und Metastasierung hingegen ist mehrfach belegt (221, 222). Vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse muss daher diskutiert werden, ob es durch eine antiproliferative Therapie, insbesondere mit Docetaxel, zu einer Umverteilung und Externalisierung des Rezeptors kommt. Weitere Studien sind hier notwendig, um insbesondere die Frage zu adressieren, inwiefern eine solche Umverteilung wirklich zu einer Malignitätssteigerung oder sogar zu diagnostischen Möglichkeiten führt.

4.6 Zusammenfassende Beurteilung der untersuchten Therapien

Das Prostatakarzinom kann im lokalisierten Stadium gut behandelt werden. Im fortgeschrittenen und metastasierten Stadium verschlechtert sich die Prognose hingegen rapide. Insbesondere im Falle einer regelhaft auftretenden Docetaxel-Resistenz sind die Therapieoptionen nach wie vor begrenzt. Ziele dieser Arbeit waren die Eignung von S6K- und RSK-Inhibitoren sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit Docetaxel an

den Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und LNCaP und der gegenüber Docetaxel resistenteren Zelllinie L929 zu untersuchen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Therapien eine Änderung des CXCR4-Status zur Folge haben. Dafür wurden sowohl für die Monotherapie als auch für die Kombinationstherapie Versuche zur Proliferation, Vitalität und der Zellgröße durchgeführt, gefolgt von Versuchen zu Apoptose, Zellzyklus und Status der Kinasen und des Substrats RPS6 nach Inkubation. Darüber hinaus wurde die Proliferation mit FLT- und der CXCR4-Rezeptorstatus mit AMD-Aufnahme-Versuchen untersucht.

Die reinen S6K-Inhibitoren PF-4708671 und LY2584702 zeigen in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen erfolgsversprechende Ergebnisse bzgl. ihrer Zellwachstum und Zellüberleben hemmenden Wirkung auf Prostatakarzinomzellen. Kombinationstherapien mit Docetaxel lassen ein differenzierteres, aber dennoch ebenfalls interessantes Bild erkennen. Während die untersuchten Monotherapien mit den Inhibitoren primär eine proliferationshemmende Wirkung offenbaren, führen die Kombinationen zusätzlich zu einer erhöhten Apoptose. Insbesondere in den gegenüber Docetaxel resistenteren L929-Zellen zeigt sich dieses Phänomen sehr ausgeprägt und bietet Grund zu der Annahme, dass Resistenzmechanismen gegenüber Docetaxel wie Autophagie durch die Kombinationstherapie erfolgreich inhibiert werden. Primär erscheint durch die aus der Literatur bekannte schlechte Verträglichkeit von LY2584702 in einer ersten Phase Ib-Studie (170) und der guten Verträglichkeit von PF-4708671 auch in hohen Konzentrationen im Tiermodell (177) eine weitere Evaluation von S6K-Hemmern und insbesondere von PF-4708671 im Tiermodell sinnvoll. Da LY2584702 in der Phase I Studie (101) in Monotherapie außerdem eine unzureichende Wirkung zeigte, erscheint insbesondere vor dem Hintergrund der vorliegenden Ergebnisse die Kombination mit Docetaxel für solche Versuche interessant.

AT6867 präsentiert als unspezifischer S6K-/PKA-/Akt-Hemmer die potenteste Wirkung in der Monotherapie für alle drei untersuchten Zelllinien. Im Gegensatz dazu hat seine Kombination mit Docetaxel wenig Wirkungssteigerung zur Folge. Seine zusätzliche Attraktivität ergibt sich aus seiner oralen Verfügbarkeit (103). Eine Kombination mit Docetaxel erscheint mit Blick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und im Kontext dieser Experimente als nicht zielführend.

Der RSK-Hemmer LJI308 führt weder in der Mono- noch in der Kombinationstherapie mit Docetaxel zu einem relevanten Ansprechen bei den untersuchten Zelllinien. Ein Erklärungsansatz könnte eine durch LJI308 hervorgerufene kompensatorische Aktivierung von Akt in Folge der RSK-Inhibition darstellen. Interessant wären zukünftige Untersuchungen zu seiner kombinierten Wirkung auf Prostatakarzinomzellen, beispielsweise mit AT7867, da somit eine reaktive Aktivierung des jeweils anderen Signalwegs (MEK/ERK/RSK bzw. Akt/mTOR/S6K) verhindert würde. Andere Arbeitsgruppen konnten für die kombinierte Hemmung der beiden Signalwege bereits therapeutische Erfolge nachweisen (107, 199, 223) und auch im Prostatakarzinom zeigten sich für eine kombinierte Akt/mTOR- und MEK/ERK-Hemmung im Mausmodell erfolgsversprechende Ergebnisse (58). Als Monotherapie oder als Kombination mit Docetaxel ist allerdings beim Prostatakarzinom keine Wirkung zu erwarten. Sowohl bei Versuchen mit AT7867, LJI308 oder beiden als Kombination sollten die Kinasen der beiden Signalwege untersucht werden, um kompensatorische Aktivierungen nicht zu übersehen.

BI-D1870 dagegen zeigt in der Monotherapie vielversprechende Ergebnisse und in der Kombination mit Docetaxel in L929-Zellen sehr starke Effekte. Für PC-3- und LNCaP-Zellen sind die beobachteten Effekte der Kombination allerdings nur mäßig stark ausgeprägt. Neben den rein zytotoxischen und proliferationshemmenden Effekten sind für BI-D1870 allerdings auch weitere antitumoröse Eigenschaften zu erwarten (113, 115, 185–187). Vor dem Hintergrund der zitierten Arbeiten und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wären weitere Experimente, insbesondere in Docetaxel-resistenten Zell- oder Tiermodellen, interessant. BI-D1870 zeigte sich allerdings in ersten Versuchen im Tiermodell bei mittleren pH-Werten schlecht löslich und wurde schnell eliminiert (93). Außerdem ist die RSK-Spezifität wenig ausgeprägt (84, 189), weshalb bereits weitere Substanzen auf der Basis der BI-D1870-Struktur entwickelt wurden, um seine RSK-Spezifität sowie sein pharmakologisches Profil zu verbessern (224, 225). Diese sollten bei weiteren Versuchen daher vermehrt im Fokus stehen.

PDA-66 zeigt sich in der Monotherapie in allen drei Zelllinien im niedrigen einstelligen μM -Bereich potent, wobei Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest angenommen werden können. Diese Ergebnisse und weitere erfolgsversprechender Arbeiten mit PDA-66 im Prostatakarzinom und weiteren hämatologischen Malignomen (124–127) lassen eine weitere Evaluation von PDA-66 in der Monotherapie zwar sinnvoll erscheinen, vor dem Hintergrund

des fehlenden Ansprechens von PC-3-Tumoren im Xenograftmodell auf PDA-66 (128) ist eine weitere Evaluation von PDA-66 allerdings sehr kritisch zu hinterfragen. In der Kombination mit Docetaxel ist aufgrund der in der Theorie gleichen Wirkansätze lediglich von einer geringen Wirksteigerung auszugehen, was im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen steht.

Die FLT-Aufnahmeversuche zeigen eine höhere Abhängigkeit zum gewählten Zellmodell als zur durchgeführten Therapie und deuten darauf hin, dass insbesondere für Prostatakarzinomzellen die zelluläre FLT-Aufnahme im hier vorgestellten experimentellen Setting keinen geeigneten Proliferationsmarker darstellt.

Die Versuche zum CXCR4 hingegen zeigen eine erhöhte Oberflächenexpression des Rezeptors nach Therapie mit Docetaxel. Diese Expression wird durch Kombination mit S6K oder RSK-Inhibitoren nicht vermindert, sondern eher noch verstärkt. Vor dem Hintergrund des in nativen Zellen in großem Maße internalisiert vorliegendem CXCR4 (220) sollten zukünftige Arbeiten daher untersuchen, inwiefern bei der Expressionssteigerung nach Docetaxel-Therapie eine Umverteilung internalisierter Rezeptoren vorliegt und ob die Folge davon eine Malignitätssteigerung der überlebenden Zellen ist oder sich ein diagnostischer Angriffspunkt bietet.

5 Literaturverzeichnis

1. Stephen W. Leslie, Taylor L. Soon-Sutton, Hussain Sajjad, Larry E. Siref Prostate Cancer. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-.
2. Krebs in Deutschland 2015/2016, Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), 12. Ausgabe, Berlin 2019.
3. Hautmann R, Gschwend JE. Urologie. 5., aktual. Aufl. Berlin: Springer; 2014. (Springer-Lehrbuch).
4. Ann W. Hsing, Lilian Tsao and Susan S. Devesa. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 85, 60–67 (2000).
5. Benafif S, Eeles R. Genetic predisposition to prostate cancer. *British Medical Bulletin* 2016; 120(1):75–89. Verfügbar unter:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LIN KOUT=Y&CSC=Y&AN=00002417-201612000-00008>.
6. Edward Giovannucci, Eric B. Rimm, Graham A. Colditz, Meir J. Stampfer, Alberto Ascherio, Chris C. Chute, Walter C. Willett. A Prospective Study of Dietary Fat and Risk of Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 85, No. 19, October 6, 1993.
7. Kaiser A, Haskins C, Siddiqui M, Hussain A, D'Adamo C. The evolving role of diet in prostate cancer risk and progression. *Current Opinion in Oncology* 2019 05; 31(3):222–9.
8. Sfanos KS, Marzo AM de. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology* 2012; 60(1):199–215. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04033.x.
9. Round A, Sharp D, Peters T, Hamilton W. Clinical features of prostate cancer before diagnosis: a population-based, case-control study. *British Journal of General Practice* 2006 Oct; 56(531):756–62.
10. Parnham A, Serefoglu EC. Retrograde ejaculation, painful ejaculation and hematospermia. *Transl Androl Urol* 2016; 5(4):592–601. doi: 10.21037/tau.2016.06.05.

11. Nieder C, Haukland E, Pawinski A, Dalhaug A. Pathologic fracture and metastatic spinal cord compression in patients with prostate cancer and bone metastases. *BMC Urology* 2010 Dec 22; 10:23.
12. Bubendorf L, Schöpfer A, Wagner U, Sauter G, Moch H, Willi N et al. Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Human Pathology* 2000; 31(5):578–83. doi: 10.1053/hp.2000.6698.
13. Harada M, Iida M, Yamaguchi M, Shida K. Analysis of bone metastasis of prostatic adenocarcinoma in 137 autopsy cases. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 1992; 324:173–82. doi: 10.1007/978-1-4615-3398-6_18.
14. Datta K, Muders M, Zhang H, Tindall DJ. Mechanism of lymph node metastasis in prostate cancer. *Future Oncology* 2010; 6(5):823–36. Verfügbar unter: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=01245405-201005000-00019>.
15. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.0, 2021, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/> (abgerufen am: 30.05.2021).
16. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. 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* 2016; 40(2):244–52. doi: 10.1097/PAS.0000000000000530.
17. Wittekind C., Meyer H.-J. (2017) TNM, 8. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG aA.
18. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR et al. 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. *Lancet* 2016; 387(10024):1163–77. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01037-5.
19. Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *Journal of the National Cancer Institute* 1991; 83(4):288–91. doi: 10.1093/jnci/83.4.288.

20. Cheetham PMD, Petrylak DPM+. Tubulin-Targeted Agents Including Docetaxel and Cabazitaxel. *Cancer Journal* 2013; 19(1):59–65. Verfügbar unter:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LIN KOUT=Y&CSC=Y&AN=00130404-201301000-00009>.
21. Bhalla KN. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 2003; 22(56):9075–86.
22. Tannock IF, Wit R de, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN et al. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* 2004; 351(15):1502–12. Verfügbar unter:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LIN KOUT=Y&CSC=Y&AN=00006024-200410070-00008>.
23. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA, Lara PN, Jones JA, Taplin ME et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; 351(15):1513–20. doi:
10.1056/NEJMoa041318.
24. Crown J, O'Leary M, Ooi W. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 2:24–32.
25. Matikas A, Georgoulas V, Kotsakis A. The role of docetaxel in the treatment of non-small cell lung cancer lung cancer: an update. *Expert Review of Respiratory Medicine* 2016 Nov; 10(11):1229–41.
26. van Cutsem E, Grp T. Docetaxel in gastric cancer. *EJC Supplements* 2004; 2(7):52–8.
27. Kavanagh JJ. Docetaxel in the treatment of ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)* 2002; 16(6 Suppl 6):73–81.
28. Ho MY, Mackey JR. Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. *Cancer management and research* 2014; 6:253–9. doi: 10.2147/CMAR.S40601.
29. Hwang C. Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: a perspective review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 2012 Nov; 4(6):329–40.
30. Armstrong CM, Gao AC. Drug resistance in castration resistant prostate cancer: resistance mechanisms and emerging treatment strategies. *Am J Clin Exp Urol* 2015; 3(2):64–76.

31. Gan L, Wang J1, Xu H1, Yang X1. Resistance to docetaxel-induced apoptosis in prostate cancer cells by p38/p53/p21 signaling. *Prostate* 2011; 71(11):1158–66. Verfügbar unter:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=01445497-201108010-00003>.
32. Ashrafizadeh M, Paskeh MDA, Mirzaei S, Gholami MH, Zarrabi A, Hashemi F et al. Targeting autophagy in prostate cancer: preclinical and clinical evidence for therapeutic response. *J Exp Clin Cancer Res* 2022; 41(1):105. doi: 10.1186/s13046-022-02293-6.
33. Farrow JM, Yang JC, Evans CP. Autophagy as a modulator and target in prostate cancer. *Nature Reviews Urology* 2014; 11(9):508–16. Verfügbar unter:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=01429668-201409000-00028>.
34. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 2012; 441(1):1–21. doi: 10.1042/BJ20110892.
35. Lee-Fruman KK, Kuo CJ, Lippincott J, Terada N, Blenis J. Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1. *Oncogene* 1999; 18(36):5108–14. doi: 10.1038/sj.onc.1202894.
36. Rosner M, Hengstschlager M. Nucleocytoplasmic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR. *Oncogene* 2011 Nov 03; 30(44):4509–22.
37. Avruch J, Hara K, Lin Y, Liu M, Long X, Ortiz-Vega S et al. Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene* 162006; 25(48):6361–72. Verfügbar unter:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=00006374-200625480-00004>.
38. Ben-Sahra I, Manning BD, Howell JJ, Asara JM. Stimulation of de Novo Pyrimidine Synthesis by Growth Signaling Through mTOR and S6K1. *Science (Washington D C)*. doi: 10.1126/science.1228792.

39. Jiang B-H, Liu L-Z. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat* 2008; 11(3):63–76. doi: 10.1016/j.drug.2008.03.001.
40. Tavares MR, Pavan ICB, Amaral CL, Meneguello L, Luchessi AD, Simabuco FM. The S6K protein family in health and disease. *Life Sciences* 2015; 131:1–10. doi: 10.1016/j.lfs.2015.03.001.
41. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science (Washington D C)* 1998; 279(5351):707–10. doi: 10.1126/science.279.5351.707.
42. Dowling R, Topisirovic I, Fonseca B, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010 Mar; 1804(3):433–9.
43. Saitoh M, Pullen N, Brennan P, Cantrell D, Dennis PB, Thomas G. Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *0021-9258* 2002; 277(22):20104–12. doi: 10.1074/jbc.M201745200.
44. Weng QP, Kozlowski M, Belham C, Zhang A, Comb MJ, Avruch J. Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies. *0021-9258* 1998; 273(26):16621–9. doi: 10.1074/jbc.273.26.16621.
45. Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech S, Sanghera J, Avruch J. An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *0021-9258* 1992; 267(5):3325–35.
46. Pardo OE, Seckl MJ. S6K2: The Neglected S6 Kinase Family Member. *Frontiers in Oncology* 2013; 3:191. doi: 10.3389/fonc.2013.00191.
47. Chauvin C, Koka V, Nouschi A, Mieulet V, Hoareau-Aveilla C, Dreazen A et al. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene* 2014 Jan 23; 33(4):474–83.
48. Fenton TR, Gout IT. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43(1):47–59. doi: 10.1016/j.biocel.2010.09.018.

49. Meyuhas O. Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind. *Int Rev Cell Mol Biol* 2008; 268:1–37. doi: 10.1016/S1937-6448(08)00801-0.
50. Fang J, Meng Q, Vogt PK, Zhang R, Jiang B-H. A downstream kinase of the mammalian target of rapamycin, p70S6K1, regulates human double minute 2 protein phosphorylation and stability. *J Cell Physiol* 2006; 209(2):261–5. doi: 10.1002/jcp.20749.
51. Mayo LD, Donner DB. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends in Biochemical Sciences* 2002; 27(9):462–7. doi: 10.1016/s0968-0004(02)02166-7.
52. Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N, Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(17):9666–70. doi: 10.1073/pnas.171301998.
53. Maruani DM, Spiegel TN, Harris EN, Shachter AS, Unger HA, Herrero-González S et al. Estrogenic regulation of S6K1 expression creates a positive regulatory loop in control of breast cancer cell proliferation. *Oncogene* 2012; 31(49):5073–80. doi: 10.1038/onc.2011.657.
54. Sinclair CS, Rowley M, Naderi A, Couch FJ. The 17q23 amplicon and breast cancer. *Breast Cancer Research & Treatment* 2003; 78(3):313–22. Verfügbar unter: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=00001803-200304030-00004>.
55. Savinska LO, Lyzogubov VV, Usenko VS, Ovcharenko GV, Gorbenko ON, Rodnin MV et al. Immunohistochemical analysis of S6K1 and S6K2 expression in human breast tumors. *Ekspierimental'naya Onkologiya* 2004; 26(1):24–30.
56. Yoshida S, Matsumoto K, Arao T, Taniguchi H, Goto I, Hanafusa T et al. Gene amplification of ribosomal protein S6 kinase-1 and -2 in gastric cancer. *Anticancer Research* 2013; 33(2):469–75.
57. Lu Q, Wang J, Yu G, Guo T, Hu C, Ren P. Expression and clinical significance of mammalian target of rapamycin/P70 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in human colorectal carcinoma tissue. *Oncology Letters* 2015; 10(1):277–82. doi: 10.3892/ol.2015.3228.

58. Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, Yan J, Foster TH, Gao H et al. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest* 2008; 118(9):3051–64. doi: 10.1172/JCI34764.
59. Kremer CL, Klein RR, Mendelson J, Browne W, Samadzedeh LK, Vanpatten K et al. Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. *Prostate* 2006; 66(11):1203–12. doi: 10.1002/pros.20410.
60. Menon S, Manning B. Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene* 2008 Dec; 27 Suppl 2:S43-51.
61. Chen B, Yang L, Zhang R, Gan Y, Zhang W, Liu D et al. Hyperphosphorylation of RPS6KB1, rather than overexpression, predicts worse prognosis in non-small cell lung cancer patients. *PLoS One* 2017; 12(8):e0182891. doi: 10.1371/journal.pone.0182891.
62. Ip CKM, Yung S, Chan T-M, Tsao S-W, Wong AST. p70 S6 kinase drives ovarian cancer metastasis through multicellular spheroid-peritoneum interaction and P-cadherin/b1 integrin signaling activation. *Oncotarget* 2014; 5(19):9133–49. doi: 10.18632/oncotarget.2362.
63. Karlsson E, Pérez-Tenorio G, Amin R, Bostner J, Skoog L, Fornander T et al. The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomised Stockholm tamoxifen trials. *Breast Cancer Res* 2013; 15(5):R96. doi: 10.1186/bcr3557.
64. Liu L, Li F, Cardelli JA, Martin KA, Blenis J, Huang S. Rapamycin inhibits cell motility by suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways. *Oncogene* 2006; 25(53):7029–40. doi: 10.1038/sj.onc.1209691.
65. Berven L, Willard F, Crouch M. Role of the p70(S6K) pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration. *0014-4827* 2004 Jun 10; 296(2):183–95.
66. Klos KS, Wyszomierski SL, Sun M, Tan M, Zhou X, Li P et al. ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Cancer Research* 2006; 66(4):2028–37. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4559.

