

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der  
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Präklinische Studien zum Metastasierungsverhalten  
Docetaxel-resistenter Prostatakarzinomzellen nach  
Artesunat-Exposition**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin der  
Universitätsmedizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Laura Wüstefeld  
aus Duderstadt

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

08.03.2024

Für Acki.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung und Literaturdiskussion</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Prostatakarzinom (PCa).....	1
1.1.1 Terminologie und Grundlagenwissen .....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	2
1.1.3 Ätiologie.....	2
1.1.4 Pathologie.....	3
1.1.5 Klassifikation.....	4
1.1.6 Prognose .....	6
1.1.7 Symptome und Klinik.....	7
1.1.8 Diagnostik.....	7
1.1.9 Therapie .....	8
1.1.9.1 Docetaxel .....	10
1.1.9.2 Docetaxel-Resistenz .....	10
1.2 Naturstoffe.....	11
1.2.1 Artesunat (ART).....	12
1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit .....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.1.1 Software .....	15
2.1.2 Geräte.....	15
2.1.3 Verbrauchsmaterial .....	16
2.1.4 Reagenzien.....	19
2.1.5 Antikörper .....	21
2.1.6 Zelllinien .....	21
2.1.6.1 Isolation humaner Endothelzellen (HUVEC) .....	24
2.2 Methoden .....	25
2.2.1 Zellkulturmedium.....	25
2.2.2 Kultivierung der Zellen.....	25
2.2.3 Behandlung der Zellen mit ART .....	26
2.2.4 Kryokonservierung von Zellen .....	26

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.5	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	27
2.2.6	Chemotaxis .....	27
2.2.7	Migration .....	29
2.2.8	Invasion .....	29
2.2.9	<i>Scratch Wound Migration Assay</i> .....	30
2.2.10	Blockadestudien zur chemotaktischen Aktivität .....	32
2.2.11	MTT-Assay .....	32
2.2.12	Statistische Auswertung der Versuchsreihen .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	Veränderung der Zellmobilität und invasiven Eigenschaften nach ART-Exposition .....	34
3.1.1	Chemotaxis, Migration, Invasion .....	34
3.2	Evaluation der funktionellen Relevanz veränderter Integrin-Subtypen nach ART-Behandlung .....	37
3.3	Einfluss von ART auf das Wachstum der PCa-Zellen .....	40
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
4.1	Der Einfluss von ART auf die Zellmobilität und invasiven Eigenschaften der PCa-Zellen .....	42
4.1.1	ART verändert zelltypspezifisch die Chemotaxis der PCa-Zellen .....	42
4.1.2	ART beeinflusst zelltypspezifisch die Migration der PCa-Zellen .....	42
4.1.3	ART verändert nicht die invasiven Eigenschaften der PCa-Zellen .....	44
4.2	Die durch ART veränderte Integrin-Expression resultiert in einer modifizierten Zellmotilität .....	45
4.3	Die durch ART veränderte Integrin-Expression resultiert in einem reduzierten Tumorzellwachstum von PCa-Zellen .....	48
<b>5</b>	<b>Fazit</b> .....	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>60</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>61</b>
<b>11</b>	<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>62</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AR	Androgenrezeptor
ART	Artesunat
BrdU	Bromdesoxyuridin
Ctrl	Kontrolle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Docetaxel-resistent
DRU	Digital rektale Untersuchung
ECM	Extrazelluläre Matrix
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormon
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IGRT	<i>Image-guided Radiotherapy</i>
LDR	<i>Low-Dose-Rate</i>
MDR	<i>Multi-Drug-Resistance</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCC	Nierenzellkarzinom
Par	Parental
PCa	Prostatakarzinom
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches-Membran-Antigen
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TfR-1	Transferrin-Rezeptor
TRUS	Transrektale Sonographie
UICC	Union internationale contre le cancer

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DU145 Parentale Zellen.....	22
Abbildung 2: DU145 Zellen Docetaxel-resistent.....	22
Abbildung 3: PC3 Parentale Zellen .....	23
Abbildung 4: PC3 Zellen Docetaxel-resistent.....	23
Abbildung 5: LNCaP Parentale Zellen .....	24
Abbildung 6: LNCaP Zellen Docetaxel-resistent .....	24
Abbildung 7: Chemotaxis: Pipettierschema. ....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Welleinteilung mittels Gitter in der 6-Well-Platte. ....	30
Abbildung 9: Scratch Wound Migration Assay.....	31
Abbildung 10: Chemotaxis, Migration und Invasion der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) DU145-Zellen nach einer Artesunat (ART)-Behandlung .....	34
Abbildung 11: Chemotaxis, Migration und Invasion der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) PC3-Zellen nach einer Artesunat (ART)-Behandlung.....	35
Abbildung 12: Chemotaxis, Migration und Invasion der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) LNCaP-Zellen nach einer Artesunat (ART)-Behandlung .....	36
Abbildung 13: Blockade der Chemotaxis der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) DU145-Zellen .....	38
Abbildung 14: Blockade der Chemotaxis der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) PC3-Zellen .....	38
Abbildung 15: Blockade der Chemotaxis der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) LNCaP-Zellen.....	39
Abbildung 16: Blockadestudie. MTT-Assay der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) DU145, PC3 und LNCaP-Zellen ...	40

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation des PCa .....	4
Tabelle 2:	UICC-Stadien .....	6
Tabelle 3:	Risikostratifizierung nach D´Amico.....	6
Tabelle 4:	Software.....	15
Tabelle 5:	Geräte.....	15
Tabelle 6:	Verbrauchsmaterial.....	16
Tabelle 7:	Reagenzien .....	19
Tabelle 8:	Antikörper .....	21
Tabelle 9:	p-Werte mit Signifikanzniveaus und deren Definition .....	33



# **1 Einleitung und Literaturdiskussion**

## **1.1 Das Prostatakarzinom (PCa)**

### **1.1.1 Terminologie und Grundlagenwissen**

Die wichtigste akzessorische Geschlechtsdrüse des Mannes ist die Prostata, die auch Vorsteherdrüse genannt wird (1). Sie produziert das saure Prostatasekret und ist damit die klinisch bedeutsamste akzessorische Geschlechtsdrüse des Mannes. Beim Prostatasekret handelt es sich um ein milchiges, dünnflüssiges Sekret, das 30 % des Ejakulats ausmacht und die Aufgabe hat, ein Medium für die Spermien zu sein und die Beweglichkeit dieser zu erhalten. Wichtige Bestandteile dieses Sekrets sind saure Phosphatasen, Citrat, Zink und das Prostata-spezifische Antigen (PSA). Bei letzterem handelt es sich um eine Serin-Protease, die zum einen das Ejakulat verflüssigt, zum anderen als organspezifischer Marker eine Rolle in der Diagnostik des PCa spielt (2). Die Prostata hat physiologisch die Form einer Kastanie und wiegt 20 bis 25 Gramm. Sie umschließt unterhalb der Harnblase liegend ringförmig den proximalen Anteil der Harnröhre, in welchen die Samenleiter schließlich münden (3). Die Fläche lässt sich in einen Apex prostatae und eine Basis prostatae einteilen. Während der Apex die kegelförmig zulaufende Spitze der Prostata darstellt, bildet die Basis den breiten Körper dieser. In Gänze wird die Prostata von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, die dorsal vom Rektum begrenzt wird (4).

Eine Funktionsstörung der Prostata können verschiedene Erkrankungen auslösen. Ein häufiger Grund für die gutartige Volumenzunahme des Drüsengewebes ist das benigne Prostatasyndrom, das vorwiegend im fortgeschrittenen Alter des Mannes auftritt (5). Grund für den behinderten Urinabfluss ist, dass die Volumenzunahme vor allem in der Transitionszone auftritt, die die Harnröhre unmittelbar umgibt (5). Anhand von Scores ist es u. a. möglich, über akut behandlungsbedürftige Formen zu entscheiden oder ein abwartendes Prozedere zu wählen (6). Dazu wird zunächst eine umfassende Anamnese einschließlich der Vorerkrankungen und der Medikation erhoben und eine körperliche Untersuchung durchgeführt. In Zusammenschau der Befunde kann sich gemeinsam mit dem Patienten für ein abwartendes Konzept, ein konservatives (medikamentös) oder ein operatives Verfahren entschieden

werden (7). Ausschlaggebend ist jedoch, dass es trotz einer operativen Versorgung eines benignen Prostatasyndroms zu einem PCa kommen kann.

Beim PCa handelt es sich um eine maligne Neoplasie, die vom Drüsengewebe der Prostata ausgeht und häufig in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wird. Das hat mehrere Gründe. Zum einen sind PCa anfangs selten symptomatisch, zum anderen werden die möglichen Symptome wie Schwäche oder Schmerz von einigen Patienten nicht als kritisch wahrgenommen und entsprechend erfolgt häufig nicht initial eine Vorstellung beim Arzt. Dadurch steigt das Risiko für zum Beispiel eine ossäre Filialisierung mit dem Voranschreiten der Erkrankung, wodurch sich die Prognose verschlechtert. Daher ist es wichtig, Männer in Hinblick auf mögliche Symptome (s. 1.1.7) eines PCa aufmerksam zu anamnestizieren (8).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Das PCa ist die häufigste Tumorerkrankung des Mannes und stellt nach dem Lungenkarzinom die zweithäufigste Todesursache bei Männern in Deutschland dar (9). Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter. Während ein 35-Jähriger ein Erkrankungsrisiko von unter 0,1 % hat (bezogen auf die folgenden zehn Jahre), ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein 75-Jähriger erkrankt, wesentlich höher bei circa fünf Prozent (9). Wird die Entwicklung der Epidemiologie des PCa allgemein betrachtet, fällt auf, dass in Deutschland und anderen Industrienationen seit dem Beginn der 90er-Jahre die Inzidenz des PCa stieg, während die Sterblichkeit sank (10). Gründe dafür sind u. a. eine vermehrte Verbreitung von PSA-Tests und verbesserte Früherkennungs- sowie Therapiestrategien (11). Durch den vermehrten Einsatz von PSA-Tests kommt es zwar zu einer früheren Diagnose, aber auch zum Feststellen von PCa, die möglicherweise ohne als Todesursache zu gelten, bis zum Ende des Lebens des Patienten unentdeckt geblieben wären (11). Somit ist hier eine potenzielle Übertherapie als Problem zu sehen.

### **1.1.3 Ätiologie**

Insbesondere drei Risikofaktoren sind zu nennen, die die Wahrscheinlichkeit an einem PCa zu erkranken, erhöhen. Dazu gehört das Alter, der Lebensort und die familiäre Prädisposition. Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erwähnt, steigt die Inzidenz mit dem Alter des Mannes (9). Auch konnte global sowohl ein Nord-

Süd- als auch ein West-Ost-Gefälle gesehen werden. In den USA und im nordeuropäischen Raum tritt das PCa dabei häufiger auf als in südeuropäischen Ländern und im asiatischen Raum. Dieses Gefälle wird anhand von sozioökonomischen Faktoren und verschiedenen Essgewohnheiten erklärt (12). Die familiäre Prädisposition spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Ist ein Verwandter (z. B. der Vater) von einem PCa betroffen, so erhöht sich das Risiko, zu erkranken. Im Mittel werden Patienten mit einem vererbten PCa sechs bis sieben Jahre früher diagnostiziert im Vergleich zum sporadisch auftretenden PCa. Allerdings unterscheidet sich die Klinik der Erkrankung wenig vom nicht-hereditären PCa. Somit sollte das Screening als präventive Maßnahme bei erhöhtem Risiko erfolgen, um das Karzinom in heilbaren Stadien zu diagnostizieren (13). Ergibt sich aus der Familienanamnese ein deutlich erhöhtes Risiko, kommt eine genetische Beratung in Betracht sowie eine engmaschige Kontrolle der betreffenden Familienmitglieder (14).

Auch wenn bisher durch die Vermeidung von Risikofaktoren kein positiver Nutzen festgestellt werden konnte, gibt es dennoch Faktoren, die mit dem Auftreten eines PCa korrelieren. Dazu gehört beispielsweise das metabolische Syndrom. Auch können Lebensstilfaktoren wie die Ernährung (z. B. viele Fleischprodukte, insbesondere rotes Fleisch, fischfreie Kost) und Nikotinkonsum mit einer erhöhten Inzidenz einhergehen (15).

### **1.1.4 Pathologie**

Beim Ursprungsgewebe des PCa handelt es sich meistens um Adenokarzinome, während andere Gewebe wie ein Plattenepithelkarzinom oder ein Urothelkarzinom seltener zu finden sind. Im typischen Fall befindet sich das PCa in der peripheren Zone der Prostata und ist sonographisch gut zu erkennen (16).

Der Gleason-Score ist ein Instrument, das die histologische Beurteilung der Drüsenmorphologie als prognostischen Parameter verwendet. Je höher der Wert des Scores ist, desto höher ist der Grad der Entdifferenzierung des Gewebes. Aus der Addition von zwei Gleason-Graden ergibt sich der Gleason-Score. Zur Bestimmung des Wertes wird entweder das histologische Präparat einer Prostatastanzbiopsie oder eines Prostatektomiepräparats herangezogen. Bei einer Prostatastanzbiopsie wird der am schlechtesten differenzierte und der häufigste Gleason-Grad verwendet. Bei einem Prostatektomiepräparat hingegen

wird eine Addition des am häufigsten mit dem am zweithäufigsten zu findenden Gleason-Grads durchgeführt (17). Auch wenn der Gleason-Score ein klinisch häufig verwendetes Instrument ist, so wird dieser auch kritisch diskutiert im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit und die Untersucherabhängigkeit (18).

### 1.1.5 Klassifikation

Zur Klassifikation des PCa wird u. a. die TNM-Klassifikation herangezogen (Tabelle 1) (19). Hierbei wird das Karzinom nach Tumor (Verhalten, Ausdehnung), Nodus (Lymphknotenbefall/Ausdehnung dessen) und Metastasen (Fehlen/Vorhandensein/Fernmetastasen) eingeteilt (19). Klinisch ist zwischen lokal begrenztem, lokal fortgeschrittenem und fortgeschrittenem bzw. metastasiertem PCa zu unterscheiden. Von T1 ist bei einem klinisch nicht zu erkennenden Tumor zu sprechen, der weder sichtbar noch zu tasten ist, während sich die Neoplasie bei T2 auf die Prostata beschränkt und die bindegewebige Kapsel vollständig intakt ist. T1 und T2 sind unter dem lokal begrenzten PCa erfasst. Zu T3 zählen Tumore, die die Prostatakapsel bereits durchbrechen und somit ein extraprostatitisches Wachstum zeigen. Hierbei sind Nachbarorgane im Vergleich zu T4 noch nicht betroffen. T4 beschreibt eine Situation, in der Nachbarorgane wie z. B. die Harnblase, das Rektum oder die Beckenwand bereits infiltriert sind. T3 und T4 werden unter den lokal fortgeschrittenen PCa zusammengefasst. N1 steht für einen regionären Lymphknotenbefall. M1 zeigt an, dass Fernmetastasen zu finden sind. Beim PCa sind insbesondere ossäre Metastasen typisch. N1 und M1 beschreiben das fortgeschrittene bzw. metastasierte PCa. Neben der Unterteilung in T1 bis T4 bzw. N1 und M1 gibt es weitere Untergliederungen, die in folgender Tabelle dargestellt sind und nach der außerdem eine entsprechende Zuordnung zu den Stadien erfolgt (20).

*Tabelle 1: TNM-Klassifikation des PCa (20)*

<b>TNM</b>	<b>Ausdehnung</b>	<b>Klinische Einteilung</b>
<b>T1</b>	Klinisch nicht erkennbarer Tumor  <b>T1a:</b> PCa in <5 % des untersuchten Präparats  <b>T1b:</b> PCa in >5 % des untersuchten Präparats	Lokal begrenzt

## Einleitung und Literaturdiskussion

<b>TNM</b>	<b>Ausdehnung</b>	<b>Klinische Einteilung</b>
	<b>T1c:</b> PCa in Stanzbiopsie bei nicht-tastbarem Tumor	
<b>T2</b>	Auf die Prostata begrenzt, Kapsel intakt  <b>T2a:</b> Befall von <50 % eines Seitenlappens  <b>T2b:</b> Befall von >50 % eines Seitenlappens  <b>T2c:</b> Befall beider Seitenlappen	Lokal begrenzt
<b>T3</b>	Extraprostatisches Tumorwachstum, Tumor durchbricht Kapsel  <b>T3a:</b> Extrakapsuläre Ausbreitung  <b>T3b:</b> Samenblaseninfiltration	Lokal fortgeschritten
<b>T4</b>	Infiltration von Nachbarorganen: Harnblase, Rektum, Schließmuskel oder Beckenwand	Lokal fortgeschritten
<b>N1</b>	Regionärer Lymphknotenbefall	Metastasiertes PCa
<b>M1</b>	Fernmetastasen  <b>M1a:</b> Extraregionäre Lymphknotenmetastasen  <b>M1b:</b> Knochenmetastasen  <b>M1c:</b> Andere Fernmetastasen	Metastasiertes PCa

Auf die TNM-Klassifikation aufbauend teilt die *Union internationale contre le cancer* (UICC) Stadien ein, die die möglichen Therapien und Prognosen von malignen Tumoren berücksichtigen. Das PCa betreffend ergeben sich vier Stadien (Tabelle 2) (21).

Tabelle 2: UICC-Stadien (21)

UICC-Stadium	TNM
Stadium I	Bis T2a
Stadium II	T2b oder T2c
Stadium III	T3
Stadium IV	T4 oder N1 oder M1

Handelt es sich um einen lokal begrenzten Tumor, was  $T < 3$  und  $M_0$  sowie  $N_0$  entspricht, können diese weiter mit der Risikostratifizierung nach D´Amico eingeteilt werden (Tabelle 3) (22). Ist der Tumor weiter fortgeschritten ( $T > 3$  oder  $M_1$  und  $N_1$ ) so gilt dieser immer als Hochrisikotumor (20, 23).

Tabelle 3: Risikostratifizierung nach D´Amico (20)

Risiko	Kriterien für die Einteilung
Gering	PSA $< 10$ ng/ml und Gleason-Score $\leq 6$ und $\leq T_2a$
Mittel	PSA $10 - 20$ ng/ml oder Gleason-Score = 7 oder $cT_2b$
Hoch	PSA $> 20$ ng/ml oder Gleason-Score $\geq 8$ oder $cT_2c$

### 1.1.6 Prognose

Insgesamt hängt die Prognose des PCa von der Konstitution des Patienten und vor allem von drei Faktoren ab: Dem Gleason-Score, der operativen Entfernung des Tumors bzw. die Tumorfreiheit der Resektionsränder und der TNM-Kategorie (24).

Weiterhin ist zu beachten, dass die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus bei der Prognose des PCa eine Rolle spielen kann. Zwar ist festzustellen, dass Diabetiker weniger häufig am PCa leiden, jedoch ein höheres Risiko haben, daran zu versterben als nicht an Diabetes erkrankte Patienten. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei Diabetes der AR verstärkt ausgebildet wird und dadurch vermehrt Wachstumsreize für das PCa entstehen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in den PCa von Diabetikern Insulinrezeptoren zu finden sind, die über Wachstumsfaktoren zu einem Voranschreiten der Erkrankung führen können (25).

