

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

Präklinische Analyse zur antiproliferativen Wirkung von Artesunat  
im Docetaxel-resistenten Prostatakarzinom

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Vitus Bräunig  
aus Bamberg

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

20. Juli 2023

*Meinen Eltern*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung / Ziel der Arbeit</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literaturdiskussion</b> .....	<b>3</b>
2.1 Die Prostata .....	3
2.2 Das Prostatakarzinom .....	3
2.2.1 Epidemiologie .....	3
2.2.2 Ätiologie .....	4
2.2.3 Klassifikation .....	5
2.2.4 Das kastrationsresistente Prostatakarzinom (CRPC) .....	7
2.2.5 Therapien .....	8
2.3 Docetaxel .....	11
2.3.1 Grundlagen .....	11
2.3.2 Docetaxel in der Behandlung des Prostatakarzinoms .....	11
2.3.3 Docetaxel-Resistenz .....	13
2.4 Artesunat .....	15
<b>3. Material</b> .....	<b>18</b>
3.1 Reagenzien für die Zusammensetzung des Nährmediums der PCa-Zellkulturen .....	18
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	19
3.3 Chemikalien .....	20
3.4 Geräte .....	21
3.5 Software .....	23
3.6 Zelllinien .....	24
3.6.1 PC3 .....	24
3.6.2 DU145 .....	24
3.6.3 LNCaP .....	24
3.6.4 Docetaxel-resistente Zelllinien PC3 DR, DU145 DR, LNCaP DR .....	24
<b>4. Methoden</b> .....	<b>26</b>
4.1 Zellkultur .....	26
4.1.1 Herstellung der Kulturmedien .....	26
4.1.2 Kultivierung der Zellkulturen .....	26
4.1.3 Passagieren der Zellkulturen .....	26
4.1.4 Kryokonservierung der Zellkulturen .....	27
4.1.5 Auftauen kryokonservierter Zellkulturen .....	27

4.1.6	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	27
4.1.7	Analyse der Viabilität / des Zellwachstums – MTT-Test .....	28
4.1.8	Analyse der Proliferation – BrdU-Test .....	30
4.1.9	Analyse des Zellzyklus .....	32
4.1.10	Analyse der Apoptose – FITC-Annexin V .....	33
4.2	Statistische Auswertung .....	35
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
5.1	Analyse des Zellwachstums / der Viabilität .....	37
5.2	Analyse der Proliferation .....	44
5.3	Analyse des Zellzyklus .....	48
5.4	Analyse der Apoptose .....	50
<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>XIX</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>XXI</b>
<b>11.</b>	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>XXII</b>
<b>12.</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>XXIII</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ACT	Artemisinin-basierte Kombinationstherapie(n)
ADT	Androgendeprivationstherapie
ANOVA	Varianzanalyse
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AR	Androgenrezeptor
ARS	Artemisinin
ARSS	Artemisinine
ART	Artesunat
BrdU-ELISA	5-bromo-2`-desoxyuridin-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
CAM	komplementäre und alternative Medizin
CRPC	kastrationsresistentes Prostatakarzinom
cTNM	klinisches Staging
DHA	Dihydroartemisinin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco´s Phosphatgepufferte Salzlösung
DR	Docetaxel-resistent
DX	Docetaxel
EAU	European Association of Urology
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSH	follikelstimulierendes Hormon
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase-Konjugat
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ISUP	International Society of Urological Pathology
LC50	mittlere letale Konzentration
M	Metastase(n)
mCRPC	metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom
MDR	multidrug resistance
mHSPC	metastasiertes hormonsensitives Prostatakarzinom

nmCRPC	nicht-metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
N	regionäre(r) Lymphknoten
PAR	parental
PCa	Prostatakarzinom
PI	Propidiumiodid
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
POD	Peroxidase
PSMA	Prostataspezifisches Membranantigen
PSA	Prostataspezifisches Antigen
pTNM	pathologisches Staging
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
T	lokale Ausdehnung des Tumors
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TMP	Tetramethylbenzidin
UICC	Union for International Cancer Control

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zellwachstum und die IC50-Werte der parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen. ....	38
Abbildung 2: Zellwachstum und die IC50-Werte der parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen. ....	40
Abbildung 3: Zellwachstum und die IC50-Werte der parentalen und DX-resistenten LNCaP-Zellen. ....	42
Abbildung 4: Proliferation der parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen. ....	44
Abbildung 5: Proliferation der parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen. ....	45
Abbildung 6: Proliferation der parentalen und DX-resistenten LNCaP-Zellen. ....	46
Abbildung 7: Verteilung der PCa-Zellen in den Zellzyklusphasen nach Behandlung mit ART. ....	49
Abbildung 8: Basale Apoptoserate der parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen. ....	50
Abbildung 9: Apoptose in den parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen nach Exposition mit ART. ....	51
Abbildung 10: LC50-Werte der parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen. ....	XIX
Abbildung 11: LC50-Werte der parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen. ....	XX
Abbildung 12: LC50-Werte der parentalen und DX-resistenten LNCaP-Zellen. ....	XX



**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: TNM-Klassifikation .....	6
Tabelle 2: Reagenzien für die Zusammensetzung des Nährmediums der PCa-Zellkulturen .....	18
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....	19
Tabelle 4: Fortsetzung Verbrauchsmaterialien .....	20
Tabelle 5: Chemikalien .....	20
Tabelle 6: Fortsetzung Chemikalien .....	21
Tabelle 7: Geräte .....	21
Tabelle 8: Fortsetzung Geräte .....	22
Tabelle 9: Software .....	23
Tabelle 10: Plattenbelegung Standardkurve MTT .....	29
Tabelle 11: Plattenbelegung Zellversuch MTT .....	30
Tabelle 12: Plattenbelegung BrdU .....	31
Tabelle 13: Messansatz Apoptose .....	34
Tabelle 14: IC50- und LC50-Werte der parentalen (PAR) und DX-resistenten (DR) Zelllinien nach 72 h ART-Behandlung .....	43
Tabelle 15: Formeln der Kurven zur Ermittlung des IC50 und LC50 .....	XIX

## **1. Einleitung / Ziel der Arbeit**

Das Prostatakarzinom (PCa) ist mit 65.200 Neuerkrankungen und 14.963 Todesfällen im Jahr 2018 die häufigste Krebserkrankung des Mannes nach dem nicht-melanotischen Hautkrebs und zweithäufigste krebsbedingte Todesursache des Mannes in Deutschland (1).

Weltweit stellt das PCa als zweithäufigste diagnostizierte Krebserkrankung und fünfhäufigste Krebstodesursache beim Mann ein erhebliches gesundheitliches Problem dar (2). Ein entscheidender Risikofaktor ist dabei das Alter, wodurch die Problematik des PCa in Zukunft aufgrund der demographischen Entwicklung weiter zunehmen wird (3, 4).

Zwar wird der überwiegende Anteil der PCa in einem frühen Stadium entdeckt, welches kurativ behandelt werden kann, aber mit Zunahme an Diagnosen nimmt auch die Anzahl derer zu, die bereits an einem kastrationsresistenten bzw. metastasierten PCa erkrankt sind (5). Die Wirkung der zur Verfügung stehenden Therapieoptionen ist in diesem Stadium zeitlich limitiert; eine Heilung kann in der Regel nicht mehr erreicht werden (6). Unter der in diesem Stadium standardmäßig durchgeführten Androgendeprivationstherapie (ADT) kommt es im Mittel nach 18-36 Monaten zur Entwicklung eines metastasierten kastrationsresistenten PCa (mCRPC) (7). Falls die Behandlung mit Docetaxel (DX) in diesem Stadium überhaupt initial anspricht, erfolgt nach median etwa 8 Monaten ein Krankheitsprogress infolge einer erworbenen DX-Resistenz (8, 9). Aufgrund seiner, trotz allem, guten Wirksamkeit selbst beim metastasierten hormonsensitiven PCa (mHSPC), hat DX eine Indikationserweiterung erfahren und wird nun auch früher, in Kombination mit der ADT, angewendet. Die Resistenzproblematik bleibt jedoch weiterhin bestehen (6). Der Wunsch nach innovativen Strategien, die dieses Problem lösen können, ist entsprechend groß. Die komplementäre und alternative Medizin (CAM) könnte dabei vielversprechend sein. Tatsächlich kann, je nach verwendetem Assessment, davon ausgegangen werden, dass etwa 40-50 % der Krebspatienten in Europa Wirkstoffe der CAM zu sich nehmen, häufig ohne Kenntnis des therapierenden Arztes (10-12). Gegenwärtig ist das Wissen über Nebenwirkungen, Kontraindikationen und Interaktionen mit konventionellen Pharmaka sowie die antitumorale Wirkung der CAM jedoch häufig sehr begrenzt und daher die unkontrollierte Einnahme durch die Patienten kritisch zu sehen (13). Artemisinin, das aus *Artemisia annua* (Einjähriger Beifuß) gewonnen wird, findet seit Jahrtausenden Anwendung in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) und wird seit dem letzten Jahrhundert gezielt zur Behandlung der Malaria eingesetzt. Artesunat

(ART), ein Derivat von Artemisinin, welches ebenfalls wirkungsvoll gegen Malaria eingesetzt wird, hat in verschiedenen Krebsentitäten erste vielversprechende Ergebnisse erzielt (14). Die Zugabe von ART zur konventionellen Therapie hat bei einigen Entitäten zudem das Potenzial Therapieresistenz zu überwinden gezeigt (15-19). Die Daten bezüglich der Behandlung des PCa mit ART waren bisher jedoch spärlich und beim DX-resistenten PCa nicht existent.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, erstmalig die antiproliferative Wirkung von ART im Therapie-sensitiven (parentalen) und DX-resistenten PCa *in vitro* zu untersuchen. Hierzu wurden jeweils parentale und DX-resistente PCa-Zellen der Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP mit aufsteigenden Konzentrationen von ART behandelt. In den ART-behandelten PCa-Zellen wurde das Zellwachstum mittels Bestimmung der Zellviabilität im MTT-Assay, die Proliferation mit einem BrdU-Assay sowie die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen und die Apoptose-Induktion mittels Durchflusszytometrie evaluiert.

## **2. Literaturdiskussion**

### **2.1 Die Prostata**

Die Prostata ist ein Organ, das dorsokaudal der Blase anliegt und den proximalen Anteil der Harnröhre umschließt (20). Sie ist etwa 3 cm lang, 4 cm breit und 2 cm hoch und wiegt postpubertär ungefähr 20 g (21, 22). Hauptfunktion der Prostata ist die Bildung eines dünnflüssigen leicht sauren Sekretes, welches unter anderem die saure Phosphatase und das Prostataspezifische Antigen (PSA) enthält. Das Prostatasekret macht etwa 30 % des gesamten Ejakulats aus. Es erhält die Beweglichkeit der Spermatozoen und verflüssigt das Ejakulat (23-25). Über die Ductus ejaculatorii werden zum einen das Seminalplasma und zum anderen die Spermatozoen in die Prostata geleitet und beides gelangt über den Colliculus seminalis als Ejakulat in die Harnröhre (20). Zudem erfolgt in der Prostata die Umwandlung von Testosteron in das wirksamere Dihydrotestosteron durch die 5-Alpha-Reduktase (25).

Histologisch wird die Prostata in vier Zonen nach McNeal eingeteilt. In der peripheren Zone entstehen ca. 75 % der Prostatakarzinome, in der Übergangszone etwa 20 % und in der zentralen Zone nur etwa 5 %. Als vierte Zone schließt sich noch das anteriore fibromuskuläre Stroma an. Während das PCa v.a. peripher entsteht, geht die benigne Prostatahyperplasie hauptsächlich von der Übergangszone und zentralen Zone aus (26, 27).

### **2.2 Das Prostatakarzinom**

#### **2.2.1 Epidemiologie**

Mit 65.200 Neuerkrankungen (standardisierte Erkrankungsrate 99,1 je 100.000 Personen) in Deutschland im Jahr 2018 ist das Prostatakarzinom (PCa) die häufigste Krebserkrankung des Mannes nach dem nicht-melanotischen Hautkrebs (1). Die Mortalität im gleichen Jahr lag bei 14.963, womit das PCa bei Männern die zweithäufigste Todesursache an Krebstoten in Deutschland nach Krebserkrankungen der Lunge darstellt. Weltweit ist das PCa im Jahr 2020 mit etwa 1.414.259 Fällen die zweithäufigste diagnostizierte Krebsart und mit geschätzten 375.304 Todesfällen die fünfhäufigste Krebstodesursache bei Männern, wobei sich die Inzidenz zwischen verschiedenen Ländern um bis das 40-fache, die Mortalität um etwa das 10-fache unterscheiden kann (2, 3). Besonders stark betroffen sind hochentwickelte Länder wie Australien, Neuseeland, USA und Westeuropa (28). Innerhalb Europas zeigt sich ein

Nord-Süd-Gefälle mit den höchsten Inzidenzraten in Skandinavien und den Baltischen Staaten (4, 29).

Das PCa ist vorwiegend eine Erkrankung des Alters mit einem medianen Erkrankungsalter von etwa 71 Jahren (1).

Durch die demographische Entwicklung wird die Bedeutung des PCa in der Zukunft weiter zunehmen (3, 4). So war zwar die altersstandardisierte Sterblichkeit (18,8 je 100.000 Personen in 2017) zuletzt wesentlich geringer, jedoch sterben in absoluten Zahlen doppelt so viele Männer am PCa und die Inzidenz ist etwa fünfmal so hoch wie in den 1970ern (4, 30).

Nicht zuletzt aufgrund der hohen Inzidenz, stellt das PCa, trotz einer im Vergleich mit anderen Entitäten guten 5-Jahres-Überlebensrate von 89 %, ein massives Gesundheitsproblem dar (1, 30).

### **2.2.2 Ätiologie**

Die Ursachen für die Entstehung des PCa sind weitestgehend unbekannt. Ein wichtiger Risikofaktor ist das Alter. Eine Erkrankung vor dem 50. Lebensjahr ist sehr selten. Ein 35-jähriger Mann hat derzeit ein Risiko von unter 0,1 % in den nächsten 10 Jahren an einem PCa zu erkranken, dagegen liegt dieses Risiko bei einem 75-Jährigen bei ungefähr 5 % (5). So ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass mehr als drei Viertel derjenigen, die seit höchstens fünf Jahren die Diagnose einer malignen Erkrankung der Prostata erhalten haben, über 65 Jahre alt sind (4).

Als weiterer Risikofaktor gilt eine familiäre Disposition, die v.a. bei jüngeren Männern eine Rolle spielt. Das relative Risiko am PCa zu erkranken steigt, wenn ein Verwandter ersten Grades betroffen ist, um das 2,5-fache an (31-33).

Durch Forschung in den USA konnte gezeigt werden, dass die afroamerikanische Bevölkerung ein 1,6-fach erhöhtes Risiko gegenüber der kaukasischen Bevölkerung aufweist am PCa zu erkranken (28, 34, 35).

Neben den bisher geschilderten Risikofaktoren spielen weiterhin Umwelteinflüsse und die Ernährung eine entscheidende Rolle. Als ein Anzeichen hierfür kann der Anstieg an Neuerkrankung im asiatischen Raum gesehen werden, in dem zunehmend der westliche Lebensstil übernommen wird (36). Allerdings gestaltet sich ein Nachweis dieser Faktoren als schwierig und die Forschungslage ist noch inhomogen.

Einige Einflüsse der Ernährung konnten jedoch gezeigt werden (37). So wurde für Soja und lycopinreiche Produkte (etwa Tomaten) ein offensichtlich protektiver Effekt nachgewiesen (38-40).

Dieser Effekt könnte unter anderem auf die antiinflammatorische Wirkung dieser Lebensmittel zurückzuführen sein, was im Einklang zur gängigen Theorie steht, dass chronische Entzündungsreaktionen zusammen mit bestimmten epigenetischen Veränderungen die Entwicklung eines PCa begünstigen können. Das Risiko für ein PCa steigt zudem mit einer Prostatitis um das 1,6-fache und beim Vorliegen von Geschlechtskrankheiten um das 1,4-fache gegenüber einem Gesunden, wobei die Kausalität und die genaue Pathophysiologie weiterhin unklar sind (41-43).

### **2.2.3 Klassifikation**

#### **Staging**

Die Stadieneinteilung (*Staging*) des PCa erfolgt nach der gemeinsam durch das *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* und der *Union for International Cancer Control (UICC)* entwickelten TNM-Klassifikation, die seit 2017 in ihrer achten Version vorliegt (44). T steht für die lokale Ausdehnung des Primärtumors, N für den regionären Lymphknotenbefall und M für das Vorliegen von Fernmetastasen. Häufig erfolgt zuerst ein klinisches *Staging* (cTNM), welches vor allem auf einer digital-rektalen Untersuchung, dem Serum-PSA-Wert und eventuell bildgebenden Verfahren beruht (45). Ziel des klinischen *Stagings* ist es, dem Patienten eine stadiengerechte Therapie zuzuführen, da beispielsweise lokal begrenzte Tumoren noch kurativ behandelt werden können. Bei inzidentellen Tumoren, d.h. Tumoren, die die Lebenserwartung nicht einschränken und klinisch nicht auffallen, besteht allerdings die Gefahr einer Überbehandlung. Dem klinischen schließt sich ein pathologisches *Staging* (pTNM) an, dessen Grundlage der histologische Befund einer Biopsie oder eines Prostatektomiepräparates bildet und welches es erlaubt prognostische Aussagen zu treffen. Eine pT1-Kategorie existiert nicht (46). pT2 wird nicht subkategorisiert. Ansonsten entsprechen sich die pT- und cT-Kategorisierung. Die Stadien T1-2 N0 M0 werden als lokal begrenztes PCa bezeichnet (6). Das lokal fortgeschrittene PCa umfasst die Stadien T3-4 N0 M0. Als lymphknotenpositives bzw. metastasiertes PCa werden die Stadien N1 bzw. M1 benannt.

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation**

<b>T = Lokale Ausdehnung</b>		
Tx		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Hinweis auf Primärtumor
T1		Klinisch inapparenter Primärtumor (nicht palpabel oder durch bildgebende Verfahren darstellbar)
	T1a	Inzidenteller Tumor: histologisch in $\leq 5\%$ des Resektionsgewebes
	T1b	Inzidenteller Tumor: histologisch in $> 5\%$ des Resektionsgewebes
	T1c	Tumor durch Nadelbiopsie bei erhöhtem PSA-Wert identifiziert
T2		Primärtumor tastbar und beschränkt auf Prostata
	T2a	Tumor befällt $\leq 50\%$ eines Seitenlappens
	T2b	Tumor befällt $> 50\%$ eines Seitenlappens
	T2c	Tumor befällt beide Seitenlappen
T3		Primärtumor überschreitet die Prostatakapsel
	T3a	Extrakapsulärer Tumor ohne Samenblasenbefall (eingeschlossen mikroskopischer Nachweis einer Infiltration des Blasenhalses)
	T3b	Tumor infiltrierte Samenblase(n)
T4		Primärtumor ist fixiert oder infiltrierte benachbarte Strukturen (außer Samenblasen)
<b>N = Regionäre Lymphknoten</b>		
Nx		Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1		Regionärer Lymphknotenbefall
<b>M = Fernmetastasen</b>		
M0		Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1		Vorliegen von Fernmetastasen
	M1a	Nichtregionärer Lymphknotenbefall
	M1b	Knochenmetastasen
	M1c	Andere Lokalisation(en)

**Tabelle 1:** modifiziert nach (44).

### **Histologisches Grading – Gleason-Score**

Histologisch lassen sich PCa zu 95 % als Adenokarzinome klassifizieren, die ihren Ursprung in den azinären Zellen des Epithels haben (45). Als Vorstufe hiervon ist häufig die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) zu finden (47).

Zum histologischen *Grading* beim PCa wird der *Gleason-Score* verwendet, welcher auf dem histomorphologischen Bild und dem zunehmenden Verlust der Differenzierung des Tumors in fünf Stufen beruht (22, 48, 49). Bei der Prostatastanzbiopsie werden das häufigste und das am schlechtesten differenzierte Wachstumsmuster (*Gleason-Grad*) addiert. Beim Prostataresektat wird dagegen der häufigste mit dem zweithäufigsten *Gleason-Grad* addiert und ergibt den *Gleason-Score*. Bei Vorliegen nur eines Wachstumsmusters wird dieses verdoppelt. Der *Gleason-Score* kann zwischen 2 (1+1) und 10 (5+5) liegen. Je schlechter die Differenzierung des Tumors ist, umso höher ist der *Gleason-Score* und umso schlechter ist die Prognose für den Patienten. In einer Konsensuskonferenz der *International Society of Urological Pathology* (ISUP) wurde ein neues *Grading*system eingeführt, welches auf dem *Gleason-Score* beruht (50, 51). Das PCa wird danach in 5 Kategorien eingeteilt, welche noch genauer das Risiko des Patienten stratifizieren. Alle Tumoren mit einem *Gleason-Score*  $\leq 6$  gehören dabei der Kategorie 1, mit *Gleason-Score* 3+4=7 der Kategorie 2, mit *Gleason-Score* 4+3=7 der Kategorie 3, mit *Gleason-Score* 8 der Kategorie 4 und mit *Gleason-Score* 9 oder 10 der Kategorie 5 an.

#### **2.2.4 Das kastrationsresistente Prostatakarzinom (CRPC)**

Anfänglich entwickelt sich das PCa androgenabhängig und spricht zunächst gut auf eine ADT an. Nach durchschnittlich 18-36 Monaten wechselt das PCa aber in ein kastrationsresistentes Stadium (7).

Der genaue Mechanismus der Entstehung des CRPC ist, ebenso wie die Ätiologie des PCa, nicht vollständig aufgeklärt (52).

Eine Möglichkeit der Resistenzentstehung ist eine erhöhte Sensitivität des Tumors auf Androgene. Dies geschieht etwa durch die Überexpression des Androgenrezeptors (AR) durch einen Selektionsprozess. Das PCa wirkt klinisch androgenunabhängig (52-55).

Die erhöhte Sensitivität kann aber auch durch eine gesteigerte intratumorale Androgensyntheseleistung bedingt sein (56).



Durch Mutationen im AR geht die Ligandenspezifität verloren und so können andere Liganden den AR aktivieren. Es können auch andere Steroide oder gar Antiandrogene seine Aktivierung bewirken (52).

Weiterhin gibt es AR, die unabhängig von der Bindung eines Liganden aktiviert werden („outlaw receptors“). In ihre Aktivierung sind verschiedene Signalwege involviert (52). So kann der AR durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie den *insulin-like growth factor 1*, *keratinocyte growth factor* oder den *epidermal growth factor* aktiviert werden (57).

Neben den AR-abhängigen Resistenzmechanismen können zudem antiapoptotische Proteine, wie Bcl-2, überexprimiert und damit die Apoptose umgangen werden (58, 59).

### **2.2.5 Therapien**

In den lokalen Stadien stehen neben der Prostatektomie und der Strahlentherapie die Brachytherapie als Therapieoptionen zur Verfügung (6). Um eine Übertherapie und deren Folgen zu vermeiden, ohne gleichzeitig die Heilungsrate zu vermindern, existiert das *Active Surveillance*. Dabei wird das PCa, welches in der S3-Leitlinie festgelegte Kriterien erfüllen muss, engmaschig überwacht und erst kurativ behandelt, wenn es zu einer Progression kommt oder der Patient dies wünscht (6). Einen weiteren abwartenden Ansatz stellt das *Watchful Waiting* dar, das für Patienten geeignet ist, bei denen eine kurative Behandlung keine Aussicht auf Erfolg hat, da aufgrund des Alters oder durch Komorbiditäten die Lebenserwartung eingeschränkt ist. Es erfolgt eine palliative Behandlung (6). Für ihre Funktion und Wachstum sind PCa-Zellen auf Androgene angewiesen. Entzieht man den PCa-Zellen diesen Reiz, wird die Apoptose eingeleitet (45, 60, 61). Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass Androgene auch an der Karzinogenese im Rahmen des PCa beteiligt sind (62).

Beim lymphknotenpositiven bzw. metastasierten Prostatakarzinom erfolgt neben einer lokalen Therapie eine Androgendeprivationstherapie/Hormonablation (ADT), welche entweder chirurgisch oder medikamentös durchgeführt werden kann (6).

### **Metastasiertes hormonsensitives Prostatakarzinom (mHSPC)**

Für Patienten mit einem metastasierten aber noch hormonsensitiven PCa (mHSPC) hat sich die Behandlung in den letzten Jahren deutlich diversifiziert. So steht neben einer Kombination aus ADT mit den sogenannten Hormonpräparaten der neuen

Generation (Apalutamid, Enzalutamid, Abirateron plus Prednison/Prednisolon) die Kombination ADT mit DX (sh. folgenden Abschnitt) zur Verfügung (6).