67. Khotskaya YB, Goverdhan A, Shen J, Ponz-Sarvise M, Chang S-S, Hsu M-C et al. S6K1 promotes invasiveness of breast cancer cells in a model of metastasis of triple-negative breast cancer. *American Journal Of Translational Research* 2014; 6(4):361–76.
68. Akar U, Ozpolat B, Mehta K, Lopez-Berestein G, Zhang D, Ueno N et al. Targeting p70S6K prevented lung metastasis in a breast cancer xenograft model. *Molecular Cancer Therapeutics* 2010 May; 9(5):1180–7.
69. Segatto I, Berton S, Sonogo M, Massarut S, D'Andrea S, Perin T et al. Inhibition of breast cancer local relapse by targeting p70S6 kinase activity. *Journal of Molecular Cell Biology* 2013; 5(6):428–31. Verfügbar unter:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LIN KOUT=Y&CSC=Y&AN=01436909-201312000-00008>.
70. Pardo OE, Arcaro A, Salerno G, Tetley TD, Valovka T, Gout I et al. Novel cross talk between MEK and S6K2 in FGF-2 induced proliferation of SCLC cells. *Oncogene* 2001; 20(52):7658–67. doi: 10.1038/sj.onc.1204994.
71. Martin KA, Schalm SS, Romanelli A, Keon KL, Blenis J. Ribosomal S6 kinase 2 inhibition by a potent C-terminal repressor domain is relieved by mitogen-activated protein-extracellular signal-regulated kinase kinase-regulated phosphorylation. *J Biol Chem* 2001; 276(11):7892–8. doi: 10.1074/jbc.M009972200.
72. Sridharan S, Basu A. Distinct Roles of mTOR Targets S6K1 and S6K2 in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(4). doi: 10.3390/ijms21041199.
73. Karlsson E, Magić I, Bostner J, Dyrager C, Lysholm F, Hallbeck A-L et al. Revealing Different Roles of the mTOR-Targets S6K1 and S6K2 in Breast Cancer by Expression Profiling and Structural Analysis. *PLoS One* 2015; 10(12):e0145013. doi: 10.1371/journal.pone.0145013.
74. Bostner J, Karlsson E, Eding CB, Perez-Tenorio G, Franzén H, Konstantinell A et al. S6 kinase signaling: tamoxifen response and prognostic indication in two breast cancer cohorts. *Endocrine-Related Cancer* 2015; 22(3):331–43. doi: 10.1530/ERC-14-0513.
75. Perez-Tenorio G, Karlsson E, Waltersson MA, Olsson B, Holmlund B, Nordenskjöld B et al. Clinical potential of the mTOR targets S6K1 and S6K2 in breast cancer. *Breast Cancer Research & Treatment* 2011; 128(3):713–23. Verfügbar unter:

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=00001803-201108000-00013>.

76. Grasso S, Tristante E, Saceda M, Carbonell P, Mayor-Lopez L, Carballo-Santana M et al. Resistance to Selumetinib (AZD6244) in colorectal cancer cell lines is mediated by p70S6K and RPS6 activation. *Neoplasia (New York)* 2014 Oct; 16(10):845–60.
77. Amaral CL, Freitas LB, Tamura RE, Tavares MR, Pavan ICB, Bajgelman MC et al. S6Ks isoforms contribute to viability, migration, docetaxel resistance and tumor formation of prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2016; 16:602. doi: 10.1186/s12885-016-2629-y.
78. Dümmler BA, Hauge C, Silber J, Yntema HG, Kruse LS, Kofoed B et al. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. *0021-9258* 2005; 280(14):13304–14. doi: 10.1074/jbc.M408194200.
79. Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 1998; 273(3):1496–505. doi: 10.1074/jbc.273.3.1496.
80. Frödin M, Jensen CJ, Merienne K, Gammeltoft S. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO Journal* 2000; 19(12):2924–34. doi: 10.1093/emboj/19.12.2924.
81. Hauge C, Frödin M. RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 15):3021–3. doi: 10.1242/jcs.02950.
82. Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M, Kuwano M. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* 2003; 25(7):691–8. doi: 10.1002/bies.10300.
83. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J et al. RAS/ERK Signaling Promotes Site-specific Ribosomal Protein S6 Phosphorylation via RSK and Stimulates Cap-dependent Translation. *0021-9258*. Verfügbar unter: <http://www.jbc.org/> Available from publisher's Web site.
84. Aronchik I, Appleton BA, Basham SE, Crawford K, Del Rosario M, Doyle LV et al. Novel potent and selective inhibitors of p90 ribosomal S6 kinase reveal the

- heterogeneity of RSK function in MAPK-driven cancers. *Mol Cancer Res* 2014; 12(5):803–12. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0595.
85. Ray-David H, Romeo Y, Lavoie G, Dél  ris P, Tcherkezian J, Galan JA et al. RSK promotes G2 DNA damage checkpoint silencing and participates in melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2013; 32(38):4480–9. doi: 10.1038/onc.2012.472.
86. Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, Hisamoto K, Hayakawa J, Nishio Y et al. Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel. *0021-9258* 2002; 277(36):33490–500. doi: 10.1074/jbc.M204042200.
87. Zhang Z, Liu R, Townsend PA, Proud CG. p90(RSK)s mediate the activation of ribosomal RNA synthesis by the hypertrophic agonist phenylephrine in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 59:139–47. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.03.006.
88. Doehn U, Hauge C, Frank SR, Jensen CJ, Duda K, Nielsen JV et al. RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. *Molecular Cell* 2009; 35(4):511–22. doi: 10.1016/j.molcel.2009.08.002.
89. Li P, Goto H, Kasahara K, Matsuyama M, Wang Z, Yatabe Y et al. P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Molecular Biology of the Cell* 2012; 23(8):1582–92. doi: 10.1091/mbc.E11-10-0883.
90. Saha M, Carriere A, Cheerathodi M, Zhang X, Lavoie G, Rush J et al. RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation. *Biochem J* 2012; 447(1):159–66. doi: 10.1042/BJ20120938.
91. Cho Y-Y, Yao K, Kim H-G, Kang BS, Zheng D, Bode AM et al. Ribosomal S6 kinase 2 is a key regulator in tumor promoter induced cell transformation. *Cancer Research* 2007; 67(17):8104–12. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4668.
92. Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Research* 2005; 65(3):1027–34.

93. Pambid MR, Berns R, Adomat HH, Hu K, Triscott J, Maurer N et al. Overcoming resistance to Sonic Hedgehog inhibition by targeting p90 ribosomal S6 kinase in pediatric medulloblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61(1):107–15. doi: 10.1002/pbc.24675.
94. Clark DE, Errington TM, Smith JA, Frierson HF, Weber MJ, Lannigan DA. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer Research* 2005; 65(8):3108–16. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3151.
95. Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J* 2012; 441(2):553–69. doi: 10.1042/BJ20110289.
96. Müller-Esterl W. *Biochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
97. Pearce LR, Alton GR, Richter DT, Kath JC, Lingardo L, Chapman J et al. Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1). *Biochem J* 2010; 431(2):245–55. doi: 10.1042/BJ20101024.
98. Nogami A, Okada K, Ishida S, Akiyama H, Umezawa Y, Miura O. Inhibition of the STAT5/Pim Kinase Axis Enhances Cytotoxic Effects of Proteasome Inhibitors on FLT3-ITD-Positive AML Cells by Cooperatively Inhibiting the mTORC1/4EBP1/S6K/Mcl-1 Pathway. *Translational Oncology* 2019; 12(2):336–49. doi: 10.1016/j.tranon.2018.11.001.
99. Qiu Z, Sun R, Mo X, Li W. The p70S6K Specific Inhibitor PF-4708671 Impedes Non-Small Cell Lung Cancer Growth. *PLoS ONE [Electronic Resource]* 2016; 11(1):e0147185.
100. Wang Q, Zhang Y, Zhu J, Zheng H, Chen S, Chen L et al. IGF-1R inhibition induces MEK phosphorylation to promote survival in colon carcinomas. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5(1):153. doi: 10.1038/s41392-020-0204-0.
101. Tolcher A, Goldman J, Patnaik A, Papadopoulos KP, Westwood P, Kelly CS et al. A phase I trial of LY2584702 tosylate, a p70 S6 kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* 2014; 50(5):867–75. doi: 10.1016/j.ejca.2013.11.039.
102. Gao M-Z, Wang H-B, Chen X-L, Cao W-T, Fu L, Li Y et al. Aberrant modulation of ribosomal protein S6 phosphorylation confers acquired resistance to MAPK

- pathway inhibitors in BRAF-mutant melanoma. *Acta Pharmacologica Sinica* 2019; 40(2):268–78. doi: 10.1038/s41401-018-0020-z.
103. Grimshaw KM, Hunter L-JK, Yap TA, Heaton SP, Walton MI, Woodhead SJ et al. AT7867 is a potent and oral inhibitor of AKT and p70 S6 kinase that induces pharmacodynamic changes and inhibits human tumor xenograft growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 2010; 9(5):1100–10. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0986.
104. Mark Axelrod, Vicki L. Gordon, Mark Conaway Neitzke Daniel Gioeli and Michael J. Weber. Combinatorial drug screening identifies compensatory pathway interactions and adaptive resistance mechanisms. *Oncotarget*, April, Vol.4, No 4 2013 Apr 10.
105. Zhang S, Deng Z, Yao C, Huang P, Zhang Y, Cao S et al. AT7867 Inhibits Human Colorectal Cancer Cells via AKT-Dependent and AKT-Independent Mechanisms. *PLoS One* 2017; 12(1):e0169585. doi: 10.1371/journal.pone.0169585.
106. Davies A, Reipas K, Hu K, Berns R, Firmino N, Stratford A et al. Inhibition of RSK with the novel small-molecule inhibitor LJ308 overcomes chemoresistance by eliminating cancer stem cells. *Oncotarget* 2015 Aug 21; 6(24):20570–7.
107. Lettau K, Zips D, Toulany M. Simultaneous Targeting of RSK and AKT Efficiently Inhibits YB-1-Mediated Repair of Ionizing Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks in Breast Cancer Cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2020. doi: 10.1016/j.ijrobp.2020.09.005.
108. Watanabe D, Nogami A, Okada K, Akiyama H, Umezawa Y, Miura O. FLT3-ITD Activates RSK1 to Enhance Proliferation and Survival of AML Cells by Activating mTORC1 and eIF4B Cooperatively with PIM or PI3K and by Inhibiting Bad and BIM. *Cancers* 2019; 11(12). doi: 10.3390/cancers11121827.
109. Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, Armstrong C, Bain J, Frodin M et al. BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem J* 2007; 401(1):29–38. doi: 10.1042/BJ20061088.
110. Astanehe A, Finkbeiner M, Krzywinski M, A F, Dhillon J, berquin I et al. MKNK1 is a YB-1 target gene responsible for imparting trastuzumab resistance and can be blocked by RSK inhibition. *Oncogene* 2012 Oct 11; 31(41):4434–46.

111. Amith S, Wilkinson J, Fliegel L. Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 regulation modulates metastatic potential and epithelial-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget* 2016 Apr 19; 7(16):21091–113.
112. Reipas K, Law J, Couto N, Islam S, Li Y, Li H et al. Luteolin is a novel p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor that suppresses Notch4 signaling by blocking the activation of Y-box binding protein-1 (YB-1). *Oncotarget* 2013 Feb; 4(2):329–45.
113. Salhi A, Farhadian J, Giles K, Vega-Saenz EdM, Silva I, Bourque C et al. RSK1 activation promotes invasion in nodular melanoma. *American Journal of Pathology* 2015 Mar; 185(3):704–16.
114. Theodosakis N, Micevic G, Langdon CG, Ventura A, Means R, Stern DF et al. p90RSK Blockade Inhibits Dual BRAF and MEK Inhibitor-Resistant Melanoma by Targeting Protein Synthesis. *J Invest Dermatol* 2017; 137(10):2187–96. doi: 10.1016/j.jid.2016.12.033.
115. Abdulrahman N, Jaballah M, Poomakkoth N, Riaz S, Abdelaziz S, Issa A et al. Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase attenuates cell migration and proliferation of the human lung adenocarcinoma through phospho-GSK-3 β and osteopontin. *Mol Cell Biochem* 2016; 418(1-2):21–9. doi: 10.1007/s11010-016-2727-9.
116. Abdulrahman N, Siveen KS, Joseph JM, Osman A, Yalcin HC, Hasan A et al. Inhibition of p90 ribosomal S6 kinase potentiates cisplatin activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *J Pharm Pharmacol* 2020; 72(11):1536–45. doi: 10.1111/jphp.13335.
117. Chiu C, Bai L, Kapuriya N, Peng S, Wu C, Sargeant a et al. Antitumor effects of BI-D1870 on human oral squamous cell carcinoma. *Cancer Chemotherapy & Pharmacology* 2014 Feb; 73(2):237–47.
118. Fan L, Li P, Yin Z, Fu G, Liao DJ, Liu Y et al. Ribosomal s6 protein kinase 4: a prognostic factor for renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 2013; 109(5):1137–46. doi: 10.1038/bjc.2013.463.
119. Chae H, Dutta R, Tiu B, Hoff F, Accordi B, Serafin V et al. RSK inhibitor BI-D1870 inhibits acute myeloid leukemia cell proliferation by targeting mitotic exit. *Oncotarget* 2020 Jun 23; 11(25):2387–403.

120. Shimura Y, Kuroda J, Ri M, Nagoshi H, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T et al. RSK2(Ser227) at N-terminal kinase domain is a potential therapeutic target for multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics* 2012 Dec; 11(12):2600–9.
121. Milosevic N, Kuhnemuth B, Muhlberg L, Ripka S, Griesmann H, Lolkes C et al. Synthetic lethality screen identifies RPS6KA2 as modifier of epidermal growth factor receptor activity in pancreatic cancer. *Neoplasia (New York)* 2013 Dec; 15(12):1354–62.
122. Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Shimura Y, Chinen Y, Tanba K, Kuwahara-Ota v et al. Serine-227 in the N-terminal kinase domain of RSK2 is a potential therapeutic target for mantle cell lymphoma. *Cancer Medicine* 2020 Jul; 9(14):5185–99.
123. Wu CF, Liu S, Lee Y-C, Wang R, Sun S, Yin F et al. RSK promotes G2/M transition through activating phosphorylation of Cdc25A and Cdc25B. *Oncogene* 2014; 33(18):2385–94. Verfügbar unter: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=00006374-201433180-00011>.
124. Kretzschmar C, Roolf C, Langhammer T, Sekora A, Pews-Davtyan A, Beller M et al. The novel arylindolylmaleimide PDA-66 displays pronounced antiproliferative effects in acute lymphoblastic leukemia cells. *BMC Cancer* 2014 Feb 06; 14:71.
125. Eisenlceffel C, Schmcele A-C, Pews-Davtyan A, Brennfcohrer A, Kuznetsov SA, Hcobner R et al. Interference of a novel indolylmaleimide with microtubules induces mitotic arrest and apoptosis in human progenitor and cancer cells. 0006-2952. doi: 10.1016/j.bcp.2012.12.013.
126. Liu W, Beck J, Schmidt LC, Roolf C, Pews-Davtyan A, Ruetgen BC et al. Characterization of the novel indolylmaleimides' PDA-66 and PDA-377 effect on canine lymphoma cells.
127. Schille JT, Nolte I, Beck J, Jilani D, Roolf C, Pews-Davtyan A et al. PDA Indolylmaleimides Induce Anti-Tumor Effects in Prostate Carcinoma Cell Lines Through Mitotic Death. *Front Vet Sci* 2020; 7:558135. doi: 10.3389/fvets.2020.558135.
128. SM Schwarzenböck, S Sender, C Bergner, A Velicu, C Schlie, M Joksch, A Pews-Davtyan, R Schwarz, D Zechner, J Stenzel, T Lindner, A Moeller, J Förster, M

- Guliyev, B Hinz, B Vollmar, C Junghanß, M Beller, BJ Krause, HM Escobar.
Assessment of the efficacy of targeted PDA-66 therapy in a PC-3 Prostate Cancer
Xenograft Model using [18 F]FDG and [18 F]FLT PET/CT and MRI.
Nuklearmedizin 2020; 59(02): 155.
129. Bollineni VR, Kramer GM, Jansma EP, Liu Y, Oyen WJG. A systematic review on
(18)FFLT-PET uptake as a measure of treatment response in cancer patients. *Eur J
Cancer* 2016; 55:81–97. doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.018.
130. Aiuti A, Taviani M, Cipponi A, Ficara F, Zappone E, Hoxie J et al. Expression of
CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human
lympho-hematopoietic progenitors. *European Journal of Immunology* 1999;
29(6):1823–31. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<1823::AID-
IMMU1823>3.0.CO;2-B.
131. Bergner C, Gummeson A, Joksch M, Sarvestani MK, Helldorff H von, Lapa C et
al. Der Chemokinrezeptor CXCR4 – seine Entwicklung und Bedeutung in der
nuklearmedizinischen Theranostik. *Der Nuklearmediziner* 2021; 44(02):160–76. doi:
10.1055/a-1393-7958.
132. Xin-Wei Diao, Jia-Yu Feng, Qin-Wen Wang, Jian-Guo Sun, Zheng-Tang Chen.
SDF-1/CXCR4 axis promotes prostate cancer cell; *Int J Clin Exp Pathol*
2016;9(2):2706-2717.
133. Akashi T, Koizumi K, Tsuneyama K, Saiki I, Takano Y, Hideki F. Chemokine
receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer.
Cancer Sci 2008; 99(3):539–42. Verfügbar unter:
[http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LIN
KOUT=Y&CSC=Y&AN=00148331-200803000-00013](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=00148331-200803000-00013).
134. Kato M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression pattern of CXC chemokine
receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal
carcinoma. *Breast Cancer Res* 2003; 5(5):R144-50. doi: 10.1186/bcr627.
135. Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang H-J, Kuo C et al. Chemokine
receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for
recurrence and for poor survival. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(12):2744–53.
doi: 10.1200/JCO.2005.07.078.