### **1.1.7 Symptome und Klinik**

Grundsätzlich sind im frühen Stadium keine Symptome zu erwarten, da sich die Neoplasie häufig in der peripheren Zone der Prostata entwickelt, die nicht die Urethra umschließt. Das Karzinom wird hier häufig im Zuge von Voruntersuchungen wie der digital-rektalen Untersuchung (DRU) diagnostiziert (26), die ab einem Alter von 45 Jahren von den Krankenkassen bezahlt werden (27). Im späten Stadium leiden die Patienten hingegen je nach Lokalisation des Tumors unter Inkontinenz, Hämaturie, Harnverhalt, Harnstauungsniere, Gewichtsverlust und lumbosakralen Schmerzen bei bereits stattgefundener ossärer Metastasierung (28). Dabei stellt es eine Herausforderung dar, Hinweise auf ein PCa zu erkennen. So gibt es teilweise Überschneidungen in der Symptomatik zu gutartigen Prozessen in der Prostata. Als Beispiele seien die Pollakisurie und Nykturie genannt, die sowohl beim PCa als auch beim benignen Prostatasyndrom auftreten können (26).

### **1.1.8 Diagnostik**

Wie bereits in Abschnitt 1.1.7 erwähnt, gibt es ab dem 45. Lebensjahr die Möglichkeit, an Früherkennungsmaßnahmen teilzunehmen (27). Die Patienten sollten laut den aktuellen Leitlinien entsprechend über die Möglichkeit dieser Vorsorgeuntersuchungen und gleichzeitig über die Vor- und Nachteile dieser aufgeklärt werden (20). Dennoch ist die Sinnhaftigkeit der Früherkennungsmaßnahmen umstritten, da zwar mehr PCa früh entdeckt und therapiert werden, sich aber bisher kein deutlicher Überlebensvorteil daraus ergeben hat. Es ist weiterhin zu befürchten, dass einige Patienten übertherapiert werden oder das Karzinom aufgrund anderer lebenslimitierender Erkrankungen gar nicht symptomatisch geworden wäre. Allerdings sollte eine Verunsicherung der Patienten gegenüber der Vorsorgeuntersuchung vermieden werden. Insgesamt erscheint die Kombination aus klinischen und laborchemischen Parametern sinnvoll und praktikabel (29).

Wünscht ein Patient eine Vorsorgeuntersuchung, so gibt es zwei Standarduntersuchungen. Zum einen die DRU und die Bestimmung des PSA-Wertes. Die DRU stellt die Basisdiagnostik bei Verdacht auf ein PCa dar. Pathologisch lassen sich derbe, asymmetrische Areale beschreiben (30).

Das PSA wird ausschließlich von der Prostata gebildet und ist daher ein organspezifischer Marker. Die Bestimmung dieses Wertes zur Früherkennung von PCa ist dennoch Gegenstand von Diskussionen, da individuelle Unterschiede evtl. in einer Übertherapie resultieren könnten (s. oben) (1).

Zur Basisdiagnostik bei Verdacht auf ein PCa und zur Verlaufskontrolle gehört dieser Wert jedoch.

Das MRT birgt gegenüber der Computertomographie den Vorteil, dass der Patient keiner Strahlenbelastung ausgesetzt ist (31). Ein weiterer Vorteil der MRT-Bildgebung ist, dass falls suspektere Areale gesehen werden, diese in einer Fusionsbiopsie gezielt punktiert und charakterisiert werden können. Die Diagnosesicherung erfolgt weiterhin über eine Biopsie. So werden im Vergleich zur transrektalen Sonographie (TRUS) mehr suspektere Befunde identifiziert und gleichzeitig weniger nicht signifikante PCa einer Therapie zugeführt. Je nach Risiko kann den Patienten beispielsweise ein abwartendes Prozedere (s. Therapie 1.1.9) angeboten werden (32).

Gegebenenfalls schließen sich weitere Staginguntersuchungen an wie die Abdomensonographie, die pelvine Lymphadenektomie, Ganzkörper-szintigraphie, Röntgen der Wirbelsäule und MRT des kleinen Beckens (20). Allerdings haben Untersuchungen wie beispielsweise die Ganzkörper-szintigraphie einen vergleichsweise geringeren Vorhersagewert in Bezug auf ossäre- und Lymphknotenmetastasen bei Hochrisikopatienten (32), so dass die PSMA-PET (Prostata-spezifisches-Membran-Antigen Positronenemissionstomographie) als Verfahren zum Staging Einzug gehalten hat (33). Dabei wird eine detektierbare Strahlenquelle an einen Bindungspartner gekoppelt, der für PSMA affin ist, so dass mögliche Metastasen sichtbar werden (34).

### **1.1.9 Therapie**

Zunächst lassen sich zwei grundsätzlich verschiedene Konzepte unterscheiden. Zum einen konkrete Behandlungsmaßnahmen wie eine Bestrahlung oder eine Operation, zum anderen eine sogenannte *Active Surveillance*. Bei letzterem handelt es sich um eine abwartende Beobachtung mit engmaschigen Kontrollen und Re-Staging (35). Sollte es zu einer Tumorprogression kommen, erfolgt die Einleitung einer Therapie. Wird sich für konkrete Behandlungsmaßnahmen



entschieden, gibt es unterschiedliche Konzepte für die Therapie bei nicht-metastasiertem und bei metastasiertem PCa. Handelt es sich um ein nicht-metastasiertes PCa bei gleichzeitigem Fehlen von Fernmetastasen, sind die radikale Prostatektomie und die externe Bestrahlung gleichwertige kurative Therapieoptionen. Bei der radikalen Prostatektomie werden in den meisten Fällen die Lymphknoten mit entfernt (Lymphadenektomie). Weiterhin ist eine Kombination mit einer Bestrahlung nach Entfernung des Tumors möglich; insbesondere im Falle eines nicht tumorfreien Randes. Die externe Bestrahlung als zweite Therapieoption wird bei einem Lymphknotenbefall mit einer Hormontherapie kombiniert. Alternative Therapiestrategien können überlegt werden, sobald ein lokal begrenztes PCa mit einer niedrigen Risikoeinschätzung nach D'Amico vorliegt. Ist dies der Fall, können sowohl eine Low-Dose-Rate-Brachytherapie in Form einer lokalen Strahlentherapie als auch die *Active Surveillance* Möglichkeiten sein (20).

Handelt es sich um ein metastasiertes PCa mit Fernmetastasen oder einer eingeschränkten Lebenserwartung von unter zehn Jahren, kommt eine Hormontherapie, eine kombinierte Hormon-Chemotherapie oder das *Watchful Waiting* (beobachtendes Abwarten) in Frage. Bei der Hormontherapie handelt es sich mechanistisch um eine Androgendeprivation. Dabei wird eine chemische Kastration mittels Gonadotropin Releasing-Hormon-Agonist (GnRH)-Analoga oder GnRH-Blocker durchgeführt. In den ersten Tagen bis Wochen der Therapie mit GnRH-Analoga kommt es zu einem reaktiven Anstieg der Androgene. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, kann eine Kombination mit nicht-steroidalen Antiandrogenen gewählt werden, so dass eine vollständige Androgenblockade erreicht wird. Die beidseitige Entfernung der Hoden (Orchiektomie) stellt als operativ durchgeführte Kastration eine andere Option dar. Während einer Androgendeprivationstherapie kann es im Verlauf zu einer Resistenzbildung kommen. Zusätzlich kann daher das Chemotherapeutikum Docetaxel gegeben werden (siehe 1.1.9.1). Ist trotz chemischer oder operativer Kastration ein Tumorprogress zu beobachten, so kann weiterhin Abirateron als Hormontherapie der zweiten Generation verordnet werden (36). Abirateron hemmt ein Enzym, das bei der Androgensynthese eine Rolle spielt und inhibiert diese somit (37).

Nach der Aktualisierung der Leitlinie zum PCa wird daher keine Monotherapie mehr als Androgendeprivation empfohlen, sondern nur noch die

Kombinationstherapien. Dabei kommt als weitere Kombination die zusätzliche Gabe von Apalutamid in Frage (32). Dieses Medikament wirkt, indem es gezielt die Aktivierung des Androgenrezeptors (AR) durch seine Liganden unterbindet; entsprechend ist es als AR-Inhibitor zu bezeichnen. In Studien konnte hier ein deutlich längeres und metastasenfrees Überleben im Vergleich zum Placebo gezeigt werden (38). Weiterhin wird eine Kombination aus Androgendeprivation und Enzalutamid empfohlen (32), wobei letzteres ebenfalls den AR, allerdings an drei Angriffspunkten, hemmt (39). Dabei ist die AR-Bindung, die Translokation in den Zellkern sowie die transkriptionale Aktivität des AR zu nennen (39).

### **1.1.9.1 Docetaxel**

Das Chemotherapeutikum Docetaxel gehört zur Gruppe der Taxane und wird beim metastasierten kastrationsresistenten PCa eingesetzt (20). Bei Docetaxel handelt es sich um ein zytostatisch wirkendes Medikament, das halbsynthetisch aus in der Europäischen Eibe vorkommenden Stoffen hergestellt wird (40). Die Zielstrukturen der Taxane stellen die Mikrotubuli der Zelle dar. Diese sind ein wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts und spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung (41). Sie sind somit eine wichtige Zielstruktur für die Krebstherapie. So werden Taxane nicht ausschließlich zur Therapie des PCa eingesetzt, sondern finden auch in anderen Entitäten, wie zum Beispiel dem Ovarial- oder Lungenkarzinom, Anwendung (42). Die Wirkung beruht auf einer Stabilisierung der Mikrotubuli während der Mitose, so dass der Spindelapparat erstarrt, die Zellteilung nicht stattfinden kann und es in der Folge zum Zelltod kommt. Durch Docetaxel hingegen kann dieser Prozess nicht stattfinden, es kommt zu einer gestörten Zellteilung und zur Apoptose (43). Da Docetaxels nicht spezifisch auf maligne Zellen wirkt, unterliegen auch andere, sich teilende Zellen diesem Effekt, wodurch es zu Nebenwirkungen kommt. Diese können sich beispielsweise als gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe), Polyneuropathien, Myalgien und Neutropenien präsentieren (44, 45).

### **1.1.9.2 Docetaxel-Resistenz**

Ein therapielimitierender Faktor beim Einsatz von Docetaxel ist die Resistenzbildung. Dabei gibt es verschiedene Theorien zu den möglichen Mechanismen. Eine der dabei führenden Mechanismen ist die Multi-Drug-Resistance (MDR) bei der es zu einer geringeren Akkumulation des

Medikaments aufgrund von Effluxpumpen kommt (42). Darüber hinaus spielt auch die Modifikation von Signalwegen innerhalb der Zelle eine Rolle. Dabei ist besonders die vermehrte Proliferation und konsekutiv eine Verminderung der Apoptose zu nennen (46), allerdings auch Signalwege, die während der Embryonalentwicklung von Bedeutung sind (47). Ein weiterer Ansatzpunkt bei der Resistenzbildung sind die Mikrotubuli, wobei postuliert wird, dass es durch eine Mutation an den Bindungsstellen zu einer reduzierten Affinität zwischen Medikament –in dem Fall Docetaxel– und den Mikrotubuli kommt (48). Darüber hinaus legen andere Studien nahe, dass eine Mutation im AR die Docetaxel-Resistenz fördern kann, beispielsweise durch die AR-Signalübertragung (48). Auf molekularer Ebene betrachtet kommt es zu Resistenzen, sobald onkogene Faktoren wie CD133 höherreguliert werden und Tumorsuppressoren (z. B. PTEN) weniger exprimiert werden; in diesem Fall nimmt die Malignität zu und das Risiko für Arzneiresistenzen erhöht sich (49).

Die Docetaxel-Resistenz ist häufig ein limitierender Faktor in der Therapierbarkeit des PCa. Daher ist es nachvollziehbar, dass sowohl Ärzt:innen, Wissenschaftler:innen und auch Patienten sich ergänzende Therapien wünschen und diese unabdingbar sind, um das *Outcome* zu verbessern und das Gesamtüberleben zu steigern. Eine Möglichkeit sind dabei die Naturstoffe, u. a. Artesunat, dessen Wirkung auf verschiedenen Ebenen in dieser Arbeit untersucht wird.

### **1.2 Naturstoffe**

Über 80 % der an Malignomen erkrankte Patient:innen suchen neben der schulmedizinischen Behandlung nach Ergänzungen oder Alternativen. Dabei spielen Naturstoffe eine große Rolle, die es sowohl in der Anamnese als auch in der Therapieplanung zu berücksichtigen gilt (50). Vor allem als Additive haben Naturstoffe Potenzial, etablierte Therapiekonzepte des PCa zu ergänzen. Dabei ist die Wirkung dieser hauptsächlich auf sekundäre Pflanzenstoffe zurückzuführen, die zu einer antikanzerogenen Wirkung führen im Sinne von antiproliferativen, antimetastatischen und antiangiogenen Eigenschaften (51). In Studien konnte gezeigt werden, dass sekundäre Pflanzenstoffe den Therapieerfolg und das *Outcome* der Patient:innen verbessern können (52). Allerdings liegen bisher nicht ausreichend Daten vor, die Evidenz über die

Wirkung der Naturstoffe geben und somit nach Leitlinien klinische Anwendung finden können. Daraus ergibt sich auch die Gefahr von Arzneimittelinteraktionen und Wechselwirkungen. Dies zeigt den großen Bedarf auf, ausreichend Daten zu generieren, um eine solche Evidenz schaffen zu können und Naturstoffe möglicherweise als ergänzende Therapeutika zu etablieren. Einige dieser Pflanzenstoffe wurden vor über 2.000 Jahren in der chinesischen Heilkunde etabliert, die auch als Traditionelle Chinesische Medizin (TCM) bekannt ist. Artemisinin als sekundärer Pflanzenstoff ist ein Bestandteil der TCM und wird darüber hinaus in der Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gelistet, da es zur Behandlung von Malaria eingesetzt wird (53).

### 1.2.1 Artesunat (ART)

ART ist ein halbsynthetischer Arzneistoff, abgeleitet vom sekundären Pflanzenstoff Artemisinin. Artemisinin kommt im einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) vor, aus dessen Blüten und Blättern es mit einem Lösungsmittel extrahiert wird (54). Im Vergleich zu dem reinen Pflanzenstoff Artemisinin verfügt ART über eine höhere Wirksamkeit durch eine höhere Bioverfügbarkeit sowie eine bessere Verträglichkeit, was dazu führt, dass ART in der Medizin häufiger Verwendung findet als Artemisinin. ART wird zur Behandlung von Malaria eingesetzt, da es neben der Therapie gegen Malaria selbst, das Übertragungspotenzial verringert und gleichzeitig nebenwirkungsarm ist (55).

Im Zuge der COVID-19-Pandemie wird eine Wirkung von ART gegen SARS-CoV-2 diskutiert. Anlass dazu gab u. a. die verzögerte Verbreitung des Virus in Gebieten, in denen Malaria endemisch ist (wie z. B. in Afrika) und entsprechend mit ART behandelt wird (s. oben). *In vitro* Ergebnisse legen nahe, dass ART gegen das Coronavirus wirkungsvoll sein kann (56). In folgenden Versuchen wurde die Wirksamkeit von ART gegen einen dänischen SARS-CoV-2-Stamm gezeigt. Allerdings sind weitere Studien notwendig, um ART und seine Derivate als Behandlungsoption für das Coronavirus etablieren zu können (57).

In anschließenden Studien hat ART antitumorale Effekte gezeigt. Der grundlegende Mechanismus der Wirkung von ART scheint sich aus dem erhöhten Eisengehalt maligner Zellen zu ergeben. Dabei kommt eine erhöhte Expression des Transferrin-Rezeptors (TfR-1) bei gleichzeitig erhöhter

Eisenkonzentration in der Tumorzelle nachgewiesen werden (58). Durch die Kombination von ART und Eisen kommt es zur Bildung von reaktivem Sauerstoffspezies (59, 60), wodurch oxidativer Stress entsteht, der zu Zellschädigung führt. Durch die ausgelöste Zellschädigung kommt es konsekutiv zum Ablauf von antitumoralen Kaskaden, wie der Ferroptose (61). Weitere Signalkaskaden, die zur Schädigung der Tumorzellen führen, sind die Ferroptose, Nekroptose und Nekrose (60). Von Vorteil ist, dass es sich durch den in den malignen Zellen erhöhten Eisengehalt um einen selektiven Mechanismus handelt und in der Regel nur entartete Zellen geschädigt werden (62). Eine weitere Wirkung von ART zeigt sich auf das Metastasierungsverhalten. Beispielsweise wurde die metastatische Aktivität des hepatozellulären Karzinoms durch ART herabgesetzt, was vermuten lässt, dass dies auch in anderen Tumorentitäten, wie dem PCa, der Fall sein könnte (63).

### **1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Die im Therapieverlauf entstehenden Resistenzen gegen Standardtherapeutika limitieren die Behandlung von Patienten mit PCa. Vor allem das metastasierte PCa steht dabei im Fokus, da die Patienten durch eine operative Therapie nicht mehr geheilt werden können und die Resistenzen die Lebenserwartung der Patienten einschränken. Naturstoffe zeigten schon im Rahmen anderer Entitäten antitumorale Effekte. Insbesondere der aus der TCM stammende Wirkstoff ART. Allerdings sind bisher keine ausreichenden Daten zu der Wirkung ART insbesondere auf das Chemotherapeutikum Docetaxel resistente PCa vorhanden.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Wirkung von ART:

- auf die Chemotaxis, Migration und Invasion von PCa-Zellen
- mittels Blockadestudien, die durch ART veränderten Adhäsionsrezeptoren (Integrin-Subtypen) der PCa-Zellen auf ihre funktionelle Relevanz für die metastatischen Eigenschaften
- auf das Wachstum der PCa-Zellen untersucht.

Jeweils ART-unbehandelte PCa-Zellen dienten als Kontrollen. Für die Versuchsreihen fanden die PCa-Zellen DU145, PC3 und LNCaP Verwendung.