Diese Kombinationstherapien sollte v.a. Patienten mit gutem Allgemeinzustand (die S3-Leitlinie empfiehlt ECOG 0-1) vorgeschlagen werden, da in den Zulassungsstudien eher Patienten mit guter Prognose eingeschlossen wurden (6, 63-72). Weiterhin ist bei evtl. multimorbiden Patienten die Toxizität der Chemotherapie mit DX zu beachten (6). Insbesondere bei *high-volume* mHSPC („mindestens vier Knochenmetastasen, davon mindestens eine außerhalb des Achsenskeletts bzw. Beckens und/oder viszerale Metastasen“ (6)) wird die Kombination ADT mit DX empfohlen. Ist die Kombinationsbehandlung nicht möglich, kommt auch die alleinige ADT in Frage. Beim symptomatischen, metastasierten PCa wird die sofortige ADT empfohlen, da neben dem verlängerten progressionsfreien Überleben weitere Komplikationen durch das Fortschreiten der Krankheit vermindert werden können (6).

### **Das kastrationsresistente Prostatakarzinoms (CRPC)**

Für Patienten mit einem kastrationsresistentem PCa ist keine Heilung mehr möglich. Die Behandlung ist hauptsächlich von der Symptomatik abhängig und hat eine Verbesserung der Lebenserwartung und -qualität zum Ziel. (6).

Bei hohem Risiko für eine Metastasierung (PSA-Verdopplungszeit von  $\leq 10$  Monaten) wird Patienten mit nicht-metastasiertem, kastrationsresistentem PCa (nmCRPC) zusätzlich zur ADT ein Androgen-Pathway-Inhibitor (Apalutamid, Darolutamid oder Enzalutamid) angeboten (6).

Asymptomatischen oder nur gering symptomatischen/progredienten Patienten mit metastasiertem kastrationsresistentem PCa (mCRPC) kann außer einem abwartenden Vorgehen („*Active Surveillance*“) eine Umstellung der Therapie angeboten werden. Hierfür stehen Abirateron plus Prednison/Prednisolon, Enzalutamid und DX zur Verfügung. (6).

Für Patienten mit symptomatischer bzw. progredienter Erkrankung bestehen neben einer symptomatischen und supportiven Therapie die gleichen systemischen Therapieoptionen, wie gerade genannt, zur Verfügung. Insbesondere wenn die Symptomatik durch das metastasierte PCa begründet ist, wird hier v.a. DX empfohlen. (6).

Kommt es nach einer Therapiesequenz mit DX zu einem Progress wird neben Abirateron plus Prednison/Prednisolon oder Enzalutamid, das Taxan Cabazitaxel angeboten. Gerade bei Patienten, die gut auf die Ersttherapie mit DX angesprochen haben, ist eine Retherapie mit DX denkbar (6).

Bei symptomatischen ossären Metastasen kann eine Behandlung mit Radium-223 erfolgen (6).

Befindet sich der Patient mit mCRPC in gutem Allgemeinzustand und es wurden die empfohlenen Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft, kann evtl. ein Therapieversuch mit Lutetium-177-PSMA (Prostata-spezifisches Membranantigen) erfolgen (6).

## **2.3 Docetaxel**

### **2.3.1 Grundlagen**

Eine funktionierende Mitosespindel ist unabdingbar für die Zellteilung, welche die Grundlage für das Wachstum sowohl von gesunden als auch von Tumorzellen darstellt. Die Mitosespindel ist aus Mikrotubuli zusammengesetzt, die einem ständigen Auf- und Abbauprozess unterliegen. Das Chemotherapeutikum DX, semisynthetisch aus den Nadeln der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*) hergestellt, gehört zur Gruppe der Taxane und bindet reversibel mit hoher Affinität an das Tubulin, dem Grundbestandteil der Mikrotubuli (73, 74). Dadurch werden die Mikrotubuli stabilisiert und am Abbau gehindert, sodass keine Zellteilung stattfinden kann und im Folgenden die Apoptose induziert wird. (74). Dabei spielt die Hemmung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 eine wichtige Rolle (75). Zudem zeigten Taxane immunmodulatorische Effekte beim Mammakarzinom (76). Im PCa konnte außerdem nachgewiesen werden, dass DX in die Signalwege des AR eingreift, indem die Translokation des AR zum Zellkern verhindert wird (77).

### **2.3.2 Docetaxel in der Behandlung des Prostatakarzinoms**

Lange Zeit galt das kastrationsresistente Prostatakarzinom (CRPC) als Chemotherapie-resistent und die Chemotherapie wurde lediglich in palliativer Intention durchgeführt (78). Für das Chemotherapeutikum DX konnte erstmals ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber der bisherigen Therapie in zwei Phase-3-Studien nachgewiesen werden.

In der TAX 327 Studie durch Tannock et al. wurde die Gabe von DX plus Dexamethason und Prednison mit der bisherigen Behandlung aus Mitoxantron plus Prednison verglichen (79).

DX war hier sowohl im primären Endpunkt, dem Gesamtüberleben, als auch in den sekundären Endpunkten, Schmerz, PSA-Level und Lebensqualität der Behandlung mit Mitoxantron, überlegen. Von den untersuchten Patienten zeigten diejenigen im DX-Arm mit dreiwöchentlicher Gabe ein durchschnittliches Überleben von 18,9 Monaten ( $p = 0.009$ ) gegenüber 17,4 Monaten ( $p = 0.36$ ) bei wöchentlicher Gabe und 16,5 Monaten in der Mitoxantron-Gruppe. In einer Update-Analyse stellte sich mit einem medianen Gesamtüberleben von 19,2 Monaten bei dreiwöchentlicher Gabe von DX gegenüber 16,3 Monaten im Mitoxantron-Arm ( $p = 0.004$ ) ein noch stärkerer Effekt dar (80).

In der SWOG 9916 Phase-3-Studie wurde an 770 Patienten mit mCRPC die Behandlung mit DX in Kombination mit Estramustin und Dexamethason gegen Mitoxantron und Prednison verglichen (81). Auch hier stellte das Gesamtüberleben den primären Endpunkt dar, wobei die DX-Gruppe der Mitoxantron-Gruppe mit durchschnittlich 17,5 Monaten gegenüber 15,6 Monaten ( $p = 0,02$ ) überlegen war. Diese Überlegenheit zeigte sich auch bei den sekundären Endpunkten, dem progressionsfreien Überleben und dem PSA-Rückgang um mind. 50 %.

Durch die *Crossover*-Behandlung, die bei etwa der Hälfte der Patienten erfolgte, weil sie kein Ansprechen auf die zugewiesene Behandlung zeigten, wurde der Unterschied im Überleben vermutlich unterschätzt.

Aufgrund der Überlegenheit erhielt DX in Kombination mit Prednison die Zulassung durch die Europäische Arzneimittel-Agentur und stellt seitdem eine relevante Therapieoption beim mCRPC dar (6, 82).

Die Empfehlung besteht v.a. für symptomatische Patienten mit gutem Allgemeinzustand (ECOG 0-1 oder Karnofsky  $\geq 70$  %) (6, 79).

Laut S3-Leitlinie kann eine Wiederbehandlung mit DX erfolgen, wenn die Ersttherapie gut ansprach und gut vertragen wurde (6, 83, 84).

Durch weitere Phase-3-Studien hat DX eine Indikationserweiterung bei Patienten mit mHSPC erfahren. In der CHAARTED-Studie wurden ADT und ADT mit DX beim mHSPC verglichen (71). Durch die Kombinationsbehandlung konnte in der gesamten Studienpopulation ein verlängertes Gesamtüberleben (57,6 Monate vs. 44 Monate,  $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden, besonders bei den Patienten mit hoher Tumorlast. In einer Metaanalyse der STAMPEDE-Studie konnte für die Subgruppe der Patienten mit mHSPC, die ADT und DX im Gegensatz zu denen, die nur ADT erhielten, ein Gesamtüberleben von 65 Monaten vs. 43 Monaten (HR: 0.73 (0.59–0.89)) ermittelt werden (70, 85). Zudem gab eine sich der CHAARTED-Studie anschließende Analyse Hinweise auf eine verbesserte Lebensqualität nach Abschluss der Chemotherapie (86). Aufgrund dieser Daten wird die ADT kombiniert mit DX in der S3-Leitlinie bei Patienten mit mHSPC in gutem Allgemeinzustand empfohlen (6).

Mehrere Studien untersuchen derzeit die adjuvante oder neoadjuvante Wirkung von DX auch bei lokalem PCa mit hohem Risiko zusätzlich zu den bisher etablierten Therapieoptionen der radikalen Prostatektomie und der Strahlentherapie (78).

Eine immer frühere Anwendung von DX zeigt zwar das Potenzial dieses Wirkstoffes auf, ist aber auch kritisch zu bewerten, da die Therapieoptionen für Patienten, deren Tumor sich zum mCRPC entwickelt, eingeschränkt sein könnten.

### 2.3.3 Docetaxel-Resistenz

Die Entwicklung von Resistenzen gegen DX stellt ein nicht zu unterschätzendes Problem in der Behandlung des PCa dar.

Etwa die Hälfte der Patienten mit CRPC sprechen überhaupt nicht auf Taxane an (sog. native Resistenz) (87). Weiterhin kommt es bei denjenigen, die initial auf die Therapie mit Taxanen ansprechen, im Median nach etwa acht Monaten zu einem Krankheitsprogress infolge einer erworbenen Resistenz (8, 9).

Die Mechanismen, die zu einer Resistenz gegenüber Taxanen führen, sind vielfältig, aber noch nicht vollständig geklärt (88).

Einer der am besten untersuchten Resistenzmechanismen beinhaltet eine Überexpression der *multidrug resistance* (MDR)-Transporter, die als Effluxpumpen dafür sorgen, dass die intrazelluläre Konzentration an Taxanen möglichst gering bleibt (88-95).

Auch Veränderungen an den Tubulinen oder an Proteinen, die mit den Mikrotubuli interagieren, z.B. Kinesine, können ein verändertes Ansprechen auf Taxane bedingen (88).

Bestimmte Androgenrezeptor-*Splice*-Varianten (AR-V7) brauchen keinen funktionierenden Mikrotubuliapparat, um zum Zellkern zu gelangen und dort ihre Funktion ausüben zu können. Somit fällt ein Wirkungsmechanismus der Taxane bei diesen Varianten weg (96, 97).

Die Behandlung mit Taxanen beim DX-resistenten PCa führt außerdem zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, was mit einem weiteren Tumorwachstum und Metastasierung verbunden ist (98-100).

Auch die Deregulation von Wachstumsfaktoren und intrazellulären Signalwegen, v.a. von solchen, die mit der Apoptose verbunden sind, kann zur Resistenz gegen die Chemotherapie mit Taxanen führen (101-105).

Die Möglichkeiten, die zu einer Resistenz gegen Taxane und DX im Speziellen führen können, sind vielfältig. Gegen einige dieser Möglichkeiten wurde bereits versucht therapeutisch vorzugehen. Auf Grund der Heterogenität des PCa ist es jedoch ratsam, einen Therapieansatz zu finden, der möglichst viele Resistenzmechanismen gleichzeitig unterbindet. Dabei stellt das Medikament Artesunat, dessen Wurzeln in die

Traditionelle Chinesische Medizin reichen, mit seinen zahlreichen Wirkweisen einen vielversprechenden Ansatz dar.

## 2.4 Artesunat

Auf der Suche nach einem Heilmittel gegen Malaria in China wurde 1969 das Extrakt aus *Artemisia annua* L. (*Asteracea* bzw. *Qinghao*), dem Einjährigen Beifuß, als vielversprechend erkannt (106).

1972 wurde die Wirksubstanz mit der Summenformel  $C_{15}H_{22}O_5$  identifiziert und als *Qinghaosu* (Artemisinin) benannt (107).

1973 wurde das Derivat Dihydroartemisinin (DHA) synthetisiert, das sich später als der eigentliche aktivere Metabolit herausstellen sollte und die Grundlage für weitere stabile lipophile (Arteether, Artemether) und hydrophile (Artesunat) Derivate der zweiten Generation darstellte, welche zehnmal so effektiv wie die Ursprungssubstanz Artemisinin (ARS) sind (108, 109). Die Wirksamkeit von ARS und dessen Derivaten wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen (109).

Artesunat (ART) ist das am besten untersuchte Derivat, da die Ergänzung einer Hemisuccinatgruppe ihm eine gute Wasserlöslichkeit und hohe orale Bioverfügbarkeit verleiht, was insgesamt zu einem günstigeren pharmakologischen Profil führt (109). Hierdurch wird die intravenöse oder intramuskuläre Applikation von ART möglich, die von der WHO als Behandlung der Wahl bei schwerer Malaria empfohlen wird (110). 2021 wurde die intravenöse Applikation von ART auch durch die Europäische Arzneimittel-Agentur zur Erstbehandlung bei Kindern und Erwachsenen mit schwerer Malaria zugelassen (111).

Schon früh gab es Anzeichen, dass auch andere Krankheitsbilder von diesen Wirkstoffen profitieren könnten (14, 109). Nicht zuletzt wurden bei verschiedenen Tumorentitäten antitumorale Eigenschaften von Artemisininen (ARSS) festgestellt.

Erste Studien in den 1990er-Jahren gaben Hinweise auf eine antitumorale Wirkung von ARSS *in vitro* (14). Auch im Tiermodell, überwiegend Mäusen, konnte dies *in vivo* bestätigt werden. So zeigte sich beispielsweise beim Pankreaskarzinom, metastasiertem Nierenzellkarzinom und Ovarialkarzinom ein Rückgang der Tumorgöße in Tierversuchen durch die Gabe von ART (112-114).

Eisen ist unabdingbar für das Überleben und die Proliferation gesunder Zellen. Tumorzellen haben einen noch weitaus größeren Bedarf an Eisen und einen ausgeprägten Eisenstoffwechsel (115, 116). Eisen wird nicht nur für das Tumorwachstum, sondern auch für die Metastasierung benötigt. Ähnlich wie bei der Behandlung der Malaria scheint oxidativer Stress, der durch die eisenabhängige Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) infolge der Spaltung der



Endoperoxidbrücke entsteht, eine entscheidende Rolle für die Wirkung von ART gegen Tumoren zu haben, indem beispielsweise DNA-Schäden entstehen (14, 117). Dafür spricht, dass eine Gabe von Prooxidantien die Wirkung von ARSS verstärkt, eine Zugabe von Antioxidantien diese hingegen abschwächt. Das konnte u.a. für Leukämiezellen bei der Anwendung von DHA nachgewiesen werden (118). Die Viabilität der Tumorzellen nimmt dabei durch ART ab und auch die Proliferation ist eingeschränkt (119, 120). Die durch den oxidativen Stress verursachten Schäden führen zudem zu einem Zellzyklusarrest. In welcher Zellzyklusphase der Arrest auftritt, ist abhängig von der Tumorentität und der angewandten Konzentration von ART. Im Nierenzellenkarzinom induzierten 20  $\mu\text{M}$  ART über 48 h appliziert einen G0/G1-Phase-Arrest (16), mit 50  $\mu\text{M}$  ART hingegen einen G2/M-Phase-Arrest (113). Durch die größeren Mengen an Eisen in Tumorzellen ist der Einfluss von ART dort wesentlich größer als in gesunden Zellen (115, 116).

ARSS beeinflussen zudem verschiedene Formen des regulierten Zelltodes (14). Besonders genannt sei hier die Ferroptose, welche einen entscheidenden Wirkmechanismus darstellt (121-123). Hierbei kommt es zu einer eisenabhängigen Akkumulation von ROS, die zur Zellschädigung und im Folgenden zum Zelltod führt (124, 125).

ARSS wirken durch viele weitere Mechanismen antitumoral.

Eine durch ARSS hervorgerufene Hemmung der Angiogenese schränkt die Versorgung des Tumors ein. ART hemmt die Angiogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beim Kaposi-Sarkom und Ovarialkarzinom (126, 127).

Schließlich greifen ARSS in zahlreiche Wege der Signaltransduktion ein, die die Differenzierung, das Wachstum, die Invasion und die Metastasierung der Tumorzellen vermitteln (14).

Es wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die die Anwendung von ARSS mit etablierten Therapien kombinieren. So konnte eine erhöhte Chemosensitivität und Radiosensitivität durch die Kombination mit ARSS festgestellt werden (15). Darüber hinaus stellte sich die Behandlung von Therapie-resistenten Zellen, etwa Cisplatin-resistenten Blasenkarzinomzellen und Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinomzellen, mit ART als erfolgreich heraus (16, 17).

Die antitumoralen Effekte von ARSS bzw. ART konnten somit in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Für das PCa ist die Datenlage jedoch spärlich und für das DX-resistente PCa nicht existent. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit

wurden daher erstmalig Daten zur antiproliferativen Wirkung von ART insbesondere auch im DX-resistenten PCa generiert.

### 3. Material

#### 3.1 Reagenzien für die Zusammensetzung des Nährmediums der PCa-Zellkulturen

Tabelle 2: Reagenzien für die Zusammensetzung des Nährmediums der PCa-Zellkulturen

Name	Hersteller	Standort
Antibiotic-Antimycotic (100X) (10.000 E/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B)	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS) CAS 67-68-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Docetaxel (C <sub>43</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>14</sub> ) CAS 114977-28-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) ohne Calcium, ohne Magnesium	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
HEPES (1M) Pufferlösung (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S) CAS 7365-45-9	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
RPMI 1640 mit L-Glutamin und Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Trypsin EDTA 0,25 % CAS 9002-07-7/60-00-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Name	Firma	Standort
BD Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Eppendorf Tubes® 5.0 ml mit Schraubdeckel	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar® 25 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar® 75 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
LUNA™ Cell Counting Slides	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich
Mikroreaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Nunc™ Kryoröhrchen	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 20 µl	STARLAB GmbH	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 100 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 1.250 µl	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 2 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 5 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland

**Tabelle 4: Fortsetzung Verbrauchsmaterialien**

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Standort</b>
Pipettenspitzen 10 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 25 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 50 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Präzisions-Dispenser-Tips 0,5 ml	Brand GmbH + Co. KG	Wertheim, Deutschland
Präzisions-Dispenser-Tips 1 ml	Brand GmbH + Co. KG	Wertheim, Deutschland
Präzisions-Dispenser-Tips 2,5 ml	Brand GmbH + Co. KG	Wertheim, Deutschland
TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen, Deutschland

### **3.3 Chemikalien**

**Tabelle 5: Chemikalien**

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Standort</b>
Ampuwa	Fresenius Kabi AG	Bad Homburg v.d.H. , Deutschland
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD FACS Flow Sheath Fluid	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Cell Proliferations Kit I (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland

Tabelle 6: Fortsetzung Chemikalien

Name	Firma	Standort
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Propidium Iodid (PI) (C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub> ) CAS 25535-16-4	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Schwefelsäure (1N) 0,5M (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) CAS 7664-93-9	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau „Trypan Blue Stain 0,4 %“ (C <sub>34</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub> .4Na) CAS 72-57-1	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland

### 3.4 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Name	Firma	Standort
BD FACSCalibur Flow Cytometer	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Brutschrank B 30	Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach, Deutschland
CO2 Inkubator HERAcCell® VIOS 160i	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH	Isernhagen, Deutschland
LUNA™ Automated Cell Counter	logos Biosystems	Villeneuve d'Ascq, Frankreich
Manueller Mehrfachdispenser HandyStep® S	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Microplattenreader Tecan Spark 10M (ELISA-Reader)	Tecan Austria GesmbH	Grödig, Österreich
Mikroskop AE2000 Binocular	Motic Deutschland GmbH	Wetzlar, Deutschland

Tabelle 8: Fortsetzung Geräte

Name	Firma	Standort
Mikroskop Zeiss AxioObserver Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Pipette Eppendorf Research plus 0,5-10 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research plus 2-20 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research plus 10-100 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research plus 20-200 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Research plus 100-1000 µl	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Rührschüttler/Mixing Block MB-102	Hangzhou Bioer Co. Ltd.	Hangzhou, China
Sicherheitswerkbank Herasafe™ KS 12	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
VACUSAFE-Absaugsystem	Integra Biosciences GmbH	Biebertal, Deutschland
Vortexer RS-VA 10	Phoenix Instrument	Garbsen, Deutschland
Wärmebad LAUDA Aqualine AL 18	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16R	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland

### 3.5 Software

Tabelle 9: Software

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Standort</b>
CellQuestPro v5	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
FlowJo 10.4.2	FlowJo LLC	Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism v7	GraphPad Software	La Jolla, California, USA
Microsoft Office 365	Microsoft	Redmond, Washington, USA
ModFit LT 5.0	Verity Software House	Topsham, Maine, USA
SparkControl magellan V 2.2	Tecan Austria GesmbH	Grödig, Österreich
ZEN 2.3 pro (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland



### **3.6 Zelllinien**

Die DX-resistenten PCa-Zellen und ihre Therapie-sensitiven (parentale) Ursprungszellen wurden von der „*Resistant Cancer Cell Line (RCCL) collection*“ (<http://research.kent.ac.uk/industrial-biotechnology-centre/the-resistant-cancer-cell-line-rccl-collection/>), Prof. Jindrich Cinatl (Interdisziplinäres Labor für Tumor- und Virusforschung, Universitätsklinikum Frankfurt), Prof. Martin Michaelis, PhD (University of Kent, UK) bzw. Herrn Dr. Martin Puhr und Prof. Zoran Culig (Abteilung für Experimentelle Urologie, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich) zur Verfügung gestellt.

#### **3.6.1 PC3**

Die Zelllinie PC3 wurde 1978 aus einer Knochenmetastase eines 62-jährigen Kaukasiers gewonnen (128-131). PC3 bildet keinen funktionellen Androgenrezeptor aus, jedoch ist die mRNA hierfür vorhanden (132, 133). Des Weiteren wird kein PSA exprimiert und das Y-Chromosom ging in der Etablierung der immortalisierten Zelllinie verloren (134, 135). Von den untersuchten Zelllinien ist das Metastasierungspotenzial von PC3 als am höchsten einzustufen (136-138).

#### **3.6.2 DU145**

Eine Metastase des Zentralen Nervensystems eines 69-jährigen Kaukasiers bildete 1975 das Ausgangsmaterial für die Zelllinie DU145, welche weder über ein funktionelles Androgenrezeptorprotein verfügt, noch PSA produziert (130-132, 139).

#### **3.6.3 LNCaP**

LNCaP-Zellen entstammen einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Kaukasiers aus dem Jahr 1977 (130, 131, 140). Die LNCaP-Zellen sind hormonsensitiv und verfügen über einen mutierten Androgenrezeptor, der auch die Bindung anderer Steroide zulässt (141, 142). Es erfolgt die Freisetzung von PSA (131). Die LNCaP-Zellen haben eine vergleichsweise lange Verdopplungszeit von etwa 60 Stunden, wachsen nur schwach an und lösen sich leicht ab (140).

#### **3.6.4 Docetaxel-resistente Zelllinien PC3 DR, DU145 DR, LNCaP DR**

Die Resistenzbildung erfolgte durch chronische Gabe aufsteigender Konzentrationen von Docetaxel (DX) (<http://research.kent.ac.uk/industrial-biotechnology-centre/the-resistant-cancer-cell-line-rccl-collection/>). Bei den Versuchen befand sich in den Medien der DX-resistenten Zellen immer zusätzlich 12,5 nM DX, um den

Resistenzdruck aufrechtzuerhalten. Der Nachweis, dass der Resistenzdruck erfolgreich aufrechterhalten werden kann, erfolgte in Vorversuchen mittels Vergleiches der Dosis-Wirkungskurven von parentalen und DX-resistenten Zellen und Bestimmung des IC<sub>50</sub> (= Konzentration mit halbmaximaler Wirkung im ausgewählten Dosierungsbereich). Dabei wurden Erhöhungen des IC<sub>50</sub> um mindestens das Zweifache des parentalen IC<sub>50</sub> als Resistenzinduktion gewertet.

## **4. Methoden**

### **4.1 Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden steril in der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Jegliche Materialien, die darin zur Verwendung kamen, mit Ausnahme der bewachsenen Zellkulturflaschen, wurden zuvor desinfiziert.

#### **4.1.1 Herstellung der Kulturmedien**

Allen Zelllinien diente das am Roswell Park Memorial Institute entwickelte RPMI 1640 als Kulturmedium, welches durch Natriumhydrogenkarbonat gepuffert ist und neben zahlreichen Aminosäuren und Vitaminen unter anderem auch Glukose (2g/l) enthält. Weiterhin ist Phenolrot zugesetzt; es dient als optischer pH-Wert-Indikator.