136. Arun Bhardwaj, Sanjeev K. Srivastava, Seema Singh, Sumit Arora, Nikhil Tyagi Joel Andrews Steven McClellan James E. Carter, Ajay P. Singh. CXCL12/CXCR4 signaling counteracts docetaxel-induced microtubule stabilization via p21-activated kinase 4-dependent activation of LIM domain kinase 1. *Oncotarget*, Vol. 5, No. 22 2014.
137. Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Kruizinga RC, Ananias HJK et al. CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia* 2012; 14(8):709–18. doi: 10.1593/neo.12324.
138. Hartimath SV, Domanska UM, Walenkamp AME, Rudi A J O D, Vries EFJ de. ^{99m}TcO₂-AMD3100 as a SPECT tracer for CXCR4 receptor imaging. *Nucl Med Biol* 2013; 40(4):507–17. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2013.02.003.
139. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research* 1983; 43(4):1809–18.
140. Wu X, Gong S, Roy-Burman P, Lee P, Culig Z. Current mouse and cell models in prostate cancer research. *Endocrine-Related Cancer* 2013; 20(4):R155-70. doi: 10.1530/ERC-12-0285.
141. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 1979; 17(1):16–23.
142. Sanford KK, Earle WR, Likely GD. The growth in vitro of single isolated tissue cells. *Journal of the National Cancer Institute* 1948; 9(3):229–46.
143. ISO 10993 U.S. Food and Drug Administration 2013.
144. Jangsuwan N, Sangsuwan P. Antiproliferation of Fibrosarcoma Cell Line (L929) by Hua-Khao-Yen-Tai Thai Medicinal Plant (*Dioscorea membranacea* Pierre). *J. of Biological Sciences* 2016; 16(6):236–41. doi: 10.3923/jbs.2016.236.241.
145. www.signagen.com/Brief-procedures-for-transfecting-L929-cell aufgerufen am 17.01.21.
146. Gaviñondo J, Fernandez A, Castillo R, Lage A. Neoplastic progression evidenced in the L929 cell system. I. Selection of tumorigenic and metastasizing cell variants. *Neoplasma* 1982; 29(3):269–79.

147. Rodríguez T, Rengifo E, Gavilondo J, Tormo B, Fernández A. Morphologic and cytochemical study of L929 cell variants with different metastasizing ability in C3HA/Hab mice. *Neoplasma* 1984; 31(3):271–9.
148. Sanford KK, HOBBS GL, Earle WR. The tumor-producing capacity of strain L mouse cells after 10 years in vitro. *CANCER RES* 1956; 16(2):162–6.
149. Gstraunthaler G, Lindl T. Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
150. Dissertation Heike von Helldorff: Charakterisierung des Chemokinrezeptors CXCR4 auf der humanen Prostatakarzinomzelllinie PC-3, Universitätsmedizin Rostock, 2021.
151. Shi J, Shi Y, Waehrens LN, Rasmussen JT, Heegaard CW, Gilbert GE. Lactadherin detects early phosphatidylserine exposure on immortalized leukemia cells undergoing programmed cell death. *Cytometry A* 2006; 69(12):1193–201. doi: 10.1002/cyto.a.20345.
152. Zembruski NCL, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem* 2012; 429(1):79–81. doi: 10.1016/j.ab.2012.07.005.
153. Brockhoff G: DNA- und Proliferation Messungen in der Durchflusszytometrie. Sack UND, Tárnok A, Rothe G (Hrsg): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Karger, 2007; 604-646.
154. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006; 58(3):621–81. doi: 10.1124/pr.58.3.10.
155. Frost I. (2017) *Statistische Testverfahren, Signifikanz und p-Werte. essentials*. Springer VS, Wiesbaden. 978-3-658-16258-0.
156. Gaetano J2. Holm-Bonferroni sequential correction: An Excel calculator (1.3.).
157. Li Y, Li X, Hussain M, Sarkar FH. Regulation of microtubule, apoptosis, and cell cycle-related genes by taxotere in prostate cancer cells analyzed by microarray. *Neoplasia* 2004; 6(2):158–67. doi: 10.1593/neo.03391.

158. Liu C, Zhu Y, Lou W, Nadiminty N, Chen X, Zhou Q et al. Functional P53 Determines Docetaxel Sensitivity in Prostate Cancer Cells. *Prostate* 2013; 73(4):418–27. Verfügbar unter:
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LINKOUT=Y&CSC=Y&AN=01445497-201303000-00010>.
159. Jackson P, Grimm M-O, Kingsley EA, Brosius U, Antalis T, Yardley G et al. Relationship between expression of KAI1 metastasis suppressor gene, mRNA levels and p53 in human bladder and prostate cancer cell lines. *Urologic Oncology* 2002; 7(3):99–104. doi: 10.1016/s1078-1439(01)00175-2.
160. Jiang C, Hu H, Malewicz B, Wang Z, Lü J. Selenite-induced p53 Ser-15 phosphorylation and caspase-mediated apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2004; 3(7):877–84.
161. Levine AJ. Introduction: The Changing Directions of p53 Research. *Genes Cancer* 2011; 2(4):382–4. doi: 10.1177/1947601911413463.
162. Gut I, Danielová V, Holubová J, Soucek P, Klucková H. Cytotoxicity of cyclophosphamide, paclitaxel, and docetaxel for tumor cell lines in vitro: effects of concentration, time and cytochrome P450-catalyzed metabolism. *Archives of Toxicology* 2000; 74(8):437–46. doi: 10.1007/s002040000141.
163. Chiu HI, Ayub AD, Mat Yusuf SNA, Yahaya N, Abbd Kadir E, Lim V. Docetaxel-Loaded Disulfide Cross-Linked Nanoparticles Derived from Thiolated Sodium Alginate for Colon Cancer Drug Delivery. *Pharmaceutics* 2020; 12(1). doi: 10.3390/pharmaceutics12010038.
164. Atsushi Suzuki, Takami Kawabata, Michiyuki Kato. Necessity of interleukin-1b converting enzyme cascade in taxotere-initiated death signaling.
165. Yu Jh, Liu Cy, Zheng Gb, Zhang LY, Yan Mh, Zhang Wy et al. Pseudolaric acid B induced cell cycle arrest, autophagy and senescence in murine fibrosarcoma 1929 cell. *International Journal of Medical Sciences* 2013; 10(6):707–18. doi: 10.7150/ijms.5726.
166. Yu J, Li X, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Bcl-2 family proteins were involved in pseudolaric acid B-induced autophagy in murine fibrosarcoma L929 cells. *J Pharmacol Sci* 2008; 107(3):295–302. doi: 10.1254/jphs.08091fp.

167. Wong VKW, Chiu P, Chung SSM, Chow LMC, Zhao Y-Z, Yang BB et al. Pseudolaric acid B, a novel microtubule-destabilizing agent that circumvents multidrug resistance phenotype and exhibits antitumor activity in vivo. *Clinical Cancer Research* 2005; 11(16):6002–11. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0209.
168. Lin J-Z, Wang W-W, Hu T-T, Zhu G-Y, Li L-N, Zhang C-Y et al. FOXM1 contributes to docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer by inducing AMPK/mTOR-mediated autophagy. *Cancer Letters* 2020; 469:481–9. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.014.
169. Wang Q, He W-Y, Zeng Y-Z, Hossain A, Gou X. Inhibiting autophagy overcomes docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer cells. *Int Urol Nephrol* 2018; 50(4):675–86. doi: 10.1007/s11255-018-1801-5.
170. Hollebecque A, Houédé N, Cohen EEW, Massard C, Italiano A, Westwood P et al. A phase Ib trial of LY2584702 tosylate, a p70 S6 inhibitor, in combination with erlotinib or everolimus in patients with solid tumours. *Eur J Cancer* 2014; 50(5):876–84. doi: 10.1016/j.ejca.2013.12.006.
171. Chen H-Y, Goldman AR, Zayas-Bazan D, Reyes-Uribe PI, Guterres AN, Lipchick B et al. Selective abrogation of S6K2 maps lipid homeostasis as a survival vulnerability in MAPKi-resistant NRAS MUT melanoma; 2021.
172. Madala SK, Sontake V, Edukulla R, Davidson CR, Schmidt S, Hardie WD. Unique and Redundant Functions of p70 Ribosomal S6 Kinase Isoforms Regulate Mesenchymal Cell Proliferation and Migration in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; 55(6):792–803. doi: 10.1165/rcmb.2016-0090OC.
173. Liu H, Feng X, Ennis KN, Behrmann CA, Sarma P, Jiang TT et al. Pharmacologic Targeting of S6K1 in PTEN-Deficient Neoplasia. *Cell Reports* 2017; 18(9):2088–95. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.022.
174. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular & Cellular Biology* 2004; 24(1):200–16. doi: 10.1128/mcb.24.1.200-216.2004.
175. Lane H, Fernandez A, Lamb N, Thomas G. p70s6k function is essential for G1 progression. *Nature (London)* 1993 May 13; 363(6425):170–2.

176. Tulipano G, Faggi L, Cacciamali A, Spinello M, Cocchi D, Giustina A. Role of AMP-activated protein kinase activators in antiproliferative multi-drug pituitary tumour therapies: effects of combined treatments with compounds affecting the mTOR-p70S6 kinase axis in cultured pituitary tumour cells. *J Neuroendocrinol* 2015; 27(1):20–32. doi: 10.1111/jne.12231.
177. Huynh TN, Santini E, Klann E. Requirement of Mammalian target of rapamycin complex 1 downstream effectors in cued fear memory reconsolidation and its persistence. *The Journal of Neuroscience* 2014; 34(27):9034–9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0878-14.2014.
178. Pan S-T, Qin Y, Zhou Z-W, He Z-X, Zhang X, Yang T et al. Plumbagin induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via p38 MAPK- and PI3K/Akt/mTOR-mediated pathways in human tongue squamous cell carcinoma cells. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9:1601–26. doi: 10.2147/DDDT.S76057.
179. Hemstrom T, Sandstrom M, Zhivotovsky B. Inhibitors of the PI3-kinase/Akt pathway induce mitotic catastrophe in non-small cell lung cancer cells. *International Journal of Cancer* 2006 Sep 01; 119(5):1028–38.
180. Pearson RB, Dennis PB, Han JW, Williamson NA, Kozma SC, Wettenhall RE et al. The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal* 1995; 14(21):5279–87.
181. Palmer A, Gavin A-C, Nebreda AR. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *EMBO Journal* 1998; 17(17):5037–47.
182. Wang R, Jung SY, Wu CF, Qin J, Kobayashi R, Gallick GE et al. Direct roles of the signaling kinase RSK2 in Cdc25C activation during *Xenopus* oocyte maturation. *PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(46):19885–90. doi: 10.1073/pnas.1003528107.
183. Daksis JI, Lu RY, Facchini LM, Marhin WW, Penn LJZ. Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 1994; 9(12):3635–45.

184. Q Q, J J, L L, S C, D X, W J et al. Downregulation of RSK2 influences the biological activities of human osteosarcoma cells through inactivating AKT/mTOR signaling pathways. *International Journal of Oncology* 2016 Jun; 48(6):2508–20.
185. Tanimura S, Hashizume J, Kurosaki Y, Sei K, Gotoh A, Ohtake R et al. SH3P2 is a negative regulator of cell motility whose function is inhibited by ribosomal S6 kinase-mediated phosphorylation. *Genes to Cells* 2011 May; 16(5):514–26.
186. Aiken J, Birot O. The Vascular Endothelial Growth Factor-A phosphorylates Murine Double Minute-2 on its Serine 166 via the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and p90 Ribosomal S6 Kinase in primary human endothelial cells. 0006-291X. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.150.
187. Hammoud L, Adams JR, Loch AJ, Marcellus RC, Uehling DE, Aman A et al. Identification of RSK and TTK as Modulators of Blood Vessel Morphogenesis Using an Embryonic Stem Cell-Based Vascular Differentiation Assay. *Stem Cell Reports* 2016; 7(4):787–801. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.004.
188. Maier E, Attenberger F, Tiwari A, Lettau K, Rebholz S, Fehrenbacher B et al. Dual Targeting of Y-Box Binding Protein-1 and Akt Inhibits Proliferation and Enhances the Chemosensitivity of Colorectal Cancer Cells. *Cancers* 2019; 11(4). doi: 10.3390/cancers11040562.
189. Edgar A, Trost M, Watts V, Zaru R. A combination of SILAC and nucleotide acyl phosphate labelling reveals unexpected targets of the Rsk inhibitor BI-D1870. *Biosci Rep* 2014 02 01; 34(1).
190. Chen S, Mackintosh C. Differential regulation of NHE1 phosphorylation and glucose uptake by inhibitors of the ERK pathway and p90RSK in 3T3-L1 adipocytes. *Cellular Signalling* 2009; 21(12):1984–93. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.09.009.
191. Buttarelli M, Babini G, Raspaglio G, Filippetti F, Battaglia A, Ciucci A et al. A combined ANXA2-NDRG1-STAT1 gene signature predicts response to chemoradiotherapy in cervical cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38. doi: 10.1186/s13046-019-1268-y.
192. Yardley DA. Combining mTOR Inhibitors with Chemotherapy and Other Targeted Therapies in Advanced Breast Cancer: Rationale, Clinical Experience, and Future Directions. *Breast Cancer (Auckl)* 2013; 7:7–22. doi: 10.4137/BCBCR.S10071.

193. Wang Z, Huang Y, Zhang J. Molecularly targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway can sensitize cancer cells to radiotherapy and chemotherapy. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2014 Jun; 19(2):233–42.
194. Yasumizu Y, Miyajima A, Kosaka T, Miyazaki Y, Kikuchi E, Oya M. Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Sensitizes Docetaxel in Castration Resistant Prostate Cancer. *Journal of Urology* 2014; 191(1):227–34. Verfügbar unter: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=fulltext&D=ovft&NEWS=N&LIN KOUT=Y&CSC=Y&AN=00076734-201401000-00089>.
195. Hać A, Pierzynowska K, Herman-Antosiewicz A. S6K1 Is Indispensible for Stress-Induced Microtubule Acetylation and Autophagic Flux. *Cells* 2021; 10(4). doi: 10.3390/cells10040929.
196. Hong S-E, Shin K-S, Lee Y-H, Seo S-K, Yun S-M, Choe T-B et al. Inhibition of S6K1 enhances dichloroacetate-induced cell death. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141(7):1171–9. doi: 10.1007/s00432-014-1887-9.
197. Shen H, Wang G-C, Li X, Ge X, Wang M, Shi Z-M et al. S6K1 blockade overcomes acquired resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2020; 39(49):7181–95. doi: 10.1038/s41388-020-01497-4.
198. Zhang Y, Wang Q, Chen L, Yang H-S. Inhibition of p70S6K1 Activation by Pcd4 Overcomes the Resistance to an IGF-1R/IR Inhibitor in Colon Carcinoma Cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 2015; 14(3):799–809. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0648.
199. You KS, Yi YW, Cho J, Seong Y-S. Dual Inhibition of AKT and MEK Pathways Potentiates the Anti-Cancer Effect of Gefitinib in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Cancers* 2021; 13(6). doi: 10.3390/cancers13061205.
200. Stratford AL, Reipas K, Hu K, Fotovati A, Brough R, Frankum J et al. Targeting p90 ribosomal S6 kinase eliminates tumor-initiating cells by inactivating Y-box binding protein-1 in triple-negative breast cancers. *Stem Cells* 2012; 30(7):1338–48. doi: 10.1002/stem.1128.
201. Stratford AL, Fry CJ, Desilets C, Davies AH, Cho YY, Li Y et al. Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008; 10(6):R99. doi: 10.1186/bcr2202.

202. Tiwari A, Rebholz S, Maier E, Dehghan Harati M, Zips D, Sers C et al. Stress-Induced Phosphorylation of Nuclear YB-1 Depends on Nuclear Trafficking of p90 Ribosomal S6 Kinase. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(8). doi: 10.3390/ijms19082441.
203. Kuwano M, Oda Y, Izumi H, Yang S-J, Uchiumi T, Iwamoto Y et al. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics* 2004; 3(11):1485–92.
204. Fujimoto N, Shiota M, Kubo T, Matsumoto T. Novel therapeutic strategies following docetaxel-based chemotherapy in castration-resistant prostate cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2010; 3(6):785–95. doi: 10.1586/ecp.10.119.
205. Shiota M, Yokomizo A, Fujimoto N, Kuruma H, Naito S. Castration-resistant prostate cancer: novel therapeutics pre- or post- taxane administration. *Curr Cancer Drug Targets* 2013; 13(4):444–59. doi: 10.2174/15680096113139990078.
206. Shiota M, Itsumi M, Yokomizo A, Takeuchi A, Imada K, Kashiwagi E et al. Targeting ribosomal S6 kinases/Y-box binding protein-1 signaling improves cellular sensitivity to taxane in prostate cancer. *Prostate* 2014; 74(8):829–38. doi: 10.1002/pros.22799.
207. Roffe M, Lupinacci F, Soares L, Hajj G, Martins V. Two widely used RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, alter mTORC1 signaling in a RSK-independent manner. *Cellular Signalling* 2015 Aug; 27(8):1630–42.
208. Lee JT, Lehmann BD, Terrian DM, Chappell WH, Stivala F, Libra M et al. Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle* 2008; 7(12):1745–62. doi: 10.4161/cc.7.12.6166.
209. Lu X, Yang F, Chen D, Zhao Q, Chen D, Ping H et al. Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Biol Sci* 2020; 16(7):1121–34. doi: 10.7150/ijbs.41686.
210. Qian DZ, Rademacher BLS, Pittsenbarger J, Huang C-Y, Myrthue A, Higano CS et al. CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity. *Prostate* 2010; 70(4):433–42. doi: 10.1002/pros.21077.
211. Dittmann H, Jusufoska A, Dohmen BM, Smyczek-Gargya B, Fersis N, Pritzkow M et al. 3'-Deoxy-3'-(18)Ffluorothymidine (FLT) uptake in breast cancer cells as a

- measure of proliferation after doxorubicin and docetaxel treatment. *Nucl Med Biol* 2009; 36(2):163–9. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2008.10.012.
212. Direcks W, Berndsen S, Proost N, Peters G, Balzarini J, Spreeuwenberg M et al. [18F]FDG and [18F]FLT uptake in human breast cancer cells in relation to the effects of chemotherapy: an in vitro study. *British Journal of Cancer* 2008 Aug 05; 99(3):481–7.
213. Dittmann H, Dohmen BM, Kehlbach R, Bartusek G, Pritzkow M, Sarbia M et al. Early changes in 18FFLT uptake after chemotherapy: an experimental study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29(11):1462–9. doi: 10.1007/s00259-002-0925-z.
214. Schelhaas S, Wachsmuth L, Hermann S, Rieder N, Heller A, Heinzmann K et al. Thymidine Metabolism as a Confounding Factor for 3'-Deoxy-3'-18F-Fluorothymidine Uptake After Therapy in a Colorectal Cancer Model. *J Nucl Med* 2018; 59(7):1063–9. doi: 10.2967/jnumed.117.206250.
215. Hatano K, Yamaguchi S, Nimura K, Murakami K, Nagahara A, Fujita K et al. Residual prostate cancer cells after docetaxel therapy increase the tumorigenic potential via constitutive signaling of CXCR4, ERK1/2 and c-Myc. *Mol Cancer Res* 2013; 11(9):1088–100. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0029-T.
216. Willers H, Azzoli CG, Santivasi WL, Xia F. Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. *Cancer J* 2013; 19(3):200–7. doi: 10.1097/PPO.0b013e318292e4e3.
217. Li J, Jiang K, Qiu X, Li M, Hao Q, Wei L et al. Overexpression of CXCR4 is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *BMB reports* 2014; 47(1):33–8. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.1.069.
218. Conley-LaComb K, Saliganan A, Kandagatla P, Chen Y, Cher M, Chinni S. PTEN loss mediated Akt activation promotes prostate tumor growth and metastasis via CXCL12/CXCR4 signaling.
219. Werner C, Dirsch O, Dahmen U, Grimm M-O, Schulz S, Lupp A. Evaluation of Somatostatin and CXCR4 Receptor Expression in a Large Set of Prostate Cancer Samples Using Tissue Microarrays and Well-Characterized Monoclonal Antibodies. *Translational Oncology* 2020; 13(9):100801. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100801.