Die Studien sind als wegweisend für die Etablierung einer neuen Therapieoption für Patienten mit fortgeschrittenem PCa zu sehen. Längerfristiges Ziel ist es, diesen Patienten in der Zukunft ein wirkungsvolles Behandlungskonzept anbieten zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Software

Tabelle 4: Software

Name	Version	Firma	Firmensitz
AzureSpot	2.0.062	Azure Biosystems	Dublin, Californien, USA
Endnote	X7.2	Thomson Reuters	London, Vereinigtes Königreich
GraphPad Prism	7.04.	GraphPad Software, Inc.	San Diego, Californien, USA
Image J	1.48 v	Wayne Rasband	Kensington, Maryland, USA
Magellan	V 2.2	Tecan Trading AG	Männedorf, Schweiz
Office Professional Plus 2010	14.0.7237.5000	Microsoft Corporation	Seattle, Washington, USA
Zen	2.3.	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland

#### 2.1.2 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Gerät	Produkt nummer	Firma	Firmensitz
Bunsenbrenner, FIREBOY eco	451-0136	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
CO <sub>2</sub> Inkubator HERAcell®VIOS 160i	51030286	Heraus Instruments	Hanau, Deutschland
Delfia® Plate shake	1296-001	Wallac-ADL-GmbH	Freiburg, Deutschland
Durchflusszytometer BD LSRFortessa X-20	657669	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Herasafe™ KS Sicherheitswerkbank	42016188	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Inverses Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1	491915-0001-000	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
LUNA™ Automated Cell Counter	L10001	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich

## Material und Methoden

Gerät	Produkt nummer	Firma	Firmensitz
Mikroskop Axiovert 40 CFL	491202-0002-001	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop, AE2000 Binocular	630-1316	Motic Deutschland GmbH	Wetzlar, Germany
Mikrozentrifuge Hereaus Fresco 21	75002425	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
pH Meter Orion Star A111	11661399	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe accu-jet® pro	26301	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Sapphire Biomolecular Imager	IS1026	Azure Biosystems	Dublin, California, USA
Tecan US Inc. Spark 10M	30086375	Tecan Austria GesmbH	Grödig, Österreich
ThermoCell MixingBlock	MB-102 (MB-101)	Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd	Hangzhou, China
VACUSAFE-Absaugsystem	158320	INTEGRA Biosciences GmbH	Biebertal, Deutschland
Vibrationsmischer/Vortex	RS-VA 10	Phönix Instruments	Garbsen, Deutschland
Waage, Analysewaage		Sartorius	Göttingen, Deutschland
Waage, Präzisionwaage		Sartorius	Göttingen, Deutschland
Wasserbad Precision GP28	15315867	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge, Megafuge 16R	521-2065	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge, Megafuge® 1.0R	75003060/02	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

*Tabelle 6: Verbrauchsmaterial*

Produkt	Produkt nummer	Firma	Firmensitz
Cell Counting Slides	L12001	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich
Eppendorf Tubes® 5.0 mL mit Schraubdeckel	30122305	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland



## Material und Methoden

<b>Produkt</b>	<b>Produkt nummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
Falcon® Round-Bottom Tubes, Disposable, Polystyrene, Corning®, 5 mL, Cap	352054	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar® 75 cm <sup>2</sup>	658175	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
FluoroBlomTM Insert 8.0 µm pore size 24 well format	351152	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
Multiwell 24-Well Companion Plate mit Membraneinsätzen	353504	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
Pasteurpipetten 2 ml, L: 230 mm, Glas	612-1702	VWR	Radnor, Pennsylvania, USA
Pasteurpipetten graduert 3 ml, Unsteril, 155 mm	EA65.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitze 10 µl SurPhop mit Filter steril	VT0200	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 10 µl SurPhop extra lang unsteril	VT0103	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 100 µl SurPhop mit Filter steril	VT0230	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 1.250 µl SurPhop mit Filter steril	VT0270	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 1.250 µl SurPhop extra lang unsteril	VT0173	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 20 µl SurPhop mit Filter steril	VT0220	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 200 µl SurPhop mit Filter steril	VT0240	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitze 200 µl SurPhop extra lang unsteril	VT0143	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reagenzreservoir 25 ml steril	89094-664	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml	0030121023	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe-Lock 1,5 ml	0030120086	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

## Material und Methoden

<b>Produkt</b>	<b>Produkt nummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
Reaktionsgefäße Safe-Lock 2,0 ml	0030120094	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Schülke wipes	119541	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette steril mit Filter 10 ml	607180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette steril mit Filter 2 ml	710180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette steril mit Filter 25 ml	760180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette steril mit Filter 5 ml	606180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipette steril mit Filter 50 ml	768180	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
StarGuard Protect Nitril Handschuhe M	SG-P-M	STARLAB INTERNATIONAL GmbH	Hamburg, Deutschland
terralin® liquid	102001	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
terralin® protect	181604	Schülke & Mayr GmbH	Hamburg, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 24 Well, transparent, Flachboden, steril	662160	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zellkultur Multiwellplatte, 6 Well, transparent, Flachboden, steril	657160	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zellkultur Multiwellplatte, 96 Well, transparent, Flachboden, steril	833924005	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup>	833910	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	833911	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	831830	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	188271	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen 50 ml	227261	Greiner bio-one GmbH	Kremsmünster, Österreich

## 2.1.4 Reagenzien

Tabelle 7: Reagenzien

Name	Produkt nummer	Firma	Firmensitz
1,4-Dithiothreitol DTT 5 g	6908.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Accutase® solution	A6964	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumperoxisdsulfat (APS)	9592.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Antibiotic-Antimycotic (100x)	1524006 2	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Artesunat	A3731	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Bovine Serum Albumin	A2153-100G	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	3947.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Collagen G	L7213	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Deferoxamin	D9533	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8418	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Docetaxel	1885	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure 100 %	3738.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol abs.	5176863 5	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	A3678	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Gibco® FBS	10500-064	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Glutamax I Supplement	35050-038	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Glycin	3790.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
HEPES (1M) Pufferlösung	1563010 6	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

## Material und Methoden

<b>Name</b>	<b>Produkt nummer</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
Iscove Basal Medium	F 0465	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Isopropanol			
Laminin	51746934	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
Matrigel	354234	Corning® Inc.	Corning, New York, USA
Methanol	1060081000	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	TA562033	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Molecular Probes CellTracker Green CMFDA Dye	C7025	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	M2128-5G	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
NaCl	3957.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Nuklease free water UltraPure Distilled Water (Rnase/Rnase free)	10977-035	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne MgCl <sub>2</sub> und CaCl <sub>2</sub>	14190-094	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride solution) 100mM	93482-50ML-F	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Poly-D-Lysin	51708035	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
RPMI 1640	R8758	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure HCl 1N	K025.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure HCl 5M	1.821.091.211	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Trypanblau 0,4 %	T8154-100ml	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypsin EDTA 0,25 %	T4049	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

### 2.1.5 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper

Name	Klon	Hersteller	Nummer	Verwendete Konzentration	Herkunft
Anti- $\alpha$ 2	P1E6	Merck Millipore	MAB1950Z	10 $\mu$ g/ml	Maus
Anti- $\alpha$ 3	P1B5	Merck Millipore	MAB1952Z	10 $\mu$ g/ml	Maus
Anti- $\alpha$ 5	P1D6	Merck Millipore	MAB1956Z	10 $\mu$ g/ml	Maus
Anti- $\alpha$ 6	Nkl-GoH3	Merck Millipore	MAB1378	10 $\mu$ g/ml	Ratte

### 2.1.6 Zelllinien

Durch eine einzelne Zelllinie ist es nicht möglich, das klinische Verhalten des PCa repräsentativ abzubilden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Panel aus drei Zelllinien verwendet. Die Zelllinien DU145, PC3 und LNCaP gehören zu den am häufigsten eingesetzten Zellen in der PCa-Forschung (64). Sie eignen sich u. a. aufgrund ihres unlimitierten Wachstums zum Screening auf das Ansprechen einer bestimmten Behandlung und damit zur Etablierung neuer Therapiekonzepte. Als weitere wichtige Differenzierung bilden die DU145- und die PC3-Zellen die Androgen-unabhängigen Eigenschaften ab, während die LNCaP-Zelllinie hormonsensitiv ist (65). Dies hat eine große Bedeutung im Hinblick auf die Resistenzbildung sowie die onkologische Therapie und zählte somit u. a. zu den Kriterien, die zur Auswahl der genannten Zelllinien in dieser Arbeit führte.

Um das Spektrum des PCa abzubilden, wurde ein Panel mit drei verschiedene Zelllinien verwendet. Neben den Therapie-sensitiven (parentalen) Zellen wurden die Versuche zusätzlich mit den jeweils gegen Docetaxel-resistenten (DR) Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jindrich Cinatl (Institut für Medizinische Virologie, Universitätsklinikum Frankfurt, Goethe-Universität, GER; Petra Joh-Forschungshaus, 60528 Frankfurt am Main, GER) und Prof. Dr. Martin Michaelis (Industrial Biotechnology Centre, School of Biosciences, University of Kent, Canterbury CT2 7NJ, UK) bzw. der *The Resistant Cancer Cell Line (RCCL) collection* zur Verfügung gestellt. Die Zellen

wurden mit aufsteigenden Konzentrationen des Chemotherapeutikums Docetaxel behandelt, bis es zu einer Resistenzbildung kam. Der Resistenznachweis erfolgte mittels Verschiebung des IC<sub>50</sub>-Wertes um mindestens das Doppelte.

### **DU145**

Die DU145-Zellen sind aus einer Metastase des zentralen Nervensystems (ZNS) abgeleitet, die von einem primären PCa stammt (66). Diese Zellen sind nicht hormonsensitiv, haben keinen funktionalen AR und produzieren kein PSA (67). Das metastatische Potenzial ist mäßig verglichen mit anderen Zelllinien, wie den PC3-Zellen (68). Die in dieser Arbeit verwendeten parentalen DU145-Zellen (Abbildung 1) entsprachen zu Beginn der Passage 242; die Docetaxel-resistenten DU145-Zellen (Abbildung 2) der Passage 152/12.

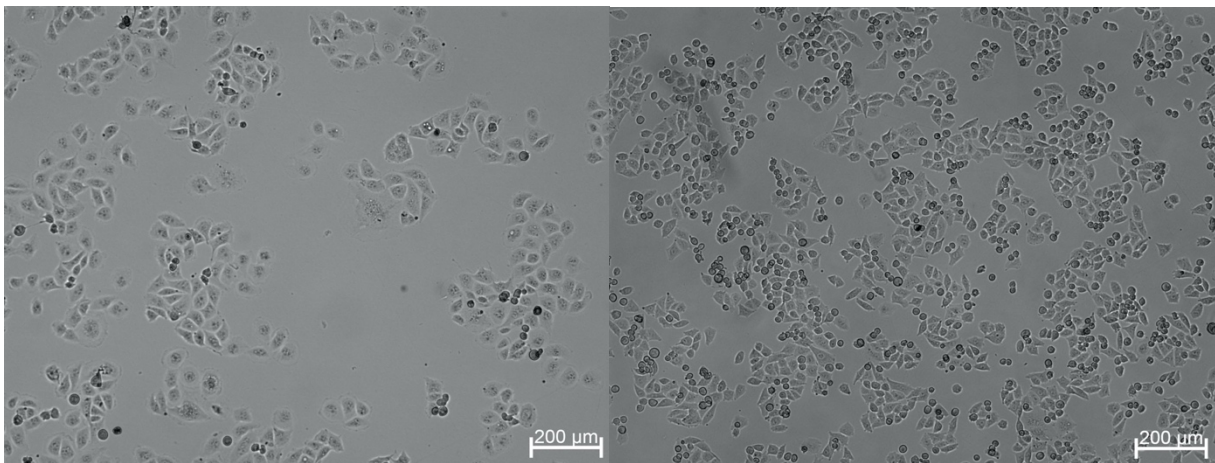


Abbildung 1: DU145 Parentale Zellen (40-fache Vergrößerung)

Abbildung 2: DU145 Zellen Docetaxel-resistent (40-fache Vergrößerung)

### **PC3**

Die PCa-Zelllinie PC3 wurde aus der Knochenmetastase eines 62-jährigen Europäers gewonnen (66). Im Gegensatz zu anderen Prostatakrebszelllinien zeichnen sich die PC3-Zellen durch das vergleichsweise hohe Metastasierungspotential aus. Sie besitzen keinen AR und exprimieren kein PSA (67). Die PC3-Zellen sind somit hormon- bzw. kastrationsresistent. Die in dieser Arbeit verwendeten parentalen PC3-Zellen (Abbildung 3) entsprachen zu Beginn

der Passage 155, die Docetaxel-resistenten PC3-Zellen (Abbildung 4) der Passage 74.

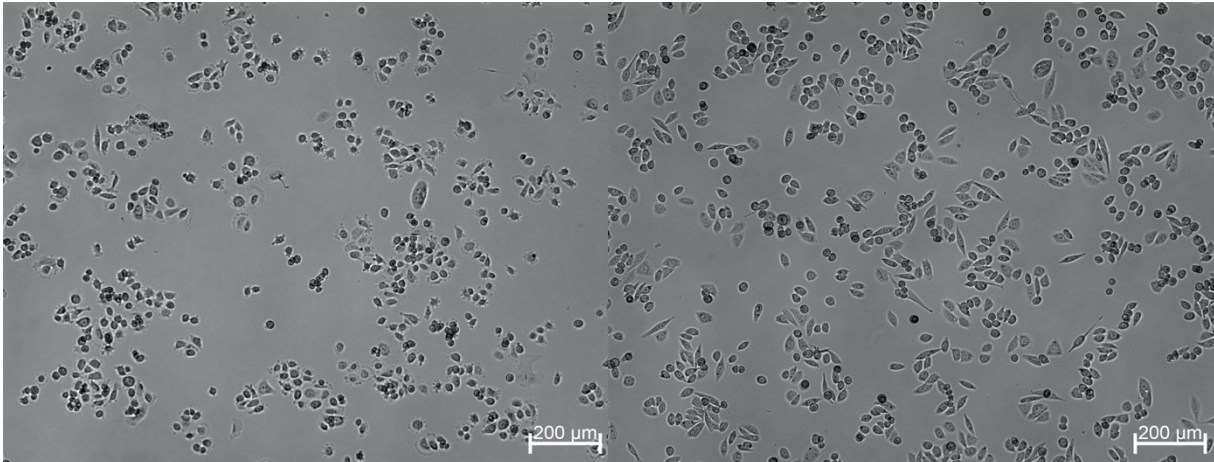


Abbildung 3: PC3 Parentale Zellen (40-fache Vergrößerung)

Abbildung 4: PC3 Zellen Docetaxel-resistent (40-fache Vergrößerung)

### **LNCaP**

LNCaP-Zellen stammen aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines metastasierten PCa. Diese Zellen exprimieren PSA und sind hormonsensitiv (66). Ein abweichendes Verhalten gegenüber Antiandrogenen war zu beobachten, da diese wachstumsfördernd wirkten. Dies sei durch eine Veränderung am AR im Sinne einer Überaktivierung zu erklären, wobei im Rahmen einer Mutation an Position 868 der Steroidbindungsdomäne Threonin mit Alanin substituiert ist (69). Die in dieser Arbeit verwendeten parentalen LNCaP-Zellen (Abbildung 5) entsprachen zu Beginn der Passage 403, die Docetaxel-resistenten LNCaP-Zellen (Abbildung 6) der Passage 200.

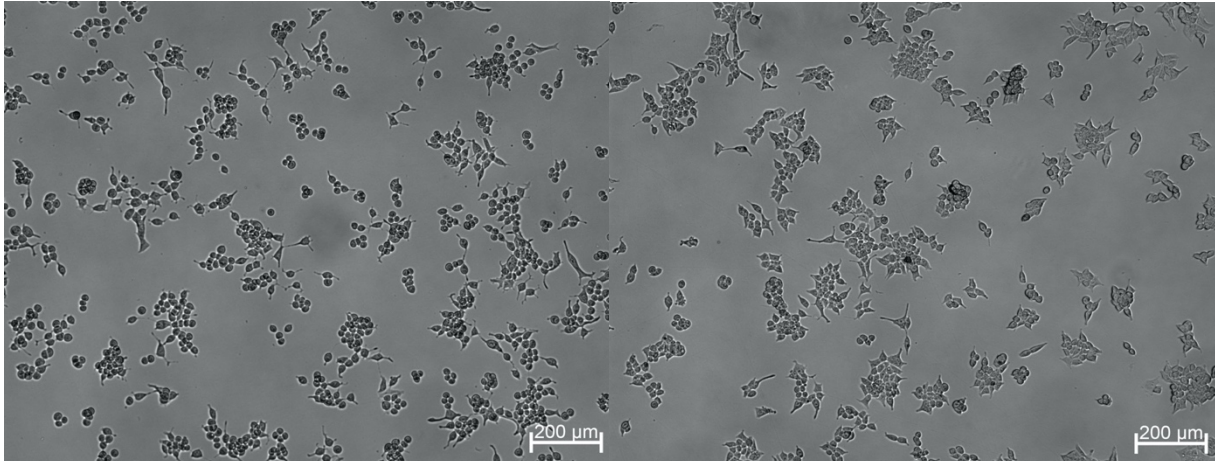


Abbildung 5: LNCaP Parentale Zellen (40-fache Vergrößerung)

Abbildung 6: LNCaP Zellen Docetaxel-resistent (40-fache Vergrößerung)

### 2.1.6.1 Isolation humaner Endothelzellen (HUVEC)

Um das Invasionsverhalten der PCa-Zellen zu evaluieren, wurden vaskuläre Endothelzellen aus Nabelschnüren isoliert. Die dazu notwendigen Nabelschnüre stammen aus der Gynäkologie/Geburtshilfe der Universitätsmedizin Mainz. Dazu wurde zunächst die Nabelschnurvene mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, um Verunreinigungen zu entfernen. (Dabei wurde PBS ohne  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$  verwendet, was im Folgenden als PBS- definiert ist.) Anschließend wurde die Vene an einer Seite abgeklemmt, Dispase eingespült und eine zweite Klemme gesetzt, so dass die Dispase über eine Inkubationszeit von 20 Minuten in der Vene verblieb. Dadurch wurde das Ablösen der Endothelzellen erreicht. Nach Ablauf der 20 Minuten wurde die Flüssigkeit aus der Nabelschnurvene in ein Falcon überführt, erneut mit PBS- gespült, zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit abgesaugt. Das entstandene Zellpellet mit den Endothelzellen wurden in 5 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Im Inkubator wurden die Zellen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 %  $CO_2$  kultiviert, bis diese konfluent waren und für die Versuche eingesetzt werden konnten.



### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Zellkulturmedium**

Das Zellkulturmedium diente als Nährmedium, um die Zellen kultivieren zu können. Für die Zelllinien DU145 und PC3 wurde das RPMI-1640 Medium benutzt. Dieses wurde vom Roswell Park Memorial Institute (RPMI) entwickelt. Das Iscove Basal Medium der Firma Biochrom GmbH wurde für die Zelllinie LNCaP benötigt. Dieses Medium wurde 1978 von N. N. Iscove und Jindrich Cinatl entwickelt. Sowohl das RPMI- als auch das Iscove-Medium funktionieren über ein Hydrogencarbonat-Puffersystem und sind aus Glucose, Aminosäuren, Vitaminen und Salzen zusammengesetzt. Phenolrot dient als pH-Wertindikator. Weiterhin wurde 10 % fetales Kälberserum (FCS) hinzugegeben, wodurch den Zellen Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und Hormone zur Verfügung gestellt werden. Zu beiden Medien wurde jeweils Glutamin zugegeben. 20 mM HEPES dient der chemischen Pufferung im RPMI-Medium. Abschließend sollte durch das Hinzufügen von 1 % Streptomycin und Penicillin die Gefahr der Kontamination durch Bakterien herabgesetzt werden. Um die Resistenz in den entsprechenden Zelllinien aufrechtzuerhalten, wurde 12,5 nM Docetaxel hinzugegeben. Im Inkubator wurden die Zellen bei 37,0 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **2.2.2 Kultivierung der Zellen**

Die oben beschriebenen Zelllinien (2.1.6) wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert und entsprechend ihrer Konfluenz passagiert. Zunächst wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und anschließend 5 ml PBS- (phosphatgepufferte Salzlösung) auf die adhärenierten Zellen gegeben. Dieser Waschschrift diente dem Entfernen von Mediumresten und abgestorbenen Zellen. Es wurde PBS- verwendet, um Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> zu entziehen und somit die Zellen auf den enzymatischen Ablöseprozess vorzubereiten. Das PBS- wurde ebenfalls abgesaugt und 1 ml 0,25 %iges Trypsin auf den Zellrasen gegeben, wodurch nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C im CO<sub>2</sub>-Inkubator ein Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche erreicht wurde. Das Enzym Trypsin bewirkt eine Abspaltung von extrazellulären Proteinen, was im Ablösen der Zellen resultiert. Nachdem die Zellen abgelöst waren, wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von Kulturmedium abgestoppt. Dazu wurden 4 ml frisches

Medium (für die resistenten Zellen mit 12,5 nM Docetaxel versetzt) auf die abgelösten Zellen gegeben und resuspendiert. Nach dem Erreichen von ca. 80-90 % Konfluenz fand das Passagieren ca. zwei Mal pro Woche statt. Dabei wurden die Zellen in dem gewünschten Verhältnis in eine neue Zellkulturflasche überführt. Das Überführen der jeweiligen Zellmenge hing von den geplanten Versuchen ab und lag zwischen 1:2 bis 1:10. Schließlich wurde die neue Zellkulturflasche mit 12-13 ml Nährmedium (entsprechend mit oder ohne 12,5 nM Docetaxel) aufgefüllt und die Flasche leicht geschwenkt, um ein vollständiges Benetzen und ein gleichmäßiges Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Die Zellen verblieben für den späteren Gebrauch im Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.2.3 Behandlung der Zellen mit ART**

Für die Versuche wurden die Zelllinien (2.1.6) mit einer Konzentration von 37,5 µM ART behandelt und über 48 Stunden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. (Weiterhin wurde ein Teil der Zellen kryokonserviert; s. 2.2.4.) Als Kontrollen dienten jeweils ART-unbehandelte Zellen. Mittels MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) und BrdU (Bromdesoxyuridin) wurde die IC<sub>50</sub>-Werte (mittlere inhibitorische Konzentration) der verwendeten Zelllinien in vorausgegangenen Arbeiten ermittelt. Die Docetaxel-resistenten Zellen wurden während der ART-Exposition weiter mit Docetaxel behandelt.

### **2.2.4 Kryokonservierung von Zellen**

Die Zellen wurden kryokonserviert, um einen Vorrat zu etablieren und sie so zu lagern. Zum Konservieren von Zellen in zwei bis drei Kryoröhrchen (abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen) wurde eine 90-100 % konfluente 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche verwendet, um eine ausreichend hohe Zellzahl im Kryoröhrchen zu erzielen. Zunächst wurden die Zellen dazu, wie in 2.2.2 beschrieben, abgelöst und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden sie bei 1.200 rpm (Megafuge 16R) für 5 Minuten zentrifugiert, so dass sich ein Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes bildete. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 2-3 ml Einfriermedium mit 70 % Medium ohne Zusätze, 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Das DMSO hat eine zytotoxische Wirkung, so dass die Arbeiten

ab der Aufnahme der Zellen in das Einfriermedium zügig verliefen. Die Kryoröhrchen wurden mit der Zelllinie, der Passage, dem verwendeten Nährmedium, dem aktuellen Datum und dem Namen der durchführenden Person beschriftet. Die Zellen wurden anschließend mittels Einfrierhilfe schonend, in 1 °C-Schritten pro Minute, eingefroren. Die Zellen konnten so kurzzeitig (4 Wochen) im -80 °C Gefrierfach oder längerfristig im flüssigen Stickstoff gelagert werden.

### **2.2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Das Ermitteln der Lebendzellzahl ist in vielen Versuchen Basis zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit. Dies geschah mit Hilfe des LUNA Automated Cell Counter. Nach dem Ablösen der Zellen (siehe 2.2.2) wurden dazu 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt und 10 µl davon in eine Zählkammer überführt. Trypanblau ist ein anionischer Bisazofarbstoff, der die poröse Zellwand abgestorbener Zellen passieren kann und die Zellen dunkelblau färbt. Da Trypanblau an Proteine bindet und zytotoxisch ist, sollte die Zellzählung kurz nach der Zugabe des Farbstoffs erfolgen, da nach gewisser Zeit Trypanblau in alle Zellen eindringt. Der LUNA Automated Cell Counter ermittelt anhand der Färbung die Zellzahl der lebenden und der toten Zellen/ml. Die Gesamtzellzahl wurde entsprechend errechnet und an den Versuch angepasst.

### **2.2.6 Chemotaxis**

48 Stunden vor dem Beginn des Versuchs wurden die Zellen mit ART behandelt (2.2.3). Am Tag des Versuchs wurden die *24-Well Companion Platten* mit Einsätzen (*Inserts*) versehen, welche in die einzelnen *Wells* eingesetzt wurden. Die Einsätze haben am Boden einen Filter mit 8,0 µm Porengröße, den die Zellen passieren können. Für die Chemotaxis verbleiben die Filter ohne Beschichtung, während sie für die Migration und Invasion unterschiedlich beschichtet werden (s. 2.2.7). Am Versuchstag wurden die Zellen zunächst abgelöst und auf 10<sup>6</sup> Zellen pro Milliliter eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1.200 rpm (Megafuge 16R) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet in 1 ml serumfreien Medium resuspendiert. Danach wurden 4 µl *GreenDye* Lebendfarbstoff auf 1 ml Zellsuspension gegeben und die Färbelösung mit den Zellen für 30 Minuten bei 37 °C, 95 %

## Material und Methoden

Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Menge des Farbstoffs ist in Vorversuchen entsprechend der Zellzahl austitriert worden. Nach der Färbung wurde die Zellsuspension erneut 5 Minuten bei 1.200 rpm (Megafuge 16R) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Vollmedium mit 10 % FCS aufgenommen. Damit entsprachen 300 µl Zellsuspension weiterhin der gewünschten Zellzahl von 60.000 Zellen pro *Insert*. Für die Docetaxel-resistenten Zellen wurde ein mit Docetaxel versetztes Medium verwendet, um die Resistenz aufrecht zu erhalten. In das untere Kompartiment (unterhalb des *Inserts*) wurde jeweils Vollmedium mit 30 % FCS als Lockmedium pipettiert. Auch hierbei war die Zugabe des Docetaxels bei den resistenten Zellen zu beachten. Anschließend wurden, wie oben beschrieben, 300 µl bzw. 60.000 Zellen oben in jedes *Insert* pipettiert. Die Platten wurden anschließend 24 Stunden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

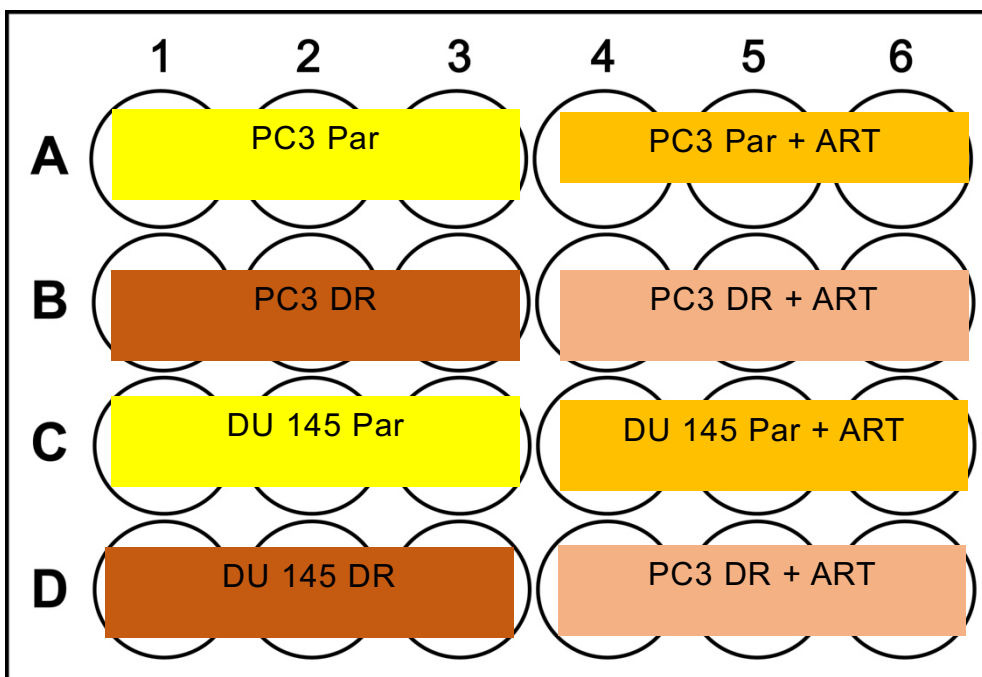


Abbildung 7: Chemotaxis: Pipettierschema. A+C 1-3: Parentale (Par) PC3-/DU145-Zellen = unbehandelte Kontrolle.; A+C 4-6: Parentale (Par) PC3-/DU145-Zellen, die mit Artesunat (ART) behandelt wurden; B+D 1-3: Docetaxel-resistente (DR) PC3-/DU145-Zellen als Kontrolle; B+D 4-6: Docetaxel-resistente (DR) PC3-/DU145-Zellen, die mit ART behandelt wurden. Dieses Pipettierschema erfolgte analog für die LNCaP-Zellen.

Nach 24 Stunden wurde das Medium im *Insert* sowie darunter abgesaugt und beides mit PBS+ gewaschen. Danach wurde die Fixierlösung (2 %ige Glutaraldehydlösung) in das untere Kompartiment pipettiert und dort für 15 Minuten belassen. Die Lösung wurde abgesaugt und die Platte am Sapphire mit dem Programm Azure Capture gemessen. Die Methode Fluoreszenz/Green Dye, die für diese Messungen angelegt wurde, wurde ausgewählt. Die Anregung erfolgte bei 488 nm und einer Laserstärke von 7. Um den Filter des *Inserts* messen zu können, wurde der Fokus des Lasers auf 2,5 mm (Auflösung 50 µm) für die Unterseite des *Inserts* und 1,5 mm (Auflösung 100 µm) für den Wellboden eingestellt. Dies wurde in Vorversuchen empirisch ermittelt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Azure Spot. Dabei wurden über eine genaue Definition des Messbereichs innerhalb der *Wells* die fluoreszierenden Zellen erfasst und entsprechend die Emission gemessen. Aus dieser Messung konnten die Werte in eine Excel-Tabelle zur weiteren Auswertung exportiert werden.

### 2.2.7 Migration

Zur Vorbereitung der Migration erfolgte die Behandlung der Zellen ebenfalls mit ART wie in 2.2.3 beschrieben. Darüber hinaus wurden die sich bereits in der *24-Well Companion* Platte befindlichen *Inserts* mit 100 µl Kollagenlösung (Kollagen 200 µg/ml) beschichtet und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Versuchstag musste das Kollagen aus den *Inserts* entfernt und mit 100 µl Blockierlösung (1 % bovines Serumalbumin (BSA) in PBS+, entspricht 5 g BSA in 500 ml PBS+) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert werden. PBS+ ist definiert als PBS mit MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurde die Blockierlösung aus den *Inserts* entfernt und einmal mit 100 µl PBS+ gewaschen. Das Einstellen der Zellzahl und das Ausplattieren der Zellen sowie die Messung und Auswertung wurde analog zur Chemotaxis (2.2.6) durchgeführt.

### 2.2.8 Invasion

Die Zelllinien wurden wie in 2.2.3 beschrieben mit ART behandelt. Ebenso wurden die *Inserts* wie in 2.2.7 dargestellt mit Kollagen beschichtet. Die Inkubation der beschichteten Einsätze erfolgte hier für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zuvor isolierte Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (siehe 2.1.6.1) wurden aus der Zellkulturflasche abgelöst und auf 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde das Gesamtvolumen auf

5 ml aufgefüllt. Somit entsprachen 100  $\mu$ l Zellsuspension einer Zellzahl von 20.000 Zellen pro *Insert*. Die 100  $\mu$ l Zellsuspension wurde auf die mit Kollagen beschichteten *Inserts* gegeben und über Nacht bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Versuchstag entsprach das Vorgehen dem der Chemotaxis (2.2.6). Nach der Zugabe der Zellen in die *Inserts* wurde zusätzlich zu den 300  $\mu$ l Zellsuspension 200  $\mu$ l HUVEC-Medium hinzugegeben. Die Inkubationszeit, die Messung und Auswertung wurde analog zur Chemotaxis (2.2.6) durchgeführt.

### 2.2.9 *Scratch Wound Migration Assay*

Vertiefende Untersuchungen zum Metastasierungsverhalten wurden mit den Zelllinien DU145 und PC3 durchgeführt. Dabei wurden jeweils parentale und Docetaxel-resistente ART-unbehandelte PCa-Zellen ART-behandelten gegenübergestellt. Die Versuchsdurchführung erfolgte in 6-Well-Platten. Am ersten Tag wurde dazu ein Gitter händisch auf die Unterseite der *Wells* gezeichnet, um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Abschnitte im Well zu ermöglichen. Die Zellen wurden abgelöst und in jedes Well 2 x 10<sup>6</sup> Zellen ausgesät, um am nächsten Tag eine 80-90 %ige Konfluenz zu erreichen. Pro Well wurden drei Banden in den bestehenden Zellrasen mit einer 1.000  $\mu$ l Pipettenspitze gezogen (Abbildung 8).

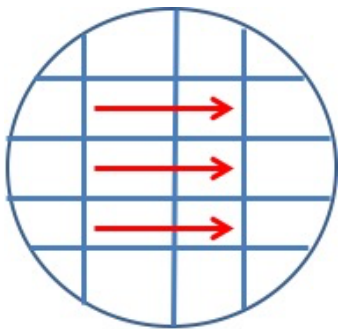


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Welleinteilung mittels Gitter in der 6-Well-Platte. Entlang der in Rot dargestellten Pfeile wurden die Bahnen in den bestehenden Zellrasen gezogen. Dies geschah mit einer 1.000  $\mu$ l Pipettenspitze.

Nach der Herstellung der Wunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und mit ART behandelt. Das Gesamtvolumen betrug 5 ml pro Well.

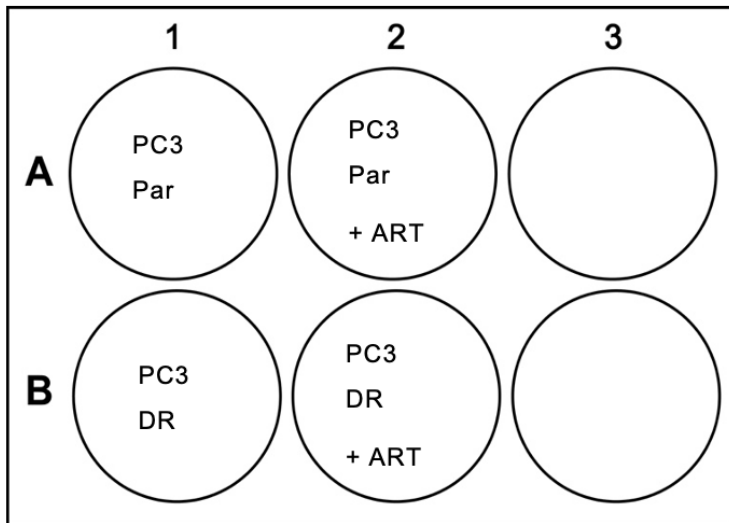


Abbildung 9: Scratch Wound Migration Assay. Exemplarische Darstellung für die Plattenbelegung (hier für PC3). ART-unbehandelte parentale (Par) und Docetaxel-resistente (DR) Zellen dienen als Kontrollen. [Endkonzentration ART 37,5  $\mu$ M]

Nach 24 Stunden Inkubation wurden von den einzelnen Wells unter dem Mikroskop Aufnahmen für die spätere Auswertung gemacht. Die Auswertung erfolgte mit dem *Plugin Scratch Assay* im Programm *ImageJ* (70).

### 2.2.10 Blockadestudien zur chemotaktischen Aktivität

Die Vorbereitung des Versuchs erfolgte analog zur Chemotaxis (2.2.6). Nach der Färbung mit *GreenDye* wurden 195 µl Zellsuspension der jeweiligen Zelllinien entnommen (= 195.000 Zellen) und 5 Minuten bei 1.200 rpm (Megafuge 16R) in einem 2 ml Reaktionsröhrchen zentrifugiert. Danach wurde das entstandene Zellpellet in 325 µl Nährmedium gelöst und 3,25 µl Antikörper zur Blockade hinzu pipettiert. Das entspricht einer Konzentration des Antikörpers von 10 µg/ml. Bei der Zelllinie DU145 wurden Integrine  $\alpha$  3, 5, 6; bei den LNCaP- und PC3-Zellen die Integrine  $\alpha$  2, 3, 5, 6 blockiert. Die Zellen wurden mit dem Antikörper unter gelegentlichem Aufschütteln für eine Stunde bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets jeweils in 975 µl Vollmedium (bzw. Vollmedium mit Docetaxel für die resistenten Zellen) aufgenommen. 300 µl Zellsuspension entsprachen somit 60.000 Zellen. Das weitere Prozedere erfolgte analog zur Chemotaxis (2.2.6).

### 2.2.11 MTT-Assay

Das MTT-Assay basiert auf einem Farbumschlag durch die Reduktion des namensgebenden Tertrazoliums Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Das MTT stellt die oxidierte Form dar und ist wasserlöslich. Durch die stoffwechselaktiven Zellen kommt es zur Reduktion des Farbstoffes, wodurch das blaue, nicht wasserlösliche Formazan entsteht (71). Photometrisch konnte der Farbumschlag als Extinktionswert gemessen und mittels einer Eichkurve in eine Zellzahl umgerechnet werden.