Es wurden anteilig vom Gesamtvolumen 10 % fetales Kälberserum (FCS), 2 % HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure) sowie 1 % Antibiotic-Antimycotic (1:100 von 10.0000 Units/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) zugesetzt. Den Kulturmedien der DX-resistenten Zelllinien wurde zudem, zur Erhaltung der Resistenz, DX in einer Endkonzentration von 12,5 nM zugefügt.

#### **4.1.2 Kultivierung der Zellkulturen**

Für optimale Wachstumsbedingungen wurden die parentalen und DX-resistenten Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator gelagert. Der Umschlag des Kulturmediums ins Saure (gelb) zeigte dabei den Nährstoffverbrauch an. Die Konfluenz der Zellen wurde regelmäßig und immer vor den Versuchsreihen am inversen Lichtmikroskop überprüft. In Abhängigkeit der Konfluenz erfolgte alle 3 Tage ein Wechsel des Nährmediums oder ein Passagieren der Zellkulturen.

Für den Medienwechsel wurde das verbrauchte Nährmedium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und anschließend neues Kulturmedium hinzugefügt.

#### **4.1.3 Passagieren der Zellkulturen**

Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Nährmedium mittels Pasteurpipette entfernt und die Zellen mit 5 ml Dulbecco's Phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin/EDTA hinzugefügt. Nach ~3-5 Minuten Inkubation wurde das Ablösen der Zellen überprüft. Es wurde mindestens 1 ml neues Medium hinzugefügt, um durch das enthaltende FCS den enzymatischen Ablösevorgang durch Trypsin abzustoppen. Je nach Zellteilungsrate und Bedarf an der jeweiligen Zelllinie

betrug das Teilungsverhältnis 1:2 bis 1:10. Gemäß dem Teilungsverhältnis wurde die Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt, diese mit frischem Medium aufgefüllt und der Inhalt durch Schwenken gleichmäßig auf dem Kulturboden verteilt, bevor die Zellen weiter inkubiert wurden.

#### **4.1.4 Kryokonservierung der Zellkulturen**

Um die Zellen lange Zeit aufbewahren zu können, wurden diese in  $-196\text{ °C}$  kaltem flüssigem Stickstoff konserviert. Hierzu wurden die Zellen, wie oben unter 4.1.3 beschrieben, abgelöst. Durch Zugabe von 9 ml Medium und anschließendem Resuspendieren wurde das Trypsin inaktiviert und die noch anhaftenden Zellen abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1.200 U/min (Heraeus Megafuge 16R; Heraeus Instruments; Hanau, Deutschland) bei  $4\text{ °C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium bestand aus dem Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie (sh. 4.1.1), das mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzt wurde, um eine Zellschädigung durch Eiskristallbildung zu vermeiden.

Eine nahezu konfluente  $75\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche wurde jeweils auf 3 Kryoröhrchen in je 1 ml Einfriermedium aliquotiert. Die fertigen Aliquots wurden sofort in eine auf Raumtemperatur bereitstehende Einfrierhilfe gestellt und damit im  $-80\text{ °C}$ -Gefrierschrank in  $1\text{ °C/min}$ -Schritten langsam heruntergekühlt und konnten am folgenden Tag in den flüssigen Stickstoff überführt werden.

#### **4.1.5 Auftauen kryokonservierter Zellkulturen**

Das Kryoröhrchen wurde bei  $37\text{ °C}$  für etwa 5 Minuten im Wasserbad aufgetaut und anschließend zusammen mit 9 ml Kulturmedium in die  $75\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um eine toxische Schädigung der Zellen durch das DMSO zu vermeiden.

#### **4.1.6 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die Lebendzellzahl wurde mithilfe des LUNA™ *Automated Cell Counter* von logos Biosystems bestimmt. Hierfür wurden je  $10\text{ }\mu\text{l}$  Zellsuspension mit  $10\text{ }\mu\text{l}$  Trypanblau vermischt und von dieser 1:1-Mischung  $10\text{ }\mu\text{l}$  in die Kammer eines LUNA™ *Cell Counting Slides* pipettiert. Nach dem Scharfstellen des Fokus am Gerät wurde die Gesamtzellzahl, Lebendzellzahl, Totzellzahl und Viabilität automatisch bestimmt.

#### **4.1.7 Analyse der Viabilität / des Zellwachstums – MTT-Test**

Das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) gelangt durch die Zellmembran und wird in Abhängigkeit von Enzymen des endoplasmatischen Retikulums und im Zytoplasma bzw. Reduktionsäquivalenten der Zellatmung vitaler Zellen zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazan reduziert. Dieser Vorgang findet nur in vitalen, nicht in toten Zellen statt. Durch einen Solubilisierungspuffer wird der Farbstoff aus den vitalen Zellen gelöst und kann anschließend photometrisch gemessen werden. Da die so gemessene enzymale Aktivität im Zusammenhang mit der Zellviabilität bzw. dem Wachstum steht, gibt die Intensität Aufschluss über die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen (143-145) und indirekt über das Tumorzellwachstum. In Kombination mit den unter 4.1.8 beschriebenen Proliferationsstudien können Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Tumorzellen insgesamt gezogen werden.

#### **Standardkurve**

Um den im MTT-Test (Cell Proliferation Kit I (MTT); Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland) gewonnenen Farbumschlag in entsprechende Zellzahlen umrechnen zu können, wurde für jede Zelllinie eine Standardkurve erstellt.

Hierzu wurde die Lebendzellzahl, wie unter 4.1.6 beschrieben, auf 1.600.000 Zellen/ml eingestellt und je Zelllinie eine Verdünnungsreihe mit 1.600.000, 800.000, 400.000, 200.000, 100.000, 50.000 und 25.000 Zellen/ml erstellt. Je 100 µl dieser Verdünnungen wurden in einem dreifachen Ansatz zusammen mit einer Hintergrundkontrolle (Nährmedium ohne Zellen = Blank) in eine 96-Well-Platte pipettiert (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Plattenbelegung Standardkurve MTT**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A									
B	Parental	Blank	2.500 Zellen	5.000 Zellen	10.000 Zellen	20.000 Zellen	40.000 Zellen	80.000 Zellen	160.000 Zellen
C		Blank	2.500 Zellen	5.000 Zellen	10.000 Zellen	20.000 Zellen	40.000 Zellen	80.000 Zellen	160.000 Zellen
D		Blank	2.500 Zellen	5.000 Zellen	10.000 Zellen	20.000 Zellen	40.000 Zellen	80.000 Zellen	160.000 Zellen
E	Docetaxel-resistent	Blank	2.500 Zellen	5.000 Zellen	10.000 Zellen	20.000 Zellen	40.000 Zellen	80.000 Zellen	160.000 Zellen
F		Blank	2.500 Zellen	5.000 Zellen	10.000 Zellen	20.000 Zellen	40.000 Zellen	80.000 Zellen	160.000 Zellen
G		Blank	2.500 Zellen	5.000 Zellen	10.000 Zellen	20.000 Zellen	40.000 Zellen	80.000 Zellen	160.000 Zellen
H									

Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl MTT-Reagenz (Cell Proliferation Kit I (MTT); Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland) pro Well und eine Inkubation für 4 Stunden. Anschließend wurden 100 µl Solubilisierungspuffer in jedes Well hinzu pipettiert und die Platten über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Messung am Mikroplattenreader Spark 10M (Tecan Austria GesmbH; Grödig, Österreich) bei 570 nm mit der Referenz bei 650 nm.

### Zellversuch

Für jede parentale und dazugehörige DX-resistente Zelllinie wurden für die kinetische Darstellung Dosis-Wirkungskurven erstellt. Dazu wurde je eine 96-Well-Platte für die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h ausgesät.

Zuerst wurden die Zellen im Mikroskop überprüft und, wie unter 4.1.3 beschrieben, gelöst und je nach Konfluenz mit maximal 9 ml Medium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Daraufhin erfolgte die Messung der Lebendzellzahl nach 4.1.6. Die Zellkonzentration wurde für die parentalen und DX-resistenten PC3- und DU145-Zellen auf 100.000 Zellen/ml und für die LNCaP-Subzelllinien auf 200.000 Zellen/ml eingestellt.

Von diesen Zellsuspensionen wurden je 50 µl in die Wells überführt. Somit befanden sich von den Zelllinien PC3 und DU145 jeweils 5.000 Zellen und von den LNCaP-Zelllinien jeweils 10.000 Zellen in einem Well. War die vorhandene Zellkonzentration nicht ausreichend, wurde die Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten bei 1.200 Umdrehungen/min und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand

abgenommen, das Pellet in 1 ml Medium gelöst und die Zellzahl bzw. -konzentration erneut bestimmt und eingestellt.

Für die Dosis-Wirkungskurven mit Artesunat wurden die Zellen mit den Endkonzentrationen 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  behandelt (Tabelle 11).

Die 96-Well-Platte wurde mit je 100  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Kulturmediums für den Blank oder 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension und 50  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Behandlung (doppelt konzentriert) nach dem Pipettierschema versehen.

**Tabelle 11: Plattenbelegung Zellversuch MTT**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A										
B	Parental	Blank	0	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
C		Blank	0	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
D		Blank	0	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
E	Docetaxel-resistent	Blank	0	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
F		Blank	0	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
G		Blank	0	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$
H										

Nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation wurden auch hier je 10  $\mu\text{l}$  MTT-Reagenz in die Wells der jeweiligen Platten pipettiert und weiter verfahren, wie oben beschrieben (sh. Standardkurve 4.1.7).

#### 4.1.8 Analyse der Proliferation – BrdU-Test

5-bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) ist ein synthetisches Thymidinanalogon. In proliferierenden Zellen wird es während der S-Phase anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und kann anschließend über eine Antikörper-vermittelte, enzymatische Reaktion nachgewiesen werden. Dazu bindet ein Anti-BrdU Antikörper, gekoppelt an ein Meerrettich Peroxidase-Konjugat (HRP), an das BrdU. Die Zugabe des chromogenen Substrates Tetramethylbenzidin (TMB) führt in Kombination mit dem HRP zu einem Farbumschlag. Die zuvor klare Lösung, wird durch das HRP katalysierte TMB, proportional zum eingebauten BrdU, bläulich bzw. nach Zugabe der Stopp-Lösung gelblich. Das entstandene Produkt kann anschließend photometrisch detektiert werden. Über die Extinktionswerte kann der Vergleich des Ausmaßes der Proliferation der Proben erfolgen (146, 147).

Für jede Sub-Zelllinie wurde auch hier je eine 96-Loch-Platte für 24, 48 und 72 h ausgesät. Das Vorgehen bis zur Behandlungsreihe entsprach dem MTT-Test (sh. 4.1.7). Zusätzlich wurden zwei Kontroll-Spalten bestehend aus 50 µl Zellsuspension plus 50 µl Medium angelegt, wobei nur einer dieser Kontrollen im folgenden Schritt je 10 µl *BrdU-Labeling-Reagent* (Kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric); Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland) pro Well hinzugefügt wurde. Das weitere Prozedere war für alle Proben und Kontrollen gleich.

Artesunat wurde in den Endkonzentrationen 12,5 µM, 25 µM, 37,5 µM und 50 µM zu je 50 µl Zellsuspension in die einzelnen Wells pipettiert. Vor Zugabe lag die Behandlungsreihe entsprechend doppelt konzentriert vor (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Plattenbelegung BrdU**

	1	2	3	4	5	6	7
A							
B	Parental	ohne BrdU	mit BrdU	12,5 µM	25 µM	37,5 µM	50 µM
C		ohne BrdU	mit BrdU	12,5 µM	25 µM	37,5 µM	50 µM
D		ohne BrdU	mit BrdU	12,5 µM	25 µM	37,5 µM	50 µM
E	Docetaxel-resistent	ohne BrdU	mit BrdU	12,5 µM	25 µM	37,5 µM	50 µM
F		ohne BrdU	mit BrdU	12,5 µM	25 µM	37,5 µM	50 µM
G		ohne BrdU	mit BrdU	12,5 µM	25 µM	37,5 µM	50 µM
H							

Die 24 h-Platte wurde bereits nach Fertigstellung mit je 10 µL *BrdU-Labeling-Reagent* (Kit Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric); Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland) pro Well bestückt und für 24 h inkubiert. Derselbe Schritt erfolgte für die 48 h-Platte nach 24 h und für die 72 h-Platte nach 48 h.

Das Medium wurde nach abgeschlossener Inkubation durch leichtes Abklopfen auf Papierhandtüchern entfernt und mit 50 µl Fix-Denat-Lösung pro Well fixiert bzw. denaturiert. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur konnte die Fixierungslösung durch erneutes Abklopfen entfernt werden. Danach waren die Platten für 1 Woche haltbar.

Zur Färbung der Zellen wurde eine Anti-BrdU-POD Antikörper *Working Solution* durch 1:100 Verdünnung des Antikörpers mit der *Dilution Solution* erstellt. 50 µl der fertigen *Working Solution* wurden pro Well zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde eine *Washing Solution* durch Verdünnung des *Washing Buffers* mit DPBS (1:10) zubereitet. Nach dreimaligem Waschen mit je 100 µl *Washing Solution* pro Well wurden je 50 µl Substratlösung pro Well zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl



H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [0,5 M] pro Well abgestoppt. Die zu messende Platte wurde daraufhin für 1 Minute im Mikroplattenreader Tecan Spark 10M (Tecan Austria GesmbH; Grödig, Österreich) bei 300 Umdrehungen/Minute geschüttelt und anschließend die Adsorption bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

#### **4.1.9 Analyse des Zellzyklus**

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte mithilfe einer Färbung mit Propidiumiodid (PI). Dieser fluoreszierende Farbstoff interkaliert in die DNA und macht deren Gehalt, aufgrund der im Durchflusszytometer messbaren Intensitätsunterschiede, quantifizierbar. Zellen, die sich in der G<sub>2</sub>/M-Phase befinden, weisen einen diploiden Chromosomensatz auf und verursachen damit ein doppelt so starkes Signal wie Zellen, die sich in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase befinden, da diese nur über einen haploiden Chromosomensatz verfügen. Das Signal von Zellen in der S-Phase befindet sich entsprechend zwischen diesen beiden, da der Chromosomensatz noch nicht vollständig verdoppelt wurde (148, 149).

Die Aussaat der Zellen erfolgte in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen. Es wurde jeweils die unbehandelte Zelllinie gegen mit 37,5 µM Artesunat behandelte Zellen nach 48 h verglichen. Bei der Aussaat wurde darauf geachtet eine Konfluenz von etwa 80 % zum Zeitpunkt der Messung nicht zu überschreiten, um dadurch mögliche hemmende Effekte auf den Zellzyklus und damit auf die Messung zu vermeiden.

Das Kulturmedium wurde jeweils aus der Zellkulturflasche entfernt und der Zellrasen mit 5 ml DPBS abgewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA und etwa fünfminütiger Inkubation wurde das Ablösen der Zellen überprüft, 1,5 ml Medium zugefügt, der gesamte Inhalt in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 300 µl DPBS gelöst und in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt.

Unter Schütteln wurden 700 µl eiskaltes 100 % Ethanol hinzugefügt und die Zellen damit für 30-60 min bei 4 °C fixiert. In diesem Stadium sind die Proben mehrere Wochen lagerbar. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 1.000 g und 4 °C sowie zwei Waschschrte mit DPBS.

Um sicherzustellen, dass nur DNA angefärbt wurde, erfolgte der Verdau von RNA mittels 50 µl Ribonuclease A (100 µg/ml), die direkt auf das Zellpellet gegeben wurden. Nach 30-60 Minuten bei 37 °C im Dunkeln wurden 200 µl PI-Lösung (50 µg/ml) hinzupipettiert, sorgfältig gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 300 µl DPBS hinzugefügt und der gesamte Inhalt in ein 5 ml-Rundbodenröhrchen überführt. Um eine optimale Einstellung des FACS Calibur Messgerätes (Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) gewährleisten zu können, wurde jeweils ein zusätzliches Rundbodenröhrchen der parentalen unbehandelten Zellkultur (Negativkontrolle) mitgeführt.

Bis zur Messung erfolgte die Lagerung der Röhrchen abgedunkelt auf Eis, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu vermeiden. Die Messung erfolgte innerhalb von 1-3 Stunden, in denen die Färbung stabil war. Der FACS Calibur (Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland) wurde dabei für jede Zelllinie neu eingestellt. Bei der Messung wurden je Probe 10.000 Zellen bei einer Geschwindigkeit von unter 300 Ereignissen/s erfasst.

#### **4.1.10 Analyse der Apoptose – FITC-Annexin V**

Während der Apoptose durchlaufen die Zellen bestimmte morphologische Veränderungen. Eine der ersten Veränderungen besteht darin, dass das negativ geladene Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite transloziert. Annexin V ist ein Protein, welches Kalzium-abhängig an Phospholipide bindet und eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist. In dem verwendeten Assay (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I; BD Biosciences; Franklin Lakes, New Jersey, USA) war Annexin V mit dem Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert und konnte somit mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Eine Färbung mit PI, zusätzlich zum Nachweis von Annexin V, ist charakteristisch für die späte Apoptose, in der die Membranintegrität nicht mehr gegeben ist, PI somit in die Zellen eindringen und die DNA anfärben kann (150, 151).

Die Aussaat erfolgte analog zu dem Zellzyklus (sh. 4.1.9) in 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen. Auch hier wurde über 48 h mit 37,5 µM ART behandelt.

Danach wurde zunächst der Überstand (das verbrauchte Medium) gesammelt, um auch die bereits abgeschwommenen toten Zellen zu erfassen. Die Zellen wurden mit 5 ml DPBS gewaschen, dieses ebenfalls aufgefangen und mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Inkubation für etwa 5 Minuten und Überprüfung der Ablösung des Zellrasens, wurden die Zellen mit 1,5 ml Medium zu den restlichen Zellüberständen gegeben und für 5 Minuten mit 1.200 Umdrehungen/min bei 4 °C zentrifugiert. Das

Zellpellet wurde zweimal mit DPBS gewaschen und in 1 ml Bindepuffer aufgenommen, der zuvor mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt wurde. Die Lebendzellzahl wurde, wie unter 4.1.6, bestimmt und mithilfe des Bindepuffers auf  $2 \times 10^6$  Zellen eingestellt. 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen) wurden jeweils in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt. Der Versuchsansatz enthielt dabei folgende Proben:

**Tabelle 13: Messansatz Apoptose**

	Annexin V-FITC	Propidiumiodid (PI)
Kontrolle ohne Zugaben	/	/
Kontrolle frühe Apoptose	5 $\mu$ l	/
Kontrolle tote Zellen	/	5 $\mu$ l
Messprobe	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

Die Zugabe von Annexin V-FITC und PI erfolgte im Dunkeln. Anschließend wurden die Rundbodenröhrchen vorsichtig mit dem Vortexer gemischt, für 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und danach wieder auf Eis gestellt. 400  $\mu$ l Bindepuffer pro Probe wurden hinzu pipettiert und am Durchflusszytometer innerhalb von einer Stunde gemessen. Die drei Kontrollen dienten zur Einstellung der Messparameter für die jeweiligen Zelllinien. Die Messung erfolgte wie auch beim Zellzyklus mit dem FACS Calibur (Becton Dickinson GmbH; Heidelberg, Deutschland). Gemessen wurden jeweils 10.000 Zellen pro Probe bei einer Geschwindigkeit von unter 300 Ereignissen/s.

## **4.2 Statistische Auswertung**

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Für alle Versuche wurde das Signifikanzniveau  $\alpha$  auf 95 % festgelegt. Somit galten Ergebnisse mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant (\*), mit einem p-Wert  $\leq 0,01$  als hoch signifikant (\*\*) und mit einem p-Wert  $\leq 0,001$  als höchst signifikant (\*\*\*). Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 7 (GraphPad Software; La Jolla, California, USA). Die Voranalysen und prozentualen Umrechnungen wurden mittels Microsoft Excel aus Microsoft Office 365 (Microsoft; Redmond, Washington, USA) vorgenommen.

Die Analyse der Viabilität bzw. des Zellwachstums wurde mithilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (*two-way ANOVA*) statistisch ausgewertet. Dabei werden Varianzen miteinander verglichen, um den Einfluss von zwei Faktoren auf eine Zielgröße zu determinieren. Die beiden untersuchten Faktoren waren dabei die Konzentration und die Zeit der Behandlung. Das Wachstum der behandelten Zellen im Vergleich zum Wachstum der unbehandelten Zellen zum gleichen Zeitpunkt stellte die Zielgröße dar. Um die Fehlerrate durch multiples Testen niedrig zu halten, wurde nach Dunnett korrigiert.

Die Bestimmung des IC<sub>50</sub> zum Zeitpunkt 72 h erfolgte mittels der in GraphPad Prism 7 eingebauten *Nonlinear Regression* „log(inhibitor) vs. *normalized response -- Variable slope*“. Der LC<sub>50</sub> nach 72 h wurde in Microsoft Excel durch Berechnung einer logarithmischen Ausgleichsgerade ermittelt (sh. Tab. 15).

Die statistische Auswertung der Analyse der Proliferation erfolgte mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*). Der untersuchte Faktor war hier die Konzentration der Behandlung und die Proliferation der behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen die Zielgröße. Auch hier wurde die Korrektur nach Dunnett durchgeführt.

Zur Erfassung der prozentualen Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen wurde das Programm ModFit LT 5.0 (Verity Software House; Topsham, Maine, USA) verwendet. Die statistische Analyse des Zellzyklus wurde mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse durchgeführt. Die beiden untersuchten Faktoren waren in diesem Fall die Zellzyklusphasen und die Behandlung. Die Zielvariable war die Veränderung der Zellzyklusphasen. Die Korrektur wurde nach Sidak vorgenommen.

Zur Auswertung der Apoptose wurden Annexin V-positive Zellen mittels FlowJo 10.4.2 (FlowJo LLC; Ashland, Oregon, USA) erfasst und anschließend mit dem gepaarten t-Test statistisch analysiert. Zuvor wurden Ausreißer nach der ROUT-Methode mit  $Q = 1\%$  identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen (152).

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Analyse des Zellwachstums / der Viabilität**

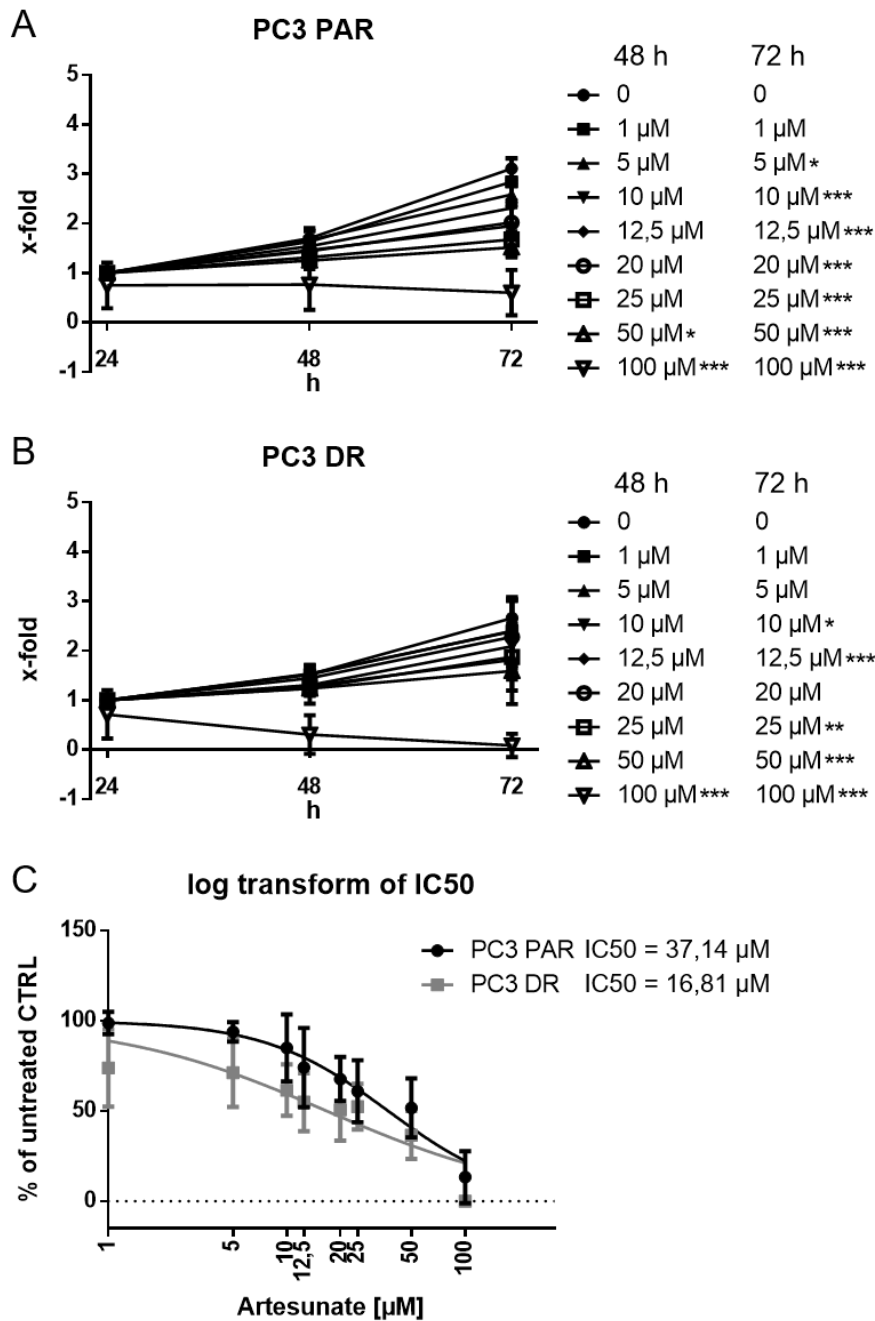
ART induzierte in allen parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen eine zeit- und dosisabhängige Reduktion des Zellwachstums (Abb. 1-3). Erste statistisch signifikante Effekte zeigten sich in allen Zelllinien bereits nach 48 h.