220. Schwarzenböck S, Stenzel J, Otto T, Helldorff HV, Bergner C, Kurth J et al. [68 Ga]pentixafor for CXCR4 imaging in a PC-3 prostate cancer xenograft model - comparison with [18 F]FDG PET/CT, MRI and ex vivo receptor expression. *Oncotarget* 2017. doi: 10.18632/oncotarget.21024.
221. Chen Q, Zhong T. The association of CXCR4 expression with clinicopathological significance and potential drug target in prostate cancer: a meta-analysis and literature review. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9:5115–22. doi: 10.2147/DDDT.S82475.
222. Lee JY, Kang DH, Chung DY, Kwon JK, Lee H, Cho NH et al. Meta-Analysis of the Relationship between CXCR4 Expression and Metastasis in Prostate Cancer. *World J Mens Health* 2014; 32(3):167–75. doi: 10.5534/wjmh.2014.32.3.167.
223. Shimizu T, Tolcher AW, Papadopoulos KP, Beeram M, Rasco DW, Smith LS et al. The clinical effect of the dual-targeting strategy involving PI3K/AKT/mTOR and RAS/MEK/ERK pathways in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2012; 18(8):2316–25. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2381.
224. Casalvieri K, Matheson C, Backos D, Reigan P. Molecular docking of substituted pteridinones and pyrimidines to the ATP-binding site of the N-terminal domain of RSK2 and associated MM/GBSA and molecular field datasets. *Data in Brief* 2020 Apr; 29:105347.
225. Casalvieri K, Matheson C, Backos D, Reigan P. Substituted pteridinones as p90 ribosomal S6 protein kinase (RSK) inhibitors: A structure-activity study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2020 03 01; 28(5):115303.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wichtige Signalwege der S6K und der RSK und Ansatzpunkte der im Rahmen dieser Studie untersuchten Inhibitoren. Aktivierung (Schwarz), Hemmung (Rot).	7
Abbildung 2: Chemische Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit benutzten Inhibitoren. Die S6K- und RSK-Hemmer nach Sellekchem.com und PDA-66 nach Kretzschmar, Roolf <i>et al.</i> 2014 [94].	12
Abbildung 3: Dosis-Wirkungskurven für Docetaxel nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC ₅₀ -Werte nach $t_1 = 24$ h, 48 h und 72 h.	40
Abbildung 4: Dosis-Wirkungskurven für PF-4708671 nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC ₅₀ -Werte nach $t_1 = 24$ h, 48 h und 72 h.	41
Abbildung 5: Dosis-Wirkungskurven für LY2584702 nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC ₅₀ -Werte nach $t_1 = 24$ h, 48 h und 72 h.	43
Abbildung 6: Dosis-Wirkungskurven für AT7867 nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC ₅₀ -Werte nach $t_1 = 24$ h, 48 h und 72 h.	44
Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurven für LJI308 nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.	45
Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurven für BI-D1870 nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC ₅₀ -Werte nach $t_1 = 24$ h, 48 h und 72 h.	46
Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurven für PDA-66 nach Inkubationsdauer (t_1) 72 h für (A) Lebendzellzahl, (C) Vitalität, (D) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) IC ₅₀ -Werte nach $t_1 = 72$ h.	47

Abbildung 10: Auswirkung einer Kombinationstherapie von LY2584702 (LY), PF-4708671 (PF) und AT7867 (AT) mit Docetaxel (DTX) auf die Zelllinie L929; normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Untersuchte Konzentrationen sind als Ziffer im Namen angegeben: Inhibitoren in μM , DTX in nM. (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen. Unbehandelte Kontrolle (KNT, Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Signifikante Unterschiede der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet..... 49

Abbildung 11: Auswirkung einer Kombinationstherapie von BI-D1870 (BID), LJI 308 (LJI) und PDA-66 (PDA) mit Docetaxel (DTX) auf die Zelllinie L929; normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Untersuchte Konzentrationen sind als Ziffer im Namen angegeben: Inhibitoren in μM , DTX in nM. (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen. Unbehandelte Kontrolle (KNT, Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Signifikante Unterschiede der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet..... 50

Abbildung 12: Auswirkung einer Kombinationstherapie von LY2584702 (LY), PF-4708671 (PF) und AT7867 (AT) mit Docetaxel (DTX) auf die Zelllinie PC-3; normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Untersuchte Konzentrationen sind als Ziffer im Namen angegeben: Inhibitoren in μM , DTX in nM. (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen. Unbehandelte Kontrolle (KNT, Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Signifikante Unterschiede der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet..... 52

Abbildung 13: Auswirkung einer Kombinationstherapie von BI-D1870 (BID), LJI 308 (LJI) und PDA-66 (PDA) mit Docetaxel (DTX) auf die Zelllinie PC-3; normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Untersuchte Konzentrationen sind als Ziffer im Namen angegeben: Inhibitoren in μM , DTX in nM. (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen. Unbehandelte Kontrolle (KNT, Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Signifikante Unterschiede der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet..... 53

Abbildung 14: Auswirkung einer Kombinationstherapie von LY2584702 (LY), PF-4708671 (PF), AT7867 (AT), BI-D1870 (BID), LJI 308 (LJI) und PDA-66 (PDA) mit Docetaxel

(DTX) auf die Lebendzellzahl von LNCaP. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung, die Konzentrationen für die Inhibitoren sind in μM und für DTX in nM angegeben. Unbehandelte Kontrolle (Schwarz), DTX Mono (Grau), Inhibitor Mono (Dunkel), Kombination (Hell). Keine signifikanten Unterschiede der Kombination gegenüber der Monotherapie ($p < 0,05$). 54

Abbildung 15: Anzahl der L929 Zellen nach Gating des Zelldebris und Apoptoserate der Zellen in Prozent. (A) Apoptoserate nach 24 h, (B) Debrisgating nach 24 h, (C) Apoptoserate nach 72 h, (D) Debrisgating nach 72 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7868 (Rot), LJI308 (Blau), BI-D1870 (Violett) und PDA-66 (Orange). Dunkel ist die niedrigere Konzentration dargestellt und hell die höhere. Signifikante Unterschiede der Monotherapien gegenüber der Kontrolle und der Kombinationstherapien gegenüber der Monotherapie sind mit * dargestellt ($p < 0,05$). Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM..... 57

Abbildung 16: Anzahl der PC-3 Zellen nach Gating des Zelldebris und Apoptoserate der Zellen in Prozent. (A) Apoptoserate nach 24 h, (B) Debrisgating nach 24 h, (C) Apoptoserate nach 72 h, (D) Debrisgating nach 72 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Rot), LJI308 (Blau), BI-D1870 (Violett) und PDA-66 (Orange). Dunkel ist die niedrigere Konzentration dargestellt und hell die höhere. Signifikante Unterschiede der Monotherapien gegenüber der Kontrolle und der Kombinationstherapien gegenüber der Monotherapie sind mit * dargestellt ($p < 0,05$). Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM..... 59

Abbildung 17: Verteilung der L929 auf G1-/S-/G2-Phase nach 24 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Blau) und BI-D1870 (Rot) jeweils in zwei Konzentrationen (Dunkel/Hell) in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 5 nM und 25 nM (Schraffiert). Signifikante Unterschiede der Monotherapie gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Monotherapie sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). (A) G1-Phase, (B) S-Phase, (C) G2-Phase. Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM. 61

Abbildung 18: Verteilung der L929 auf G1-/S-/G1-Phase nach 72 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Rot), LJI308 (Blau), BI-D1870 (Violett) und PDA-66 (Orange) jeweils in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 5 nM (Schraffiert). Signifikante Unterschiede der Monotherapie gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Monotherapie sind mit * gekennzeichnet (p

< 0,05). (A) G1-Phase, (B) S-Phase, (C) G2-Phase. Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM.	62
Abbildung 19: Verteilung der PC-3 auf G1-/S-/G2- Phase nach 24 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Blau) und BI-D1870 (Rot) jeweils in zwei Konzentrationen (Dunkel/Hell) in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 1 nM und 5 nM (Schraffiert). Signifikante Unterschiede der Monotherapie gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Monotherapie sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). (A) G1-Phase, (B) S-Phase, (C) G2-Phase. Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM.	63
Abbildung 20: Verteilung der PC-3 auf G1-/S-/G2- Phase nach 72 h. Kontrolle (Schwarz), Docetaxel (Grau), PF-4708671 (Grün), LY2584702 (Gelb), AT7867 (Rot), LJI308 (Blau), BI-D1870 (Violett) und PDA-66 (Orange) jeweils in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 1 nM (Schraffiert). Signifikante Unterschiede der Monotherapie gegenüber der Kontrolle und der Kombination gegenüber der Monotherapie sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$). (A) G1-Phase, (B) S-Phase, (C) G2-Phase. Inhibitoren in μM und Docetaxel in nM.	65
Abbildung 21: Fluoreszenz der Gesamt- und phosphorylierten Proteine S6K, RSK und RPS6 in L929-Zellen. Dargestellt ist die auf die Kontrolle normierte Medianfluoreszenz aus drei unabhängigen Messungen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die phosphorylierte Form ist in Schwarz dargestellt und die Gesamtproteinmenge in Grau. Signifikante Unterschiede zwischen Gesamt- und phosphoryliertem Protein sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$). (A) RSK, (B) RPS6, (C) S6K. Docetaxel in nM, Inhibitoren in μM	69
Abbildung 22: Fluoreszenz der Gesamt- und phosphorylierten Proteine S6K, RSK und RPS6 in PC-3-Zellen. Dargestellt ist die auf die Kontrolle normierte Medianfluoreszenz aus drei unabhängigen Messungen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die phosphorylierte Form ist in Schwarz dargestellt und die Gesamtproteinmenge in Grau. Signifikante Unterschiede zwischen Gesamt- und phosphoryliertem Protein sind mit einem Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$) (A) RSK, (B) RPS6, (C) S6K. Docetaxel in nM, Inhibitoren in μM	71
Abbildung 23: FLT-Aufnahme pro Zelle L929; normiert auf die Kontrolle (Schwarz). Alle Inhibitoren (Blau) wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet, jeweils in Monotherapie und in Kombination mit 5 nM Docetaxel (Schraffiert). Die Einheiten der Inhibitoren sind in μM angegeben, die von Docetaxel in nM. Dargestellt sind die Mittelwerte	

und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$).	73
Abbildung 24: FLT-Aufnahme pro Zelle PC-3; normiert auf die Kontrolle (Schwarz). Alle Inhibitoren (Blau) wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen getestet, jeweils in Monotherapie und in Kombination mit 1 nM Docetaxel (Schraffiert). Die Einheiten der Inhibitoren sind in μM angegeben, die von Docetaxel in nM. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.....	73
Abbildung 25: $[^{99\text{mTC}}]\text{O}_2\text{-AMD3100}$ -Aufnahme pro Zelle; L929 normiert auf die Kontrolle. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel 1 nM und 25 nM gemessen. In Schwarz sind die Monotherapien und die unbehandelte Kontrolle dargestellt, in Blau die Varianten mit Docetaxel 1 nM und in Rot die Varianten mit Docetaxel 25 nM. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle oder der Monotherapie mit Docetaxel sind mit * gekennzeichnet.....	75
Abbildung 26: $[^{99\text{mTC}}]\text{O}_2\text{-AMD3100}$ -Aufnahme pro Zelle PC-3; normiert auf die Kontrolle. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration in Monotherapie und in Kombination mit Docetaxel (1 nM und 25 nM) gemessen. In Schwarz sind die Monotherapien und die unbehandelte Kontrolle dargestellt, in Blau die Varianten mit Docetaxel 1 nM und in Rot die Varianten mit Docetaxel 25 nM. Signifikante Unterschiede im Vergleich zu der Kontrolle oder der Monotherapie mit Docetaxel sind mit * gekennzeichnet	76
Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurven für Docetaxel nach Inkubationsdauer (t_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.....	139
Abbildung 28: Dosis-Wirkungskurven für Docetaxel nach Inkubationsdauer (t_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.....	139
Abbildung 29: Dosis-Wirkungskurven für PF-4708671 nach Inkubationsdauer (t_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. .	140
Abbildung 30: Dosis-Wirkungskurven für PF-4708671 nach Inkubationsdauer (t_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. .	140

Abbildung 31: Dosis-Wirkungskurven für LY2584702 nach Inkubationsdauer (t_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. . 141

Abbildung 32: Dosis-Wirkungskurven für LY2584702 nach Inkubationsdauer (t_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. . 141

Abbildung 33: Dosis-Wirkungskurven für AT7867 nach Inkubationsdauer (t_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. 142

Abbildung 34: Dosis-Wirkungskurven für AT7867 nach Inkubationsdauer (t_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. 142

Abbildung 35: Dosis-Wirkungskurven für LJI308 nach Inkubationsdauer (t_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. 143

Abbildung 36: Dosis-Wirkungskurven für LJI308 nach Inkubationsdauer (t_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. 143

Abbildung 37: Dosis-Wirkungskurven für BI-D1870 nach Inkubationsdauer (t_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. 144

Abbildung 38: Dosis-Wirkungskurven für BI-D1870 nach Inkubationsdauer (t_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle. 144

Abbildung 39: Zellzyklusanalyse von L929 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Duplettenausschluss, (C) G1- (Blau), S- (Gelb) und G2- (Grün) Phase 145

Abbildung 40: Zellzyklusanalyse von L929 nach 72 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Duplettenausschluss, (C) G1- (Blau), S- (Gelb) und G2- (Grün) Phase 145

Abbildung 41: Zellzyklusanalyse von PC-3 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Duplettenausschluss, (C) G1- (Blau), S- (Gelb) und G2- (Grün) Phase 146

Abbildung 42: Zellzyklusanalyse von PC-3 nach 72 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Duplettenausschluss, (C) G1- (Blau), S- (Gelb) und G2- (Grün) Phase 146

Abbildung 43: Apoptose Messung von L929 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen. 147

Abbildung 44: Apoptose Messung von L929 nach 72 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen.	147
Abbildung 45: Apoptose Messung von PC-3 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen.	148
Abbildung 46: Apoptose Messung von PC-3 nach 72 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen.	148
Abbildung 47: Fluoreszenzmessung von L929 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) p-RSK, (C) p-RPS6, (D) p-S6K.....	149
Abbildung 48: Fluoreszenzmessung von L929 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) RSK, (C) RPS6, (D) S6K.....	149
Abbildung 49: Fluoreszenzmessung von PC-3 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) p-RSK, (C) p-RPS6, (D) p-S6K.....	150
Abbildung 50: Fluoreszenzmessung von PC-3 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) RSK, (C) RPS6, (D) S6K.....	150

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vereinfachte Darstellung der TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach 8. Auflage der TNM-Klassifikation (17) inklusive klinischer Einteilung.....	3
Tabelle 2: Versuchsparameter Apoptose-Assays	34
Tabelle 3: Tabelle der CI-Werte nach Chou 2006 (154).....	38
Tabelle 4: Konzentrationen, Signifikanzen und CI-Werte der Kombinationstherapien der drei Zelllinien. Farbig markiert der CI-Effekt: synergistisch (Grün), additiv (Gelb), antagonistisch (Rot). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind mit einem + gekennzeichnet, nicht signifikante mit einem -. In den Klammern stehen die postulierten Zielstrukturen der Inhibitoren.	55
Tabelle 5: Wirkung der Inhibitoren auf verschiedene Parameter der untersuchten Zelllinien L929 (Blau), PC-3 (Rot) oder beide (Weiß). Großer Pfeil = starke und signifikante Wirkung. Kleiner Pfeil = nicht signifikante oder schwache Wirkung. Querpfeil = keine wesentliche Veränderung. - = nicht untersucht oder nicht beschrieben. Via. = Vitalität, Vol. = Zellvolumen, Lit. = Literatur.....	79
Tabelle 6: Übersicht zu Versuchsaufbauten: untersuchte Zelllinien.....	151
Tabelle 7: Übersicht zu Versuchsaufbauten: untersuchte Zeitpunkte	151
Tabelle 8: Übersicht zu Versuchsaufbauten: Kombinationen und Konzentrationen für L929-Zellen.....	152
Tabelle 9: Übersicht zu Versuchsaufbauten: Kombinationen und Konzentrationen für PC-3-Zellen.....	153
Tabelle 10: Übersicht zu Versuchsaufbauten: Kombinationen und Konzentrationen für LNCaP-Zelle.....	153

8 Abkürzungsverzeichnis

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	MTT
3-phosphoinositide-dependent kinase	PDK1
7-Aminoactinomycin	7AAD
Adenosintriphosphat	ATP
Akute lymphatische Leukämie	ALL
Akute myeloische Leukämie	AML
AT7867	AT
Bcl-2-antagonist of cell death	BAD
Bcl-2-associated X protein	BAX
BI-D1870	BID
Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase	Camk
calmodulin-dependent protein kinase	Camk
cAMP response element-binding protein	CREB
cAMP responsive element modulator	CREM
Cell division cycle 25	Cdc25
Checkpoint kinase 1	Chk1
chemokine ligand 2	CCL2
Combination Index	CI
Computertomographie	CT
Counts per minute	cpm
Counts per second	cps
C-terminale Kinasedomäne	CTK
CXC-Motiv-Chemokin 12	CXCL12
CXC-Motiv-Chemokinrezeptor-4	CXCR-4
Cyclin dependent kinase 1	cdk1
Desoxyribonukleinsäure	DNS
Digital rektale Untersuchung	DRU
Dimethylsulfoxid	DMSO
Docetaxel	DTX

Epidermal growth factor	EGF
Epidermal growth factor-receptor	EGFR
Eukaryotic elongation factor-2 kinase	eEF2K
Eukaryotic translation initiation factor 4B	eIF4B
Extracellular-signal regulated kinases	ERK
Fetales Kälberserum	FKS
Fluoresceinisothiocyanat	FITC
Fluorescence activated cell sorting	FACS
Fluorothymidin F-18	[¹⁸ F]FLT
Forkhead in rhabdomyosarcoma	FKHR
Forkhead in rhabdomyosarcoma ligand	FLHRL
Glykogensynthase-Kinase 3	GSK3 β
Gonadotropin-Releasing-Hormon	GnRH
heat shock proteins	HSP
Human double minute 2	HDM2
Human embryonic kidney cells 293	HEK293
Human epidermal growth factor receptor 2	HER2
Insulin-like growth factor	IGF
Insulin-like growth factor receptor	IGFR
Kastrationsresistentes Prostatakarzinom	CRPC
Kilodalton	kDa
Kleinzelliges Lungenkarzinom	SCLC
LJI308	LJI
LY2584702	LY
Lymphocyte-oriented kinase	Lok
macrophage inhibitory cytokine-1	MIC-1
Macrophage Stimulating 1	Mst1
Magnetresonanztomographie	MRT
Mechanistic Target of Rapamycin	mTOR
Mitogen-activated protein kinase	MAPK
Mitogen-aktivierte Kinase	MEK
Mittlere inhibitorische Konzentration	IC ₅₀
Murine double minute 2-protein	mdm2