Für den Versuch wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl auf 100.000 Zellen pro Milliliter eingestellt. Der Versuch wurde mit parental und Docetaxel-resistenten PC3, DU145 und LNCaP durchgeführt. Die parental und Docetaxel-resistenten Zellen wurden mit den funktionsblockierenden Antikörpern gegen  $\alpha$  5 und  $\alpha$  6 geblockt, wobei unbehandelte und mit ART behandelte PCa-Zellen als Kontrollen dienten. Dabei ist die Behandlung mit ART als Vergleich zur Wirkung der blockierenden Antikörper anzusehen. In die *Wells* (96-Well-Platte) wurden jeweils 50 µl Normalmedium vorgelegt. Für die Docetaxel-resistenten Zelllinien wurden 12,5 nM Docetaxel hinzugegeben. Für die Behandlung mit ART



wurde eine Endkonzentration von 37,5  $\mu\text{M}$  verwendet, während für die Blockade jeweils 20.000 PCa-Zellen mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Antikörper behandelt wurden. Die Inkubationszeit des Antikörpers betrug eine Stunde bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 %  $\text{CO}_2$ . Anschließend wurden die Zellen ausplattiert, wobei zu den bereits 50  $\mu\text{l}$  vorgelegtem Medium (mit Docetaxel bzw. ART versetzt) 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension pipettiert wurden, was einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  (= 5.000 Zellen/Well) entsprach. Nach 72 Stunden Inkubationszeit unter oben genannten Bedingungen wurden 10  $\mu\text{l}$  MTT-Reagenz in die Wells pipettiert. Nach weiteren 4 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Zugabe des Solibilisierungspuffers (10 % SDS in Aqua dest., 0,01 N HCL) (100  $\mu\text{l}$  pro Well). Über Nacht wurden die Platten erneut unter den bekannten Bedingungen inkubiert. Die photometrische Messung des Farbumschlags wurde am Folgetag am Plattenlesegerät (Tecan Spark 10M) bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzmessung bei 700 nm mit der Software Magellan durchgeführt.

### 2.2.12 Statistische Auswertung der Versuchsreihen

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism genutzt. Das verwendete Verfahren war der gepaarte *t*-Test. Zwei voneinander abhängige Stichproben wurden verglichen und auf Unterschiede geprüft. Für alle Daten wurden die einzelnen Werte vor der statistischen Analyse auf die Kontrollen (auf 100 % gesetzt), die den jeweiligen parental Zellen entsprach, normalisiert. Die Unterschiede in den Ergebnissen der Versuche wurden prozentual berechnet. Signifikanzen wurden mit Signifikanzsternen in den Ergebnisgraphen kenntlich gemacht (Tabelle 9). Als signifikant wurden alle Ergebnisse gewertet, in denen der *p*-Wert  $\leq 0,05$  war. Alle beschriebenen Versuche wurden mindestens drei Mal wiederholt.

Tabelle 9: *p*-Werte mit Signifikanzniveaus und deren Definition

<b>p-Wert</b>	<b>Signifikanz</b>	<b>Bedeutung</b>
$p > 0,05$	ns	nicht signifikant
$p \leq 0,05$	*	signifikant
$p \leq 0,01$	**	hoch signifikant
$p \leq 0,001$	***	höchst signifikant

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Veränderung der Zellmobilität und invasiven Eigenschaften nach ART-Exposition

##### 3.1.1 Chemotaxis, Migration, Invasion

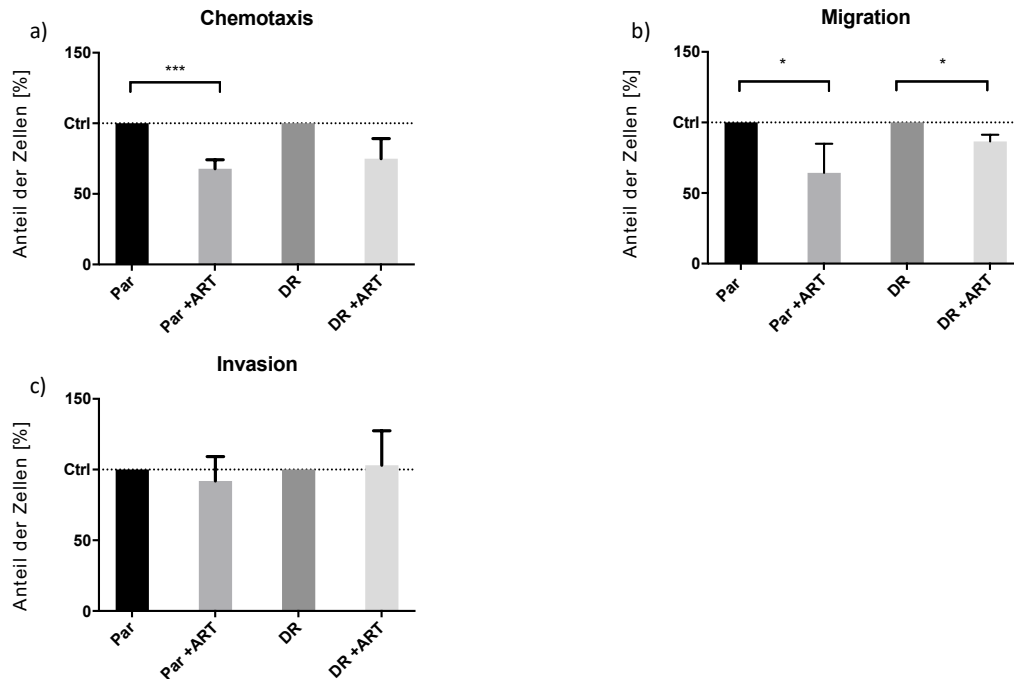


Abbildung 10: Chemotaxis, Migration und Invasion der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) DU145-Zellen nach einer Artesunat (ART)-Behandlung (37,5  $\mu$ M). a-c) Auf der x-Achse wurde die Plattenbeschichtung, auf der y-Achse die Aktivität der motilen Zellen in Prozent aufgetragen. Es wurde jeweils auf die ART-unbehandelten parentalen bzw. die Docetaxel-resistenten Zellen normalisiert. Die Balkenhöhe beschreibt den Mittelwert der einzelnen Versuche. Die Standardabweichung (SD) wird anhand der Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanzen (\*) beziehen sich auf die auf 100 % normalisierten Kontrollen (Par und DR):  $p \leq 0,05 = *$  (signifikant);  $p \leq 0,001 = ***$  (höchst signifikant).  $n = 4$ .

Die parentalen DU145-Zellen zeigten nach der Behandlung mit ART eine signifikant verringerte Chemotaxis, während die Docetaxel-resistenten Zellen zwar tendenziell weniger motil waren, sich jedoch kein signifikanter Effekt zeigte (Abbildung 10 a). Die Migration war sowohl in den parentalen als auch Docetaxel-resistenten DU145-Zellen nach Exposition mit ART signifikant reduziert (Abbildung 10 b). Für die Invasion zeigten sich in den DU145-Zellen nach ART-Gabe hingegen keine signifikanten Unterschiede zu den ART-unbehandelten Kontrollen (Abbildung 10 c).

Die PC3-Zellen zeigten in der Chemotaxis ein ähnliches Verhalten wie die zuvor genannten DU145-Zellen. So war bei den Docetaxel-resistenten PC3-Zellen eine signifikante Reduktion der chemotaktischen Aktivität im Vergleich zu den nicht

## Ergebnisse

mit ART behandelten Zellen zu beobachten (Abbildung 11 a). Bei den parentalen PC3-Zellen konnte hingegen keine signifikante Reduktion der Zellmotilität nach ART-Gabe [37,5 µM] nachgewiesen werden. Auch für die Migration und Invasion waren nach ART-Exposition keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den ART-unbehandelten Kontrollzellen zu erkennen (Abbildung 11).

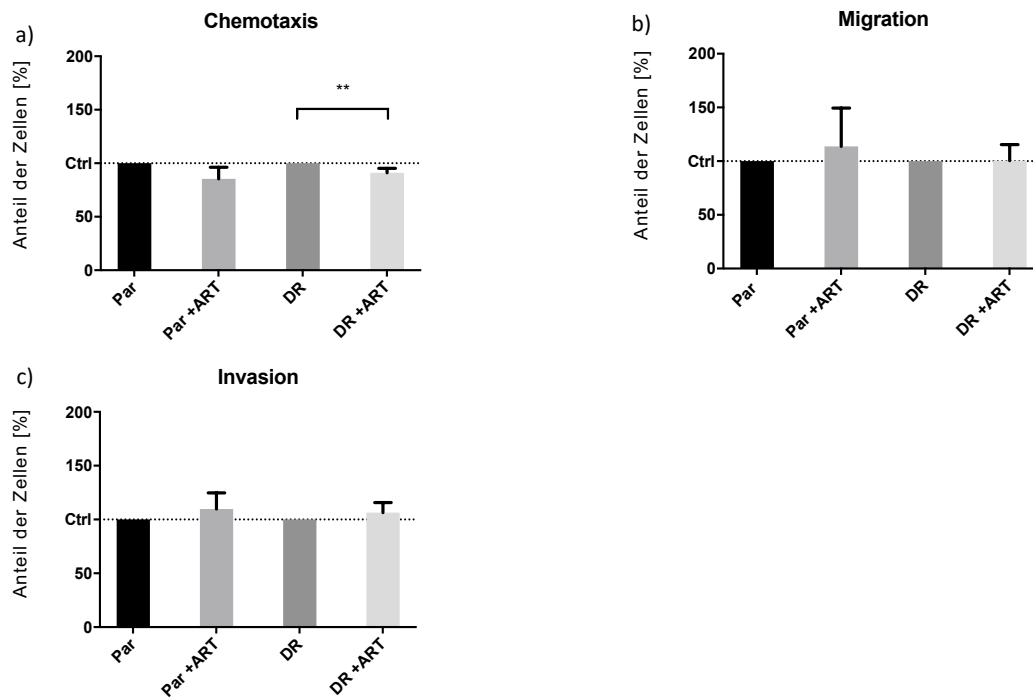


Abbildung 11: Chemotaxis, Migration und Invasion der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) PC3-Zellen nach einer Artesunat (ART)-Behandlung (37,5 µM). a-c) Auf der x-Achse wurde die Plattenbeschichtung, auf der y-Achse die Aktivität der motilen Zellen in Prozent aufgetragen. Es wurde jeweils auf die ART-unbehandelten parentalen bzw. die Docetaxel-resistenten Zellen normalisiert. Die linke Gruppe zeigt in den Graphen die parentale Gruppe, die rechte die Docetaxel-resistente. Die Balkenhöhe beschreibt den Mittelwert der einzelnen Versuche. Die Standardabweichung (SD) wird anhand der Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanzen (\*) beziehen sich auf die auf 100 % normalisierten Kontrollen (Par und DR):  $p \leq 0,05 = *$  (signifikant);  $p \leq 0,001 = ***$  (höchst signifikant).  $n = 4$ .

Die LNCaP-Zellen wurden durch die ART-Behandlung im Vergleich zu den DU145- und PC3-Zellen am stärksten in ihrem Metastasierungsverhalten inhibiert. So induzierte ART [37,5 µM] in den parentalen und Docetaxel-resistenten LNCaP-Zellen eine signifikante Hemmung der Chemotaxis (Abbildung 12 a). Die Docetaxel-resistenten LNCaP waren dabei nach ART-Behandlung etwas stärker eingeschränkt als die parentalen Zellen. Auch die Migration war nach Gabe von ART sowohl in den parentalen als auch Docetaxel-resistenten Zellen im Vergleich zu den ART-unbehandelten Kontrollzellen signifikant reduziert (Abbildung 12 b). Für die Invasion konnten, wie zuvor bei den DU145- und PC3-Zellen, keine signifikanten Effekte detektiert werden

## Ergebnisse

(Abbildung 12 c). Im *Scratch-Assay* ließen sich keine reproduzierbaren Ergebnisse feststellen, so dass die Resultate in dieser Arbeit nicht gezeigt sind.

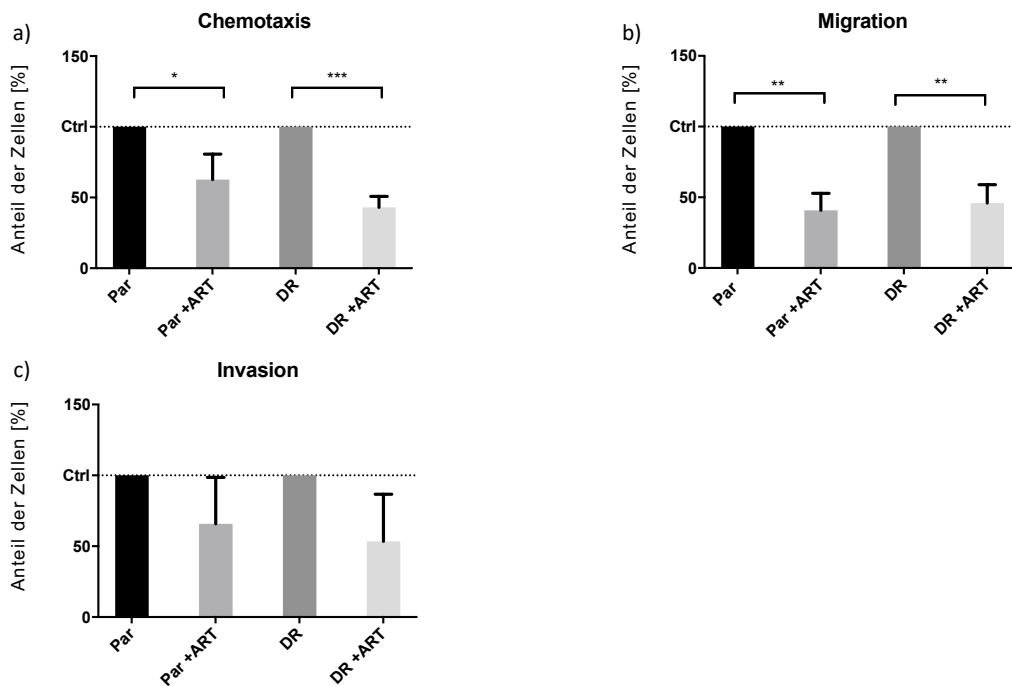


Abbildung 12: Chemotaxis, Migration und Invasion der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) LNCaP-Zellen nach einer Artesunat (ART)-Behandlung (37,5  $\mu$ M). a-c) Auf der x-Achse wurde die Plattenbeschichtung, auf der y-Achse die Aktivität der motilen Zellen in Prozent aufgetragen. Es wurde jeweils auf die ART-unbehandelten parentalen bzw. die Docetaxel-resistenten Zellen normalisiert. Die linke Gruppe zeigt in den Graphen die parentale Gruppe, die rechte die Docetaxel-resistente. Die Balkenhöhe beschreibt den Mittelwert der einzelnen Versuche. Die Standardabweichung (SD) wird anhand der Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanzen (\*) beziehen sich auf die auf 100 % normalisierten Kontrollen (Par und DR):  $p \leq 0,05 = *$  (signifikant);  $p \leq 0,001 = ***$  (höchst signifikant).  $n = 4$ .

## **Evaluation der funktionellen Relevanz veränderter Integrin-Subtypen nach ART-Behandlung**

In Vorversuchen war evaluiert worden, inwiefern sich die Expression der Integrin-Subtypen an der Oberfläche der parentalen und resistenten Zelllinien durch die Behandlung mit ART verändert.

Die Integrine  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  waren dabei in den parentalen und Docetaxel-resistenten DU145-Zellen nach ART-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant reduziert.

Auch in den parentalen PC3-Zellen war Integrin  $\alpha 5$  und in den parentalen und Docetaxel-resistenten PC3-Zellen Integrin  $\alpha 6$  durch ART signifikant in der Oberflächenexpression verringert. Die resistenten PC3-Zellen zeigten nach ART-Gabe weiterhin eine signifikant geringere Expression des Integrin  $\alpha 2$ . Das Integrin  $\alpha 3$  war in den parentalen und Docetaxel-resistenten PC3-Zellen nach ART-Behandlung hingegen signifikant erhöht.

Die Docetaxel-resistenten LNCaP-Zellen zeigten wie die DU145- und PC3-Zellen eine signifikante Inhibition der Oberflächenexpression von Integrin  $\alpha 6$ . Die Expression des Integrin  $\alpha 5$  war in den parentalen und resistenten LNCaP nach ART-Behandlung hingegen unverändert. Integrin  $\alpha 2$  zeigte nach Exposition mit ART sowohl bei den parentalen als auch den resistenten LNCaP-Zellen eine signifikante Reduktion.

Auf Grundlage der Daten wurden für die Blockadestudie für DU145 die Integrine  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  sowie für PC3- und LNCaP-Zellen die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  blockiert. Als Kontrollen dienten nicht blockierte parentale bzw. Docetaxel-resistente Zellen.

Bei den parentalen DU145-Zellen zeigte sich nach der Blockade des Integrins  $\alpha 5$  eine signifikante Reduktion der Chemotaxis im Vergleich zur nicht blockierten Kontrolle (Abbildung 13).

Nach Blockade der Integrine  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  war kein Effekt bei den parentalen Zellen zu beobachten. Auch für die Docetaxel-resistenten Zellen war nach Blockade der drei ausgewählten Integrin-Subtypen kein Effekt auf die chemotaktische Aktivität zu verzeichnen.

## Ergebnisse

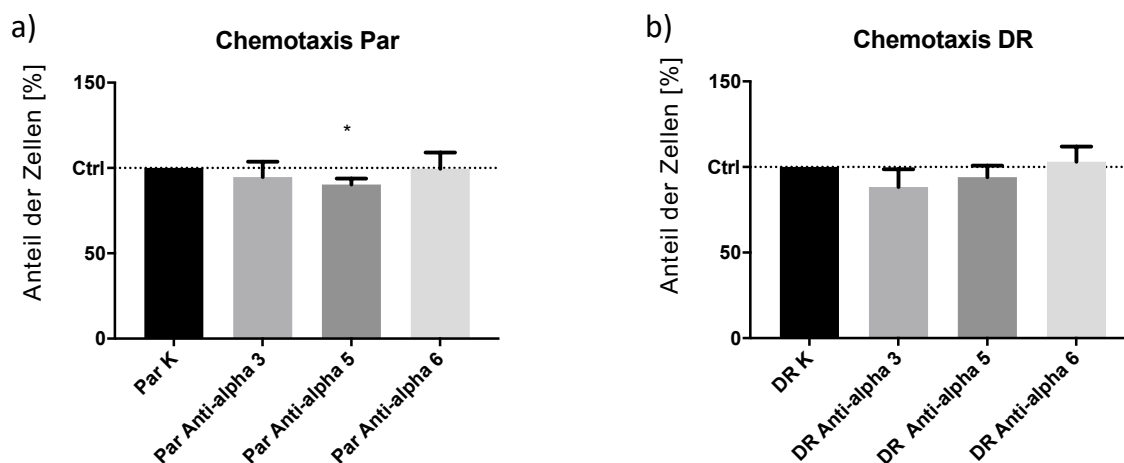


Abbildung 13: Blockade der Chemotaxis der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) DU145-Zellen nach Blockade der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ . Auf der x-Achse wurde die Plattenbeschichtung, auf der y-Achse die Prozentzahl der motilen Zellen aufgetragen. Es wurde jeweils auf die parentalen bzw. die Docetaxel-resistenten ART-unbehandelten Zellen normalisiert (Ctrl, auf 100% gesetzt). Die Balkenhöhe beschreibt den Mittelwert der einzelnen Versuche. Die Standardabweichung (SD) wird anhand der Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanzen (\*) beziehen sich auf die Kontrollen:  $p \leq 0,05$  = \* (signifikant).  $n = 3$ .

Weder die parentalen noch die Docetaxel-resistenten PC3-Zellen zeigten signifikante Effekte nach Blockade der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  in der Chemotaxis (Abbildung 14).