Nach 24 h waren in der Zelllinie PC3 kaum Abweichungen von der unbehandelten Kontrolle durch die ART-Behandlung bezüglich des Zellwachstums erkennbar (Abb. 1A+B). Doch bereits nach 48 h wurden signifikante konzentrationsabhängige Unterschiede sichtbar und nach 72 h waren diese noch stärker ausgeprägt.

Bei den parentalen PC3-Zellen reduzierte eine Behandlung über 48 Stunden mit 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  ART signifikant das Zellwachstum (Abb. 1A). Nach 72 h reichten für vergleichbar starke Effekte  $\geq 5 \mu\text{M}$  ART-Behandlung aus. In der höchsten Konzentration mit 100  $\mu\text{M}$  ART kam das Zellwachstum nicht nur zum Erliegen, sondern die Zahl der vitalen Zellen nahm sogar ab.

Die DX-resistenten PC3-Zellen induzierten bei 48 h ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ART und nach 72 h ab 10  $\mu\text{M}$  ART eine signifikante Wachstumsinhibition (Abb. 1B). Nach der Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  ART über 72 h waren kaum noch lebende Zellen nachweisbar.

Gemessen an der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) sprachen die parentalen ( $\text{IC}_{50}$ : 37,14  $\mu\text{M}$  ART) PC3-Zellen insgesamt deutlich schlechter als die DX-resistenten PC3-Zellen ( $\text{IC}_{50}$ : 16,81  $\mu\text{M}$  ART) auf die Behandlung mit ART an (Abb. 1C).

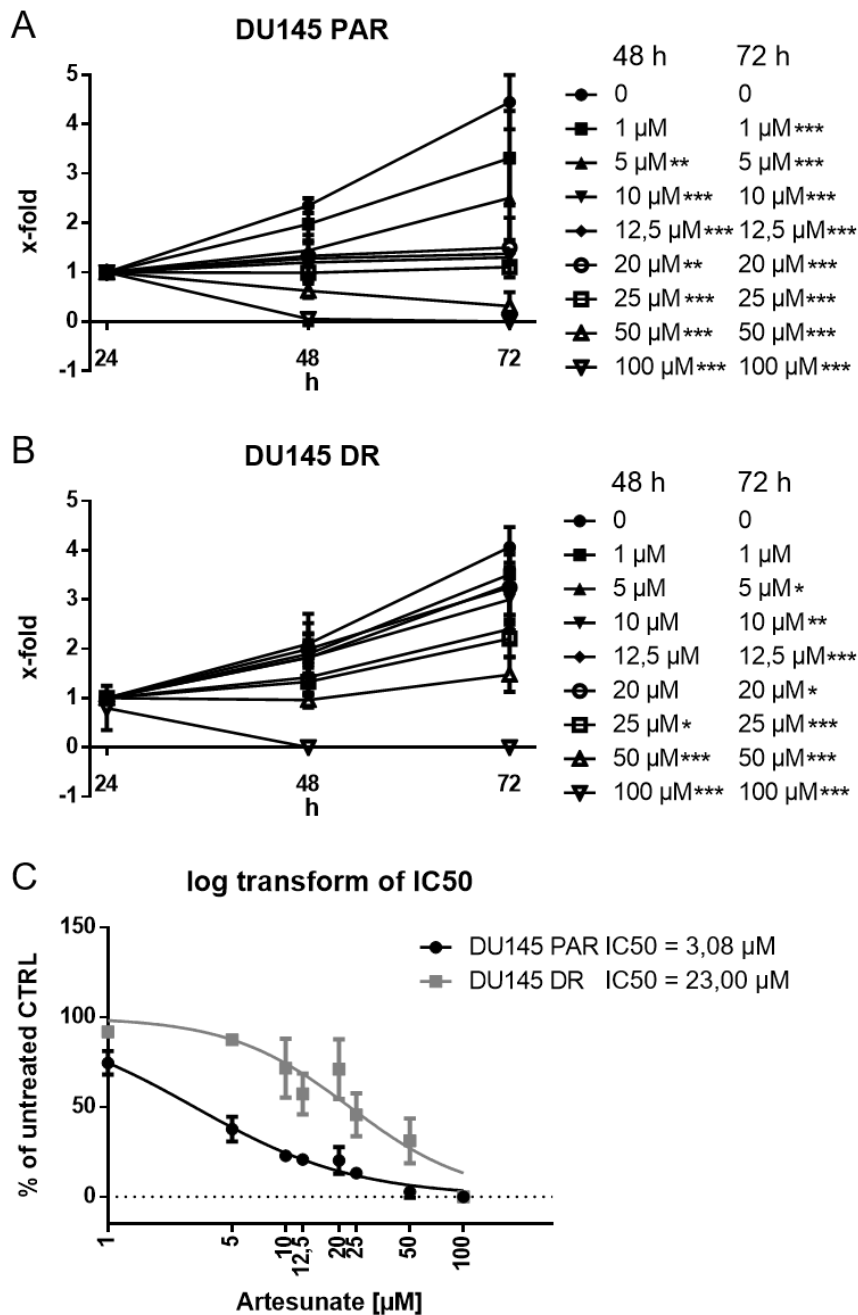


**Abbildung 1: Zellwachstum und die IC50-Werte der parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen.** Das Zellwachstum der (A) parentalen (PAR) und (B) DX-resistenten (DR) PC3-Zelllinien nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit aufsteigenden ART-Konzentrationen [1-100  $\mu$ M]. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrollen (auf 1 nach 24 h festgelegt). Die weiteren Werte als x-faches im Vergleich zur Kontrolle. (C) IC50-Wert für ART aus den logarithmischen 72 h-Kurven des Zellwachstums von PC3 PAR und PC3 DR. Das Zellwachstum der unbehandelten Kontrolle zum Zeitpunkt 72 h wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $n = 6$ .

Das Wachstum der DU145-Zellen wurde nach 48 h und 72 h ART-Behandlung ebenfalls signifikant inhibiert (Abb. 2). Die Effekte waren wieder zeit- und dosisabhängig und traten dabei noch deutlicher als bei den PC3-Zellen zu Tage. So konnte hier die höchste ART-Konzentration [100  $\mu\text{M}$ ] sowohl in den parentalen als auch in den DX-resistenten Zellen die Anzahl vitaler DU145-Zellen vollständig reduzieren. Bereits eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  ART nach 48 h und 1  $\mu\text{M}$  ART nach 72 h resultierte in den parentalen DU145-Zellen in einer signifikanten Reduktion des Zellwachstums (Abb. 2A). Die DX-resistenten DU145-Zellen zeigten bereits bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  ART nach 48 h und 5  $\mu\text{M}$  ART nach 72 h ein stark signifikantes Ansprechen (Abb. 2B).

Anders als bei den PC3-Zellen reagierten die parentalen DU145-Zellen ( $\text{IC}_{50}$ : 3,08  $\mu\text{M}$  ART) deutlich sensibler auf die Behandlung mit ART als die DX-resistenten Zellen ( $\text{IC}_{50}$ : 23,00  $\mu\text{M}$  ART) (Abb. 2C).

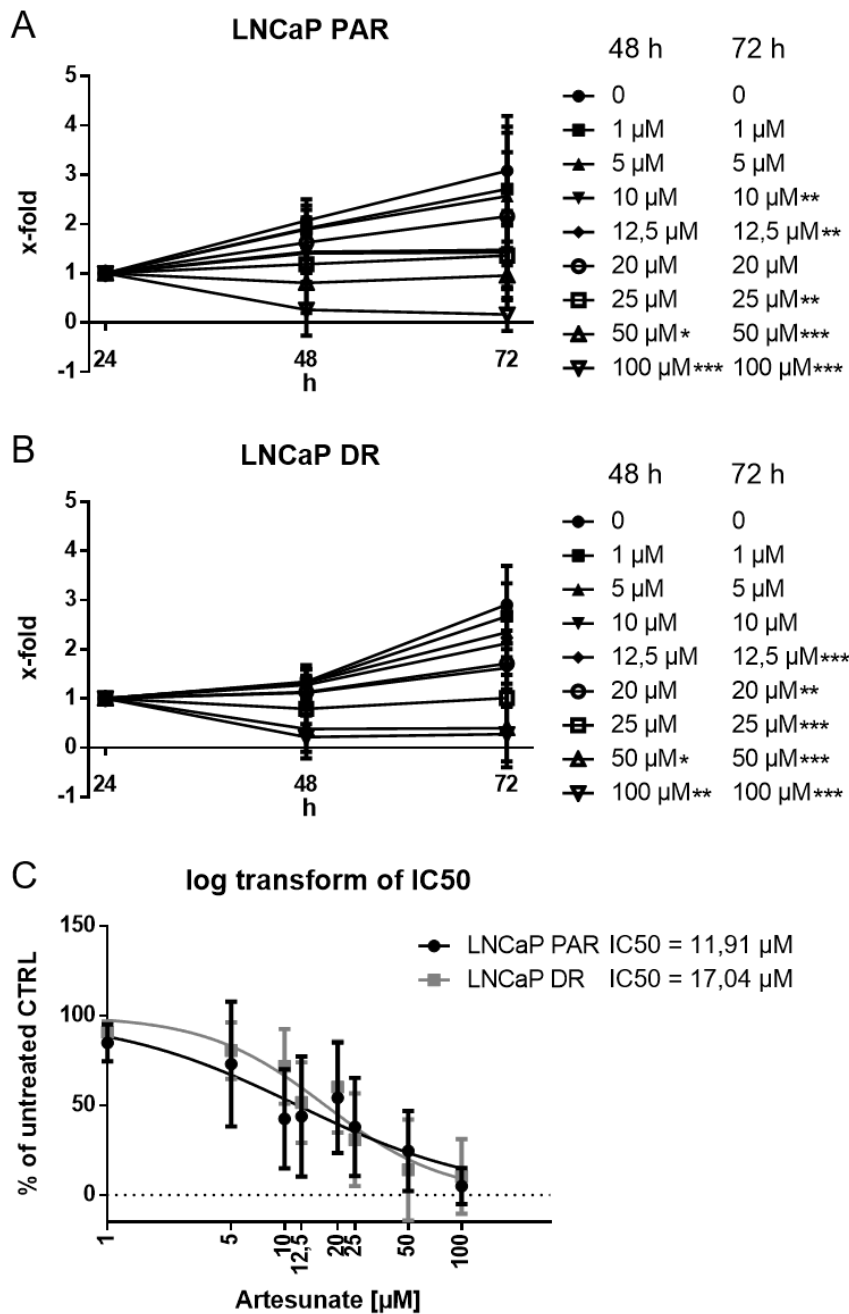




**Abbildung 2: Zellwachstum und die IC50-Werte der parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen.**

Das Zellwachstum der (A) parentalen (PAR) und (B) Docetaxel-resistenten (DR) DU145-Zelllinien nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit aufsteigenden ART-Konzentrationen [1-100 µM]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen (auf 1 nach 24 h festgelegt). Die weiteren Werte als x-faches im Vergleich zur Kontrolle. (C) IC50-Wert für ART aus den logarithmischen 72 h-Kurven des Zellwachstums von DU145 PAR und DU145 DR. Das Zellwachstum der unbehandelten Kontrolle zum Zeitpunkt 72 h wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $n = 3$ .

Die LNCaP-Zellen waren in Bezug auf die Wachstumsinhibition durch ART insgesamt sensitiver als die PC3-Zellen, aber weniger sensitiv als die DU145-Zellen. So sprachen parentale LNCaP-Zellen nach 48 h ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  ART und nach 72 h ab 10  $\mu\text{M}$  ART signifikant an (Abb. 3A). Die DX-resistenten LNCaP-Zellen zeigten ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  ART nach 48 h und 12,5  $\mu\text{M}$  ART nach 72 h eine signifikante Wachstumshemmung (Abb. 3B). Sowohl bei den parentalen als auch DX-resistenten LNCaP-Zellen führte die maximale Konzentration nicht nur zum Sistieren des Zellwachstums, sondern zu einer starken Abnahme der vitalen Zellen. Das Ansprechen der parentalen (IC<sub>50</sub>: 11,91  $\mu\text{M}$  ART) und DX-resistenten LNCaP-Zellen (IC<sub>50</sub>: 17,04  $\mu\text{M}$  ART) unterschied sich somit nicht so stark wie bei den beiden anderen Zelllinien (Abb. 3C).



**Abbildung 3: Zellwachstum und die IC50-Werte der parentalen und DX-resistenten LNCaP-Zellen.** Das Zellwachstum der (A) parentalen (PAR) und (B) DX-resistenten (DR) LNCaP-Zelllinien nach 24, 48 und 72 h Behandlung mit zunehmenden ART-Konzentrationen [1-100  $\mu$ M]. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen (auf 1 nach 24 h festgelegt). Die weiteren Werte als x-faches im Vergleich zur Kontrolle. (C) IC50-Wert für ART aus den logarithmischen 72 h-Kurven des Zellwachstums von LNCaP PAR und LNCaP DR. Das Zellwachstum der unbehandelten Kontrolle zum Zeitpunkt 72 h wurde auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $n = 4$ .

Von allen Zelllinien sprachen insgesamt die DU145-Zellen am stärksten auf die Behandlung mit ART im Hinblick auf das Tumorzellwachstum an.

Um den inhibitorischen bzw. zytotoxischen Effekt von ART auf die PCa-Zellen genauer quantifizieren zu können, wurden, neben der mittleren inhibitorische Konzentration (IC50), die mittlere letale Konzentration (LC50) zum Zeitpunkt 72 h bestimmt (Abb. 1C, 2C, 3C, 10, 11, 12 + Tab. 14). Die parentalen PC3-Zellen zeigten dabei die geringste Sensitivität gegenüber ART (IC50: 37,14  $\mu\text{M}$  ART; LC50: 36,32  $\mu\text{M}$  ART; Abb. 1C, 10 + Tab. 14). Die DX-resistenten PC3-Zellen sprachen insgesamt besser auf ART an (IC50: 16,81  $\mu\text{M}$  ART; LC50: 25,33  $\mu\text{M}$  ART; Abb. 1C, 10 + Tab. 14).

Im Vergleich zu allen anderen Zelllinien war bei den parentalen DU145-Zellen nur eine relativ geringe Konzentration nötig, um bereits halbmaximale Effekte zu erzielen (IC50: 3,08  $\mu\text{M}$  ART; LC50: 5,38  $\mu\text{M}$  ART; Abb. 2C, 11 + Tab. 14). Hier sprachen die DX-resistenten DU145 insgesamt schlechter als die parentalen Zellen an (IC50: 23,00  $\mu\text{M}$  ART; LC50: 26,18  $\mu\text{M}$  ART; Abb. 2C, 11 + Tab. 14).

Die Unterschiede im Ansprechen auf ART waren bei den parentalen und DX-resistenten LNCaP-Zellen nicht so stark ausgeprägt wie bei den anderen Zelllinien. Jedoch sprachen auch hier, wie bei den DU145, die parentalen LNCaP-Zellen (IC50: 11,91  $\mu\text{M}$  ART; LC50: 17,47  $\mu\text{M}$  ART; Abb. 3C, 12 + Tab. 14) sensitiver als die DX-resistenten Zellen an (IC50: 17,04  $\mu\text{M}$  ART; LC50: 20,91  $\mu\text{M}$  ART; Abb. 3C, 12 + Tab. 14). Die Ergebnisse der LC50-Berechnung waren damit im guten Einklang mit den Ergebnissen der IC50-Werte.

**Tabelle 14: IC50- und LC50-Werte der parentalen (PAR) und DX-resistenten (DR) Zelllinien nach 72 h ART-Behandlung**

Zelllinie	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]	LC50 [ $\mu\text{M}$ ]
PC3 PAR	37,14	36,32
PC3 DR	16,81	25,33
DU145 PAR	3,08	5,38
DU145 DR	23,00	26,18
LNCaP PAR	11,91	17,47
LNCaP DR	17,04	20,91

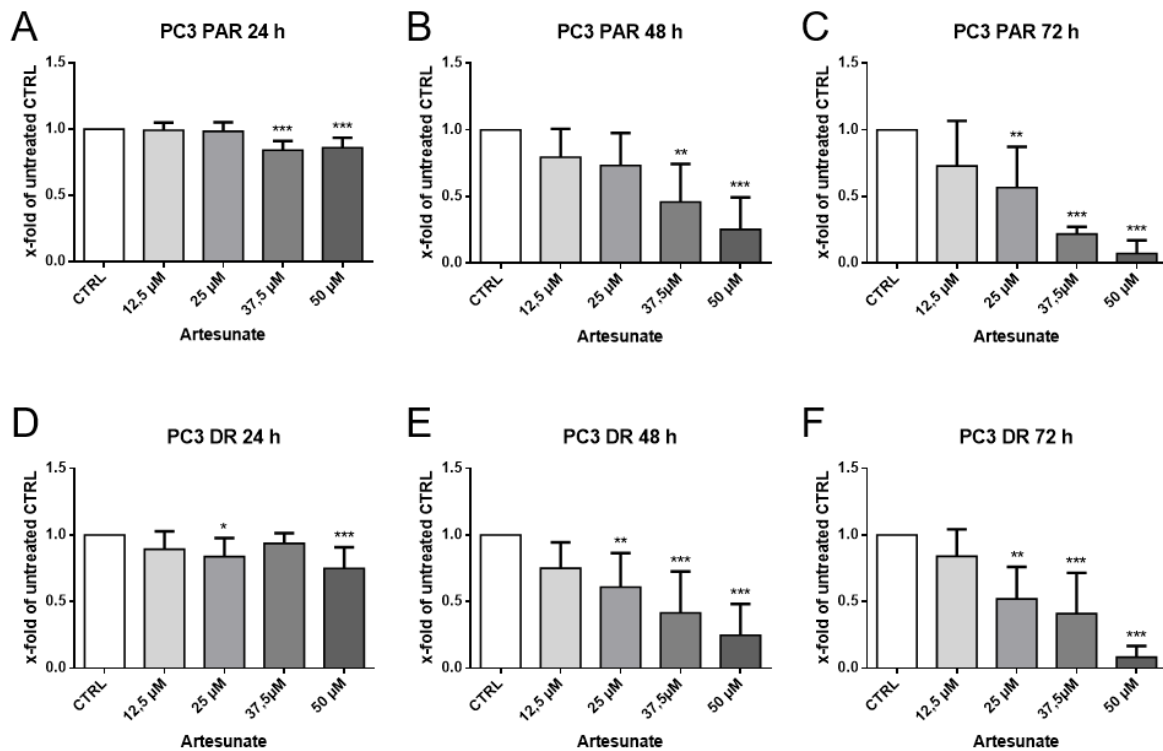
## 5.2 Analyse der Proliferation

Auf Basis der MTT-Daten wurde im Weiteren die Proliferation mit den ART-Konzentrationen 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 37,5  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  näher untersucht.

Vergleichbar zum Tumorzellwachstum zeigte sich auch bei der Proliferation eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion in allen untersuchten PCa-Zelllinien.

In den parentalen PC3-Zellen induzierte zu allen Zeitpunkten eine ART-Behandlung mit 37,5  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$ , bei 72 h zusätzlich mit 25  $\mu\text{M}$ , eine signifikante Inhibition der Proliferation (Abb. 4A-C).

In den DX-resistenten PC3-Zellen sah es vergleichbar aus (Abb. 4D-F). Nach 24 h waren die Effekte noch moderat, wenn auch partiell signifikant, insbesondere nach Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  ART (Abb. 4D). Nach 48 h und 72 h ART-Behandlung nahm die Proliferationshemmung weiter signifikant zu und war bereits ab 25  $\mu\text{M}$  hoch signifikant (Abb. 4E+F).

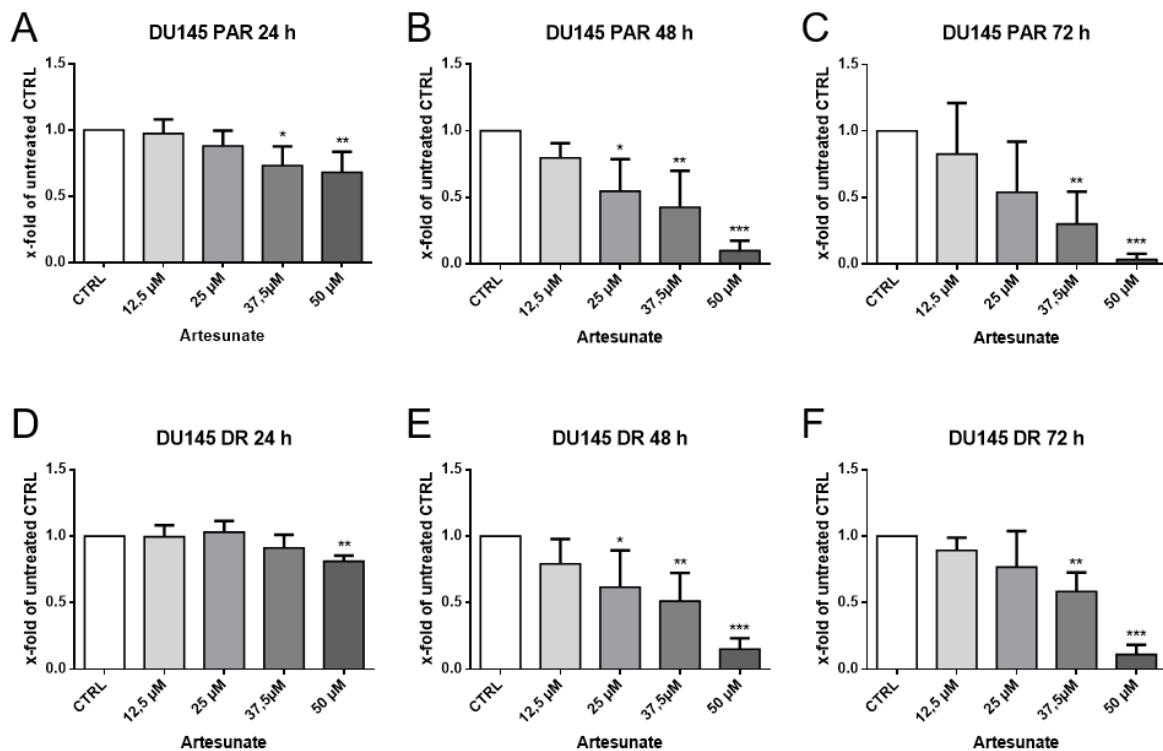


**Abbildung 4: Proliferation der parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen.**

Die Proliferation der parentalen (PAR) und DX-resistenten (DR) PC3-Zellen als x-fache der unbehandelten Kontrolle nach Behandlung mit ART in aufsteigenden Konzentrationen [0, 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 37,5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ] über 24 h (A+D), 48 h (B+E) und 72 h (C+F). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrollen (auf 1 gesetzt). Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $n = 4$ .

In den parentalen DU145-Zellen löste die Behandlung mit 37,5  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  ART zu allen Zeitpunkten eine signifikante Reduktion der Proliferation aus (Abb. 5A-C). Zum Zeitpunkt 48 h konnte zudem eine Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  ART eine signifikante Inhibition hervorrufen (Abb. 5B).