Myelin transcription factor 1	MYT-1
Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	NSCLC
N-terminale Kinasedomäne	NTK
nuclear factor kappa B	NF- κ B
nucleus localization signal	NLS
Östrogen Rezeptor	ER
P90 ribosomale S6 Kinase	RSK
PDA-66	PDA
PF-4708671	PF
P-Glykoprotein	p-gp
Phosphatase and Tensin homolog	PTEN
Phosphat-gepufferte Salzlösung	PBS
Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat	PIP3
phosphoinositide 3-kinase	PI3K
Phosphoinositide-dependent kinase-1	PDK1
Polo-like kinase	PLK
Positronen-Emissions-Tomographie	PET/CT
Prostata-spezifisches Membranantigen	PSMA
Prostata-spezifisches-Antigen	PSA
Protein 21	p21
Protein 38	p38
Protein 53	p53
Proteinkinase A, G, und C Familie	ACG
Proteinkinase B	Akt
Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin	Rictor
Rapidly growing fibrosarcoma	RAF
Rat-sarcoma	Ras
Ribosomale S6 Kinase	S6K
Ribosomales S6 Protein	RPS6
Signal transducer and activator of transcription	Stat
Sphingosinkinase 1	SphK1

Abkürzungsverzeichnis

Spindle assembly checkpoint	SAC
STE20-like kinase	slk
transforming growth factor- β 1	TGF- β 1
Transrektaler Ultraschall	TRUS
Triple negative breast cancer	TNBC
Tyrosin kinase 1	TK1
Y-box-binding protein	YB-1

9 Thesepapier

1. Alle untersuchten S6k- und RSK-Inhibitoren (PF-4708671, LY2584702, AT7867, LJI308 und BI-D1870) hemmen signifikant die Phosphorylierung des RPS6 und damit die von ihnen adressierten Kinasen.
2. Während sich die Prostatakarzinomzelllinien hochsensibel gegenüber Docetaxel zeigen, reagiert die murine Zelllinie L929 deutlich resistenter. Es finden sich in Übereinstimmung mit Literaturdaten Hinweise, dass L929 durch vermehrte Autophagie einer Docetaxel induzierten Apoptose entgehen, ein Mechanismus, welcher für Taxan-resistente Prostatakarzinomzellen nachweisbar ist.
3. Bei PF-4708671 und LY2584702 handelt es sich um S6K-Inhibitoren, welche G1-Arrest vermittelt überwiegend proliferationshemmende Eigenschaften auf Prostatakarzinomzellen besitzen. Der Inhibitor LY2584702 zeigt gegenüber PF-4708671 eine höhere Potenz. Diese Erkenntnis spricht in Übereinstimmung mit Literaturdaten für eine pan-S6K-Hemmung durch LY2584702 im Gegensatz zum S6K1-Inhibitor PF-4708671. Die Kombination von PF-4708671 und LY2584702 mit Docetaxel führt zu einer Wirksteigerung in den Prostatakarzinomzellen. Die Versuche mit der Zelllinie L929 sprechen in Übereinstimmung mit Literaturdaten für eine deutliche Wirksteigerung insbesondere bei Docetaxel-Resistenz.
4. Als oral verfügbares Pharmakon besitzt AT7867 inhibitorische Eigenschaften nicht nur für S6K, sondern auch für PKA und Akt. Es handelt sich um ein sehr potentes Pharmakon, welches neben proliferationshemmenden Eigenschaften auch signifikante zelltoxische Eigenschaften besitzt. In der Kombination mit Docetaxel ist eine Therapie mit AT7867 nicht effektiv und sinnvoll.
5. Bei BI-D1870 handelt es sich um einen RSK-Hemmer, welcher in hohem Maße proliferationshemmend und zellschädigend wirkt. Während dies bei Prostatakarzinomzellen mit G2-Phase Arrest einhergeht, zeigen L929 Zellen G1-Phase Arrest. In der Kombination mit Docetaxel erzielt BI-D1870 nur mäßige Effekte in den Prostatakarzinomzellen. Die Versuche mit L929 zeigen in Übereinstimmung mit Literaturdaten allerdings starke Hinweise für eine Synergie bei Docetaxel-Resistenz.

6. LJI308 zeigt als RSK-Hemmer sowohl auf Proliferation als auch auf Zelltod der untersuchten Zellen wenig Wirkung, eine Kombination mit Docetaxel ist durch Antagonismus geprägt.
7. PDA-66 führt als Tubulin-Hemmer effektiv zu einem G2-Phasen Arrest und zu Proliferationsstopp in den untersuchten Zellen. Eine Kombination mit Docetaxel erreicht hingegen nur wenig Wirkungsverstärkung.
8. Eine Proliferationshemmung mittels FLT-Aufnahmemessungen ist nur durch die Inhibitoren und ihre Kombination mit Docetaxel in L929 nachweisbar. In allen anderen Varianten bleibt die FLT-Aufnahme unverändert oder steigt sogar an.
9. Eine Behandlung von L929-Zellen und PC-3-Zellen mit Docetaxel führt zu einer signifikanten Zunahme der CXCR4-Rezeptor-Oberflächenexpression. Eine Kombination mit den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten S6K- und RSK-Inhibitoren verhindert diese Oberflächenexpressionssteigerung nicht, sondern führt tendenziell zu einer weiteren Erhöhung. Dies kann potenziell erhöhte Malignität und Metastasierungsfähigkeit der Zellen nach Therapie bedeuten, bietet aber zugleich diagnostische Ansatzpunkte.

10 Anhang

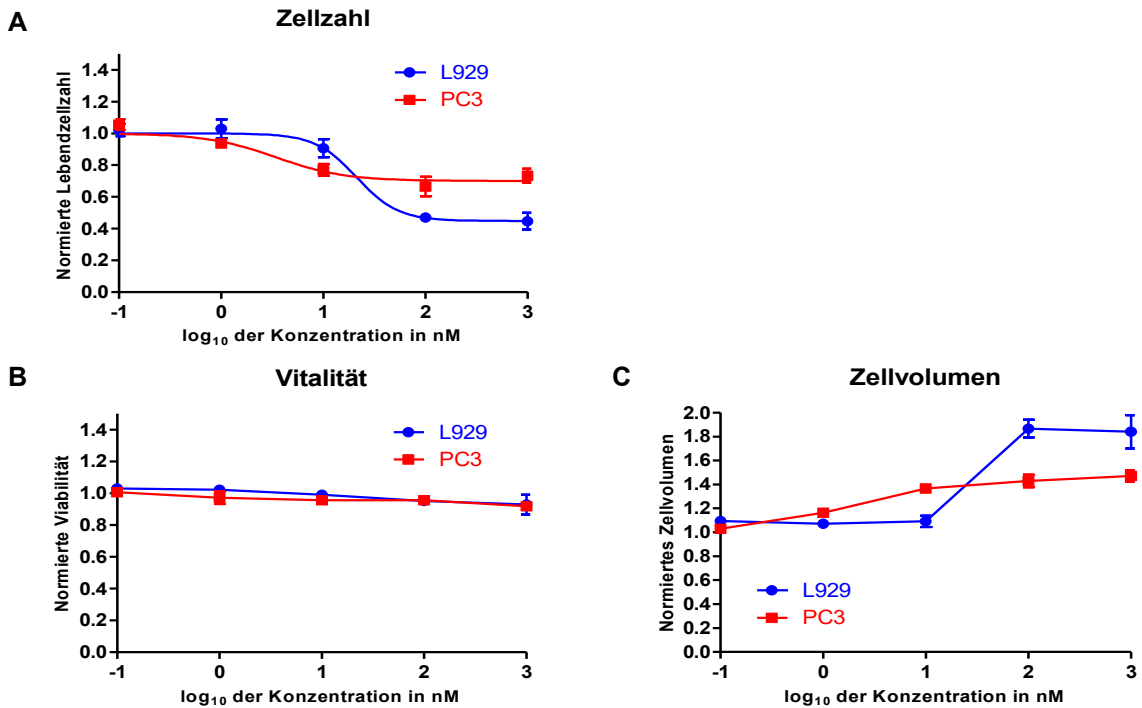


Abbildung 27: Dosis-Wirkungskurven für Docetaxel nach Inkubationsdauer (t_1) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

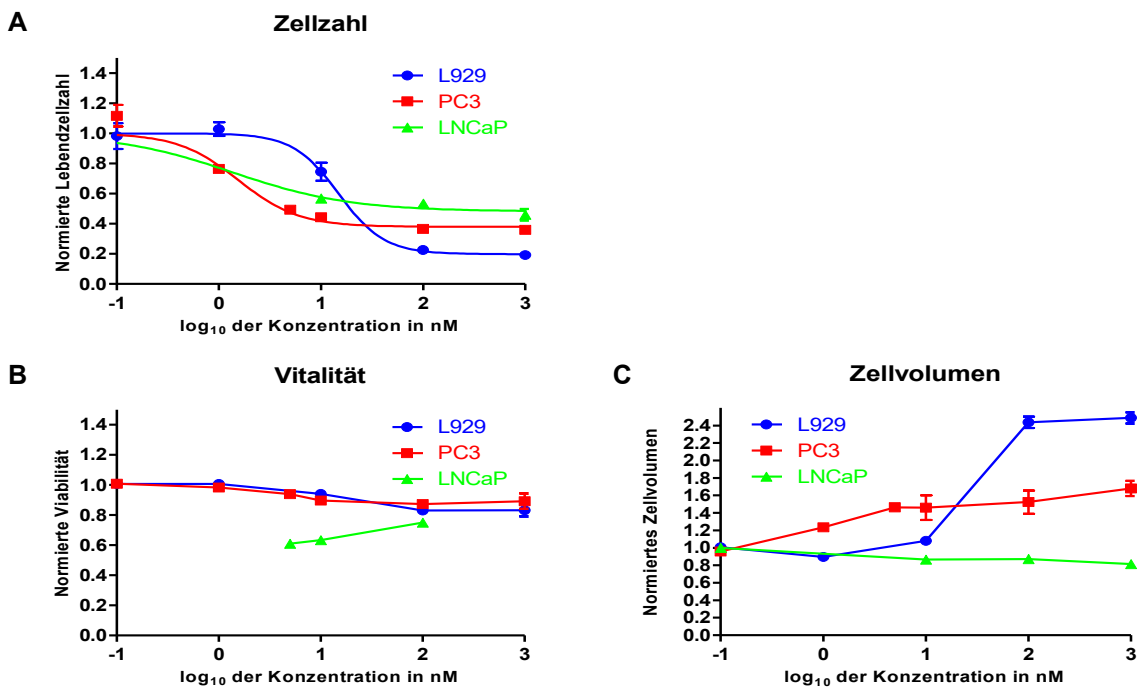


Abbildung 28: Dosis-Wirkungskurven für Docetaxel nach Inkubationsdauer (t_1) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

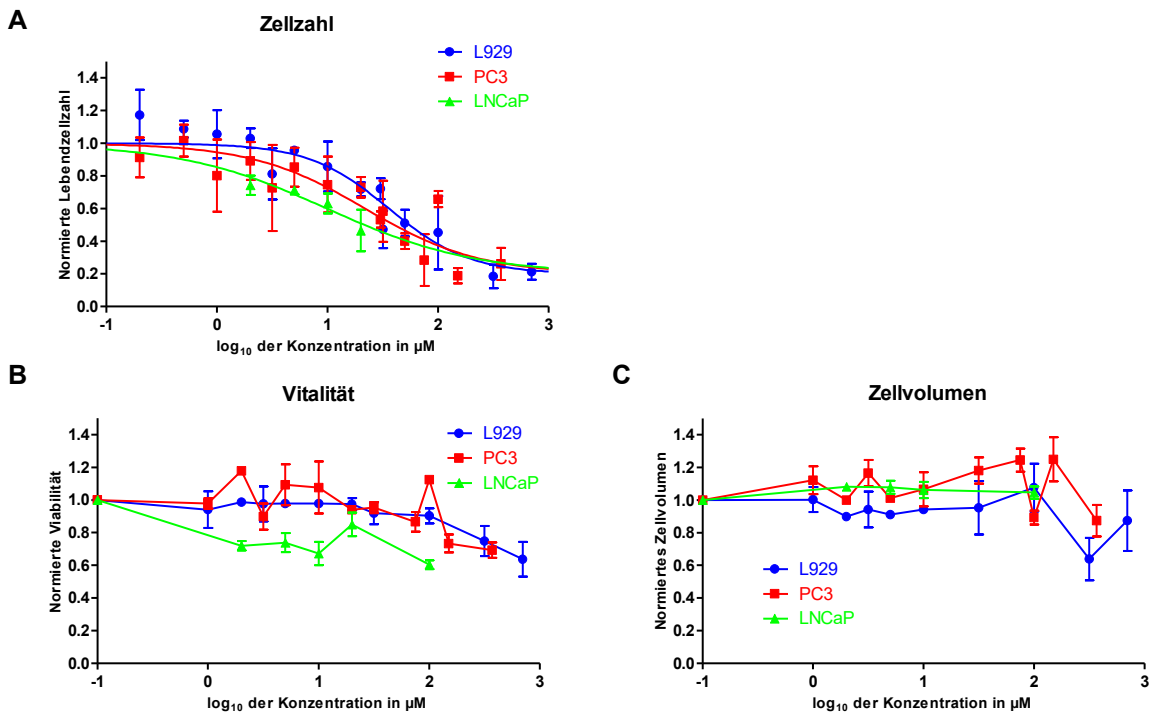


Abbildung 29: Dosis-Wirkungskurven für PF-4708671 nach Inkubationsdauer (t_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

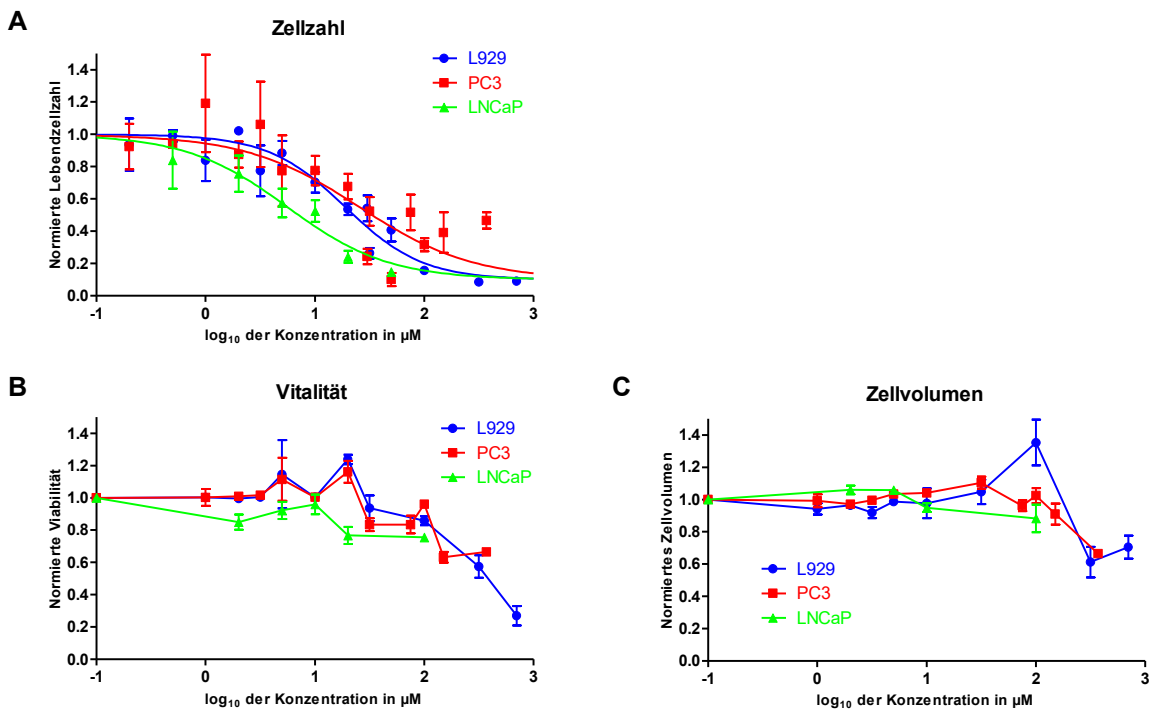


Abbildung 30: Dosis-Wirkungskurven für PF-4708671 nach Inkubationsdauer (t_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

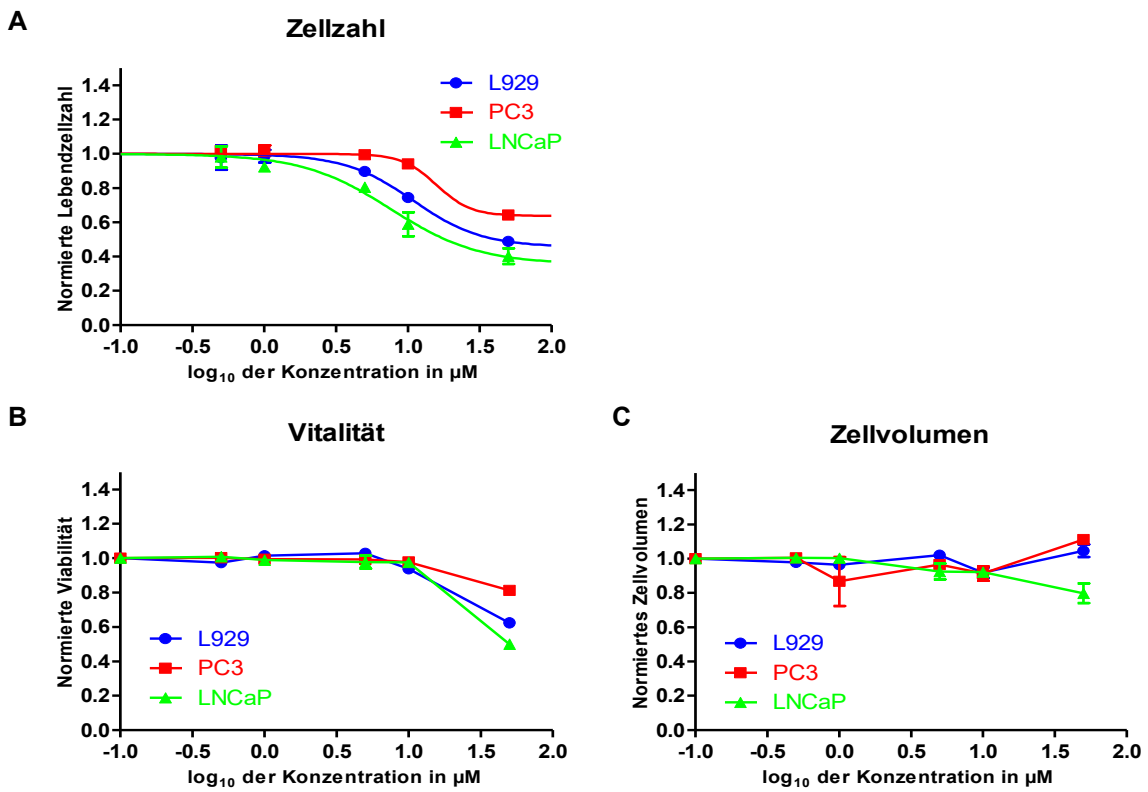


Abbildung 31: Dosis-Wirkungskurven für LY2584702 nach Inkubationsdauer (t_1) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