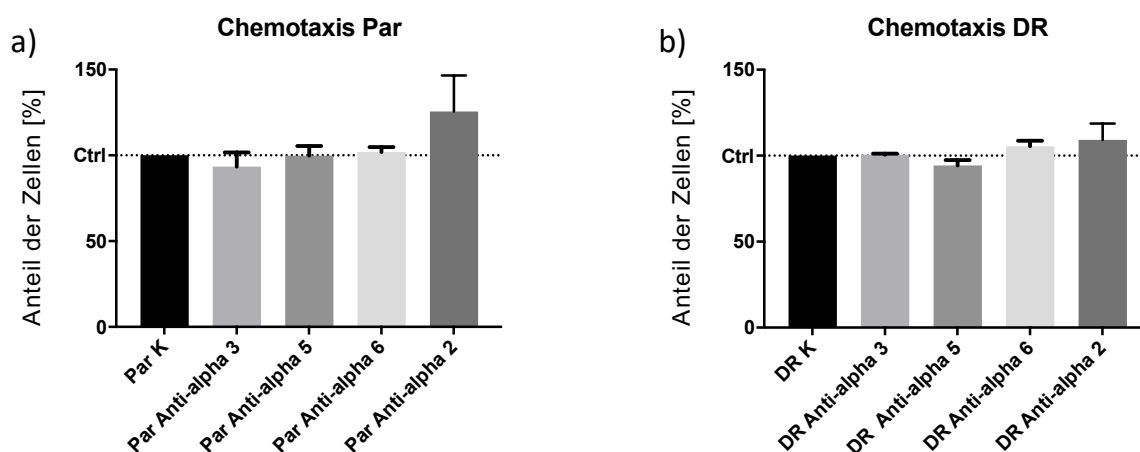


Abbildung 14: Blockade der Chemotaxis der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) PC3-Zellen nach Blockade der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ . Auf der x-Achse wurde die Plattenbeschichtung, auf der y-Achse die Prozentzahl der motilen Zellen aufgetragen. Es wurde jeweils auf die parentalen bzw. die Docetaxel-resistenten ART-unbehandelten Zellen normalisiert (Ctrl, auf 100% gesetzt). Die Balkenhöhe beschreibt den Mittelwert der einzelnen Versuche. Die Standardabweichung (SD) wird anhand der Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanzen (\*) beziehen sich auf die Kontrollen:  $p \leq 0,05$  = \* (signifikant).  $n = 3$ .

Die Chemotaxis der Docetaxel-resistenten LNCaP-Zellen war nach der Blockade der Integrine  $\alpha 3$  und  $\alpha 5$  signifikant reduziert (Abbildung 15).

## Ergebnisse

Nach der Blockade von Integrin  $\alpha 6$  war hingegen keine signifikante Reduktion der Chemotaxis, jedoch eine tendenzielle Erniedrigung der chemotaktischen Aktivität nach Integrin  $\alpha 2$ -Blockade messbar. Die Blockade der Integrine  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  in den parentalen LNCaP-Zellen resultierte in keinen signifikanten Effekten (Abbildung 15).

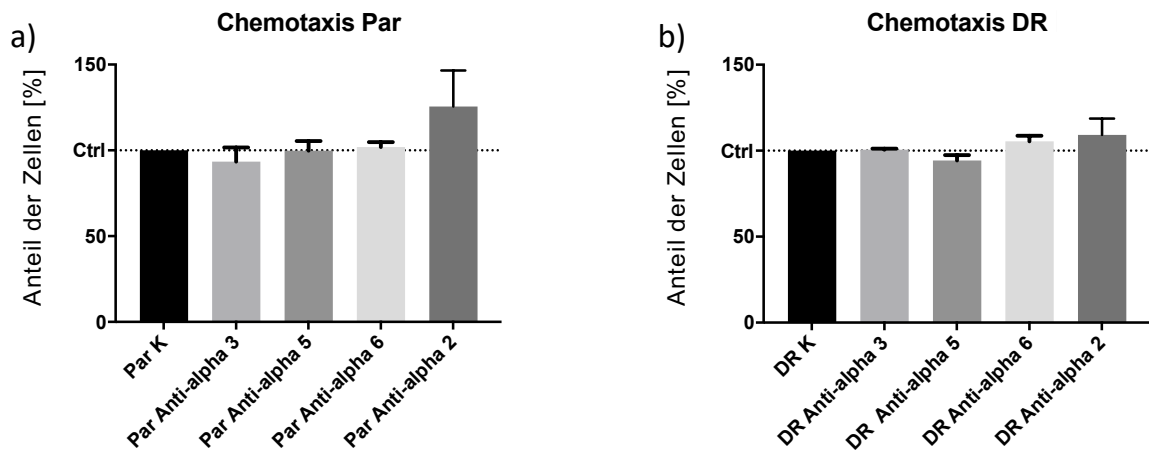


Abbildung 15 Blockade der Chemotaxis der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) LNCaP-Zellen nach Blockade der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ . Auf der x-Achse wurde die Plattenbeschichtung, auf der y-Achse die Prozentzahl der motilen Zellen aufgetragen. Es wurde jeweils auf die parentalen bzw. die Docetaxel-resistenten ART-unbehandelten Zellen normalisiert (Ctrl, auf 100% gesetzt). Die Balkenhöhe beschreibt den Mittelwert der einzelnen Versuche. Die Standardabweichung (SD) wird anhand der Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanzen (\*) beziehen sich auf die Kontrollen:  $p \leq 0,05$  = \* (signifikant).  $n = 3$ .

## Einfluss von ART auf das Wachstum der PCa-Zellen

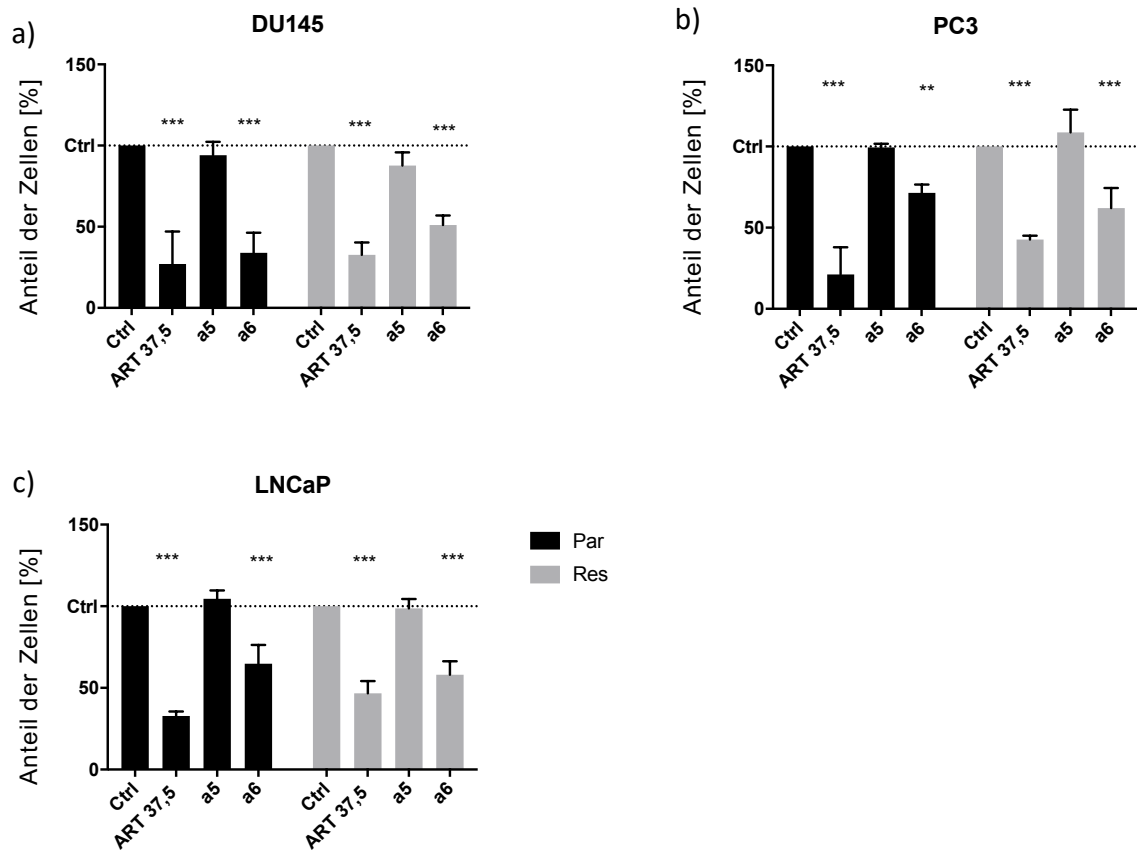


Abbildung 16: Blockadestudie. MTT-Assay der parentalen (Par) und Docetaxel-resistenten (DR) DU145, PC3 und LNCaP-Zellen nach Blockade der Integrine  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ . x-Achse: Behandlungen, y-Achse: Anzahl der Zellen [%]. unbehandelte (Ctrl) und mit 37,5  $\mu$ M ART behandelte parentalen bzw. die Docetaxel-resistenten Zellen dienen als Kontrollen. Ctrl wurden auf 100 % gesetzt. Die Standardabweichung (SD) wird anhand der Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanzen (\*) beziehen sich auf die auf 100 % normalisierten Kontrollen (Par und DR):  $p \leq 0,01 = **$  (hoch signifikant),  $p \leq 0,001 = ***$  (höchst signifikant).  $n=4$ .

Da Integrine als Differenzierungsmarker auch in das Wachstum von Tumorzellen involviert sein können, wurde die funktionelle Bedeutung der Integrine auf das Wachstum der parentalen und Docetaxel-resistenten DU145-, PC3- und LNCaP-Zellen nach Blockade der Integrine  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  untersucht. Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit 37,5  $\mu$ M ART behandelte Zellen. Die Effekte waren bei allen drei Zelllinien, sowohl den parentalen als auch den resistenten Pendanten, sehr ähnlich. Bei der Behandlung mit ART waren, wie in den vorangegangenen Studien, höchst signifikante Reduktionen des Wachstums der Zellen zu verzeichnen. Weiterhin war nach der Blockade des Integrins  $\alpha 6$  das Wachstum der parentalen und Docetaxel-resistenten PCa-Zelllinien hoch- bis



höchstsignifikant reduziert (Abbildung 16). Die Blockade von Integrin  $\alpha 5$  zeigte keine solche Effekte.

### **4 Diskussion**

In Deutschland stellt das PCa die häufigste Ursache des Mannes für Krebs dar (9). Genetische Disposition, fortgeschrittenes Alter und der persönliche Lebensstil können Risikofaktoren sein, die zur Entstehung des PCa führen (15). Die Erkrankung verläuft initial häufig symptomlos, so dass es erst in fortgeschrittenen, meist metastasierten, Stadien zur Diagnosestellung kommt. In der Konsequenz ist u. a. Docetaxel indiziert (20), dessen Wirksamkeit sich jedoch im Verlauf aufgrund der Resistenzbildung der Tumorzellen als limitiert erweist. Als mögliche Ursachen für die Taxanresistenz werden u. a. mutierte Bindungsstellen der Mikrotubuli und ein erhöhter Efflux des Medikamentes durch Transporter diskutiert. Auch wenn sich die Datenlage über das PCa in den letzten Jahren verbesserte, ist von dem Zeitpunkt der Resistenzbildung an von einem palliativen Therapiekonzept auszugehen. Patienten wünschen sich in diesem Kontext häufig Alternativen zur Schulmedizin (50). Naturstoffe könnten dabei, vor allem als integrativer Bestandteil, das Potenzial haben, Therapiekonzepte zu ergänzen und Resistenzen zu vermindern (51).

ART, abgeleitet aus Artemisinin, ein Naturstoff und Bestandteil der TCM, ist ein wichtiges Medikament, das schon in früheren Studien eine Hemmung der Zellproliferation und -metastasierung in verschiedenen Tumorentitäten zeigen konnte (63, 64). Auch wenn ART als Medikament gegen Malaria bekannt und zugelassen ist, zeigt es darüber hinaus anti-tumorale Effekte (72). In Dünnschnittkulturen eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms wurde nach einer Behandlung mit ART bzw. seinen Derivaten wie Dihydroartemisinin eine Abflachung der Tumorzellen sowie eine Ablösung der Zellkontakte der Tumorzellen festgestellt (73). Auch nimmt ART negativen Einfluss auf das Wachstum und die Metastasierung Sunitinib-resistenter Nierenzellkarzinomzellen (74) und zeigt insgesamt synergistische Effekte im Zusammenhang mit etablierten Chemotherapeutika (75).

Welchen Einfluss ART auf die Metastasierung von PCa-Zellen, insbesondere auch therapieresistente PCa-Zellen hat, war bisher unbekannt.

Da die Metastasierung bei der Entstehung des PCa eine entscheidende Rolle spielt, lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der chemotaktischen Aktivität sowie des Migrations- und Invasionsverhaltens von PCa-Zellen nach ART-Exposition. Es war das Ziel dieser Arbeit, das Verhalten der PCa-Zellen nach ART-Exposition zu evaluieren und darüber hinaus in Blockadestudien die funktionelle Relevanz von Integrinen für die Metastasierung herauszustellen. Das übergeordnete Bestreben liegt in der Etablierung neuer, wirkungsvollerer Therapieoptionen für Patienten mit fortgeschrittenem PCa.

### **4.1 Der Einfluss von ART auf die Zellmobilität und invasiven Eigenschaften der PCa-Zellen**

#### **4.1.1 ART verändert zelltypspezifisch die Chemotaxis der PCa-Zellen**

Die ART-Exposition führte bei den parentalen DU145-Zellen zu einer signifikant verringerten Chemotaxis. Bei den Docetaxel-resistenten DU145-Zellen war eine tendenziell verringerte Chemotaxis zu erkennen. Interessant war, dass bei den PC3-Zellen die chemotaktische Aktivität nur in den Docetaxel-resistenten Zellen nach ART-Exposition signifikant verringert war. Vergleichsweise stark wurde zudem die Chemotaxis der parentalen und resistenten LNCaP-Zellen durch die ART-Behandlung beeinträchtigt.

Darüber hinaus zeigte ART auch bei kutanen Plattenzellkarzinomzellen eine inhibierende Wirkung auf die Bewegungsfähigkeit der Zellen, was gleichzeitig mit einer guten Übereinstimmung aus den Ergebnissen dieser Arbeit einhergeht (76).

#### **4.1.2 ART beeinflusst zelltypspezifisch die Migration der PCa-Zellen**

Neben der Chemotaxis wurde in der vorliegenden Arbeit bei den jeweils parentalen und Docetaxel-resistenten PC3-Zellen, bei den DU145- und LNCaP-Zellen, eine signifikante Reduktion der Migration durch ART induziert.

Auch in anderen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Pankreaskarzinom wurde in guter Übereinstimmung mit unseren Daten nach ART-Exposition eine verringerte Zellmotilität nachgewiesen (77). Weiterhin zeigte sich auch in anderen urologischen Tumorentitäten wie dem Blasenkarzinom, dass ART u. a. die Migration von Blasenkrebszellen hemmt (78). In einer Studie wurden zwei Blasenkrebszelllinien mit verschiedenen Konzentrationen ART über 24 Stunden behandelt und anschließend die Lebensfähigkeit und Motilität der Zellen in

verschiedenen Assays überprüft. Es stellte sich heraus, dass ART die Fähigkeit der Blasenkarzinomzellen zu migrieren verminderte, während das physiologische Blasenepithel nicht durch toxische Einflüsse geschädigt wurde (78). Darüber hinaus wurde in einer weiteren Arbeit sowohl die Wirkung von ART auf Blasenkarzinomzellen, die sensibel auf das Standardchemotherapeutikum Cisplatin waren, als auch Blasenkarzinomzellen, die sich bereits als resistent gegen ebendieses erwiesen, überprüft (79). Auch hier bestätigte sich, dass ART eine dosisabhängige Hemmung der Migration auslöst (80). Entsprechend erschien ART auch hier als ein potenzieller Zusatzstoff, um Cisplatin, als etabliertes Chemotherapeutikum gegen Blasenkarzinome, bei der Behandlung von fortgeschrittenem oder gegen das Chemotherapeutikum resistenten Blasenkrebs zu optimieren (79). Ähnlich verhält es sich mit einer weiteren urologischen Entität: dem Nierenzellkarzinom. In einer Studie aus der Arbeitsgruppe Jüngel wurde der Einfluss von ART auf die Motilität von Nierenzellkarzinomzellen untersucht. Dabei wurden sowohl parentale als auch therapieresistenten Nierenzellkarzinomzellen verwendet. Es zeigte sich, dass vor allem die Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinomzellen in einem hohen Maß auf die zusätzliche Behandlung mit ART reagierten, indem die Migration signifikant verringert wurde (81). Bedeutsam erscheint zudem, dass ART vor allem die Motilität der resistenten Nierenzellkarzinomzellen herabsetzte (81). Auch auf gynäkologische Tumoren wirkt ART tumorsuppressiv ein. Beispielsweise reduzierte ART signifikant die Migration von Brustkrebszellen, wobei die physiologischen epithelialen Zellen der Mammae nicht beeinträchtigt wurden (82). Die Autoren beschrieben, dass die Expression der Gene, die u. a. Migration beeinflussen, sich dahingehend abwandeln, dass dies zu einer herabgesetzten Aktivität der Mammakarzinomzellen führte. Somit zeigte sich ART auch hier in den Versuchen als eine potenziell wirksame Ergänzung in der Therapie (82).

Dass ART in vitro die Zellmotilität hemmt und in Wundheilungsassays zu einem verzögerten Verschluss der Zellschicht führt, wurde auch für weitere Entitäten wie das Leberzellkarzinom gezeigt (63). Dabei wurde die Fähigkeit der Leberzellkarzinomzellen, durch Kammern zu migrieren, untersucht und eine Verringerung dieser bereits ab einer ART-Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  verzeichnet. Dieses Ergebnis wurde auch in Versuchen von anderen Autoren

bestätigt, die den Einfluss ART auf Leberzellkarzinomzellen in Kombination mit der Standardtherapie mit Sorafenib für fortgeschrittene Lebertumore prüften (83). So konnte im Zellmigrationstests eine Hemmung der Migration der Leberkarzinomzellen nach Behandlung mit ART und Sorafenib nachgewiesen werden. Die Autoren postulierten daher, dass Sorafenib in Kombination mit ART eine Behandlungsmöglichkeit für hepatozelluläre Karzinome darstellen könnte. Das Mengenverhältnis von ART und Sorafenib sowie die Darreichungsform müssen allerdings noch in klinischen Studien geprüft werden (83).

In einer weiteren Studie wurde der Effekt von ART auf die Fähigkeit der Bronchialkarzinomzellen zu migrieren beleuchtet (84). Erneut konnte die hemmende Wirkung von ART auf die Motilität der Krebszellen gezeigt werden, so nahm die Migrationsfähigkeit der Bronchialkarzinomzellen nach der Exposition mit ART deutlich ab (84).