In den DX-resistenten DU145-Zellen zeigte sich zu allen Zeitpunkten nach der Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  ART eine signifikante Proliferationshemmung (Abb. 5D), welche nach 48 h und 72 h ART-Exposition zusätzlich bei 37,5  $\mu\text{M}$ , nach 48 h darüber hinaus bei 25  $\mu\text{M}$  ART (Abb. 5E-F) messbar war.

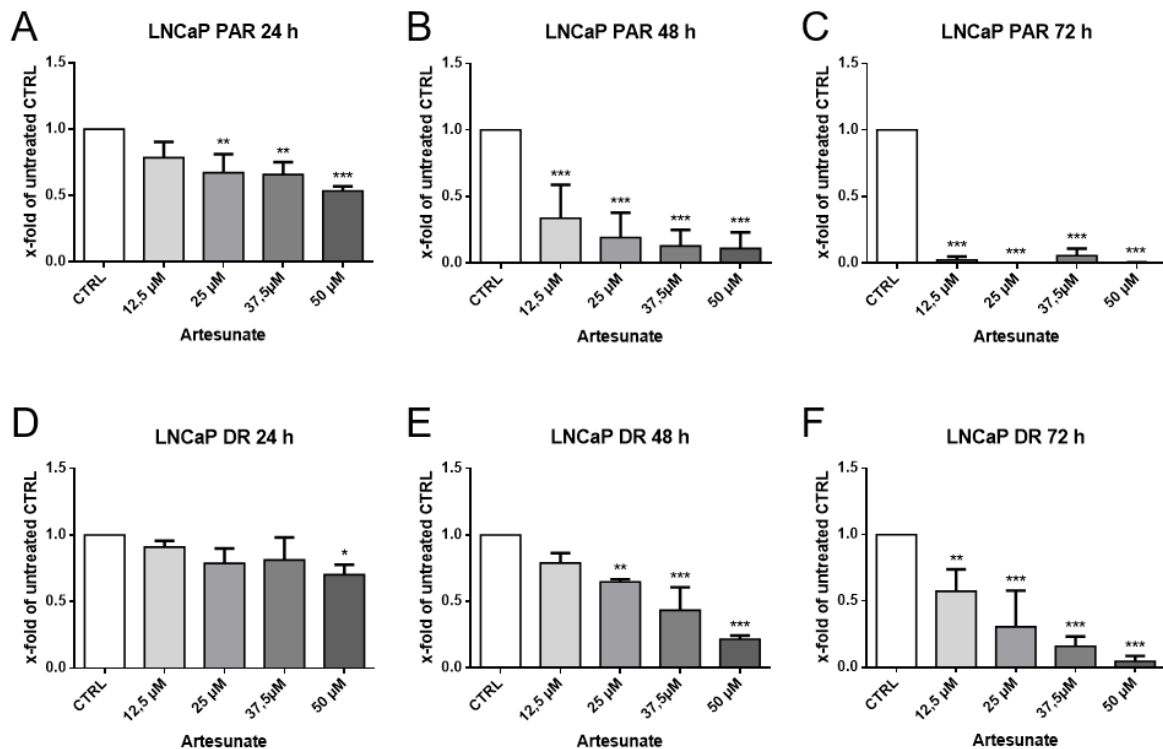


#### Abbildung 5: Proliferation der parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen.

Die Proliferation der parentalen (PAR) und DX-resistenten (DR) DU145-Zellen als x-fache der unbehandelten Kontrolle nach Behandlung mit ART in aufsteigenden Konzentrationen [0, 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 37,5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ] über 24 h (A+D), 48 h (B+E) und 72 h (C+F). Unbehandelte Zellen dienen als Kontrollen (auf 1 gesetzt). Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $n = 4$ .

In den parental LNCaP-Zellen konnten nach 24 h Behandlung mit ART bereits ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  ART eine signifikante Proliferationsinhibition, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, detektiert werden (Abb. 6A). Dieser Effekt nahm mit der Zeit weiter zu (Abb. 6A-C). Nach 72 h ART-Gabe war die Proliferation mit allen ART-Konzentrationen signifikant gehemmt und die Zellen nahezu vollständig reduziert (Abb. 6C).

Auch die DX-resistenten LNCaP-Zellen sprachen zeit- und dosisabhängig auf ART an (Abb. 6D-F). Die DX-resistenten LNCaP-Zellen zeigten nach 24 h ART-Exposition zunächst bei 50  $\mu\text{M}$  ART eine signifikante Reduktion der Proliferation (Abb. 6D). Nach 48 h sprachen die Zellen bereits signifikant ab 25  $\mu\text{M}$  ART (Abb. 6E) und nach 72 h ab 12,5  $\mu\text{M}$  ART an (Abb. 6F).



**Abbildung 6: Proliferation der parental und DX-resistenten LNCaP-Zellen.**

Die Proliferation der parental (PAR) und DX-resistenten LNCaP-Zellen als x-fache der unbehandelten Kontrolle nach Behandlung mit ART in aufsteigenden Konzentrationen [0, 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 37,5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ] über 24 h (A+D), 48 h (B+E) und 72 h (C+F). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen (auf 1 gesetzt). Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $n = 3$ .

Zusammenfassend konnte bei allen parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Proliferation beobachtet werden. In der höchsten ART-Konzentration (hier 50  $\mu$ M) kam nach 72 h bei allen Zelllinien die Proliferation nahezu und bei den parentalen LNCaP-Zellen vollständig zum Erliegen (Abb. 4, 5, 6; jeweils C + F).



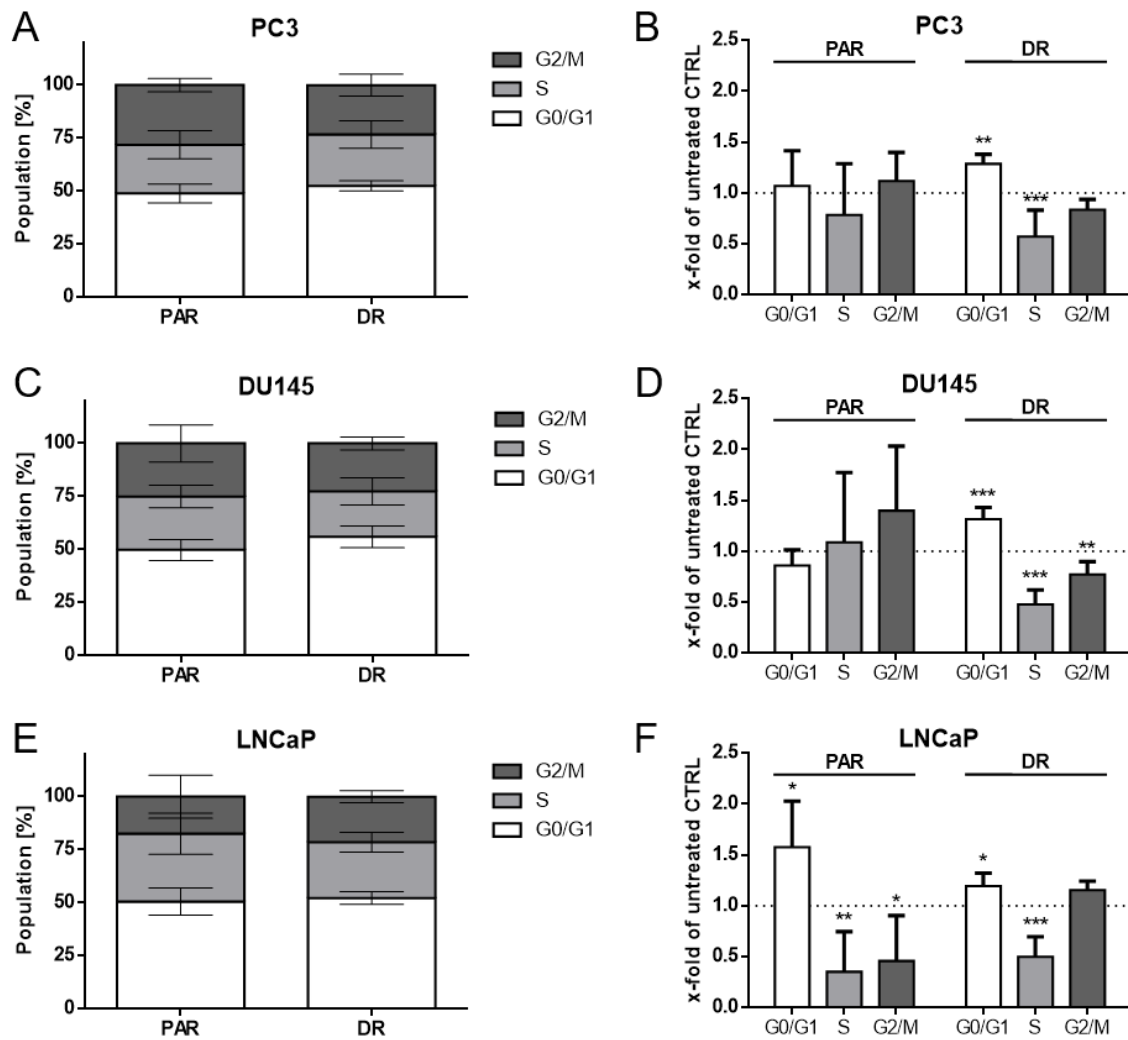
### **5.3 Analyse des Zellzyklus**

Vertiefende Analysen sollten zeigen, ob der wachstumshemmende Effekt von ART mit Verschiebungen des Anteils der Zellen in den Zellzyklusphasen einhergeht.

Aufgrund der vorangegangenen Daten aus dem Wachstum und der Proliferation wurden die PCa-Zellen im Weiteren mit 37,5  $\mu$ M ART behandelt.

Basal befanden sich alle PCa-Zelllinien zu ca. 50 % in der G0/G1-Phase (Abb. 7).

In den parentalen PC3-Zellen konnte ART keine signifikante Veränderung der Zellzyklusphasen hervorrufen (Abb. 7A+B). In den DX-resistenten PC3-Zellen hingegen resultiert die ART-Gabe in einem Arrest in der G0/G1-Phase bei gleichzeitiger signifikanter Reduktion des Anteils der Zellen in der S-Phase (Abb. 7A+B). Auch in den parentalen DU145-Zellen wurde durch die ART-Behandlung keine signifikante Veränderung der Zellzyklusphasen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen (Abb. 7C+D). Die DX-resistenten Subzelllinie der DU145-Zellen sprach auf die Behandlung mit ART hingegen mit einem signifikanten G0/G1-Phase-Arrest und einer signifikanten Reduktion der S- und G2/M-Phase-Zellen an (Abb. 7C+D). Die LNCaP-Zellen zeigten nach ART-Gabe sowohl in den DX-resistenten Zellen als auch in den parentalen Zellen einen signifikanten Arrest in der G0/G1-Phase (Abb. 7E+F). Dieser war mit einer signifikanten Reduktion der Zellen in der S-Phase und in den parentalen Zellen zusätzlich in der G2/M-Phase assoziiert (Abb. 7E+F).



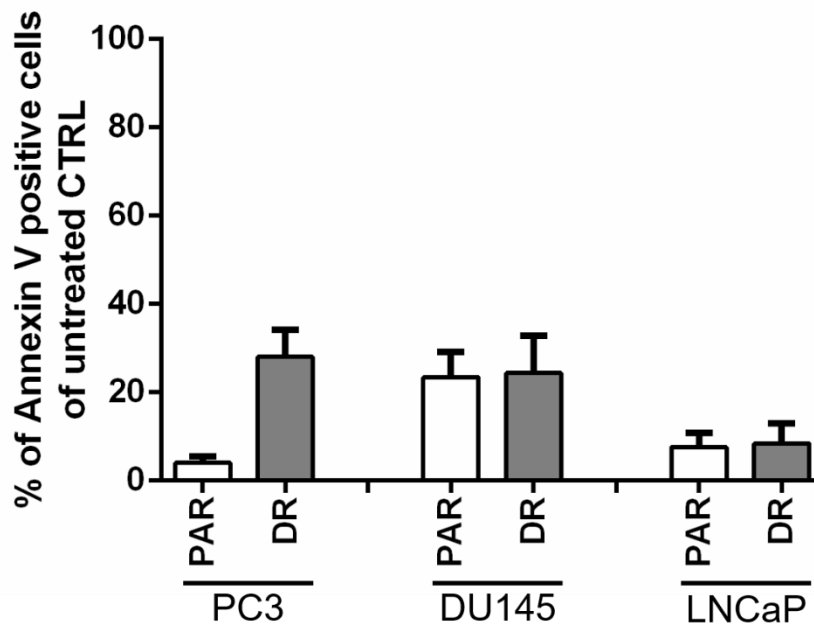
**Abbildung 7: Verteilung der PCa-Zellen in den Zellzyklusphasen nach Behandlung mit ART.**

Prozentualer Anteil der parentalen (PAR) PC3- (A), DU145- (C) und LNCaP-Zellen (E) sowie der DX-resistenten (DR) PC3 (B), DU145 (D) und LNCaP (F) in den jeweiligen Zellzyklusphasen nach 48 h Behandlung mit 37,5  $\mu$ M ART. Durchflusszytometrisch wurden jeweils 10.000 Ereignisse pro Probe gemessen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen (auf 1 gesetzt). Die Verschiebungen in den Zellzyklusphasen der ART-behandelten PCa-Zellen wurden als x-faches der unbehandelten Zellen angegeben. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . (A)  $n = 4$ ; (B-F)  $n = 5$ .

#### 5.4 Analyse der Apoptose

Auch apoptotische Ereignisse können in die detektierte Wachstumsinhibition involviert sein. Daher wurden auch die Apoptose nach Behandlung mit 37,5  $\mu$ M ART über 48 h evaluiert.

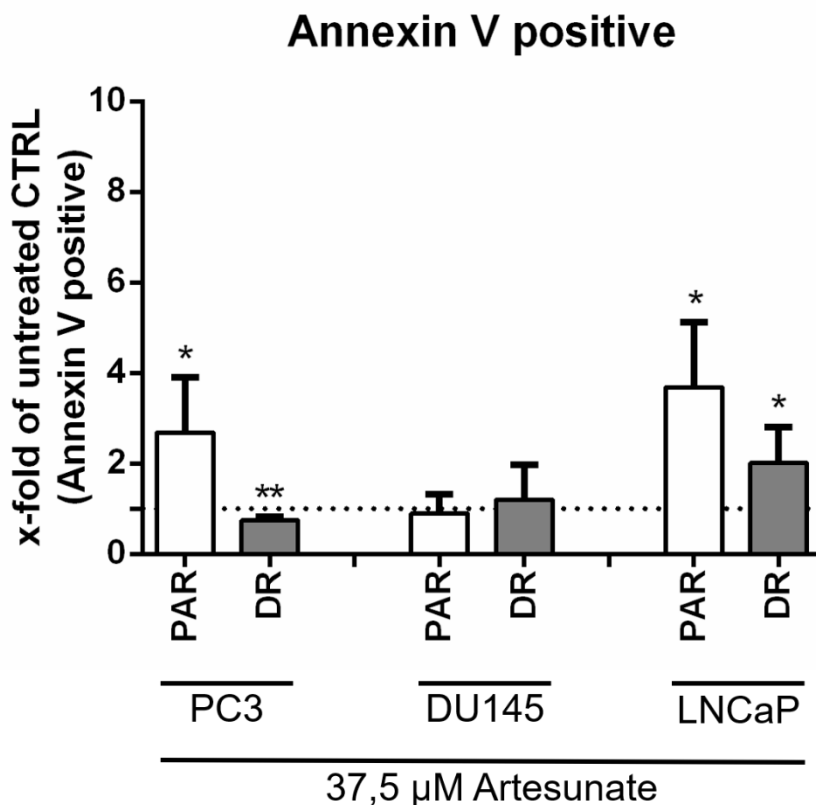
Die basale Apoptose war bei den DX-resistenten PC3-Zellen sowie den parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen etwas stärker ausgeprägt als bei den übrigen Zelllinien (Abb. 8). Insgesamt war die basale Apoptoserate aber gering.



**Abbildung 8: Basale Apoptoserate der parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen.**

Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen (Annexin V FITC positiv) der unbehandelten Kontrollen nach 48 h in den parentalen (PAR) und DX-resistenten (DR) PC3, DU145 und LNCaP. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD). n = 4.

ART resultiert in einer signifikanten Zunahme der Apoptose in parentalen PC3-Zellen (Abb. 9, linksseitig). In den DX-resistenten PC3-Zellen zeigte sich hingegen eine moderate, wenn auch signifikante, Verringerung der apoptotischen Zellen. Die parentalen und DX-resistenten Zelllinien DU145 zeigten hingegen keine signifikanten Unterschiede nach ART-Behandlung (Abb. 9, mittig). Die stärkste Zunahme an apoptotischen Zellen nach ART-Exposition war bei parentalen LNCaP-Zellen zu beobachten, deren Zahl sich etwa vervierfachte (Abb. 9, rechtsseitig). In DX-resistenten LNCaP-Zellen kam es nach ART-Gabe ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der apoptotischen Zellen, hier um das Zweifache.



**Abbildung 9: Apoptose in den parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen nach Exposition mit ART.**

Apoptotische Ereignisse (Annexin V FITC positive Zellen) als x-faches der unbehandelten Kontrolle nach 48 h ART-Behandlung [37,5 µM] in parentalen (PAR) und DX-resistenten (DR) PC3, DU145 und LNCaP. Die ART unbehandelten PCa Zellen dienen als Kontrolle (auf 1 gesetzt; gestrichelte Linie). Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung (SD).

Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $n = 4$ .

## **6. Diskussion**

Trotz des medizinischen Fortschrittes bleibt das PCa im metastasierten Stadium unheilbar. Dementsprechend groß ist der Wunsch nach innovativen Therapiemöglichkeiten, die zunehmend im Bereich der komplementären und alternativen Medizin (CAM) gesucht werden (153-155). Gegenwärtig ist unser Wissen über die antitumorale Wirkung der CAM eingeschränkt (13). Die vorliegende Arbeit untersuchte daher die antiproliferative Wirkung von ART in parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen. Um die Heterogenität des PCa abzubilden, wurden für die Versuchsreihen die PCa-Zelllinien PC3, DU145 und LNCaP ausgewählt.

### **ART inhibiert signifikant das Tumorzellwachstum parentaler und Docetaxel-resistenter PCa-Zellen**

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine zeit- und konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition durch ART sowohl in parentalen als auch DX-resistenten PCa-Zellen nachgewiesen werden.

Zhou et al. hatten in parentalen DU145- und LNCaP-Zellen nach 24 h ART-Behandlung ebenfalls eine Wachstumshemmung zeigen können (119). Aufgrund der kurzen Inkubationszeit und der Entfaltung ARTs antitumorale Effekte nach längerer Zeit waren in der Arbeit von Zhou et al. die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit. So konnte zwar auch eine konzentrationsabhängige [25-200 µM] Wachstumsinhibition nachgewiesen werden, die IC<sub>50</sub>-Werte nach 24 h lagen hier aber bei 85,59 µM für DU145 und bei 81,32 µM für LNCaP statt wie in der aktuellen Arbeit bei 3,08 µM für DU145 bzw. 11,91 µM für LNCaP nach 72 h. In einer weiteren Studie an parentalen DU145-Zellen konnte ebenfalls die wachstumshemmende Wirkung von ART gezeigt werden (156). Auch Wang et al. wiesen eine konzentrationsabhängige Reduktion des Tumorzellwachstums bei 22rv1-Zellen nach 48 h Behandlung mit ART [50 & 200 µM] nach (120).

Interessanterweise sprechen in unseren Untersuchungen die parentalen und DX-resistenten Zellen je nach Zelllinie unterschiedlich stark an. Während DX-resistente PC3-Zellen sensitiver als die parentalen Zellen auf die Behandlung mit ART reagierten, verhielt es sich bei den LNCaP und DU145 umgekehrt. Denkbar, dass es in den DX-resistenten PC3-Zellen zu einer Resensibilisierung gegenüber DX kommt, welches den zusätzlichen Effekt erklären würde. Dies ist zurzeit jedoch rein spekulativ und muss weiter untersucht werden.

Nicht nur im PCa konnte eine Wachstumsinhibition durch die Behandlung mit ART hervorgerufen werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte das Potential von ART bei zwei weiteren Therapie-resistenten urologischen Tumorentitäten, dem Nierenzell- und Harnblasenkarzinom, aufzeigen. Sowohl in parentalen als auch Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinomzelllinien kam es zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen [1-100  $\mu\text{M}$  ART] Reduktion des Tumorzellwachstums (16). Beim Nierenzellkarzinom reichte dabei bereits eine niedrige ART-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  aus, um erste signifikante Effekte zu induzieren. In drei untersuchten Nierenzellkarzinom-Zelllinien konnte ein Arrest des Tumorzellwachstums evoziert werden, wobei nur in einer der untersuchten Zelllinie die Zellzahl durch die Behandlung mit der maximalen Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ART unter die ursprünglich ausgesäte Zellzahl reduziert werden konnte. Anders als in dieser Arbeit, in der eine entsprechende Reduktion in allen untersuchten PCa-Zelllinien beobachtet werden konnte.

Auch im parentalen und Cisplatin-resistenten Harnblasenkarzinom konnte eine zeit- und konzentrationsabhängige [1-100  $\mu\text{M}$ ] Wachstumsinhibition durch ART beobachtet werden (17). Verglichen mit dem PCa reichten hier wieder vergleichsweise niedrigere ART-Konzentrationen [0,34 bis 8,72  $\mu\text{M}$ ], um einen halbmaximalen Hemmeffekt nach 72 h hervorzurufen. Beim Harnblasenkarzinom war es, wie beim PCa, zelllinienabhängig, ob die parentalen oder Cisplatin-resistenten Zellen sensitiver auf ART reagierten.

Auch bei zahlreichen nicht-urologischen Tumoren konnte ein wachstumshemmender Effekt durch ART nachgewiesen werden. Im Ovarialkarzinom wurde in der Zellkultur eine zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl beobachtet, mit ersten signifikanten Änderungen bereits nach 1  $\mu\text{M}$  ART für den Großteil der untersuchten Zellen (114). Der IC50 schwankte je nach Zelllinie zwischen 0,51 und 31,89  $\mu\text{M}$ . Der Effekt konnte in Experimenten mit Sphäroiden und aus Aszites von Patienten gewonnenen Zellkulturen bestätigt werden.

Ebenfalls niedrige Konzentrationen an ART [1-8  $\mu\text{M}$ ] waren für eine konzentrations- und zeitabhängig [24 h, 48 h, 72 h] signifikante Reduktion des Zellwachstums beim kolorektalen Karzinom ausreichend (157).

Bei Lungenkarzinomzelllinien konnte bereits nach 24 h [0,1-800  $\mu\text{g/ml}$  ART] eine Abnahme des Zellwachstums beobachtet werden (IC50:  $52.87 \pm 2.36$   $\mu\text{g/ml}$  ART) (158).

Wesentlich höhere Konzentrationen an ART als bei unseren Versuchen wurden hingegen beim Pankreaskarzinom benötigt, um antiproliferative Effekte nach 48 h zu

beobachten (IC<sub>50</sub>: 26,76 µM, 142,8 µM, 279,3 µM ART) (112). Bei normalen hepatischen Zellen, die als Kontrolle dienten, war der IC<sub>50</sub> mit 643,3 µM ART noch deutlich höher.

Bei der Behandlung von drei Magenkarzinomzelllinien mit 16,25-260 µmol/L ART über 48 h zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl (IC<sub>50</sub>: 78,2 µmol/L, 72,3 µmol/L, 102,3 µmol/L ART) (159). Normale Zellen des Epithels der Magenschleimhaut reagierten im Gegensatz dazu deutlich schwächer auf ART (IC<sub>50</sub>: 375,0 µmol/L).

Nicht nur bei soliden Tumoren, sondern auch beim B-Zell-Lymphom zeigte ART eine konzentrationsabhängige wachstumshemmende Wirkung (160). In 11 von 18 beobachteten Zelllinien war mit einem IC<sub>50</sub> unter 1 µM nach 72 h eine hohe Sensitivität nachweisbar. Auf das Zellwachstum normaler B-Zellen hatte ART hingegen kaum einen Einfluss. Was darauf schließen lässt, dass auch hier ART selektiv die Tumorzellen angreift.

In weiterführenden Arbeiten (nicht Teil dieser Dissertation) konnte unsere Arbeitsgruppe ferner zeigen, dass ART nur bei den untersuchten Krebszellen, nicht aber bei normalen Zellen (hier: tubuläre epitheliale Zellen der Niere) zu einer Abnahme des Zellwachstums führte (19).