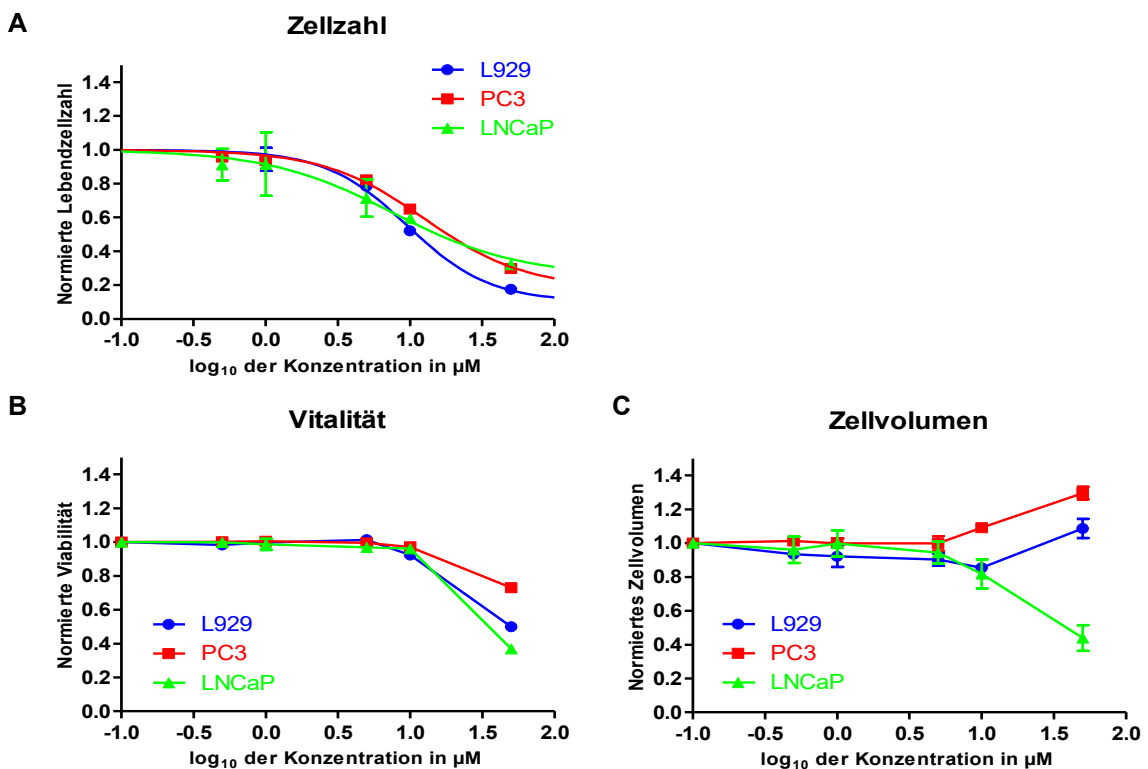


Abbildung 32: Dosis-Wirkungskurven für LY2584702 nach Inkubationsdauer (t_1) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

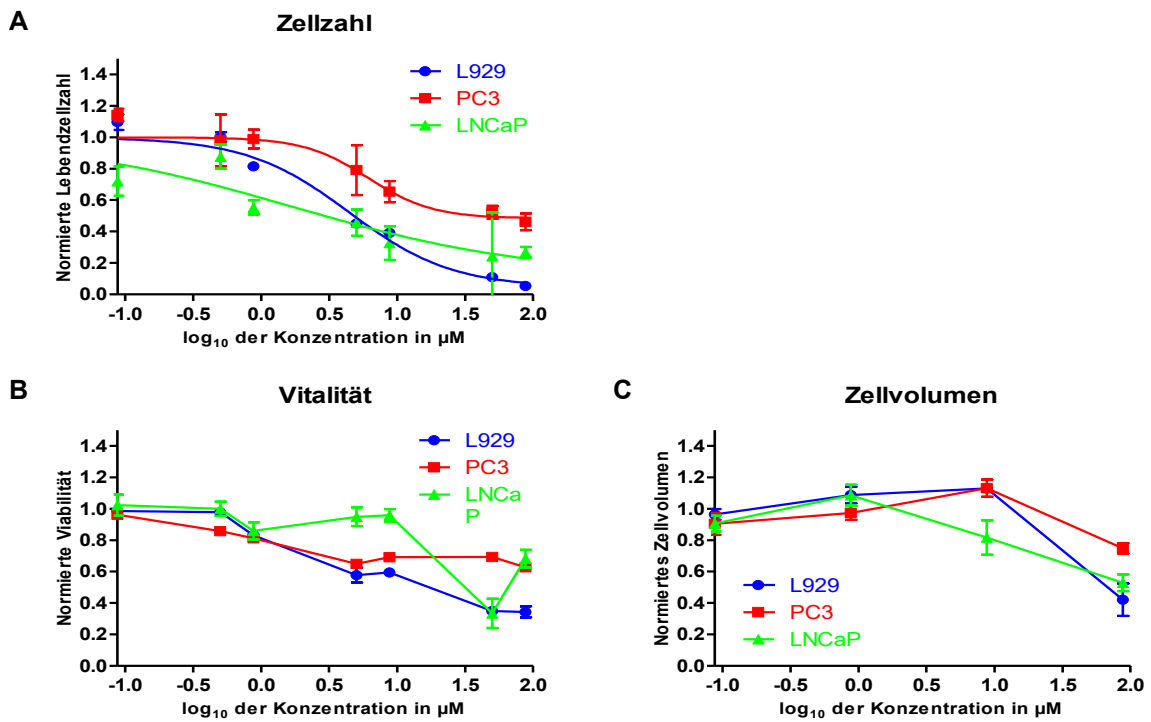


Abbildung 33: Dosis-Wirkungskurven für AT7867 nach Inkubationsdauer (*t*_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

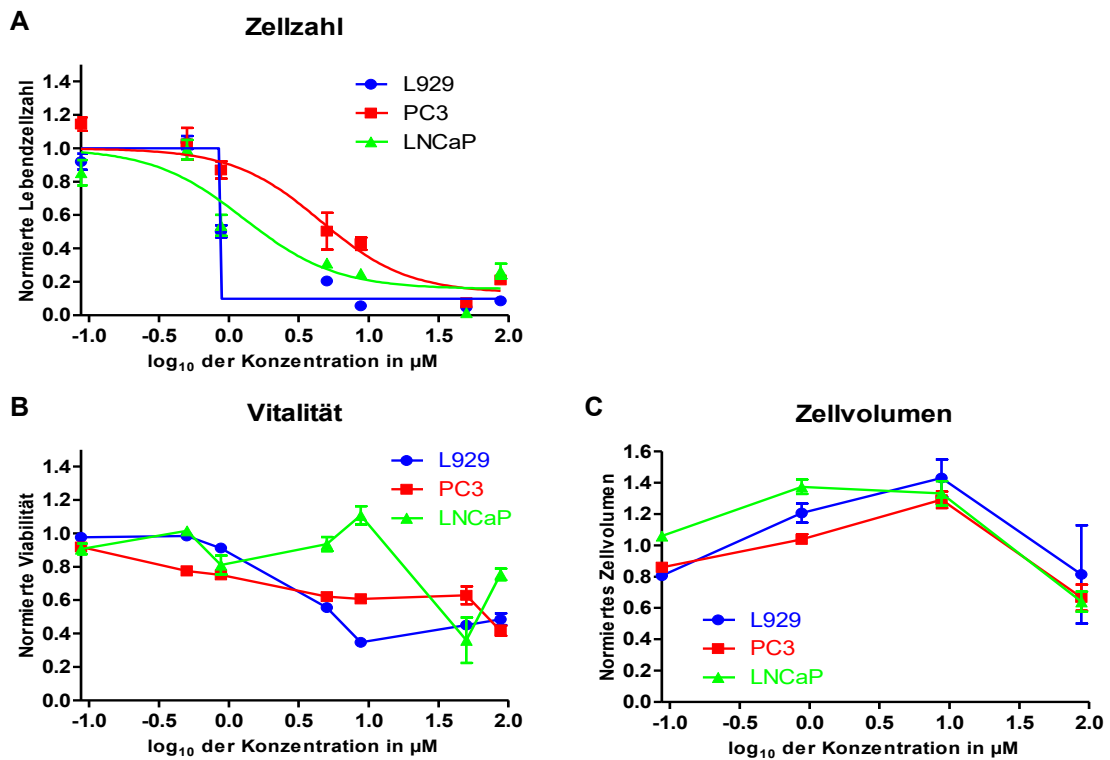


Abbildung 34: Dosis-Wirkungskurven für AT7867 nach Inkubationsdauer (*t*_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

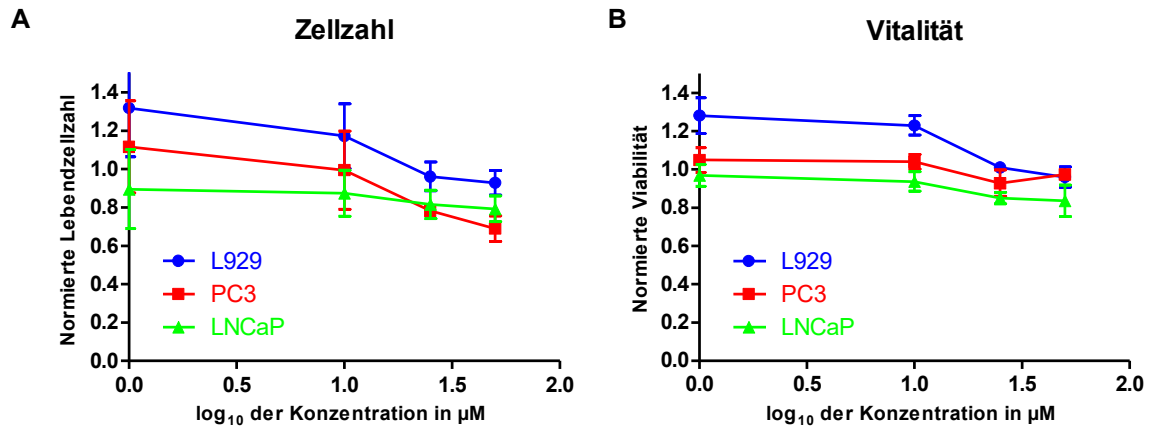


Abbildung 35: Dosis-Wirkungskurven für LJI308 nach Inkubationsdauer (t_i) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

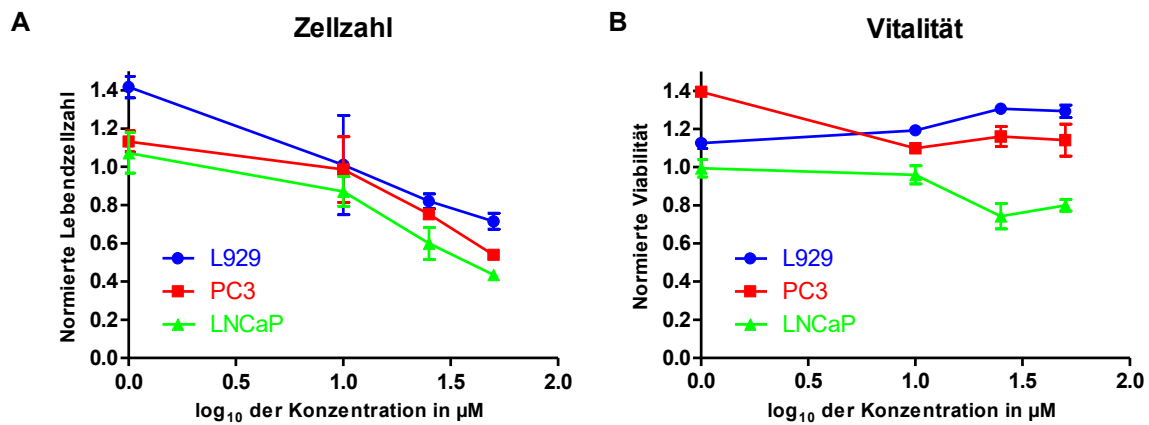


Abbildung 36: Dosis-Wirkungskurven für LJI308 nach Inkubationsdauer (t_i) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

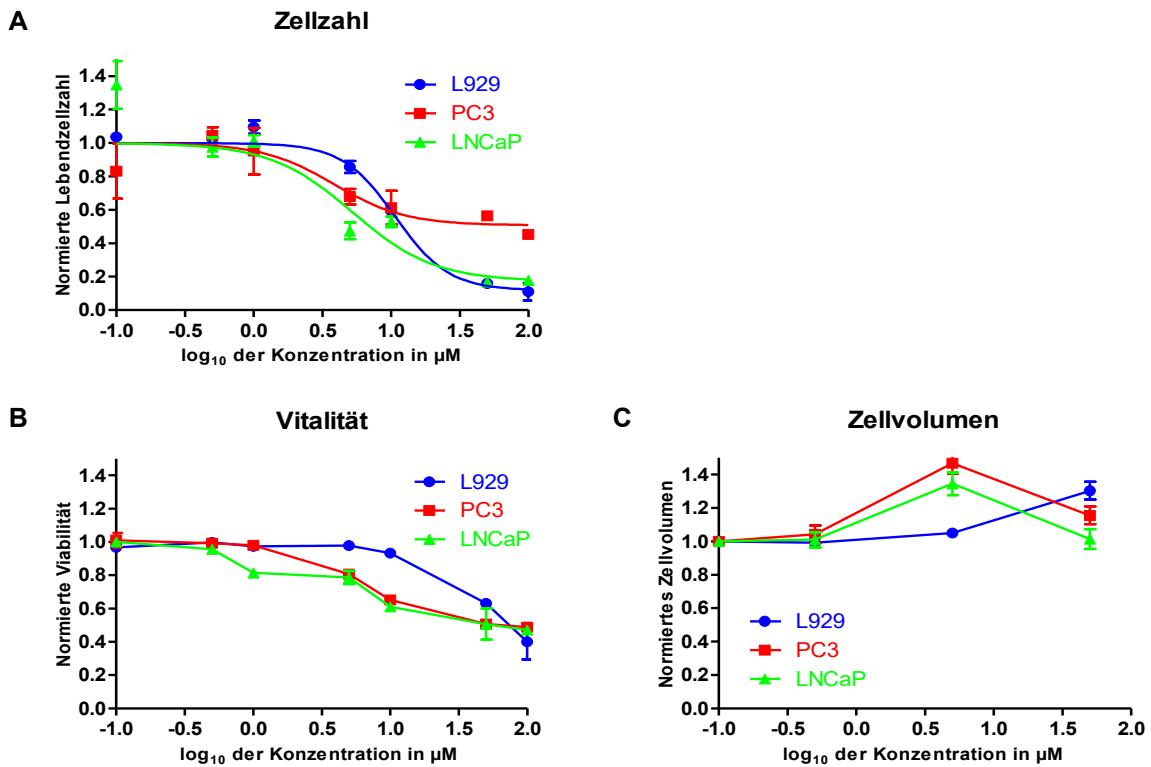


Abbildung 37: Dosis-Wirkungskurven für BI-D1870 nach Inkubationsdauer (n) 24 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

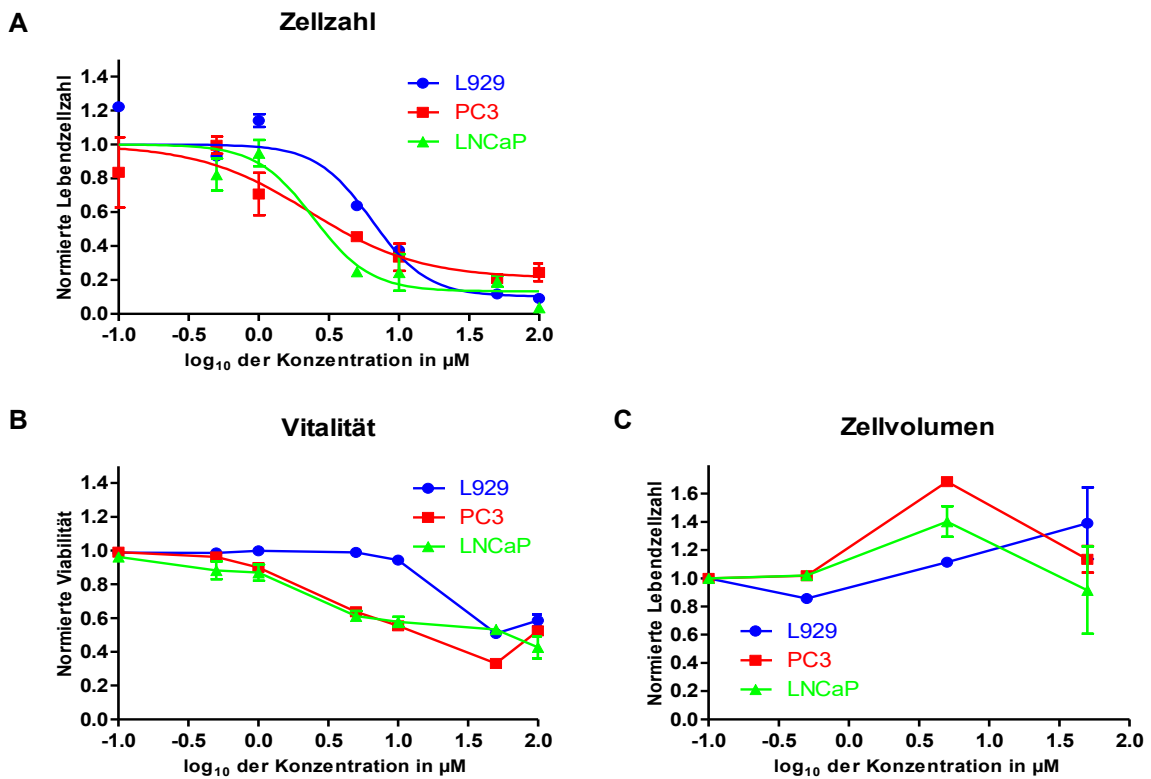


Abbildung 38: Dosis-Wirkungskurven für BI-D1870 nach Inkubationsdauer (n) 48 h für (A) Lebendzellzahl, (B) Vitalität, (C) Zellvolumen der untersuchten Zelllinien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

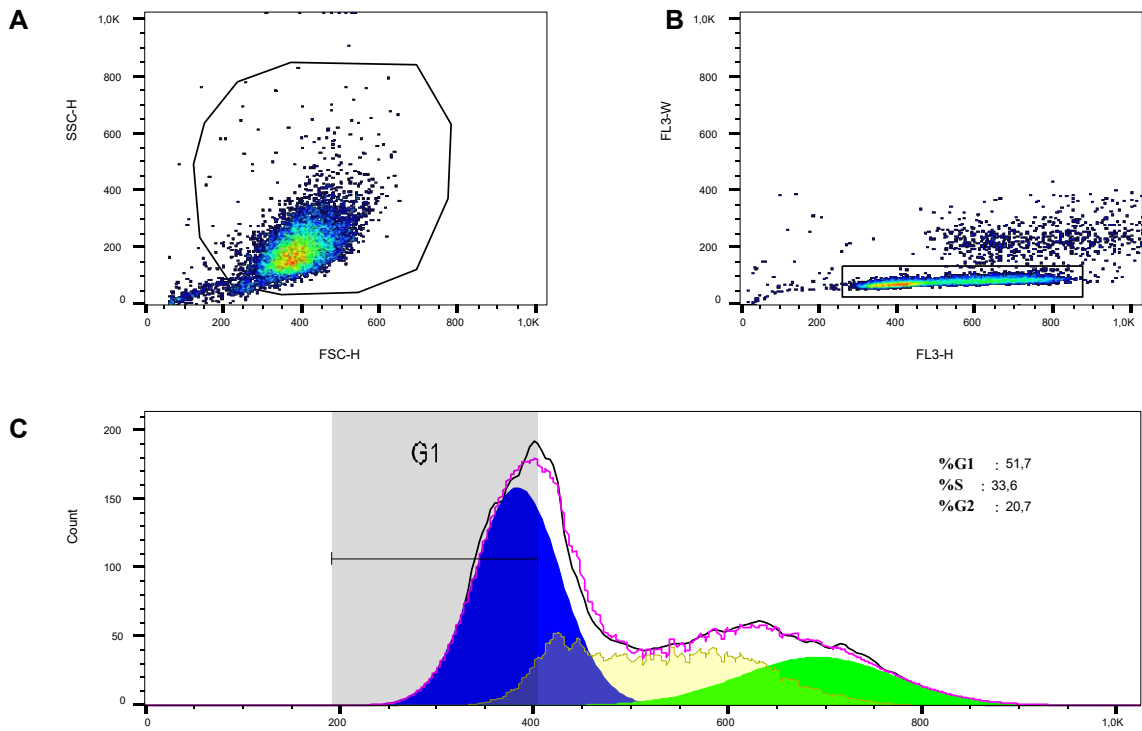


Abbildung 39: Zellzyklusanalyse von L929 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Duplettenausschluss, (C) G1- (Blau), S- (Gelb) und G2- (Grün) Phase