Auch das Schilddrüsenkarzinom wurde auf die Beeinflussbarkeit durch ART hin analysiert (85). Auch hier hemmte ART signifikant die Zellmotilität und induzierte darüber hinaus die Apoptose der Karzinomzellen. Dabei beeinflusst ART negativ den PI3K-Signalweg (86). Auch beim PCa spielt die PI3K eine Rolle, da durch die Aktivierung dieser sowohl die Tumorbildung per se als auch der Progress des PCa stimuliert wird (87). Darüber hinaus unterstützt PI3K in PCa die Therapieresistenz. Ob ART im PCa den PI3K-Signalweg beeinflusst, ist bisher spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen (85).

Insgesamt sind die hier gewonnenen Daten in einem guten Einklang mit den bisherigen Daten aus der Literatur.

### **4.1.3 ART verändert nicht die invasiven Eigenschaften der PCa-Zellen**

Für die Invasion konnte in allen drei PCa-Zelllinien nach ART-Exposition keine signifikanten Effekte beobachtet werden.

Insgesamt beeinflusst ART somit primär zelltypspezifisch die Chemotaxis und Migration der PCa-Zellen. Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe Jüngerl konnten dazu bereits eine veränderte Integrinexpression auf der Oberfläche PCa-Zellen nach ART-Behandlung zeigen (88).

Die Wirkung von ART war somit zelltypspezifisch. Dies ist nicht überraschend, da die LNCaP-Zellen grundlegende molekulare Unterschiede zu den PC3- und

DU-145-Zellen aufweisen. Zu den wichtigsten Unterschied zählt die Androgen-Sensitivität der LNCaP-Zellen im Gegensatz zu den Androgen-insensitiven PC3- und DU-145-Zellen. Dies spiegelt die Heterogenität des PCa wider und ist bereits häufig in der Literatur unter verschiedenen Aspekten diskutiert worden (89-91). In der vorliegenden Arbeit wurden daher bewusst PCa-Zelllinien unterschiedlichen Ursprung gewählt (s. 2.1.6), um die Diversität und Komplexität des PCa, wie sie auch klinisch besteht, darzustellen. Dies soll im Folgenden ausgeführt werden.

Vergleicht man grundsätzlich die Motilität der drei Zelllinien und somit deren Potenzial zu metastasieren, fallen Unterschiede auf.

Das geringste Metastasierungspotenzial weisen nach ART-Exposition die LNCaP-Zellen auf, was sich darin widerspiegelt, dass sie sich im Vergleich zu den anderen Zelllinien überdurchschnittlich gut durch ART hemmen lassen. Es zeigt sich, dass sowohl bei der Chemotaxis als auch bei der Migration die parentalen und Docetaxel-resistenten LNCaP-Zellen signifikant weniger motil sind, nachdem sie mit ART behandelt wurden. Die DU145-Zellen haben ein mittleres metastatische Potenzial (68), was auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche erkennbar wird: Die parentalen DU145-Zellen lassen sich in der Chemotaxis und in der Migration signifikant durch ART hemmen, wobei auch die Motilität der Docetaxel-resistenten DU145-Zellen in der Migration nach der Behandlung mit ART signifikant reduziert ist (s. Abbildung 10). Die PC3-Zellen hingegen weisen ein hohes Metastasierungspotenzial auf (67). Unter diesem Aspekt können die Ergebnisse der Versuche im Hinblick auf die Zellmobilität diskutiert werden, denn sowohl die parentalen als auch die Docetaxel-resistenten PC3-Zellen lassen sich in ihrer Motilität weniger durch ART hemmen als die zuvor genannten LNCaP- und DU145-Zellen (s. Abbildung 11). Das unterstützt die Hypothese des grundsätzlich erhöhten Metastasierungspotenzials der PC3-Zellen.

#### **4.2 Die durch ART veränderte Integrin-Expression resultiert in einer modifizierten Zellmotilität**

Integrine stellen als Teil der extrazellulären Matrix (ECM) einen wichtigen Faktor bei der Metastasierung von Tumoren dar. Sie sind transmembranöse Glykoproteine, die aus zwei Untereinheiten bestehen: der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -

Untereinheit (92). Das PCa entwickelt sich häufig über mehrere Stufen und kann im androgen unabhängigen Stadium enden (93). Diese Entwicklungsschritte gehen u. a. mit einer gestörten Expression und Funktion der Integrine einher, wodurch es konsekutiv zu einem anormalen Zusammenspiel von ECM und Integrinen kommt (94). Daraus ergibt sich wiederum eine erhöhte Migration und Proliferation der Zellen, was zum Progress des Karzinoms beiträgt (95). Daraus lässt sich ableiten, dass Integrine in diversen Krebsentitäten – wie auch dem PCa – fehlreguliert und somit ein Target für Therapien sein könnten (96).

Auch innerhalb der Arbeitsgruppe Jünger wurden Vorversuche zur Evaluation der Expression verschiedener Integrin-Subtypen an parentalen und Docetaxel-resistenten PCa-Zelllinien nach ART-Exposition durchgeführt (88). Dabei zeigte sich, dass ART die Integrinexpression zu beeinflussen vermag, wobei insbesondere drei Integrine,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$ , zelltypspezifisch signifikant geringer exprimiert wurden (88).

Aufgrund der in den Vorarbeiten erhobenen Daten, wurden in dieser Arbeit für die Zelllinie DU145 die Integrine  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  sowie für die PC3-Zellen und die LNCaP-Zelllinie die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  funktionell blockiert.

Bei der Chemotaxis zeigte sich bei den parentalen DU145-Zellen eine signifikante Reduktion nach Blockade des Integrins  $\alpha 5$ . Auch in anderen Krebsentitäten, wie dem Mammakarzinom, wurde eine veränderte Expression des Integrins  $\alpha 5$  und ein möglicher Einfluss auf das Zellwachstum und die Motilität beschrieben (97). Das legt nahe, dass Integrin  $\alpha 5$  auch bei der Metastasierung des PCa eine Rolle spielen könnte.

In anderen Studien wurde beispielsweise die Wirkung von Millettocalyxin B, ein Stoff, der aus der Rinde von *Millettia erythrocalyx* isoliert werden kann (98), auf die Motilität von Lungenkarzinomzellen untersucht. Dabei zeigte sich sowohl, dass die dünnen Pseudopodien der Zellen nach Behandlung mit Millettocalyxin B deutlich geringer ausgeprägt waren als auch, dass die Motilität der Lungenkarzinomzellen verringert war. Interessanterweise waren Proteine, die die Zellmotilität regulieren, ebenso reduziert. Dazu gehörte auch das Integrin  $\alpha 5$  (99).

Integrin  $\alpha 5$  ist mit Integrin  $\beta 1$  der Rezeptor für Fibronektin und bindet dazu an Kollagen (100). Es wird postuliert, dass die Integrine  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  auch in die

Invasion von Tumorzellen involviert sind (100). Zumindest partiell scheint dies auch beim PCa der Fall zu sein, wie die vorliegenden Daten zeigen. Auch in anderen urologischen Entitäten, wie beispielsweise dem klarzelligen Nierenzellkarzinom, spielt das Integrin  $\alpha 5$  eine große Rolle, da es deutlich hochreguliert vorliegt, wenn es gegen die Therapie, den Multikinasehemmer Sunitinib, resistent geworden ist (101). In der Folge wurde in einer Arbeit gezeigt, dass nach einer Blockade des Integrins  $\alpha 5$  die Zellmotilität der klarzelligen Nierenzellkarzinome herabgesetzt ist, was die Relevanz dieses Integrins bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen herausstellt (81, 101).

Bei den parentalen LNCaP-Zellen resultierte die Blockade der genannten Integrine in keinen signifikanten Ergebnissen. Nach Blockade von Integrin  $\alpha 2$  war zwar eine tendenzielle Abnahme der chemotaktischen Aktivität zu verzeichnen. Die Funktion des Integrins  $\alpha 2$  im PCa wird in der Literatur kontrovers diskutiert (102). In manchen Blockadestudien wurde eine positive Verknüpfung zwischen einer Integrin  $\alpha 2$ -Expression und der Zellmotilität bzw. der Metastasierung gesehen (102), während andere Autoren das Integrin  $\alpha 2$  als Tumorsuppressor beschrieben und eine negative Korrelation zwischen der Expression von Integrin  $\alpha 2$  und der ossären Metastasierung sahen (103). Darüber hinaus ist interessant, dass in einer klinischen Studie in ossären Metastasen eine erhöhte Expression von Integrin  $\alpha 2$  im Vergleich zum Primarius festgestellt werden konnte (104). Weiterhin wurde beschrieben, dass das Integrin  $\alpha 2$  auch mit Wachstumsfaktoren wie dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) assoziiert wird (105), was die Verbindung des Integrins  $\alpha 2$  mit Wachstum der (Krebs-) Zellen aufzeigen könnte. Die eben beschriebenen Ergebnisse vorangegangener Studien sind ein Indikator für die Diversität des PCa und seiner Metastasierung. Die Diversität des PCa wiederum könnte die tendenzielle Abnahme, aber fehlende Signifikanz der Filiasierung der LNCaP-Zellen, erklären.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass ART in der vorliegenden Studie zelltypspezifisch die Chemotaxis und Migration der PCa-Zellen hemmte. Die veränderte Migration der Tumorzellen ließ sich jedoch nicht in allen Zelllinien bzw. Subzelllinien auf das durch ART veränderte Integrin-Expressionsmuster zurückführen. Andere Adhäsionsrezeptoren, wie CD44, Selektine oder Cadherine, könnten hier (mit-)involviert sein. Möglicherweise führt die

Modulation der Integrine durch ART auch zu einem veränderten Tumorzellwachstum.

### **4.3 Die durch ART veränderte Integrin-Expression resultiert in einem reduzierten Tumorzellwachstum von PCa-Zellen**

Integrine spielen nicht nur für die Motilität des Tumors eine Rolle (s. 4.2), sondern auch für das Überleben der Zelle sowie bei der Ausbildung von Wachstumsfaktorrezeptoren (92). Die veränderte Integrin-Expression, kann somit auch in einem veränderten Tumorzellwachstum münden. Zumindest führte die Behandlung der PCa-Zellen mit ART in der vorliegenden Arbeit zu einem verringerten Zellwachstum. Die antitumorale Wirkung von ART, in Form von einem reduzierten Wachstum, wurde auch in einer Arbeit an DU145- und LNCaP-Zellen gezeigt (106). Auch neuere Studien bestätigen, dass in Docetaxel-resistenten DU145-, PC3- und LNCaP-Zellen sowohl eine Proliferations- als auch eine Wachstumshemmung verzeichnet werden kann (107). Aber nicht nur im PCa, sondern auch in anderen urologischen Tumorentitäten wie dem Sunitinib-resistenten Nierenzell- (81) oder dem Cisplatin-resistenten Blasenkarzinom (79), zeigte sich ein verringertes Wachstum nach ART-Exposition (74). Zudem wurden synergistische Effekte ART in Kombination mit etablierten Chemotherapeutika beispielsweise beim hepatozellulären Karzinom (HCC) erkennbar. In diesen Versuchen wurde Sorafenib, die medikamentöse Standardtherapie bei fortgeschrittenem Leberzellkarzinomen, mit ART kombiniert, wodurch die krebshemmende Wirkung erzielt wurde (75).

ART hemmt somit das Tumorzellwachstum signifikant. Dass die Behandlung mit ART von PCa-Zellen zudem in einem veränderten Integrinmuster mündet, wurde in vorherigen Arbeiten der AG Jünger gezeigt (88).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher bei parentalen und Docetaxel-resistenten Zelllinien das Tumorzellwachstum nach Blockade der Integrine  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  untersucht, welche durch die ART-Behandlung inhibiert wurden. Unbehandelte und mit ART exponierte Zellen dienten als Kontrollen.

Die Blockade des Integrins  $\alpha 6$  reduzierte in der vorliegenden Arbeit das Wachstum der parentalen und Docetaxel-resistenten PCa-Zellen hoch- bis höchstsignifikant. Nach Blockade des Integrins  $\alpha 5$  konnte hingegen kein verändertes Zellwachstum beobachtet werden.



Auch beim Mammakarzinom fanden sich in einer Untergruppe dieser Krebszellen Hinweise für eine gesteigerte Ausprägung des Integrins  $\alpha 6$  (108). Es ist in einer Studie gezeigt worden, dass das Integrin  $\alpha 6$  in einem hohen Maß für das Wachstum und das Fortbestehen der Zellen essenziell ist und dass Integrin  $\alpha 6$  somit einen Ansatzpunkt für gezielten Therapien darstellt (108).

Ein Zusammenhang zwischen Integrinen, Zellzyklus und Zellwachstum konnte bei Mammakarzinom-Zellen gezeigt werden (109). Besonders interessant war dabei, dass das *Knockdown* vom Integrin  $\alpha 6$  zu einem G0/G1-Arrest im Zellzyklus führte und somit zu einem geringen Zellwachstum. Ein reduziertes Zellwachstum und ein zelltypabhängiger G0/G1-Arrest waren nach einer Behandlung mit ART auch bei PCa-Zellen zu detektieren (107). Das Mamma- und PCa zeigen vielen Gemeinsamkeiten (110). So sind Tumore, die von ihnen ausgehen, in der Regel hormonabhängig. Folglich ist es nicht abwegig, dass die Integrin-Modulation von Integrin  $\alpha 6$  in beiden Tumorentitäten funktionell zu einem ähnlichen Ergebnis führt.

Um festzustellen, inwiefern die Integrin-Modulation durch ART beim PCa zu einem Zellzyklusarrest führt und somit das Zellwachstum hemmt, müssen im Weiteren Zellzyklusanalysen nach Blockade durchgeführt werden, um diese Hypothese zu stützen.

## 5 Fazit

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig das Potenzial von ART gezeigt werden, die Zellmotilität von PCa-Zellen *in vitro* zu reduzieren. Insbesondere in der Chemotaxis und der Migration war ein Ansprechen auf die ART-Behandlung nachweisbar. Die Invasion der PCa-Zellen wurde durch ART hingegen nicht signifikant beeinflusst. Die Motilität der PCa-Zellen wurde dabei, insbesondere in den LNCaP-Zellen, durch ART-bedingte Modulationen der Integrinexpression inhibiert. Integrin  $\alpha 6$ , welches signifikant durch ART gehemmt wurde, war zudem maßgeblich in die durch ART induzierte Wachstumshemmung der PCa-Zellen involviert.

Zusammenfassend konnte die antitumorale Wirkung von ART auf die Tumorzellmotilität und vertiefend weitere wachstumshemmenden Mechanismen von therapiesensitiven und Docetaxel-resistenten PCa-Zellen gezeigt werden. Weitere Studien sind notwendig, um die in dieser Arbeit erhobenen Daten zu verifizieren.

## 6 Ausblick

Ausgehend von den gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit zu ART, wäre es interessant, weitere Mechanismen hinter den therapeutischen Effekten von ART zu evaluieren, z. B. durch Untersuchung weiterer PCa-relevanter Signalwege, auf die ART Einfluss nehmen könnte.

Zelllinienbasierte Versuche stellen eine essenzielle Grundlage für die präklinische Forschung dar, jedoch bestehen aufgrund der *Monolayer*-Kulturbedingungen und des Fehlens eines lebendigen Organismus Limitationen. Weiterführende Untersuchungen im Tiermodell wären daher wünschenswert, um belastbarere Daten auch unter physiologischen Bedingungen zu erhalten (65). So könnten die *in vitro* Daten *in vivo* verifiziert werden, ein weiterer Schritt, um Patienten mit therapieresistenten oder fortgeschrittenen PCa ein neues suffizientes Therapiekonzept mit ART als *Additivum* anbieten zu können.

### **7 Zusammenfassung**

Da das Prostatakarzinom in Deutschland die häufigste Krebserkrankung beim Mann darstellt, ist es klinisch von besonders hoher Relevanz. Docetaxel, ein Chemotherapeutikum, bietet einen vielversprechenden Behandlungsansatz, ist in seiner Effektivität jedoch durch seine Resistenzbildung zeitlich limitiert. Alternative Heilungsansätze sind gefragt, sind jedoch oftmals nicht evidenzbasiert und können daher nicht verabreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Problematik aufgegriffen und sowohl an parentalen als auch Docetaxel-resistenten Prostatakarzinomzelllinien die Wirksamkeit von Artesunat, aus der Traditionellen Chinesischen Medizin, auf das Metastasierungsverhalten untersucht.

Dazu wurde an einem Panel parentaler und Docetaxel-resistenter Prostatakarzinomzellen, DU145, PC3 und LNCaP, nach Artesunat-Exposition die Chemotaxis, Migration und Invasion untersucht. Mittels Blockadestudien wurde zudem die funktionelle Relevanz der Artesunat-bedingten Modulationen der Integrin-Subtypen, relevanter Adhäsionsrezeptoren bzw. Differenzierungsmarker, auf das Metastasierungsverhalten und das Wachstum evaluiert.