Dies unterstützt die bereits genannten Befunde bei anderen Zelllinien, die ein stärkeres Ansprechen von Krebszellen gegenüber normalen Zellen ergaben.

Zusammenfassend fügt sich die zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion des Zellwachstums bei parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen gut in die bisherigen Erkenntnisse bei anderen Tumorentitäten ein.

### **Die Proliferation parentaler und Docetaxel-resistenter PCa-Zellen wird durch ART signifikant gehemmt**

Neben der Wachstumsinhibition induzierte ART zeit- und konzentrationsabhängig eine signifikante Reduktion der Proliferation in allen parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinien. Besonders stark sprachen dabei die LNCaP auf die Behandlung mit ART an.

In guter Übereinstimmung konnte auch im Nierenzellkarzinom eine konzentrationsabhängige [10-50 µM ART] antiproliferative Wirkung von ART nach 72 h in parentalen und Sunitinib-resistenten Zellen beobachtet werden (16). Für eine signifikante Reduktion genügten dabei für zwei der vier untersuchten Zelllinien schon

10  $\mu\text{M}$  ART. Die gleiche Konzentration war beim Plattenepithelkarzinom der Zunge für erste signifikante Auswirkungen verantwortlich (161). Erst bei 40  $\mu\text{M}$  ART nahm hingegen die Proliferation in nichtkanzerösen Plattenepithelien der Zunge signifikant ab, so dass auch hier wieder von einer gewissen Selektivität von ART gegenüber Tumorzellen ausgegangen werden kann.

2,5  $\mu\text{M}$  ART über 48 h waren in der Regel zudem ausreichend für eine signifikante Abnahme der Proliferation bei Cisplatin-sensitiven und -resistenten Harnblasenkarzinomzellen (17). Bei drei der vier untersuchten Zelllinien reagierten die Cisplatin-resistenten dabei sogar stärker als die parentalen Zellen, was wieder für eine Resensibilisierung der Zellen sprechen könnte.

*In vivo* Daten zeigen ebenfalls die antiproliferative Wirkung von ART auf Krebszellen. Meist handelt es sich hierbei um Xenografts im Maus- oder Rattenmodell. Auf diese Weise konnten antiproliferative Effekte unter anderem im hepatozellulären Karzinom (162), Ovarialkarzinom (114), kolorektalen Karzinom (163), Pankreaskarzinom (112), nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (164) und Ösophaguskarzinom (165) nachgewiesen werden.

Im syngenem Rattenmodell wurde durch die Gabe von N-Nitrosodiethylamin ein hepatozelluläres Karzinom ausgelöst (162). Das relative Lebervolumen nahm dabei zu und ein vermehrtes Auftreten von Tumorknoten war zu beobachten. Zudem kam es zu einem Anstieg der Leberenzyme und von Alpha-Fetoprotein, einem Tumormarker. Durch die orale Gabe von ART konnten diese Parameter deutlich gesenkt werden, ohne dass eine Kachexie, erhöhte Lebertoxizität oder Mortalität auftrat. Die antiproliferative Wirkung von ART konnte nicht nur anhand einer signifikanten Abnahme des relativen Lebervolumens, sondern durch die Histopathologie nach Sektion der Tiere und an der Reduktion verschiedener immunhistochemischer Marker, die mit einer erhöhten Proliferation bzw. Karzinogenese assoziiert sind, nachgewiesen werden.

Beim kolorektalen Karzinom nahm das relative Tumolvolumen im Mausmodell durch die intravenöse Behandlung mit 300 mg/kg ART (siebenmal, alle drei Tage) oder 100 mg/kg ART (20-mal, täglich) signifikant um 50,5 % bzw. 35,4 % ab, ohne einen schweren Gewichtsverlust oder gar Tod der Tiere auszulösen (163).

In Xenografts mit Pankreaskarzinomzellen in Mäusen konnte eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums durch 25, 50 und 100 mg/kg ART um 33, 44 und 65 % erreicht werden (112). Damit war ART in der höchsten Konzentration mit der Wirkung von 100 mg/kg Gemcitabin vergleichbar, welches eine Reduktion um 70 %



erreichte. Allerdings traten bei Gemcitabin mit einem Gewichtsverlust um 25 %, einem schwachen und inaktivem Verhalten der Mäuse sowie dem Tod von zwei Mäusen starke Nebenwirkungen auf. ART hingegen wurde gut vertragen und das Gewicht der ART-behandelten Mäuse war mit dem der unbehandelten Kontrollgruppe vergleichbar. Im Magenkarzinom konnte im Mausmodell eine ähnlich starke antitumorale Wirkung durch ART wie durch Docetaxel erzielt werden, ohne dass es zu signifikanten Nebenwirkungen kam (159).

Auch für zuvor unbehandelte urologische Tumoren (Harnblasenkarzinom, Nierenzellkarzinom) liegen Daten zur Proliferationsinhibition in Tierversuchen vor (113, 166) und Wang et al. konnten eine dosisabhängige Abnahme des Tumorwachstums durch ART in Mäusen nachweisen, denen zuvor subkutan parentale PCa-Zellen injiziert wurden (120).

Auch zur Anwendung von *Artemisia annua* und ART in einem Patienten mit PCa wurden im Rahmen einer Fallstudie bereits erste Ergebnisse veröffentlicht (167). Ein austherapierter 80-jähriger Mann mit weit fortgeschrittenem PCa, welches bereits ubiquitäre ossäre Metastasen verursachte, wurde zunächst über zwei Wochen mit Bicalutamid behandelt. Anschließend wurden über mehrere Monate *Artemisia annua*-Kapseln (5 x 50 mg/d) verabreicht. Hierunter konnte eine Reduktion des PSA von initial > 800 µg/L auf 0,98 µg/L sowie in der Bildgebung eine 50-prozentige Tumorregression des PCa beobachtet werden. Nach sieben Monaten kam es allerdings zu einem Anstieg des PSA und der alkalischen Phosphatase, was auf einen Progress und eine zunehmende ossäre Metastasierung hinwies. Auch eine Umstellung auf eine Injektion mit Artesunat (2 x 150 mg 2 x wöchentlich) konnte das weitere Fortschreiten des PCa nicht mehr aufhalten. Außer einem vorübergehenden Rückgang der Anzahl der Erythrozyten und der Hämoglobinkonzentration wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Jedoch kam es unter der Behandlung mit *Artemisia annua* zu einer Zunahme an Lebensqualität mit einem aktiven, schmerzfreien Patienten in guter Gemütslage.

Es bedarf neben dieser Fallstudie jedoch weiteren kontrollierten randomisierten Studien mit einer deutlich größeren Anzahl an Probanden, um die Effekte von ART im parentalen und DX-resistenten PCa zu verifizieren.

**ART resultiert in einem Zellzyklus-Arrest der PCa-Zellen in der G0/G1-Phase**

Insbesondere in den Docetaxel-resistenten PCa-Zellen aber auch in parentalen LNCaP induzierte ART einen signifikanten Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase bei gleichzeitiger signifikanter Reduktion der S-Phase (alle) und G2/M-Phase (DU145 DR). In den parentalen PC3 und DU145 waren hingegen keine signifikanten Veränderungen des Zellzyklus durch ART zu beobachten

Auch in Zellkulturen des Ösophaguskarzinom (165), Retinoblastom (168) und multiplem Myelom (169) war nach ART-Exposition ein G0/G1-Phase-Arrest zu beobachten. Dagegen ging die ART-Behandlung beim Mammakarzinom (170, 171), epitheliale Ovarialtumor (172) und Hypophysenadenom (173) mit einem G2/M-Phase-Arrest einher.

Besonders interessant sind die Veränderungen im Zellzyklus beim Mammakarzinom. Hier konnten durch den Einsatz unterschiedlicher Artemisininderivate unterschiedliche Ergebnisse bei der gleichen Zelllinie erzielt werden. Die Behandlung der Zelllinie MCF7 mit 100-300  $\mu\text{M}$  Artemisinin (174) über 48 h führte zu einem G0/G1-Phase-Arrest, wohingegen 50-200  $\mu\text{g/ml}$  ART (170) über 24 h oder 25-75  $\mu\text{g/ml}$  ART (171) über 48 h in einem G2/M-Phase-Arrest resultierten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Einfluss auf den Zellzyklus von der Konzentration und der Inkubationszeit des aktiven Metaboliten abhängt. Eine hohe Konzentration löst bei den Zellen den Zelltod aus, was sich im Vorfeld durch einen G2/M-Phase-Arrest ankündigt. Im Einklang mit der vorherigen Studie lag in *in vitro* Untersuchungen des Nierenzellkarzinoms nach der Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  ART über 48 h ein Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase vor (16), mit 50  $\mu\text{M}$  ART wurde dagegen ein G2/M-Phase-Arrest induziert (113).

Chen et al. konnten im Mammakarzinom nachweisen, dass nach Behandlung mit ART der G2/M-Phase-Arrest im Rahmen einer verstärkten Autophagie auftrat (170).

Auch Greenshields et al. konnten *in vitro* beim Ovarialkarzinom einen konzentrationsabhängigen Effekt auf den Zellzyklus zeigen (114). Eine Behandlung über 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  ART führte zu einem G0/G1-Phase-Arrest, mit 50  $\mu\text{M}$  zu einem G2/M-Phase-Arrest. Darüber hinaus konnten sie nachweisen, dass ROS bei den Veränderungen des Zellzyklus durch ART eine entscheidende Rolle spielen. Höhere Konzentrationen von ART führten zu einer intrazellulären Akkumulation von ROS, wurde jedoch vorher das Antioxidans Glutathion appliziert, kam es kaum zur Produktion von ROS. War ein G2/M-Phase-Arrest die Folge von 50  $\mu\text{M}$  ART über 48 h,

kam es nach vorheriger Applikation von Glutathion und gleicher Konzentration an ART zu einem G0/G1-Phase-Arrest. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein G2/M-Phase-Arrest ROS-vermittelt, ein G0/G1-Phase-Arrest dagegen ROS-unabhängig durch ART zustande kommt. Zhao et al. beobachteten in parentalen und Cisplatin-resistenten Harnblasenkarzinomzelllinien eine Akkumulation von gespaltenem PARP-1 durch Anwendung von ART, was einen Hinweis auf vermehrte DNA-Schäden darstellt (17). In derselben Arbeit konnte gezeigt werden, dass 2,5 µM ART einen G0/G1-Phase-Arrest unter Abnahme der S-Phase-Zellen auslösten. 10 µM ART führten hingegen zu weniger starken Auswirkungen auf den Zellzyklus, jedoch zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose. Inwiefern ROS bei den PCa-Zellen einen Einfluss auf die Zellzyklusphasen nach ART-Behandlung hat, war nicht Gegenstand der hiesigen Arbeit und ist daher bis dato rein spekulativ. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe an den PCa-Zellen konnten jedoch zeigen, dass dies offensichtlich nicht der alleinige Mechanismus von ART ist (19).

Um die Effekte von ART auf den Zellzyklus zu bestätigen und die verantwortlichen Proteine zu identifizieren, untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Zellzyklus-regulierenden Proteine mittels Western Blot Analyse (19).

Die hierbei beobachtete Abnahme an CDK1, CDK2, Cyclin A und Cyclin B lässt sich gut mit dem in dieser Arbeit detektierten G0/G1-Phase-Arrest in Einklang bringen. CDK2 und Cyclin A kontrollieren die Replikation der DNA in der S-Phase (175), wohingegen CDK1 und Cyclin B für den G2/M-Phase-Progress und die Zellteilung verantwortlich sind (176).

Darüber hinaus war die Expression von Cyclin D1 durch ART vermindert, welches zusammen mit CDK4 und CDK6 an dem Progress von der G0- zur G1-Phase involviert ist (177).

Einen G0/G1-Phase-Arrest durch Artemisinin (ARS), der Ausgangssubstanz von ART, bei parentalen PC3, DU145 und besonders ausgeprägt bei parentalen LNCaP-Zellen konnten Willoughby et al. nachweisen und führten dies auf eine Herunterregulierung der Transkription und Expression von CDK2 und CDK4 zurück. Einen Effekt auf Cyclin D1 durch ARS konnte im Gegensatz zu den Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit ART nicht gezeigt werden (178).

LNCaP verfügen im Gegensatz zu PC3 und DU145 über einen funktionierenden Androgenrezeptor (AR). Wang et al. konnten nachweisen, dass ART über eine

Hemmung des AR antiproliferativ auf PCa-Zellen wirkt (120). Ein intakter AR spielt bei LNCaP zudem für eine Progression von der G1- in die S-Phase eine Rolle (179). Demnach könnte der ausgeprägte G0/G1-Phase-Arrest v.a. bei parentalen Zellen der Zelllinie LNCaP auch auf eine eingeschränkte Funktion des AR durch ART zurückzuführen sein.

### **Zelltypspezifisch induziert ART Apoptose in den parentalen und Docetaxel-resistenten PCa-Zellen**

Die Exposition mit ART resultierte zudem in einer zelltypabhängigen Zunahme der Apoptose. Bei parentalen PC3-Zellen und DX-resistenten LNCaP-Zellen kam es etwa zu einer Verdoppelung der apoptotischen Zellen, bei parentalen LNCaP sogar zu einer Vervierfachung gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei parentalen und DX-resistenten Zellen der Zelllinie DU145 waren hingegen keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Auch andere Untersucher konnten Veränderungen in einer ähnlichen Größenordnung nachweisen und zeigen, dass ART nicht nur einen Stillstand des Zellzyklus, sondern auch die Apoptose hervorrufen kann. Dies wurde erstmals 1996 durch Efferth et al. an Leukämiezellen nachgewiesen (180) und konnte in weiteren Arbeiten auch bei anderen Entitäten bestätigt werden (14). Die Apoptose durch ART konnte so etwa im Adenokarzinom der Lunge (164, 181), im Ösophaguskarzinom (165) und Zervixkarzinom (182) hervorgerufen werden. ARSS induzierten auch beim parentalen PCa die Apoptose (183-185). Die Behandlung mit DHA, ebenfalls ein Derivat von ARS, konnte bei den parentalen PC3, DU145 und LNCaP nahezu in einer Vervierfachung der Apoptose resultieren (183).

In Bezug auf die Apoptose könnte der durch ART induzierte oxidative Stress tumorentitätsspezifisch einen Wirkmechanismus darstellen. Dies konnte bereits für die T-Zell-Leukämie und das B-Zell-Lymphom gezeigt werden (186, 187).

Ein Grund dafür, dass LNCaP insgesamt am sensitivsten reagiert haben, könnte sein, dass diese im Gegensatz zu den PC-3 und DU-145 über einen funktionellen Androgenrezeptor (AR) verfügen und Androgen-sensitiv sind.

Dass Androgene und damit auch der AR eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des PCa spielen, konnte schon 1941 durch Huggins und Hodges nachgewiesen werden, auf deren Arbeit das Therapiekonzept der ADT basiert (188). Zudem konnte in einer Genomassoziationsstudie gezeigt werden, dass DNA-Sequenzen, die mit einem erhöhten PCa-Risiko verbunden sind, besonders viele AR- und AR-Coaktivator-

Bindungsstellen besitzen (189). Selbst beim früher als hormonrefraktär bezeichneten CRPC sind Androgene und der AR essenziell, was sich auch an den Entstehungsmechanismen der Resistenz ablesen lässt (52-57).

Bezogen auf die Proliferation konnten Wang et al. nachweisen, dass ART über eine Hemmung der Expression des AR dosisabhängig antiproliferativ auf PCa-Zellen wirkt (120). Darüber hinaus konnte in derselben Arbeit eine Zunahme in der Expression und katalytischen Aktivität der DNA-Methyltransferase 3b durch ART ermittelt werden, was zu einer verstärkten Apoptose führte.

Steely et al. fanden in LNCaP als auch in mit einem exogenen Wild-Typ-AR transfizierten PC3-Zellen einen durch Proteasomen vermittelten Abbau von AR-Protein durch die Applikation von ARS, ohne dass es zu einer Veränderung der Transkription kam (190). Nunes et al. konnten zudem an LNCaP-Zellen zeigen, dass ART oder Bicalutamid allein oder in Kombination zu einer signifikanten Abnahme der Expression von PSA und des AR sowie zu einer Resensitivierung gegenüber der antiandrogenen Therapie im mCRPC führten (18). Die Kombinationsbehandlung mit ART und Bicalutamid zeigte dabei einen wesentlich größeren Effekt als die Behandlung mit den Einzelsubstanzen. Hier wurde auch eine starke synergistische Interaktion der Kombinationsbehandlung nachgewiesen.

Ein Grund, dass in der vorliegenden Arbeit eher schwache apoptotische Effekte detektiert wurden, könnte an der Tatsache liegen, dass ART bzw. ARSS je nach Zelllinie verschiedene Formen des regulierten Zelltodes induzieren können, die nicht-apoptotisch sind und demnach nicht mit unserem Assay erkannt werden konnten. So löste Artemether in Magenkarzinomzellen die Nekrose aus (191), wohingegen ART in Schwannomzellen die Nekroptose, einen weiteren regulierten Zelltod, einleitete (192). DHA induzierte in Leukämiezellen und Pankreaskarzinomzellen Autophagie (193, 194). Dasselbe konnte nach ART-Exposition in Mamma- und Harnblasenkarzinomzellen beobachtet werden (17, 170, 195). In Pankreas- und Magenkrebszellen konnte ART die Onkosis auslösen (112, 159).

Tatsächlich haben weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen können (nicht Gegenstand dieser Arbeit), dass ART neben der Apoptose gerade in DU145-Zellen einen Eisen-abhängigen regulierten Zelltod, die Ferroptose, hervorruft (19). Die Ferroptose wurde erstmals 2012 beschrieben. Auch hier spielt die Eisen-abhängige Akkumulation von ROS eine zentrale Bedeutung (123, 124).

In Zellkultur konnte die Ferroptose durch ART z.B. beim Ovarialkarzinom (114), KRAS-mutierten Pankreaskarzinom (196) sowie zelltypspezifisch im Nierenzellkarzinom (16) nachgewiesen werden.

Die Ferroptose-Induktion ist offensichtlich dafür verantwortlich, dass in der vorliegenden Arbeit bei den parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen eine durch ART hervorgerufene Reduktion des Wachstums und der Proliferation nachgewiesen werden konnte, ohne dass es zu einer signifikanten Zunahme der Apoptose kam und in den parentalen DU145-Zellen auch zu keinem Zellzyklusarrest. Dies wurde durch unsere Arbeitsgruppe im Nachhinein zu der vorliegenden Arbeit verifiziert (19). Durch ART kam es ferner zu einem, für die Ferroptose charakteristischen, erhöhten Verbrauch von Glutathion durch verstärkte ROS-Produktion sowie einer verminderten Expression der Glutathionperoxidase 4. Als einzige der untersuchten Zelllinien besitzt DU145 eine Mutation im Onkogen KRAS, was zu einer Fusion mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym UBE2L3 führt (197). In Zellen, die eine Mutation im HRAS (G12V)-Gen trugen, wurde durch Erastin, welches spezifisch die Ferroptose einleitet, bevorzugt der Zelltod induziert (198). Somit könnte vermutlich auch die Fusion von mutiertem KRAS mit UBE2L3 in DU145-Zellen zu einer ART-vermittelten Ferroptose führen. Zur Verifizierung dieser These ist allerdings noch weitere Forschung nötig.

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung von ART ist es als Vorteil zu werten, dass ART unterschiedliche Formen des Zelltodes auslösen kann, da viele Krebszellen Resistenzmechanismen gegen die Apoptose entwickeln (199).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erstmals antiproliferative Effekte von ART in parentalen und DX-resistenten PCas *in vitro* gezeigt werden. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um zu evaluieren, ob und inwiefern ART auch unter physiologischen Bedingungen vergleichbare antitumorale Effekte zu induzieren vermag.

### **Ausblick**

ART hat zu einer signifikanten Hemmung des Wachstums und der Proliferation der ausgesuchten parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinien geführt. Diese waren zelltypspezifisch mit Veränderungen der Zellen in den Zellzyklusphasen und der Apoptose-Induktion assoziiert. Die beobachteten zelltypspezifischen Veränderungen

könnten ein Hinweis dafür sein, dass ART situationsbedingt auch auf sehr heterogene Tumoren, wie das PCa, zu wirken vermag.

Die gewonnenen *in vitro* Daten geben einen ersten Einblick, dass und auf welche Weise ART beim DX-resistenten PCa wirkt. Weiterführende *in vitro* und *in vivo* Studien müssen dies weiter verifizieren, die genauen Wirkmechanismen evaluieren und klären, ob ART auch unter physiologischen Bedingungen im Stande ist diese antitumoralen Effekte zu induzieren.

Erste unveröffentlichte weiterführende Analysen unserer Arbeitsgruppe konnten die Wirkung von ART auf weitere wichtige Mechanismen des Tumorprogresses (Invasion, Migration und Adhäsion) nachweisen. Daher wäre es interessant auch beim PCa weitere, für den Tumorprogress relevante, molekularbiologische Mechanismen vertiefend zu evaluieren.

ART ist insgesamt sehr vielversprechend, da es bereits eine gute Wirksamkeit und Verträglichkeit bei Patienten in der Malariatherapie zeigt (200, 201). Für die Anwendung in der Tumorbehandlung werden jedoch höhere Konzentrationen benötigt, um eine ausreichende Wirkung zu erzielen (166). Daher sind weitere Studien zur Verträglichkeit von ART in erhöhten Konzentrationen und zur Ermittlung der wirksamen Dosis *in vivo* unerlässlich. Zuo et al. wiesen *in vitro* eine ausgeprägte zytotoxische und apoptotische Wirkung von ART im Harnblasenkarzinom, bei gleichzeitig wesentlich schwächerer Zytotoxizität gegenüber normalen humanen Urothelzellen nach (166). Sowohl in Tierexperimenten an Hunden mit nicht resezierbaren Tumoren als auch in einer Phase-1-Studie an Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren konnte eine gute Verträglichkeit von ART nachgewiesen werden (202, 203).

Ein wichtiger Mechanismus, der die Effekte von ART vermittelt, ist die Bildung von ROS über die Spaltung der endogenen Peroxidgruppe (14). In diversen wissenschaftlichen Arbeiten an unterschiedlichen Zelllinien konnte eine Zunahme an ROS durch ARSS nachgewiesen werden. Eine weitere Zunahme durch Prooxidantien und Abnahme durch Antioxidantien bzw. Radikalfänger unterstützen diesen Zusammenhang.

Durch ROS werden alle in dieser Arbeit gemessenen Parameter beeinflusst. Sie wirken zum einen zytotoxisch und vermindern damit die Zellviabilität, zum anderen wird die DNA geschädigt, was weitreichende Auswirkungen auf die Proliferation hat (14). Zudem führen ROS zum Zellzyklusarrest und lösen verschiedene Formen des

Zelltodes aus. Damit ARSS ROS produzieren können, ist die Anwesenheit von Eisen nötig. Die Zugabe von Holotransferrin oder Eisensulfat verstärkte die Wirkung von DHA in Brustkrebszellen und im Fibrosarkom der Ratte (216, 217). In einem Panel aus vielen verschiedenen Krebszelllinien konnte bei einigen durch einen Eisen(II)-glycinsulfat-Komplex (ferro sanol®) die Zytotoxizität von ART gesteigert werden (14, 218). Durch den Eisenchelator Deferroxamin wurden die Effekte von DHA hingegen gemindert. Der Anteil an Eisen und Transferrinrezeptoren ist in Tumorzellen erhöht (204-208), sodass diese eher als das normale Gewebe durch ARSS angegriffen werden (14, 19, 219-221). Allerdings ist zu beachten, dass Eisen als Cofaktor für viele Enzyme fungiert, die auch an der Proliferation beteiligt sein können. Eine bedenkenlose Zugabe von Eisen bei der Behandlung mit ARSS ist demnach nicht anzuraten (14, 222). Die Erforschung der Wirkmechanismen von ART im PCa, insbesondere die Bildung von ROS oder weitere Formen des durch ART ausgelösten Zelltodes, sollte nicht vernachlässigt werden, um die Wirkmechanismen von ART zu klären und ggf. potenzielle Biomarker für eine gute Wirksamkeit von ART identifizieren zu können.

Die Entwicklung von therapeutischen Systemen, die ART gezielt zum Wirkort befördern, könnte sich zudem als vielversprechend erweisen. Wie bereits erwähnt weist ART eine gewisse Selektivität gegenüber Tumorzellen auf. Dies könnte auf dem erhöhten Gehalt an Eisen und Transferrinrezeptoren begründet sein (204-208). Nakase et al. nutzten diese Eigenschaft aus, indem sie ART mit Transferrin konjugierten, um noch stärker von der Selektivität zu profitieren (209). Dies wäre ein weiterer Ansatz, um ARTs Effektivität ggf. auch im PCa weiter zu verstärken.