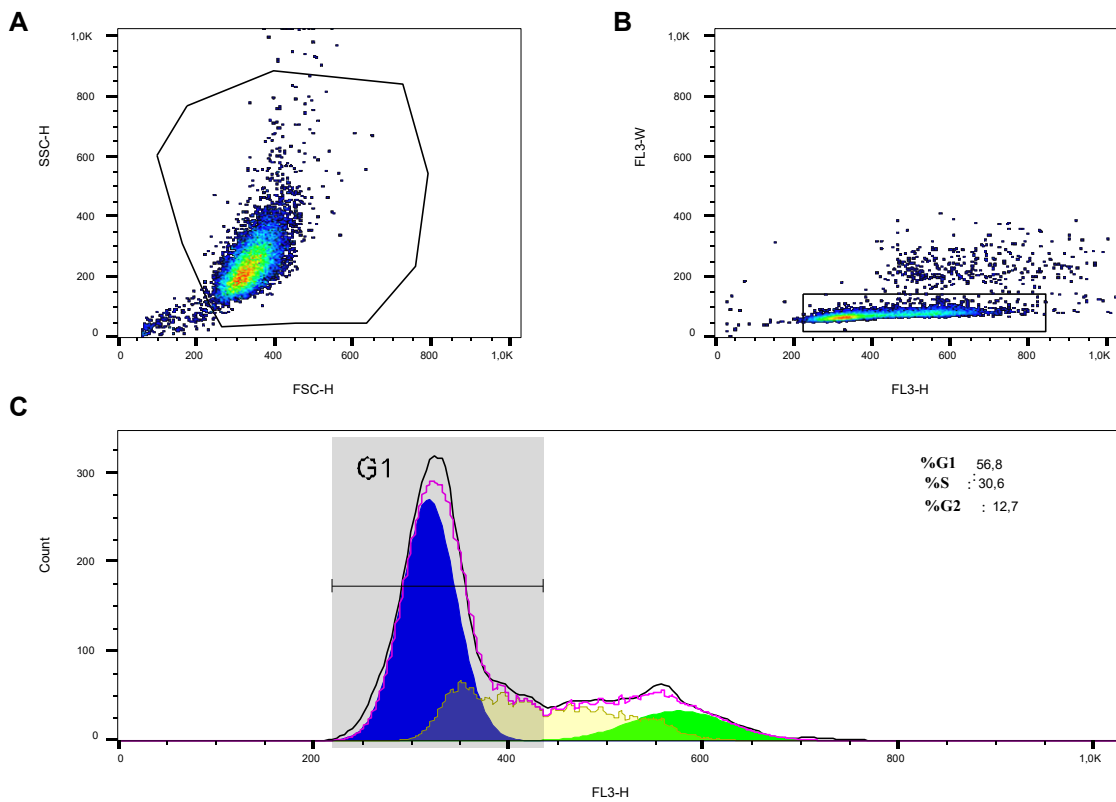


Abbildung 40: Zellzyklusanalyse von L929 nach 72 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Duplettenausschluss, (C) G1- (Blau), S- (Gelb) und G2- (Grün) Phase

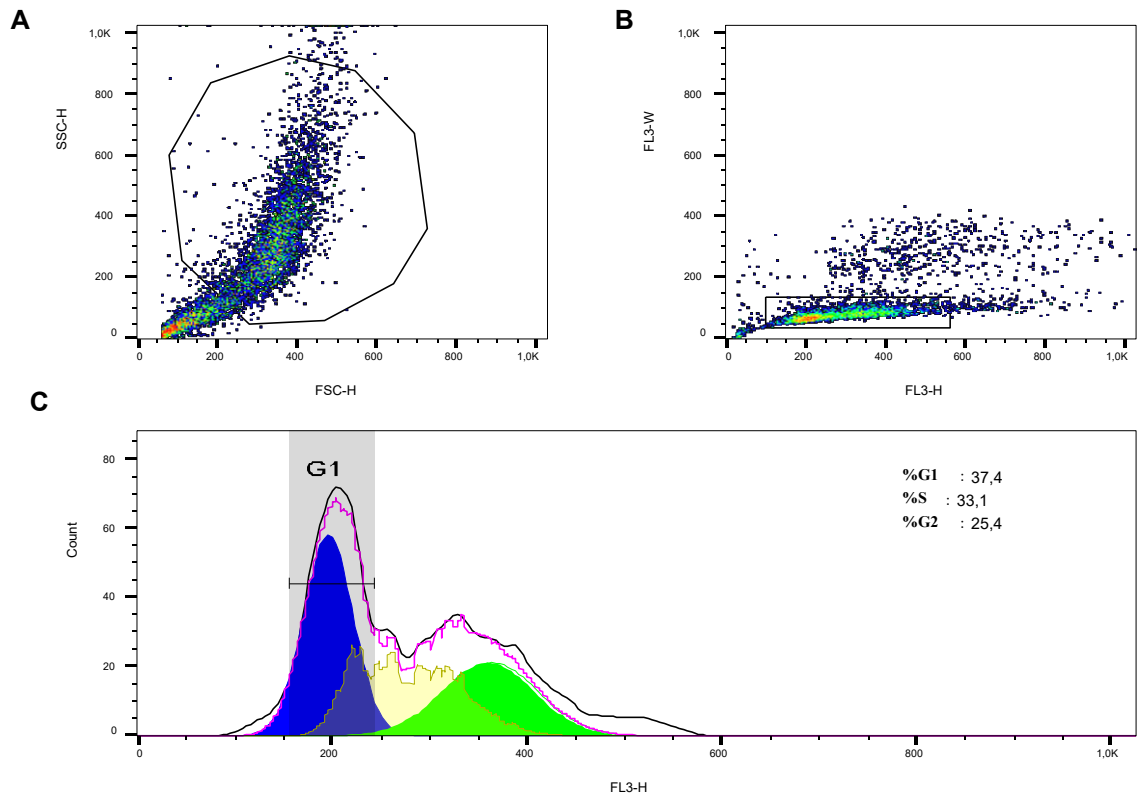


Abbildung 41: Zellzyklusanalyse von PC-3 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Duplettenausschluss, (C) G1- (Blau), S- (Gelb) und G2- (Grün) Phase

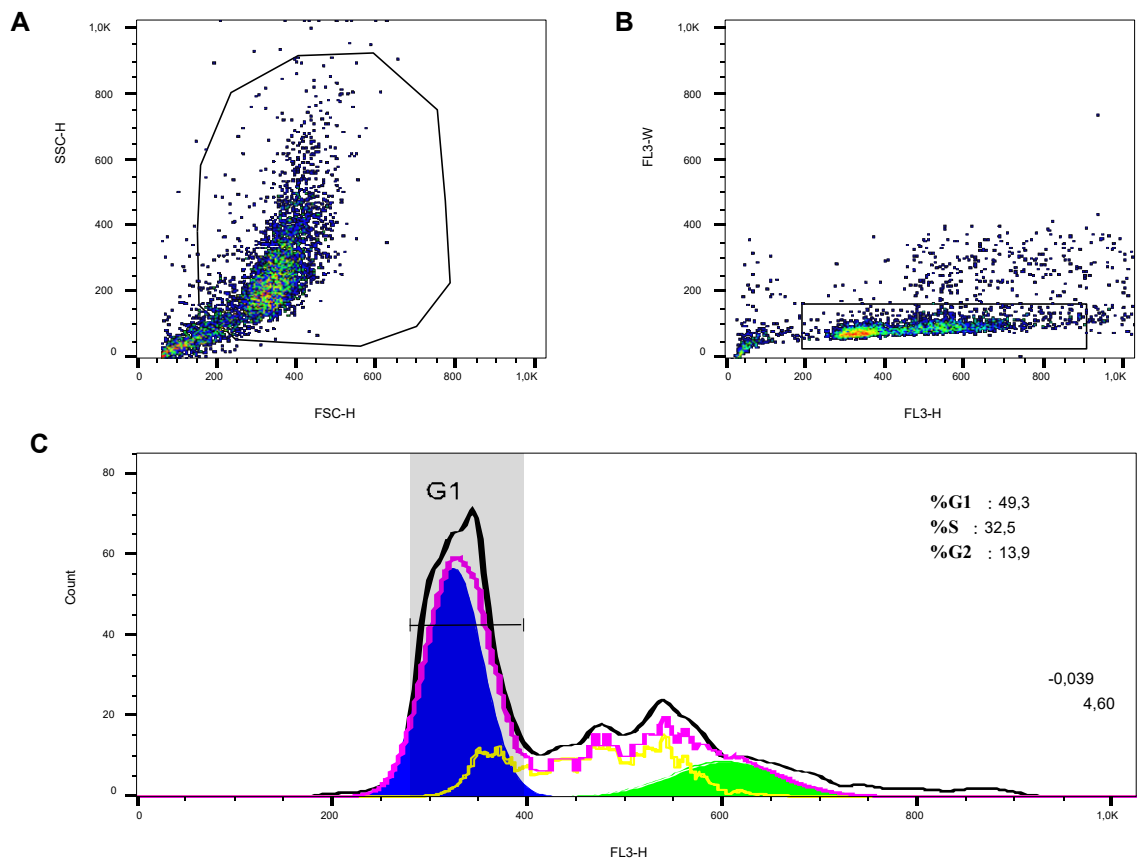


Abbildung 42: Zellzyklusanalyse von PC-3 nach 72 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Duplettenausschluss, (C) G1- (Blau), S- (Gelb) und G2- (Grün) Phase

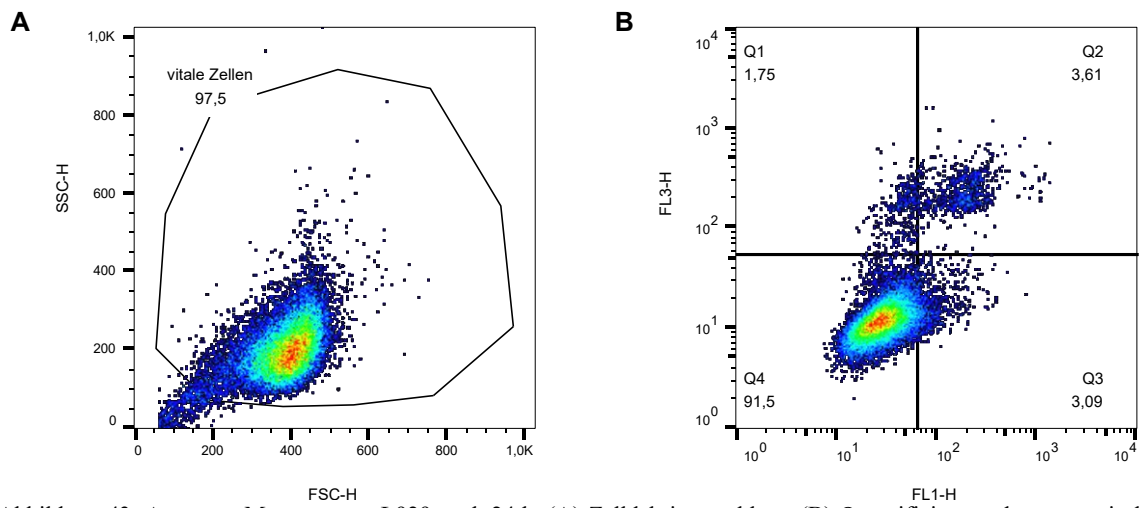


Abbildung 43: Apoptose Messung von L929 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen.

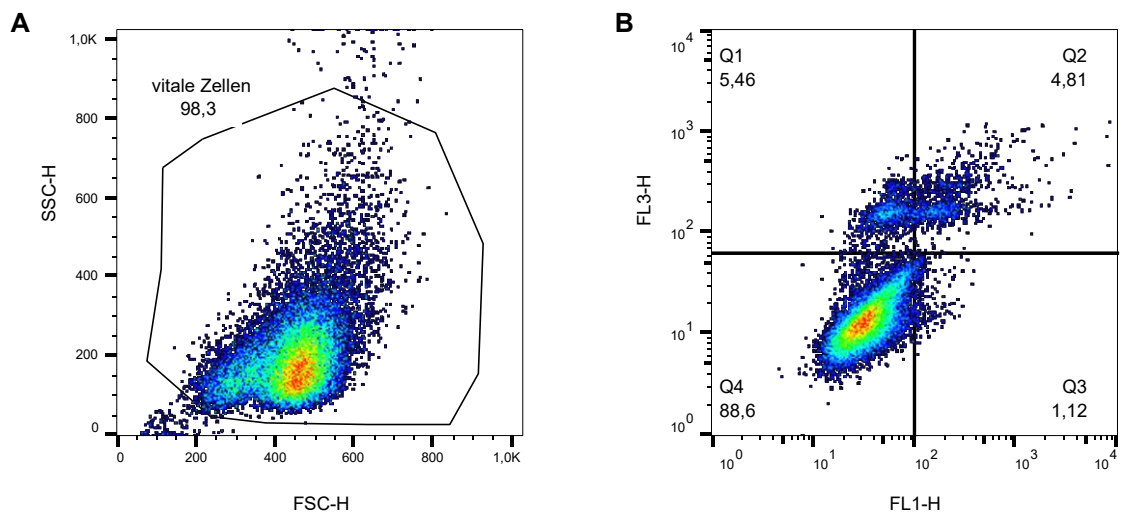


Abbildung 44: Apoptose Messung von L929 nach 72 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen.

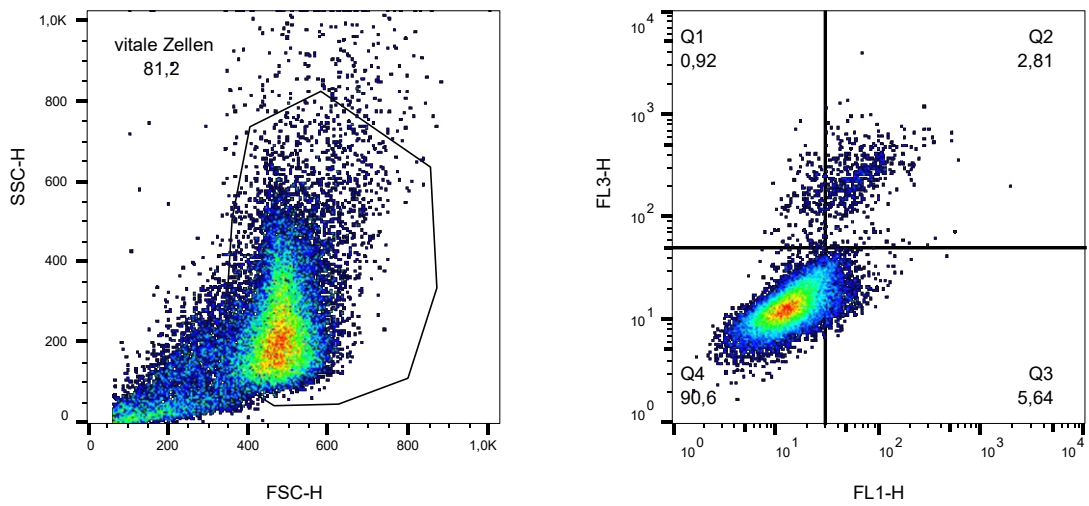


Abbildung 45: Apoptose Messung von PC-3 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen.

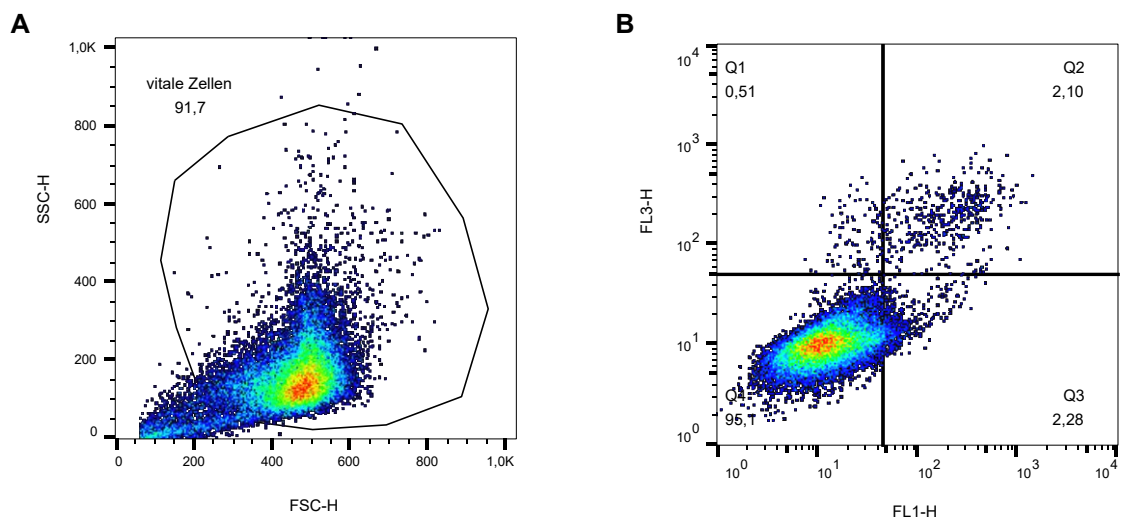


Abbildung 46: Apoptose Messung von PC-3 nach 72 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) Quantifizierung der apoptotischen Zellen.