Zelltypspezifisch wurde durch Artesunat die chemotaktische Aktivität und Migration der parentalen und Docetaxel-resistenten Prostatakarzinomzellen inhibiert. Die invasiven Eigenschaften der Prostatakarzinomzellen wurden hingegen nicht durch die Exposition mit Artesunat beeinflusst. Wie in Vorstudien gezeigt, resultierte Artesunat zudem in der Modulation der Integrin-Subtypen. Wie die hier durchgeführten Blockadestudien der entsprechenden Integrine belegten, war die durch Artesunat induzierte Modulation der Integrine partiell in die durch Artesunat inhibierte Motilität der Prostatakarzinomzellen involviert. Weiterhin konnte Integrin  $\alpha 6$  als maßgeblicher Faktor für die Artesunat-bedingte Wachstumshemmung aller Prostatakarzinomzellen identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Artesunat die Metastasierung von parentalen und Docetaxel-resistenten Prostatakarzinomzellen inhibiert. Darüber hinaus konnte die Einbindung der Integrine in die Artesunat-bedingte Hemmung der Motilität und des Wachstums nachgewiesen werden. Aufgrund der gewonnenen Daten postulieren wir, dass

## Zusammenfassung

---

Artesunat vielversprechend als integrativer Bestandteil in der Behandlung von Patienten mit Prostatakarzinom sein könnte. Weiterführende Untersuchungen müssen dies weiter verifizieren.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Randazzo M, Grobholz R. Prostata: Anatomie und Physiologie. Journal für Urologie und Urogynäkologie/Österreich. 2020;27(4):129-34.
2. Steger K. Anatomische und physiologische Grundlagen der Fertilität und der sexuellen Funktion. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. Die Urologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 1553-60.
3. Hautmann R, Huland H. Urologie: Springer-Verlag; 2006.
4. Muders M. Normale Anatomie und Histologie. Histopathologische Diagnostik der Prostatastanzbiopsie: Springer; 2020. p. 9-16.
5. Roosen A, Gratzke C, Herrlemann A, Magistro G, Strittmatter F, Weinhold P, et al. Ätiologie und Pathophysiologie der benignen Prostatahyperplasie. Der Urologe. 2013;52(2):186-92.
6. Berges RR, Pientka L, Höfner K, Senge T, Jonas U. Male lower urinary tract symptoms and related health care seeking in Germany. European urology. 2001;39(6):682-7.
7. Bach T, Heitz M, Bruns T. Benignes Prostatasyndrom. Der Urologe. 2020;59(5):544-9.
8. Bischoff M. Fortgeschrittenes Prostatakarzinom: Männer nach ihren Symptomen fragen. Uro-News. 2016;20(9):81-.
9. Robert Koch Institut ZfK. „Prostatakrebs (Prostatakarzinom)“ 2017 [Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html). (Stand: 30.09.2022, abgerufen am 25.10.2022).
10. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 2016.
11. Hermann S, Kraywinkel K. Epidemiologie des Prostatakarzinoms in Deutschland. Der Onkologe. 2019;25(4):294-303.
12. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005;55(2):74-108.
13. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. J Urol. 2002;168(3):906-13.
14. Meissner V, Jahnen M, Herkommer K. Familiäres Prostatakarzinom und genetische Prädisposition. Der Urologe. 2021;60(5):567-75.
15. Perdana NR, Mochtar CA, Umbas R, Hamid AR. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. Acta Med Indones. 2016;48(3):228-38.
16. Steinkohl F, Luger A, Bektic J, Aigner F. Ultraschall der Prostata. Der Radiologe. 2017;57(8):615-20.
17. Epstein JI. Prostate cancer grading: a decade after the 2005 modified system. Mod Pathol. 2018;31(S1):S47-63.
18. Ozkan TA, Eruyar AT, Cebeci OO, Memik O, Ozcan L, Kuskonmaz I. Interobserver variability in Gleason histological grading of prostate cancer. Scand J Urol. 2016;50(6):420-4.
19. Wittekind C. TNM: Klassifikation maligner Tumoren: John Wiley & Sons; 2016.
20. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. (AWMF)

- DKeVDuDKD. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms 2021 [Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/>]. (Stand: Oktober 2021, abgerufen am 18.12.2022).
21. Altwein J, Helpap B, Otto T, Rübber H, Wirth M. Prostatakarzinom—Pathologie, Praxis und Klinik: Pathologie, Praxis und Klinik: Springer-Verlag; 2013.
  22. Bründl J, Girtner F, Burger M. Das lokal fortgeschrittene Prostatakarzinom. *Uro-News*. 2021;25(7):40-7.
  23. Schnell D, Schön H, Weißbach L. Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. *Der Urologe*. 2009;48(9):1050-5.
  24. Leiner P. Niedrigrisiko-Prostatakarzinom: nach Operation bessere Prognose als vermutet. Springer; 2017.
  25. Lutz SZ, Todenhöfer T, Wagner R, Hennenlotter J, Ferchl JM, Scharpf MO, et al. Higher prevalence of lymph node metastasis in prostate cancer in patients with diabetes. *Endocrine-related cancer*. 2018;25(3):L19-L22.
  26. Jones D, Friend C, Dreher A, Allgar V, Macleod U. The diagnostic test accuracy of rectal examination for prostate cancer diagnosis in symptomatic patients: a systematic review. *BMC family practice*. 2018;19(1):1-6.
  27. Hammerer P, Manka L. Aktive Überwachung des Prostatakarzinoms. *Der Onkologe*. 2020;26(11):1069-78.
  28. Merriell SW, Funston G, Hamilton W. Prostate cancer in primary care. *Advances in therapy*. 2018;35(9):1285-94.
  29. Hammerer P. PSA-Screening: Sinnvoll oder Geldvernichtung? *Der Klinikarzt*. 2020;49(07/08):335-41.
  30. Mader FH, Riedl B. Beschwerden und Erkrankungen im urogenitalen Bereich. *Allgemeinmedizin und Praxis*: Springer; 2018. p. 261-97.
  31. Hentschel M, Paul D, Moser E, Brink I. Möglichkeiten und Grenzen der modernen Schnittbildverfahren (CT, MRT, PET) in der molekularen Bildgebung. *Der Nuklearmediziner*. 2007;30(01):31-41.
  32. Gerharz EW, Heidenreich A. Aktualisierte S3-Leitlinie Prostatakarzinom. *Im Fokus Onkologie*. 2022;25(1):22-5.
  33. Cytawa W, Seitz AK, Kircher S, Fukushima K, Tran-Gia J, Schirbel A, et al. 68Ga-PSMA I&T PET/CT for primary staging of prostate cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2020;47(1):168-77.
  34. Laschinsky C, Herrmann K, Fendler W, Nader M, Lahner H, Hadaschik B, et al. Onkologische Theranostik in der Nuklearmedizin. *Die Onkologie*. 2022:1-10.
  35. Chaloupka M, Westhofen T, Kretschmer A, Grimm T, Stief C, Apfelbeck M. Active Surveillance beim Prostatakarzinom. *best practice onkologie*. 2019;14(10):442-51.
  36. Förster B. Neue Hormontherapien beim metastasierten Prostatakarzinom. *Urologie in der Praxis*. 2021:1-6.
  37. Knipper S, De Santis M, Grimm M-O, Steuber T. Aktuelle medikamentöse Therapiekonzepte des metastasierten Prostatakarzinoms. *Der Onkologe*. 2019;25(4):343-51.

38. Willen C. Neuer Androgenrezeptorinhibitor für Patienten mit Hochrisiko-M0CRPC verfügbar. *Uro-News*. 2019;23(3):69-.
39. Davis I. Enzalutamid bei kastrationsresistentem Prostatakarzinom. *N Engl J Med* 2019.
40. Staub B. Docetaxel. *pharma-kritik*. 1997;18(19).
41. Wolf KW, Böhm KJ. Organisation von Mikrotubuli in der Zelle. *Biologie in unserer Zeit*. 1997;27(2):87-95.
42. Pasquier E, Kavallaris M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB life*. 2008;60(3):165-70.
43. Bartsch V. Wirkmechanismus der Taxane: Angriff auf die mitotische Spindel. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2005;34(2):104-8.
44. Gschwend J, Albers P, Bögemann M, Goebell P, Heidenreich A, Klier J, et al. Metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom. *Der Urologe*. 2018;57(1):34-9.
45. Petru E, Benedicic C. Chemotherapie, gezielte Tumorthherapie, Immuntherapie. *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*: Springer; 2019. p. 203-26.
46. West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug resistance updates*. 2002;5(6):234-48.
47. Domingo-Domenech J, Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Castillo-Martin M, Quinn SA, Rodriguez-Barrueco R, et al. Suppression of acquired docetaxel resistance in prostate cancer through depletion of notch-and hedgehog-dependent tumor-initiating cells. *Cancer cell*. 2012;22(3):373-88.
48. Sekino Y, Teishima J. Molecular mechanisms of docetaxel resistance in prostate cancer. *Cancer Drug Resist*. 2020;3(4):676-85.
49. Hashemi M, Zandieh MA, Talebi Y, Rahmanian P, Shafiee SS, Nejad MM, et al. Paclitaxel and docetaxel resistance in prostate cancer: Molecular mechanisms and possible therapeutic strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;160:114392.
50. Holzhauer P. Mit Bedacht kombinieren. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*. 2018;50(01):21-8.
51. Teiten MH, Gaascht F, Dicato M, Diederich M. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(9):1239-47.
52. Limonta P, Moretti RM, Marzagalli M, Fontana F, Raimondi M, Montagnani Marelli M. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Anticancer Activity of Natural Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(4):961.
53. WHO WHO. World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019. World Health Organization; 2019.
54. Schäfer B. Artemisinin: Ein neuer Wirkstoff gegen eine alte Krankheit. Teil 2 von 2. *Chemie in unserer Zeit*. 2014;48(3):216-25.
55. Group IAS. Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *The Lancet*. 2004;363(9402):9-17.
56. Gendrot M, Duflot I, Boxberger M, Delandre O, Jardot P, Le Bideau M, et al. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa: In vitro inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate. *International journal of infectious diseases*. 2020;99:437-40.

57. Zhou Y, Gilmore K, Ramirez S, Settels E, Gammeltoft KA, Pham LV, et al. In vitro efficacy of Artemisinin-based treatments against SARS-CoV-2. *Scientific reports*. 2021;11(1):1-14.
58. Kelter G, Steinbach D, Konkimalla VB, Tahara T, Taketani S, Fiebig H-H, et al. Role of transferrin receptor and the ABC transporters ABCB6 and ABCB7 for resistance and differentiation of tumor cells towards artesunate. *PLoS One*. 2007;2(8):e798.
59. Li PC, Lam E, Roos WP, Zdzienicka MZ, Kaina B, Efferth T. Artesunate derived from traditional Chinese medicine induces DNA damage and repair. *Cancer research*. 2008;68(11):4347-51.
60. Efferth T, editor *From ancient herb to modern drug: Artemisia annua and artemisinin for cancer therapy*. *Seminars in cancer biology*; 2017: Elsevier.
61. Perillo B, Di Donato M, Pezone A, Di Zazzo E, Giovannelli P, Galasso G, et al. ROS in cancer therapy: The bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020;52(2):192-203.
62. Konstat-Korzenny E, Ascencio-Aragón JA, Niezen-Lugo S, Vázquez-López R. Artemisinin and its synthetic derivatives as a possible therapy for cancer. *Medical Sciences*. 2018;6(1):19.
63. Weifeng T, Feng S, Xiangji L, Changqing S, Zhiquan Q, Huazhong Z, et al. Artemisinin inhibits in vitro and in vivo invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells. *Phytomedicine*. 2011;18(2-3):158-62.
64. Sobel RE, Sadar MD. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. *J Urol*. 2005;173(2):342-59.
65. Yu SQ, Lai KP, Xia SJ, Chang HC, Chang C, Yeh S. The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2009;11(1):39-48.
66. Webber MM, Bello D, Quader S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate*. 1997;30(1):58-64.
67. Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D. DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett*. 2006;580(9):2294-300.
68. 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.
69. Veldscholte J, Berrevoets CA, Mulder E. Studies on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1994;49(4-6):341-6.
70. Suarez-Arnedo A, Figueroa FT, Clavijo C, Arbeláez P, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PloS one*. 2020;15(7):e0232565.
71. Heilmann J. *Moderne Bioassay-Methoden*. *Pharmakognosie—Phytopharmazie*: Springer; 2007. p. 125-49.
72. He R-r, Zhou H-j. Progress in research on the anti-tumor effect of artesunate. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 2008;14(4):312-6.



73. Mölleken J, Monecke A, Broschewitz J, Eichfeld U, Bechmann I, Krämer S, et al. Effekte von Artemisinin und seinen Derivaten in Dünnschnittkulturen des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Zentralblatt für Chirurgie-Zeitschrift für Allgemeine, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie. 2019;144(S 01):P40.
74. Markowitsch SD, Schupp P, Lauckner J, Vakhrusheva O, Slade KS, Mager R, et al. Artesunate Inhibits Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma Cells through Cell Cycle Arrest and Induction of Ferroptosis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11).
75. Yao X, Zhao C-r, Yin H, Wang K, Gao J-j. Synergistic antitumor activity of sorafenib and artesunate in hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020;41(12):1609-20.
76. Huang X, Zhang S, Wang W. Artesunate restrains the malignant progression of human cutaneous squamous cell carcinoma cells via the suppression of the PI3K/AKT pathway. *Tissue and Cell*. 2022;76:101789.
77. Wu J, Xu M-D, Wang W-J, Shen M, Zhang Y, Qian J, et al. Artesunate Represses the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer Cells but Upregulates the Expression Levels of Proangiogenic Genes Through Inhibition of Protein Phosphatase 2A. 2019.
78. Zhou X, Chen Y, Wang F, Wu H, Zhang Y, Liu J, et al. Artesunate induces autophagy dependent apoptosis through upregulating ROS and activating AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2020;331:109273.
79. Zhao F, Vakhrusheva O, Markowitsch SD, Slade KS, Tsaur I, Cinatl J, Jr., et al. Artesunate Impairs Growth in Cisplatin-Resistant Bladder Cancer Cells by Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Autophagy Induction. *Cells*. 2020;9(12).
80. Zhao F. New approaches for cisplatin-resistant bladder cancer. Mainz2021.
81. Markowitsch SD. Präklinische Analysen zur Integration von Naturstoffen in die Behandlung therapieresistenter Nierenzellkarzinome.
82. Kumari K, Keshari S, Sengupta D, Sabat SC, Mishra SK. Transcriptome analysis of genes associated with breast cancer cell motility in response to Artemisinin treatment. *BMC cancer*. 2017;17(1):1-13.
83. Li H, Xu K, Pian G, Sun S. Artesunate and sorafenib: Combinatorial inhibition of liver cancer cell growth. *Oncology letters*. 2019;18(5):4735-43.
84. Wang J-S, Wang M-J, Lu X, Zhang J, Liu Q-X, Zhou D, et al. Artesunate inhibits epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cells by down-regulating the expression of BTBD7. *Bioengineered*. 2020;11(1):1197-207.
85. Xu Z, Liu X, Zhuang D. Artesunate inhibits proliferation, migration, and invasion of thyroid cancer cells by regulating the PI3K/AKT/FKHR pathway. *Biochem Cell Biol*. 2022;100(1):85-92.
86. Machida K, Inoue H, Matsumoto K, Tsuda M, Fukuyama S, Koto H, et al. Activation of PI3K-Akt pathway mediates antiapoptotic effects of beta-adrenergic agonist in airway eosinophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288(5):L860-7.

87. Shorning BY, Dass MS, Smalley MJ, Pearson HB. The PI3K-AKT-mTOR pathway and prostate cancer: at the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(12):4507.
88. Stein L. Einfluss von Artesunat auf die Adhäsion und Integrinexpression von parentalen und taxanresistenten Prostatakarcinomzellen 2020.
89. Ibeawuchi C, Schmidt H, Voss R, Titze U, Abbas M, Neumann J, et al. Genome-wide investigation of multifocal and unifocal prostate cancer—are they genetically different? *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11816-29.
90. Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, de Borja R, Trudel D, Lalonde E, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet*. 2015;47(7):736-45.
91. Brady L, Kriner M, Coleman I, Morrissey C, Roudier M, True LD, et al. Inter- and intra-tumor heterogeneity of metastatic prostate cancer determined by digital spatial gene expression profiling. *Nat Commun*. 2021;12(1):1426.
92. Shimoyama S, Gansauge S, Gansauge F, Oohara T, Beger H, editors. Überexpression von Rezeptoren der extrazellulären Matrix im Pankreaskarzinom im Vergleich zu normalem und chronisch entzündlich verändertem Pankreasgewebe. *Chirurgisches Forum'95 für experimentelle und klinische Forschung*; 1995: Springer.
93. Culig Z, Bartsch G. Androgen axis in prostate cancer. *J Cell Biochem*. 2006;99(2):373-81.
94. Fornaro M, Manes T, Languino LR. Integrins and prostate cancer metastases. *Cancer Metastasis Rev*. 2001;20(3-4):321-31.
95. Knudsen BS, Miranti CK. The impact of cell adhesion changes on proliferation and survival during prostate cancer development and progression. *J Cell Biochem*. 2006;99(2):345-61.
96. Goel HL, Li J, Kogan S, Languino LR. Integrins in prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(3):657-64.
97. Fang Z, Yao W, Xiong Y, Zhang J, Liu L, Li J, et al. Functional elucidation and methylation-mediated downregulation of ITGA5 gene in breast cancer cell line MDA-MB-468. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;110(5):1130-41.
98. Sritularak B, Likhitwitayawuid K, Conrad J, Vogler B, Reeb S, Klaiber I, et al. New flavones from *Millettia erythrocalyx*. *J Nat Prod*. 2002;65(4):589-91.
99. Lafauy P, Silapech A, Aksorn N, Sritularak B, Chanvorachote P. Millettocalyxin B Inhibits Migratory Behavior of Lung Cancer Cells via Integrin  $\alpha 5$  Suppression. *Anticancer Res*. 2021;41(8):3843-9.
100. Mierke CT, Frey B, Fellner M, Herrmann M, Fabry B. Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *Journal of cell science*. 2011;124(3):369-83.
101. Breuksch I, Prosinger F, Baehr F, Engelhardt F-P, Bauer H-K, Thüroff JW, et al. Integrin  $\alpha 5$  triggers the metastatic potential in renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(64):107530.
102. Tsaor I, Makarević J, Juengel E, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Kurosch M, et al. Resistance to the mTOR-inhibitor RAD001 elevates integrin  $\alpha 2$ - and  $\beta 1$ -triggered motility, migration and invasion of prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2012;107(5):847-55.

103. Ramirez NE, Zhang Z, Madamanchi A, Boyd KL, Lynda D, Nashabi A, et al. The  $\alpha 2 \beta 1$  integrin is a metastasis suppressor in mouse models and human cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(1):226-37.
104. Sottnik JL, Daignault-Newton S, Zhang X, Morrissey C, Hussain MH, Keller ET, et al. Integrin alpha2beta 1 ( $\alpha 2 \beta 1$ ) promotes prostate cancer skeletal metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(5):569-78.
105. Yu X, Miyamoto S, Mekada E. Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *Journal of Cell Science*. 2000;113(12):2139-47.
106. Zhou Y, Wang X, Zhang J, He A, Wang YL, Han K, et al. Artesunate suppresses the viability and mobility of prostate cancer cells through UCA1, the sponge of miR-184. *Oncotarget*. 2017;8(11):18260-70.
107. Vakhrusheva O, Erb HHH, Bräunig V, Markowitsch SD, Schupp P, Baer PC, et al. Artesunate Inhibits the Growth Behavior of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells. *Front Oncol*. 2022;12:789284.
108. Cariati M, Naderi A, Brown JP, Smalley MJ, Pinder SE, Caldas C, et al. Alpha-6 integrin is necessary for the tumourigenicity of a stem cell-like subpopulation within the MCF7 breast cancer cell line. *Int J Cancer*. 2008;122(2):298-304.
109. Wang Y, Shenouda S, Baranwal S, Rathinam R, Jain P, Bao L, et al. Integrin subunits alpha5 and alpha6 regulate cell cycle by modulating the chk1 and Rb/E2F pathways to affect breast cancer metastasis. *Molecular cancer*. 2011;10(1):1-11.
110. Risbridger GP, Davis ID, Birrell SN, Tilley WD. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(3):205-12.

## **9 Erklärung**

Ich, Laura Wüstefeld, erkläre hiermit, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt wurde. Alle von mir benutzten Veröffentlichungen, ungedruckten Materialien, sonstige Hilfsmittel sowie Textstellen, die ich wörtlich oder inhaltlich aus gedruckten oder ungedruckten Arbeiten übernommen habe, habe ich als solche gekennzeichnet und mit den erforderlichen bibliographischen Angaben nachgewiesen.

Unterstützungsleistungen, die ich von anderen Personen erhalten habe, wurden in der Dissertationsschrift als solche benannt.

Die Dissertation wurde bei keiner anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich vorgelegt, weder im In- noch im Ausland.

Überdies bin ich nicht im Besitz eines anderen Doktorgrades.

Ich habe bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Mir ist bekannt, dass die Zulassung zur Promotion zu versagen ist, wenn die Unterlagen unvollständig oder die Angaben unrichtig sind. Ich bin darüber informiert, dass ich zur Führung des Dokortitels erst mit Aushändigung der Promotionsurkunde berechtigt bin.

**10 Danksagung**

**11 Curriculum vitae**