Untersucht werden sollte zudem, ob die Kombination mit anderen Medikamenten, insbesondere DX, synergistische oder additive Effekte zu induzieren vermag. Weiterhin wäre es interessant zu evaluieren, ob solche Kombinationsbehandlungen einer Resistenzentwicklung gegen die jeweiligen Einzelsubstanzen vorbeugen könnten. Versuchsreihen zum Wachstums- und Metastasierungsverhalten mit entsprechenden Kombinationstherapien sollten dies klären.

So konnten Fröhlich et al. beispielsweise eine hohe Wirksamkeit von Östrogen-Artemisinin-Hybriden gegen die Zelllinie PC3 im Vergleich mit den einzelnen Wirkstoffen nachweisen (210). Denkbar also, dass sich eine Kombination mit anderen Wirkstoffen ebenfalls als aussichtsreich herausstellen könnte. Tatsächlich erwiesen



sich erste Kombinationen von ART mit etablierten Wirkstoffen und Therapien bei anderen Entitäten als erfolgreich (15). Luo et al. zeigten in Zellkultur und im Mausmodell eine erhöhte Radiosensitivität von Cervixkarzinomzellen nach der Behandlung mit ART (211). Fei et al. konnten ebenfalls eine verbesserte Sensitivität auf die Bestrahlung beim Ösophaguskarzinom sehen und begründeten dies mit einer Hemmung der Reparatur von DNA-Schäden durch ART (212). Die gleichzeitige Anwendung von ART und Carboplatin führt bei Wang et al. zu synergistischen Effekten im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (213). Sorafenib in Kombination mit ART rief ebenfalls synergistische Effekte im hepatozellulären Karzinom hervor (214). Durch die Kombination von ART mit Paclitaxel, einem anderen Taxan neben DX, in Form von Nanopartikeln konnten Synergien in Mammakarzinomzelllinien nachgewiesen werden (215). Im Weiteren sollten daher Kombinationstherapien mit den etablierten Behandlungsoptionen, insbesondere DX, und ART näher evaluiert werden, um auf lange Sicht die Integration von ART in bestehende Therapieschemata bei der Behandlung des PCa zu ermöglichen.

Es existieren bereits erste klinische Daten über die Anwendung von ART in der Krebstherapie. Die Verträglichkeit der oralen Anwendung von ART wurde etwa im metastasierten Mammakarzinom als *add on* zur leitlinienbasierten Therapie untersucht (225). Im lokalen kolorektalen Karzinom traten nach oraler Einnahme von ART vor der kurativen Resektion innerhalb eines medianen *Follow-up* von 42 Monaten weniger Rezidive auf (226). Im Rahmen einer Fallstudie *in vivo* bei fortgeschrittenem PCa führte die Anwendung von *Artemisia annua* und ART zu einer mehrmonatigen Remission (167). Es bedarf jedoch weiterer kontrollierten randomisierten Studien mit einer deutlich größeren Anzahl an Probanden, um die Effekte von ART im parentalen und DX-resistenten PCa zu verifizieren.

Einen weiteren Vorteil, neben den geschilderten vielfältigen Wirkmechanismen, stellt dar, dass ARSS günstig und gut verfügbar sind. Somit bieten sie in Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommen, in denen nicht zuletzt aufgrund struktureller Probleme eine hohe krebsbedingte Sterblichkeit vorliegt, im Sinne von Global Health eine gute Behandlungsoption (223, 224).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit erstmals antiproliferative Effekte von Artesunat im parentalen und DX-resistenten PCa *in vitro* nachgewiesen werden. Zahlreiche Aspekte, in denen weitere Forschung notwendig ist, wurden aufgezeigt. Längerfristiges Ziel ist es, ART als integrative Therapie des PCa in die bestehenden Therapiekonzepte einzufügen.

## **7. Zusammenfassung**

Therapieresistenzen gegen das Chemotherapeutikum Docetaxel (DX) stellen ein großes Problem in der Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms (PCa) dar (87, 88). Das ursprünglich gegen Malaria eingesetzte Artesunat (ART), dessen Wurzeln in der traditionellen chinesischen Medizin liegen, hat auch in der Behandlung verschiedener Krebsentitäten eine vielversprechende Wirkung gezeigt (14). Zur Behandlung des PCa mit ART liegen aber noch wenige Daten vor, zum DX-resistenten PCa im Speziellen sind derzeit keine vorhanden. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, den Einfluss von ART auf das progressive Wachstum therapiesensitiver (parentaler) und DX-resistenter PCa zu evaluieren.

Hierzu wurden parentale und erstmalig auch DX-resistente PCa-Zelllinien, PC3, DU145 und LNCaP, mit ART [1-100 µM] behandelt. ART-unbehandelte PCa-Zellen dienten als Kontrollen. Neben dem Tumorzellwachstum (MTT) und der Proliferation (BrdU) wurden Veränderungen in den Zellzyklusphasen sowie die Induktion apoptotischer und nekrotischer Effekte (mittels Durchflusszytometrie) näher untersucht.

ART konnte sowohl in allen parentalen als auch DX-resistenten PCa-Zellen eine signifikante Inhibition des Tumorzellwachstums und der Proliferation induzieren. Die Wirkung war dabei konzentrations- [1-100 µM] und zeitabhängig [24 h<48 h<72 h]. Die deutlichsten Effekte auf das Tumorzellwachstum konnten in den parentalen DU145-Zellen und auf die Proliferation in den parentalen LNCaP-Zellen detektiert werden. Die wachstumshemmende Wirkung von ART ging in allen DX-resistenten PCa-Zelllinien mit einem G0/G1-Phase-Arrest unter gleichzeitiger signifikanter Abnahme der S-Phase-Zellen einher. In den DX-resistenten DU145-Zellen wurde zudem die G2/M-Phase signifikant reduziert. In den parentalen LNCaP-Zellen resultierte die Exposition mit ART ebenfalls in einem G0/G1-Phase-Arrest bei zeitgleicher signifikanter Reduktion der Zellen in der S- und G2/M-Phase. Die übrigen parentalen PCa-Zellen zeigten keine signifikante Veränderung in den Zellzyklusphasen. In den parentalen PC3-, LNCaP- und DX-resistenten LNCaP-Zellen induzierte ART weiterhin eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen. Die stärksten apoptotischen Effekte von ART, mit etwa einer Vervielfachung, konnten dabei in der parentalen LNCaP-Subzelllinie beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals sowohl in parentalen als auch DX-resistenten PCa-Zellen der Einfluss von ART auf das progressive Tumorzellwachstum gezeigt werden. Dabei werden zelltypspezifisch unterschiedliche

Mechanismen aktiviert. ART könnte somit eine vielversprechende integrative Therapie im fortgeschrittenen, auch DX-resistenten, PCa darstellen. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um dies weiter zu verifizieren.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland für 2017/2018 [Internet]. Berlin 2021 [Aktualisierungsdatum: 04.03.2022; zitiert am 04.03.2022]. URL: [https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/9042/krebs\\_in\\_deutschland\\_2021.pdf;jsessionid=3B7086E853920E599859A5232A68DFA9.pdf?sequence=1](https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/9042/krebs_in_deutschland_2021.pdf;jsessionid=3B7086E853920E599859A5232A68DFA9.pdf?sequence=1).
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
3. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(12).
4. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, et al. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut; 2016.
5. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Kapitel 3.22 Prostata. In: Krebs in Deutschland für 2015/2016 [Internet]. Berlin 2019 [Aktualisierungsdatum: 17.08.2020; zitiert am 08.07.2021]. URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2019/krebs\\_in\\_deutschland\\_2019.pdf?blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?blob=publicationFile).
6. Leitlinienprogramm Onkologie, (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Langversion 6.2, 2021, AWMF Registernummer: 043/022OL [Internet]. [Aktualisierungsdatum: 13.10.2021; zitiert am 18.04.2022]. URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043-022OLI\\_S3\\_Prostatakarzinom\\_2021-10.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-022OLI_S3_Prostatakarzinom_2021-10.pdf).
7. Lamont KR, Tindall DJ. Minireview: Alternative activation pathways for the androgen receptor in prostate cancer. *Mol Endocrinol*. 2011;25(6):897-907.
8. Harrington JA, Jones RJ. Management of metastatic castration-resistant prostate cancer after first-line docetaxel. *Eur J Cancer*. 2011;47(14):2133-42.
9. Kelly WK, Halabi S, Carducci M, George D, Mahoney JF, Stadler WM, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial comparing docetaxel and prednisone with or without bevacizumab in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: CALGB 90401. *J Clin Oncol*. 2012;30(13):1534-40.
10. Ebel MD, Rudolph I, Keinki C, Hoppe A, Muecke R, Micke O, et al. Perception of cancer patients of their disease, self-efficacy and locus of control and usage of complementary and alternative medicine. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(8):1449-55.
11. Horneber M, Bueschel G, Dennert G, Less D, Ritter E, Zwahlen M. How Many Cancer Patients Use Complementary and Alternative Medicine. *Integr Cancer Ther*. 2012;11(3):187-203.
12. Huebner J, Micke O, Muecke R, Buentzel J, Prott FJ, Kleeberg U, et al. User rate of complementary and alternative medicine (CAM) of patients visiting a counseling facility for CAM of a German comprehensive cancer center. *Anticancer Res*. 2014;34(2):943-8.
13. Kessel KA, Lettner S, Kessel C, Bier H, Biedermann T, Friess H, et al. Use of Complementary and Alternative Medicine (CAM) as Part of the Oncological Treatment: Survey about Patients' Attitude towards CAM in a University-Based Oncology Center in Germany. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165801.

14. Efferth T. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* 2017;46(Supplement C):65-83.
15. Efferth T. Cancer combination therapies with artemisinin-type drugs. *Biochem Pharmacol.* 2017;139:56-70.
16. 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).
17. 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).
18. Nunes JJ, Pandey SK, Yadav A, Goel S, Ateeq B. Targeting NF-kappa B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens. *Neoplasia.* 2017;19(4):333-45.
19. 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.
20. Fisang C, Müller SC. Anatomie des unteren Harntraktes. In: Hautmann R, Gschwend JE, editors. *Urologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 13-23.
21. Benninghoff A. Taschenbuch Anatomie. 3. ed. Drenckhahn D, Waschke J, editors. München: Elsevier; 2020.
22. Manski D. Prostata in *Urologielehrbuch.de* [Internet]. [Aktualisierungsdatum: 19.07.2021; zitiert am 19.07.2021]. URL: <https://www.urologielehrbuch.de/prostata.html>.
23. 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; 2015. p. 1-11.
24. Schiebler TH, Korf H-W. Abdomen und Pelvis. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie.* Heidelberg: Steinkopff; 2007. p. 307-448.
25. Randazzo M, Grobholz R. Prostata: Anatomie und Physiologie. *Journal für Urologie und Urogynäkologie/Österreich.* 2020;27(4):129-34.
26. Thüroff J. Operative Anatomie der Prostata. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. *Die Urologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 1119-31.
27. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate.* 1981;2(1):35-49.
28. Humphrey PA. Cancers of the male reproductive organs. In: Stewart BW, Wild C, editors. *World Cancer Report 2014.* Lyon, France Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014.
29. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer.* 2013;49(6):1374-403.
30. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Prostatakrebs (Prostatakarzinom) [Internet]. [Aktualisierungsdatum: 14.04.2021; zitiert am 08.07.2021]. URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html).
31. Walsh PC, Partin AW. Family history facilitates the early diagnosis of prostate carcinoma. *Cancer.* 1997;80(9):1871-4.
32. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int.* 2003;91(9):789-94.

33. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000;343(2):78-85.
34. Henderson BE, Lee NH, Seewaldt V, Shen H. The influence of race and ethnicity on the biology of cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12:648.
35. Smith ZL, Eggener SE, Murphy AB. African-American Prostate Cancer Disparities. *Current Urology Reports*. 2017;18(10):81.
36. Baade PD, Youlten DR, Krnjacki LJ. International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53(2):171-84.
37. Hebert JR, Hurley TG, Olendzki BC, Teas J, Ma Y, Hampl JS. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(21):1637-47.
38. Applegate CC, Rowles JL, Ranard KM, Jeon S, Erdman JW. Soy Consumption and the Risk of Prostate Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2018;10(1).
39. Etminan M, Takkouche B, Caamano-Isorna F. The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(3):340-5.
40. Wertz K, Siler U, Goralczyk R. Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys*. 2004;430(1):127-34.
41. Dennis LK, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology*. 2002;60(1):78-83.
42. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 2012;60(1):199-215.
43. Dennis LK, Dawson DV. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. *Epidemiology*. 2002;13(1):72-9.
44. Wittekind C. TNM Klassifikation Maligner Tumoren: Korrigierter Nachdruck 2020 mit allen Ergänzungen der UICC aus den Jahren 2017 bis 2019 [E-Book]. Newark: John Wiley & Sons, Incorporated; 2020. URL: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/umainz/detail.action?docID=5997261>.
45. Börgermann C, Chun FK-H, Bastian PJ, Fischer K, Fornara P, Fröhner M, et al. Prostatakarzinom. In: Rübber H, editor. *Uroonkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 513-676.
46. Kandori S, Kojima T, Nishiyama H. The updated points of TNM classification of urological cancers in the 8th edition of AJCC and UICC. *Jpn J Clin Oncol*. 2019;49(5):421-5.
47. Yang XJ. Precancerous lesions of the prostate: Pathology and clinical implications. In: Post TW, editor. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate Inc.; 2019 [Aktualisierungsdatum: 06.09.2019; zitiert am 06.09.2019]. URL: <https://uptodate.com>].
48. Schlomm T, Sauter G. Beurteilung des Prostatakarzinoms: Gleason-Score – Status 2016. *Dtsch Arztebl International*. 2016;113(33-34):[14].
49. Yang XJ. Interpretation of prostate exam. In: Savarese DMF, editor. *UpToDate*. Waltham, MA, : UpToDate Inc.; 2018 [Aktualisierungsdatum: 29.08.2018; Zitiert am 29.08.2018]. URL: <https://www.uptodate.com>].
50. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(2):244-52.

51. Van Leenders GJLH, Van Der Kwast TH, Grignon DJ, Evans AJ, Kristiansen G, Kweldam CF, et al. The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2020;44(8):e87-e99.
52. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):34-45.
53. Chen CD, Welsbie DS, Tran C, Baek SH, Chen R, Vessella R, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med.* 2004;10(1):33-9.
54. Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2001;61(9):3550-5.
55. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 1997;57(2):314-9.
56. Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, Hess DL, Kalhorn TF, Higano CS, et al. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* 2008;68(11):4447-54.
57. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Radmayr C, Trapman J, Hittmair A, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* 1994;54(20):5474-8.
58. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 1990;348(6299):334-6.
59. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol.* 1993;143(2):390-400.
60. Huber J, Brogsitter C, Kotzerke J, Hoelscher T, Baumann M, Fröhner M, et al. Prostatakarzinom: Palliative Therapie. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, editors. *Die Urologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 1363-83.
61. Steuber T, Haese A, Huland H. Prostatakarzinom. In: Hiddemann W, Bartram CR, editors. *Die Onkologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 1129-55.
62. Noble RL. The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration. *Cancer Res.* 1977;37(6):1929-33.
63. Chi KN, Agarwal N, Bjartell A, Chung BH, Pereira de Santana Gomes AJ, Given R, et al. Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2019;381(1):13-24.
64. Agarwal N, McQuarrie K, Bjartell A, Chowdhury S, Pereira de Santana Gomes AJ, Chung BH, et al. Health-related quality of life after apalutamide treatment in patients with metastatic castration-sensitive prostate cancer (TITAN): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2019;20(11):1518-30.
65. Armstrong AJ, Szmulewitz RZ, Petrylak DP, Holzbeierlein J, Villers A, Azad A, et al. ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *J Clin Oncol.* 2019;37(32):2974-86.



66. Davis ID, Martin AJ, Stockler MR, Begbie S, Chi KN, Chowdhury S, et al. Enzalutamide with Standard First-Line Therapy in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(2):121-31.
67. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone plus Prednisone in Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(4):352-60.
68. Fizazi K, Tran N, Fein L, Matsubara N, Rodriguez-Antolin A, Alekseev BY, et al. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(5):686-700.
69. James ND, de Bono JS, Spears MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, et al. Abiraterone for Prostate Cancer Not Previously Treated with Hormone Therapy. *N Engl J Med*. 2017;377(4):338-51.
70. James ND, Sydes MR, Clarke NW, Mason MD, Dearnaley DP, Spears MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10024):1163-77.
71. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(8):737-46.
72. Gravis G, Fizazi K, Joly F, Oudard S, Priou F, Esterni B, et al. Androgen-deprivation therapy alone or with docetaxel in non-castrate metastatic prostate cancer (GETUG-AFU 15): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(2):149-58.
73. Vaishampayan U, Parchment RE, Jasti BR, Hussain M. Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Urology*. 1999;54(6A Suppl):22-9.
74. Bartsch V. [Assault on the mitotic spindle. The action mechanism of taxane]. *Pharm Unserer Zeit*. 2005;34(2):104-8.
75. Haldar S, Basu A, Croce CM. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res*. 1997;57(2):229-33.
76. Tsavaris N, Kosmas C, Vadiaka M, Kanelopoulos P, Boulamatsis D. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer*. 2002;87(1):21-7.
77. Darshan MS, Loftus MS, Thadani-Mulero M, Levy BP, Escuin D, Zhou XK, et al. Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer. *Cancer Res*. 2011;71(18):6019-29.
78. Quinn DI, Sandler HM, Horvath LG, Goldkorn A, Eastham JA. The evolution of chemotherapy for the treatment of prostate cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(11):2658-69.
79. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(15):1502-12.
80. Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol*. 2008;26(2):242-5.
81. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN, Jr., Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(15):1513-20.

82. European Medicines Agency. Docetaxel. Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit. Anhang I. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. [Internet]. 2009 [Aktualisierungsdatum: 27.03.2019; zitiert am 05.08.2019]. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/taxotere-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/taxotere-epar-product-information_de.pdf).
83. Assi T, Rassy E, Farhat F, Kattan C, Kattan J. Docetaxel Rechallenge in Patients with Metastatic Prostate Cancer: A Comprehensive Review. *Oncol Res Treat*. 2020;43(6):299-306.
84. Thomas C, Brandt MP, Baldauf S, Tsaur I, Frees S, Borgmann H, et al. Docetaxel-rechallenge in castration-resistant prostate cancer: defining clinical factors for successful treatment response and improvement in overall survival. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(10):1821-7.
85. Botrel TE, Clark O, Lima Pompeo AC, Horta Bretas FF, Sadi MV, Ferreira U, et al. Efficacy and Safety of Combined Androgen Deprivation Therapy (ADT) and Docetaxel Compared with ADT Alone for Metastatic Hormone-Naive Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(6):e0157660.
86. Morgans AK, Chen YH, Sweeney CJ, Jarrard DF, Plimack ER, Gartrell BA, et al. Quality of Life During Treatment With Chemohormonal Therapy: Analysis of E3805 Chemohormonal Androgen Ablation Randomized Trial in Prostate Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(11):1088-95.
87. Visconti R, Grieco D. Fighting tubulin-targeting anticancer drug toxicity and resistance. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(9):T107-T117.
88. Galletti G, Leach BI, Lam L, Tagawa ST. Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Treat Rev*. 2017;57:16-27.
89. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:361-98.
90. Bhangal G, Halford S, Wang J, Roylance R, Shah R, Waxman J. Expression of the multidrug resistance gene in human prostate cancer. *Urol Oncol*. 2000;5(3):118-21.
91. Kawai K, Sakurai M, Sakai T, Misaki M, Kusano I, Shiraishi T, et al. Demonstration of MDR1 P-glycoprotein isoform expression in benign and malignant human prostate cells by isoform-specific monoclonal antibodies. *Cancer Lett*. 2000;150(2):147-53.
92. van Brussel JP, van Steenbrugge GJ, Romijn JC, Schroder FH, Mickisch GH. Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins. *Eur J Cancer*. 1999;35(4):664-71.
93. Kawanobe T, Kogure S, Nakamura S, Sato M, Katayama K, Mitsuhashi J, et al. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(4):736-41.
94. Zhu Y, Liu C, Nadiminty N, Lou W, Tummala R, Evans CP, et al. Inhibition of ABCB1 expression overcomes acquired docetaxel resistance in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(9):1829-36.
95. Sissung TM, Baum CE, Deeken J, Price DK, Aragon-Ching J, Steinberg SM, et al. ABCB1 genetic variation influences the toxicity and clinical outcome of patients with androgen-independent prostate cancer treated with docetaxel. *Clin Cancer Res*. 2008;14(14):4543-9.
96. Thadani-Mulero M, Portella L, Sun S, Sung M, Matov A, Vessella RL, et al. Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer. *Cancer Res*. 2014;74(8):2270-82.

97. Zhang G, Liu X, Li J, Ledet E, Alvarez X, Qi Y, et al. Androgen receptor splice variants circumvent AR blockade by microtubule-targeting agents. *Oncotarget*. 2015;6(27):23358-71.
98. Izumi K, Fang LY, Mizokami A, Namiki M, Li L, Lin WJ, et al. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO Mol Med*. 2013;5(9):1383-401.
99. Qian DZ, Rademacher BL, Pittsenbarger J, Huang CY, Myrthue A, Higano CS, et al. CCL2 is induced by chemotherapy and protects prostate cancer cells from docetaxel-induced cytotoxicity. *Prostate*. 2010;70(4):433-42.
100. Mahon KL, Lin HM, Castillo L, Lee BY, Lee-Ng M, Chatfield MD, et al. Cytokine profiling of docetaxel-resistant castration-resistant prostate cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(8):1340-8.
101. Plymate SR, Bhatt RS, Balk SP. Taxane resistance in prostate cancer mediated by AR-independent GATA2 regulation of IGF2. *Cancer Cell*. 2015;27(2):158-9.
102. Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Quinn SA, Rodriguez-Barrueco R, Lujambio A, Williams E, et al. A targetable GATA2-IGF2 axis confers aggressiveness in lethal prostate cancer. *Cancer Cell*. 2015;27(2):223-39.
103. West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2002;5(6):234-48.
104. 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.
105. O'Neill AJ, Prencipe M, Dowling C, Fan Y, Mulrane L, Gallagher WM, et al. Characterisation and manipulation of docetaxel resistant prostate cancer cell lines. *Mol Cancer*. 2011;10:126.
106. Miller LH, Su X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden. *Cell*. 2011;146(6):855-8.
107. Tu Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nat Med*. 2011;17(10):1217-20.
108. Tu Y. The development of the antimalarial drugs with new type of chemical structure--qinghaosu and dihydroqinghaosu. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2004;35(2):250-1.
109. Ho WE, Peh HY, Chan TK, Wong WS. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial. *Pharmacol Ther*. 2014;142(1):126-39.
110. White NJ, Hien TT, Nosten FH. A Brief History of Qinghaosu. *Trends Parasitol*. 2015;31(12):607-10.
111. European Medicines Agency. Artesunate Amivas. Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit. Anhang I. Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. [Internet]. 2022 [Aktualisierungsdatum: 12.10.2022; zitiert am 12.10.2022]. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/artesunate-amivas-epar-product-information\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/artesunate-amivas-epar-product-information_de.pdf).
112. Du JH, Zhang HD, Ma ZJ, Ji KM. Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(5):895-902.
113. Jeong DE, Song HJ, Lim S, Lee SJ, Lim JE, Nam DH, et al. Repurposing the anti-malarial drug artesunate as a novel therapeutic agent for metastatic renal cell carcinoma due to its attenuation of tumor growth, metastasis, and angiogenesis. *Oncotarget*. 2015;6(32):33046-64.