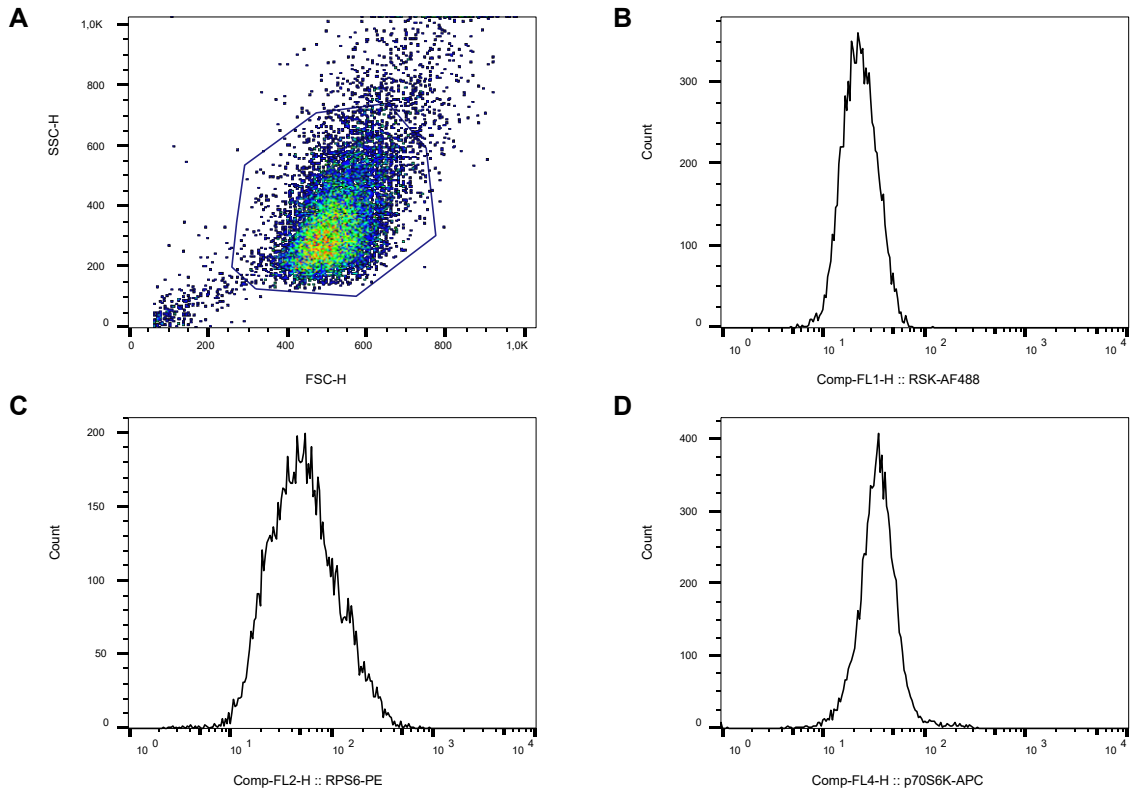


Abbildung 47: Fluoreszenzmessung von L929 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) p-RSK, (C) p-RPS6, (D) p-S6K.

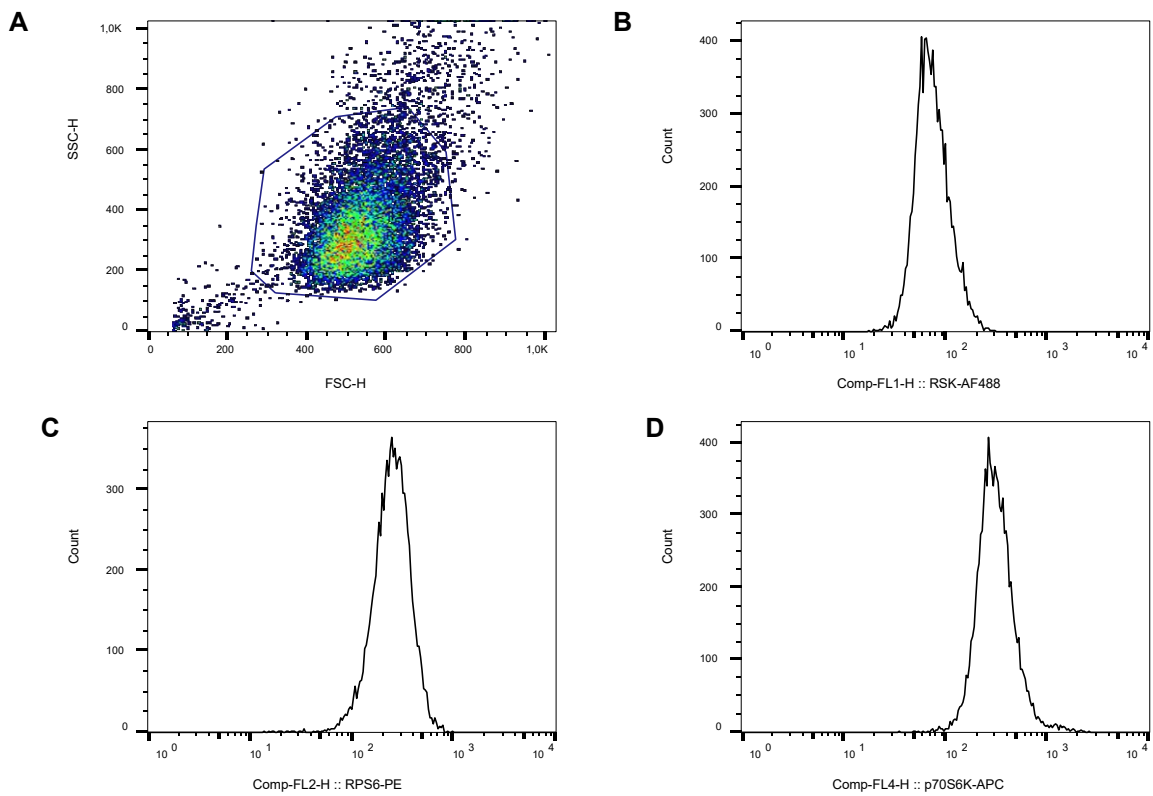


Abbildung 48: Fluoreszenzmessung von L929 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) RSK, (C) RPS6, (D) S6K.

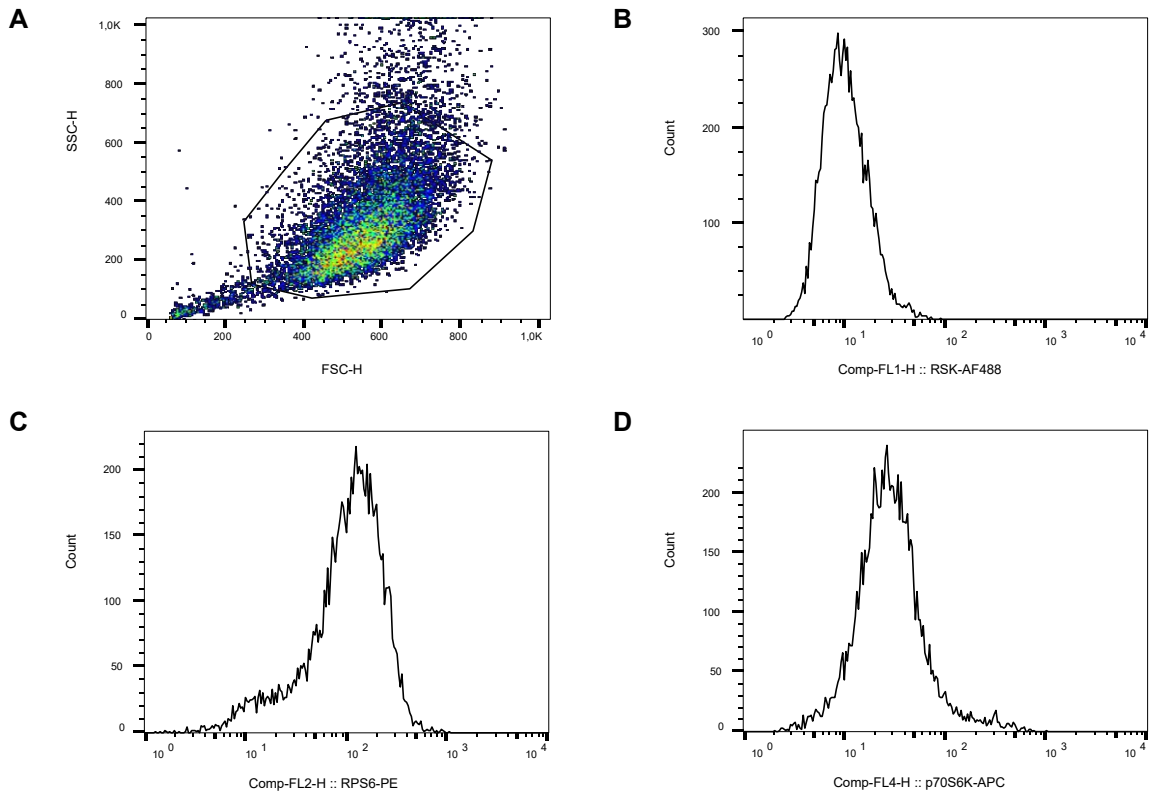


Abbildung 49: Fluoreszenzmessung von PC-3 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) p-RSK, (C) p-RPS6, (D) p-S6K.

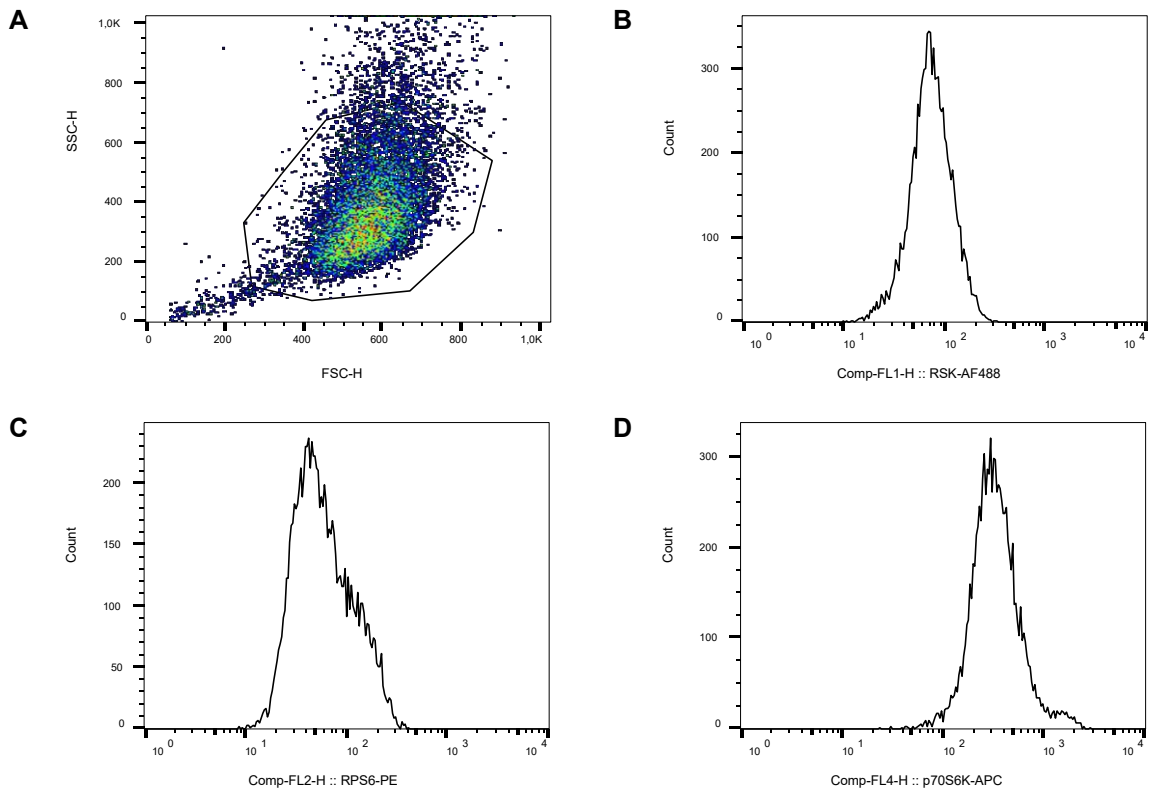


Abbildung 50: Fluoreszenzmessung von PC-3 nach 24 h. (A) Zelldebrisausschluss, (B) RSK, (C) RPS6, (D) S6K.

Untersuchung / Substanz	Docetaxel	PF-4708671	LY2584702	AT7867	LJI308	BID-1870	PDA-66	
IC ₅₀ -Bestimmung	L929, PC-3, LNCaP							
Kombinationstherapie	als Kontrolle und Kombinations-therapeutikum für den jeweiligen Inhibitor	L929, PC-3, LNCaP						
Apoptose-Assay		L929, PC-3						
Zellzyklus-Analyse		L929, PC-3						
Proteinbestimmung		L929, PC-3						-
FLT-Aufnahme		L929, PC-3						
CXCR4-Status		L929, PC-3						

Tabelle 6: Übersicht zu Versuchsaufbauten: untersuchte Zelllinien

Untersuchung / Substanz	Docetaxel	PF-4708671	LY2584702	AT7867	BI-D1870	LJI308	PDA-66	
IC ₅₀ -Bestimmung	24 h/ 48 h/ 72 h						72 h	
Kombinationstherapie	als Kontrolle und Kombinations-therapeutikum für den jeweiligen Inhibitor	72 h						
Apoptose-Assay		24 h/ 72 h				72 h		
Zellzyklus-Analyse								
Proteinbestimmung		24 h						-
FLT-Aufnahme		72 h						
CXCR4-Status		72 h						-

Tabelle 7: Übersicht zu Versuchsaufbauten: untersuchte Zeitpunkte

Substanz Untersuchung	Docetaxel	Docetaxel Kombination	PF-4708671	LY2584702	AT7867	BI-D1870	LJI308	PDA-66
IC ₅₀ - Bestimmung	0,1 nM - 1000 nM	-	0,2 µM - 700 µM	0,5 µM - 50 µM	0,1 µM – 100 µM	0,1 µM - 100 µM	1 µM - 50 µM	0,25 µM - 10 µM
Kombinationstherapie	5 nM	5 nM	5; 10; 15 µM	2; 5; 11 µM	0,2; 0,7; 0,9 µM	1; 4,5; 6,5 µM	6; 20; 35 µM	0,5; 1; 2 µM
Apoptose-Assay Zellzyklus-Analyse 72 h	5; 10; 25 µM	5 nM	15 µM	5 µM	0,7 µM	6,5 µM	35 µM	2 µM
Apoptose-Assay Zellzyklus-Analyse 24 h	5; 10; 25; 100 µM	5; 25 nM	15; 35 µM	5; 11 µM	0,7; 4,5 µM	6,5; 11 µM	-	-
Proteinbestimmung	25 nM	-	15; 35 µM	5, 11 µM	0,7; 4,5 µM	6,5; 11 µM	35; 100 µM	-
FLT-Aufnahme	1; 5; 6; 10; 25 nM	5 nM	10; 15 µM	2; 5 µM	0,2; 0,7 µM	1; 4,5 µM	20; 35 µM	1; 2 µM
CXCR4-Status	5; 10; 25; 100 nM	5; 25 nM	15 µM	11 µM	0,9 µM	6,5 µM	35 µM	-

Tabelle 8: Übersicht zu Versuchsaufbauten: Kombinationen und Konzentrationen für L929-Zellen

Substanz / Untersuchung	Docetaxel	Docetaxel Kombination	PF-4708671	LY2584702	AT7867	BI-D1870	LJI308	PDA-66
IC ₅₀ - Bestimmung	0,1 nM - 1000 nM	-	0,2 µM - 350 µM	0,5 µM - 50 µM	0,1 µM – 100 µM	0,1 µM - 100 µM	1 µM - 50 µM	0,25 µM - 10 µM
Kombinationstherapie	1 nM	1 nM	10; 15; 20 µM	2; 5; 11 µM	0,2; 0,8; 2 µM	1; 2; 4 µM	20; 35; 50 µM	0,5; 0,8; 1 µM
Apoptose-Assay Zellzyklus-Analyse 72 h	1; 10; 25 nM	1 nM	20 µM	5 µM	0,8 µM	4 µM	35 µM	1 µM
Apoptose-Assay Zellzyklus-Analyse 24 h	1; 5; 10; 25 nM	1, 5 nM	20; 35 µM	5; 16 µM	0,8; 6 µM	4; 6,5 µM	-	-
Proteinbestimmung	5 nM	-	20; 35 µM	5; 16 µM	0,8; 6 µM	4; 6,5 µM	35; 100 µM	-
FLT-Aufnahme	1; 2; 5; 6 nM	1 nM	15; 20 µM	2; 5 µM	0,2; 0,8 µM	1 4 µM	20; 35 µM	0,8; 1 µM
CXCR4-Status	1; 10; 25; 100 nM	1; 25 nM	20 µM	11 µM	2 µM	4 µM	35 µM	-

Tabelle 9: Übersicht zu Versuchsaufbauten: Kombinationen und Konzentrationen für PC-3-Zellen

Substanz / Untersuchung	Docetaxel	Docetaxel Kombination	PF-4708671	LY2584702	AT7867	BI-D1870	LJI308	PDA-66
IC ₅₀ - Bestimmung	0,1 nM - 100 nM	-	0,2 µM - 100 µM	0,5 µM - 50 µM	0,1 µM – 100 µM	0,1 µM - 100 µM	1 µM - 50 µM	0,25 µM - 10 µM
Kombinationstherapie	0,6 nM	0,6 nM	3; 8 µM	1; 4 µM	0,8; 1 µM	2,5; 4 µM	25; 40 µM	2; 4 µM

Tabelle 10: Übersicht zu Versuchsaufbauten: Kombinationen und Konzentrationen für LNCaP-Zelle

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lukas Nüsken
Geburtsdatum/-ort: 02.09.1995 in Bad Segeberg
Nationalität: Deutsch

Ausbildung

08/2001 – 07/2005 Grundschule Leezen
08/2005 – 06/2014 Gymnasium Dahlmansschule Bad Segeberg mit Abiturnote „1,4“
10/2014 - 09/2015 Studium der Humanbiologie an der Universität Greifswald
10/2015 - 11/2021 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
9/2017 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note „Gut“
10/2020 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note „Gut“
11/2020- 10/2021 Praktisches Jahr
1. Tertial: Medizinische Klinik Borstel
Leibniz Lungenzentrum, Innere Medizin
2. Tertial: Spital Zweisimmen Schweiz, Chirurgie
3. Tertial: Dres Erasmi & Scheidt Flintbek, Allgemeinmedizin
11/2021 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note „Gut“
01/2022 Ärztliche Approbation
Ab 06.2022 Assistenzarzt 2. Medizinische Klinik für Hämatologie und Onkologie,
Städtisches Krankenhaus Kiel, Professor Dr. Roland Repp

12 Danksagungen

Am Ende meiner Dissertation ist es mir wichtig, noch einmal einigen Menschen zu danken, die maßgeblich zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben und die mich auf dem Weg dabei und durch das Medizinstudium insgesamt begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. med. B.J. Krause für die freundliche Überlassung und das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Bearbeitung des vorliegenden Themas bedanken. Auch für seine Hilfestellungen, Anmerkungen und gedankliche Anstöße möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal herzlich bedanken.

Ein riesiger Dank geht an Frau Dr. Carina Bergner für die herausragende und intensive Betreuung. Sie hat mir eine Vielzahl praktischer wissenschaftlicher Fähigkeiten vermittelt und war jederzeit bereit sich meiner fachlichen Sorgen und Nöte anzunehmen und mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. An dieser Stelle auch nochmal vielen Dank für die Unterstützung zu jeder Tag- und vor allem Nachtzeit während der langen Laborarbeiten.

Auch dem Rest des Teams der Medizinphysik der Nuklearmedizin der Universität Rostock gebührt mein großer Dank für die Laborunterstützung, die Synthese der Radiopharmaka und insbesondere die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit. Darüber hinaus möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei Dr. Markus Joksch für die Bereitschaft, mir beim Erstellen der chemischen Strukturformeln unter die Arme zu greifen, bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich beim Team der Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse der Universität Rostock unter der Leitung von Frau Professor Dr. Müller-Hilke für die Einführung, Einarbeitung und Unterstützung in der Arbeit und Auswertung mit der Durchflusszytometrie.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken. Meine Freunde in Studium und Freizeit waren mir eine ständige Stütze und Bereicherung. Ich danke Ihnen, dass sie mich auf diesem langen Weg begleitet haben und es manches Mal verstanden haben mich abzulenken und den Kopf freizubekommen.

Schließlich danke ich meinen Eltern, Susan und Ingo Nüsken, meinen Geschwistern Sina und Lasse Nüsken und meiner Freundin Raika. Mein Medizinstudium und insbesondere diese Arbeit wären ohne ihre Unterstützung nicht möglich gewesen.

13 Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.