114. Greenshields AL, Shepherd TG, Hoskin DW. Contribution of reactive oxygen species to ovarian cancer cell growth arrest and killing by the anti-malarial drug artesunate. *Mol Carcinog*. 2017;56(1):75-93.
115. Jung M, Mertens C, Tomat E, Brüne B. Iron as a Central Player and Promising Target in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2).
116. Efferth T, Benakis A, Romero MR, Tomicic M, Rauh R, Steinbach D, et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinin toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(7):998-1009.
117. Gopalakrishnan AM, Kumar N. Antimalarial Action of Artesunate Involves DNA Damage Mediated by Reactive Oxygen Species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):317-25.
118. Gerhardt T, Jones R, Park J, Lu R, Chan HW, Fang Q, et al. Effects of antioxidants and pro-oxidants on cytotoxicity of dihydroartemisinin to Molt-4 human leukemia cells. *Anticancer Res*. 2015;35(4):1867-71.
119. 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.
120. Wang Z, Wang C, Wu Z, Xue J, Shen B, Zuo W, et al. Artesunate Suppresses the Growth of Prostatic Cancer Cells through Inhibiting Androgen Receptor. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(4):479-85.
121. Ooko E, Saeed ME, Kadioglu O, Sarvi S, Colak M, Elmasaoudi K, et al. Artemisinin derivatives induce iron-dependent cell death (ferroptosis) in tumor cells. *Phytomedicine*. 2015;22(11):1045-54.
122. Eling N, Reuter L, Hazin J, Hamacher-Brady A, Brady NR. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience*. 2015;2(5):517-32.
123. Zhu S, Yu Q, Huo C, Li Y, He L, Ran B, et al. Ferroptosis: a novel mechanism of artemisinin and its derivatives in cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2020.
124. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060-72.
125. Li J, Cao F, Yin H-L, Huang Z-J, Lin Z-T, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*. 2020;11(2).
126. Chen H-H, Zhou H-J, Wu G-D, Lou X-E. Inhibitory Effects of Artesunate on Angiogenesis and on Expressions of Vascular Endothelial Growth Factor and VEGF Receptor KDR/flk-1. *Pharmacology*. 2004;71(1):1-9.
127. Dell'Eva R, Pfeiffer U, Vené R, Anfosso L, Forlani A, Albini A, et al. Inhibition of angiogenesis in vivo and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti-malarial artesunate. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(12):2359-66.
128. 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.
129. Kaighn ME, Lechner JF, Narayan KS, Jones LW. Prostate carcinoma: tissue culture cell lines. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1978(49):17-21.
130. Fogh J. Human tumor lines for cancer research. *Cancer Invest*. 1986;4(2):157-84.
131. 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.
132. 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.

133. Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, Cato AC, Hittmair A, Radmayr C, et al. Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Mol Endocrinol.* 1993;7(12):1541-50.
134. Pan Y, Kytola S, Farnebo F, Wang N, Lui WO, Nupponen N, et al. Characterization of chromosomal abnormalities in prostate cancer cell lines by spectral karyotyping. *Cytogenet Cell Genet.* 1999;87(3-4):225-32.
135. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang C-Z, et al. PC3 Is a Cell Line Characteristic of Prostatic Small Cell Carcinoma. *The Prostate.* 2011;71(15):1668-79.
136. Webber MM, Bello D, Quader S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications. Part 3. Oncogenes, suppressor genes, and applications. *Prostate.* 1997;30(2):136-42.
137. Laniado ME, Lalani EN, Fraser SP, Grimes JA, Bhangal G, Djamgoz MB, et al. Expression and functional analysis of voltage-activated Na<sup>+</sup> channels in human prostate cancer cell lines and their contribution to invasion in vitro. *Am J Pathol.* 1997;150(4):1213-21.
138. Keer HN, Gaylis FD, Kozlowski JM, Kwaan HC, Bauer KD, Sinha AA, et al. Heterogeneity in plasminogen activator (PA) levels in human prostate cancer cell lines: increased PA activity correlates with biologically aggressive behavior. *Prostate.* 1991;18(3):201-14.
139. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer.* 1978;21(3):274-81.
140. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 1983;43(4):1809-18.
141. Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, et al. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(2):534-40.
142. Veldscholte J, Voorhorst-Ogink MM, Bolt-de Vries J, van Rooij HC, Trapman J, Mulder E. Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for progestagenic and estrogenic steroids. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1052(1):187-94.
143. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
144. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree IA, editor. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 237-45.
145. Prabst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hubner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol.* 2017;1601:1-17.
146. Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods.* 1985;82(1):169-79.
147. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) [Internet]. 2013 [Aktualisierungsdatum: 01.08.2019; zitiert am 01.08.2019]. Version 16 [URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf>].

148. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol.* 1975;66(1):188-93.
149. Abcam plc. Flow cytometric analysis of cell cycle with propidium iodide DNA staining [Internet]. 2019 [Aktualisierungsdatum: 01.08.2019; zitiert am 01.08.2019]. URL: <https://www.abcam.com/protocols/flow-cytometric-analysis-of-cell-cycle-with-propidium-iodide-dna-staining>.
150. BD Biosciences. Technical Data Sheet FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I [Internet]. 2008 [Aktualisierungsdatum: 01.08.2019; zitiert am 01.08.2019]. URL: <http://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/tds/556547.pdf>.
151. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184(1):39-51.
152. Motulsky HJ, Brown RE. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:123.
153. Poonthananiwatkul B, Howard RL, Williamson EM, Lim RHM. Cancer patients taking herbal medicines: A review of clinical purposes, associated factors, and perceptions of benefit or harm. *J Ethnopharmacol.* 2015;175:58-66.
154. Bishop FL, Rea A, Lewith H, Chan YK, Saville J, Prescott P, et al. Complementary medicine use by men with prostate cancer: a systematic review of prevalence studies. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2011;14(1):1-13.
155. Hierl M, Pfirstinger J, Andreesen R, Holler E, Mayer S, Wolff D, et al. Complementary and Alternative Medicine: A Clinical Study in 1,016 Hematology/Oncology Patients. *Oncology.* 2017;93(3):157-63.
156. Steinbruck L, Pereira G, Efferth T. Effects of artesunate on cytokinesis and G(2)/M cell cycle progression of tumour cells and budding yeast. *Cancer Genomics Proteomics.* 2010;7(6):337-46.
157. Huang Z, Gan S, Zhuang X, Chen Y, Lu L, Wang Y, et al. Artesunate Inhibits the Cell Growth in Colorectal Cancer by Promoting ROS-Dependent Cell Senescence and Autophagy. *Cells.* 2022;11(16).
158. Zhao Y, Liu J, Liu L. Artesunate inhibits lung cancer cells via regulation of mitochondrial membrane potential and induction of apoptosis. *Mol Med Report.* 2020.
159. Zhou X, Sun WJ, Wang WM, Chen K, Zheng JH, Lu MD, et al. Artesunate inhibits the growth of gastric cancer cells through the mechanism of promoting oncosis both in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs.* 2013;24(9):920-7.
160. Våtsveen TK, Myhre MR, Steen CB, Wälchli S, Lingjærde OC, Bai B, et al. Artesunate shows potent anti-tumor activity in B-cell lymphoma. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):23.
161. Xiao Q, Yang L, Hu H, Ke Y. Artesunate targets oral tongue squamous cell carcinoma via mitochondrial dysfunction-dependent oxidative damage and Akt/AMPK/mTOR inhibition. *J Bioenerg Biomembr.* 2020;52(2):113-21.
162. Ilamathi M, Prabu PC, Ayyappa KA, Sivaramakrishnan V. Artesunate obliterates experimental hepatocellular carcinoma in rats through suppression of IL-6-JAK-STAT signalling. *Biomed Pharmacother.* 2016;82:72-9.
163. Li LN, Zhang HD, Yuan SJ, Tian ZY, Wang L, Sun ZX. Artesunate attenuates the growth of human colorectal carcinoma and inhibits hyperactive Wnt/beta-catenin pathway. *Int J Cancer.* 2007;121(6):1360-5.
164. Ma H, Yao Q, Zhang AM, Lin S, Wang XX, Wu L, et al. The effects of artesunate on the expression of EGFR and ABCG2 in A549 human lung cancer cells and a xenograft model. *Molecules.* 2011;16(12):10556-69.



165. Liu L, Zuo LF, Zuo J, Wang J. Artesunate induces apoptosis and inhibits growth of Eca109 and Ec9706 human esophageal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):1465-72.
166. Zuo W, Wang ZZ, Xue J. Artesunate induces apoptosis of bladder cancer cells by miR-16 regulation of COX-2 expression. *Int J Mol Sci.* 2014;15(8):14298-312.
167. Michaelsen FW, Saeed ME, Schwarzkopf J, Efferth T. Activity of *Artemisia annua* and artemisinin derivatives, in prostate carcinoma. *Phytomedicine.* 2015;22(14):1223-31.
168. Zhao F, Wang H, Kunda P, Chen X, Liu QL, Liu T. Artesunate exerts specific cytotoxicity in retinoblastoma cells via CD71. *Oncol Rep.* 2013;30(3):1473-82.
169. Li S, Xue F, Cheng Z, Yang X, Wang S, Geng F, et al. Effect of artesunate on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of SP2/0 myeloma cells through affecting NFkappaB p65. *Int J Hematol.* 2009;90(4):513-21.
170. Chen K, Shou LM, Lin F, Duan WM, Wu MY, Xie X, et al. Artesunate induces G2/M cell cycle arrest through autophagy induction in breast cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2014;25(6):652-62.
171. Wen L, Liu L, Wen L, Yu T, Wei F. Artesunate promotes G2/M cell cycle arrest in MCF7 breast cancer cells through ATM activation. *Breast Cancer.* 2018;25(6):681-6.
172. Li B, Bu S, Sun J, Guo Y, Lai D. Artemisinin derivatives inhibit epithelial ovarian cancer cells via autophagy-mediated cell cycle arrest. *Acta biochimica et biophysica Sinica.* 2018;50(12):1227-35.
173. Mao ZG, Zhou J, Wang H, He DS, Xiao WW, Liao GZ, et al. Artesunate inhibits cell proliferation and decreases growth hormone synthesis and secretion in GH3 cells. *Mol Biol Rep.* 2012;39(5):6227-34.
174. Tin AS, Sundar SN, Tran KQ, Park AH, Poindexter KM, Firestone GL. Antiproliferative effects of artemisinin on human breast cancer cells requires the downregulated expression of the E2F1 transcription factor and loss of E2F1-target cell cycle genes. *Anticancer Drugs.* 2012;23(4):370-9.
175. Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell.* 1995;82(6):915-25.
176. Gavet O, Pines J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell.* 2010;18(4):533-43.
177. Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J Mol Med (Berl).* 2016;94(12):1313-26.
178. Willoughby JA, Sr., Sundar SN, Cheung M, Tin AS, Modiano J, Firestone GL. Artemisinin blocks prostate cancer growth and cell cycle progression by disrupting Sp1 interactions with the cyclin-dependent kinase-4 (CDK4) promoter and inhibiting CDK4 gene expression. *J Biol Chem.* 2009;284(4):2203-13.
179. Murthy S, Wu M, Bai VU, Hou Z, Menon M, Barrack ER, et al. Role of Androgen Receptor in Progression of LNCaP Prostate Cancer Cells from G1 to S Phase. *PLoS One.* 2013;8(2):e56692.
180. Efferth T. Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* 2005;8(1-2):85-97.
181. Zhou C, Pan W, Wang XP, Chen TS. Artesunate induces apoptosis via a Bak-mediated caspase-independent intrinsic pathway in human lung adenocarcinoma cells. *J Cell Physiol.* 2012;227(12):3778-86.
182. Thanaketpaisarn O, Waiwut P, Sakurai H, Saiki I. Artesunate enhances TRAIL-induced apoptosis in human cervical carcinoma cells through inhibition

- of the NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol.* 2011;39(1):279-85.
183. He Q, Shi J, Shen XL, An J, Sun H, Wang L, et al. Dihydroartemisinin upregulates death receptor 5 expression and cooperates with TRAIL to induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2010;9(10):819-24.
184. Morrissey C, Gallis B, Solazzi JW, Kim BJ, Gulati R, Vakar-Lopez F, et al. Effect of artemisinin derivatives on apoptosis and cell cycle in prostate cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2010;21(4):423-32.
185. Xu G, Zou W-Q, Du S-J, Wu M-J, Xiang T-X, Luo Z-G. Mechanism of dihydroartemisinin-induced apoptosis in prostate cancer PC3 cells: An iTRAQ-based proteomic analysis. *Life Sci.* 2016;157:1-11.
186. Efferth T, Giaisi M, Merling A, Krammer PH, Li-Weber M. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells. *PLoS One.* 2007;2(8):e693.
187. Sieber S, Gdynia G, Roth W, Bonavida B, Efferth T. Combination treatment of malignant B cells using the anti-CD20 antibody rituximab and the anti-malarial artesunate. *Int J Oncol.* 2009;35(1):149-58.
188. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin.* 1972;22(4):232-40.
189. Lu Y, Zhang Z, Yu H, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J, et al. Functional annotation of risk loci identified through genome-wide association studies for prostate cancer. *Prostate.* 2011;71(9):955-63.
190. Steely AM, Willoughby JA, Sr., Sundar SN, Aivaliotis VI, Firestone GL. Artemisinin disrupts androgen responsiveness of human prostate cancer cells by stimulating the 26S proteasome-mediated degradation of the androgen receptor protein. *Anticancer Drugs.* 2017;28(9):1018-31.
191. Alcantara DD, Ribeiro HF, Cardoso PC, Araujo TM, Burbano RR, Guimaraes AC, et al. In vitro evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of artemether, an antimalarial drug, in a gastric cancer cell line (PG100). *J Appl Toxicol.* 2013;33(2):151-6.
192. Button RW, Lin F, Ercolano E, Vincent JH, Hu B, Hanemann CO, et al. Artesunate induces necrotic cell death in schwannoma cells. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1466.
193. Jia G, Kong R, Ma ZB, Han B, Wang YW, Pan SH, et al. The activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase is required for dihydroartemisinin-induced autophagy in pancreatic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:8.
194. Wang Z, Hu W, Zhang JL, Wu XH, Zhou HJ. Dihydroartemisinin induces autophagy and inhibits the growth of iron-loaded human myeloid leukemia K562 cells via ROS toxicity. *FEBS open bio.* 2012;2:103-12.
195. Hamacher-Brady A, Stein HA, Turschner S, Toegel I, Mora R, Jennewein N, et al. Artesunate activates mitochondrial apoptosis in breast cancer cells via iron-catalyzed lysosomal reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 2011;286(8):6587-601.
196. Wang K, Zhang Z, Wang M, Cao X, Qi J, Wang D, et al. Role of GRP78 inhibiting artesunate-induced ferroptosis in KRAS mutant pancreatic cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:2135-44.
197. Wang XS, Shankar S, Dhanasekaran SM, Ateeq B, Sasaki AT, Jing X, et al. Characterization of KRAS rearrangements in metastatic prostate cancer. *Cancer Discov.* 2011;1(1):35-43.



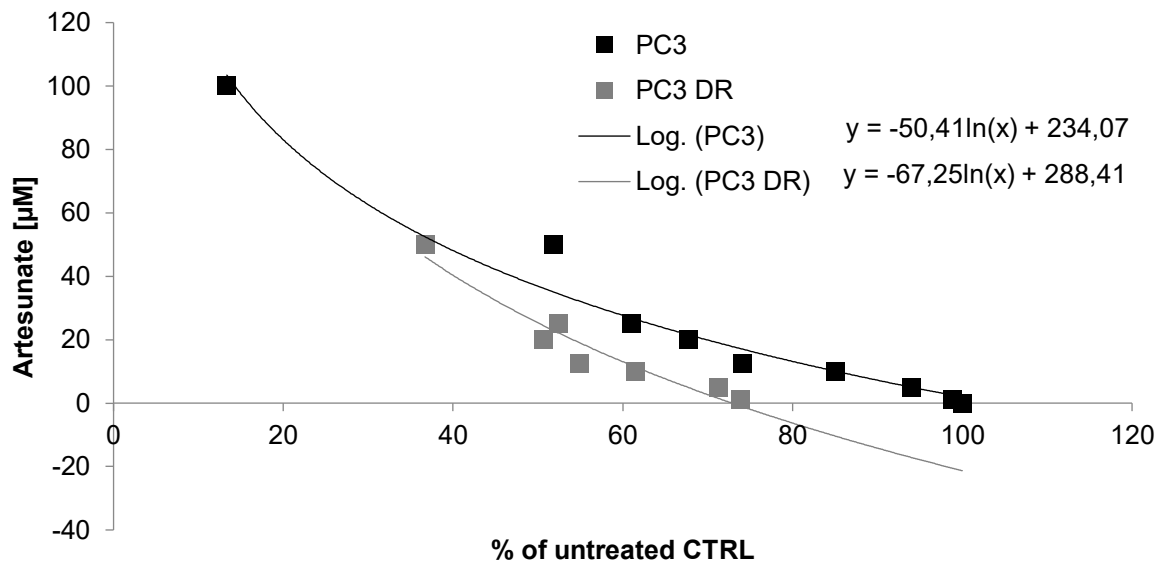
198. Dolma S, Lessnick SL, Hahn WC, Stockwell BR. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell*. 2003;3(3):285-96.
199. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
200. Davis TME, Phuong HL, Ilett KF, Hung NC, Batty KT, Phuong VDB, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous Artesunate in Severe Falciparum Malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(1):181-6.
201. Newton P, Suputtamongkol Y, Teja-Isavadharm P, Pukrittayakamee S, Navaratnam V, Bates I, et al. Antimalarial bioavailability and disposition of artesunate in acute falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(4):972-7.
202. Rutteman GR, Erich SA, Mol JA, Spee B, Grinwis GC, Fleckenstein L, et al. Safety and efficacy field study of artesunate for dogs with non-resectable tumours. *Anticancer Res*. 2013;33(5):1819-27.
203. Deeken JF, Wang H, Hartley M, Cheema AK, Smaglo B, Hwang JJ, et al. A phase I study of intravenous artesunate in patients with advanced solid tumor malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;81(3):587-96.
204. Aulbert E, Disselhoff W, Sörje H, Schulz E, Gericke D. Lysosomal accumulation of <sup>67</sup>Ga-transferrin in malignant tumors in relation to their growth rate. *European Journal of Cancer (1965)*. 1980;16(9):1217-32.
205. Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol*. 1983;36(5):539-45.
206. Judd W, Poodry CA, Strominger JL. Novel surface antigen expressed on dividing cells but absent from nondividing cells. *J Exp Med*. 1980;152(5):1430-5.
207. Trowbridge IS, Omary MB. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(5):3039-43.
208. Sutherland R, Delia D, Schneider C, Newman R, Kemshead J, Greaves M. Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(7):4515-9.
209. Nakase I, Gallis B, Takatani-Nakase T, Oh S, Lacoste E, Singh NP, et al. Transferrin receptor-dependent cytotoxicity of artemisinin-transferrin conjugates on prostate cancer cells and induction of apoptosis. *Cancer Lett*. 2009;274(2):290-8.
210. Fröhlich T, Mai C, Bogautdinov RP, Morozkina SN, Shavva AG, Friedrich O, et al. Synthesis of Tamoxifen-Artemisinin and Estrogen-Artemisinin Hybrids Highly Potent Against Breast and Prostate Cancer. *ChemMedChem*. 2020;15(15):1473-9.
211. Luo J, Zhu W, Tang Y, Cao H, Zhou Y, Ji R, et al. Artemisinin derivative artesunate induces radiosensitivity in cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Radiat Oncol*. 2014;9:84.
212. Fei Z, Gu W, Xie R, Su H, Jiang Y. Artesunate enhances radiosensitivity of esophageal cancer cells by inhibiting the repair of DNA damage. *J Pharmacol Sci*. 2018;138(2):131-7.
213. Wang Z, Wang Q, He T, Li W, Liu Y, Fan Y, et al. The combination of artesunate and carboplatin exerts a synergistic anti-tumour effect on non-small cell lung cancer. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2020;47(6):1083-91.
214. Li H, Xu K, Pian G, Sun S. Artesunate and sorafenib: Combinatorial inhibition of liver cancer cell growth. *Oncol Lett*. 2019;18(5):4735-43.

215. Tran BN, Nguyen HT, Kim JO, Yong CS, Nguyen CN. Developing combination of artesunate with paclitaxel loaded into poly-d,l-lactic-co-glycolic acid nanoparticle for systemic delivery to exhibit synergic chemotherapeutic response. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017;43(12):1952-62.
216. Singh NP, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. *Life Sci.* 2001;70(1):49-56.
217. Moore JC, Lai H, Li J-R, Ren R-L, McDougall JA, Singh NP, et al. Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat. *Cancer Lett.* 1995;98(1):83-7.
218. 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.
219. Efferth T, Benakis A, Romero MR, Tomicic M, Rauh R, Steinbach D, et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(7):998-1009.
220. Kelter G, Steinbach D, Konkimalla VB, Tahara T, Taketani S, Fiebig HH, 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.
221. Saeed MEM, Breuer E, Hegazy MF, Efferth T. Retrospective study of small pet tumors treated with *Artemisia annua* and iron. *Int J Oncol.* 2020;56(1):123-38.
222. Zhang C, Zhang F. Iron homeostasis and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Protein & cell.* 2015;6(2):88-100.
223. Augustin Y, Staines HM, Krishna S. Artemisinins as a novel anti-cancer therapy: Targeting a global cancer pandemic through drug repurposing. *Pharmacol Ther.* 2020:107706.
224. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
225. von Hagens C, Walter-Sack I, Goeckenjan M, Osburg J, Storch-Hagenlocher B, Sertel S, et al. Prospective open uncontrolled phase I study to define a well-tolerated dose of oral artesunate as add-on therapy in patients with metastatic breast cancer (ARTIC M33/2). *Breast Cancer Res Treat.* 2017;164(2):359-69.
226. Krishna S, Ganapathi S, Ster IC, Saeed ME, Cowan M, Finlayson C, et al. A Randomised, Double Blind, Placebo-Controlled Pilot Study of Oral Artesunate Therapy for Colorectal Cancer. *EBioMedicine.* 2015;2(1):82-90.

## 9. Anhang

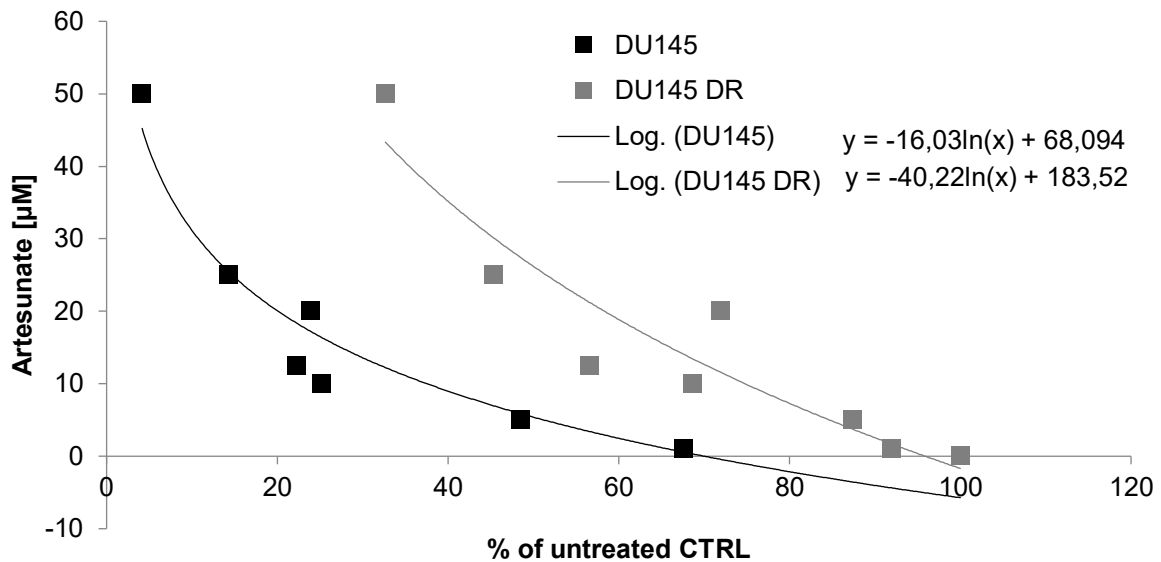
Tabelle 15: Formeln der Kurven zur Ermittlung des IC50 und LC50

	IC50	LC50
PC3 PAR	$y = 100 / (1 + 10^{((1,57-x) \times (-1,253))})$	$y = -50,41 \ln(x) + 234,07$
PC3 DR	$y = 100 / (1 + 10^{((1,225-x) \times (-0,7357))})$	$y = -67,25 \ln(x) + 288,41$
DU145 PAR	$y = 100 / (1 + 10^{((0,4886-x) \times (-0,9575))})$	$y = -16,03 \ln(x) + 68,094$
DU145 DR	$y = 100 / (1 + 10^{((1,362-x) \times (-1,275))})$	$y = -40,22 \ln(x) + 183,52$
LNCaP PAR	$y = 100 / (1 + 10^{((1,076-x) \times (-0,818))})$	$y = -34,92 \ln(x) + 154,08$
LNCaP DR	$y = 100 / (1 + 10^{((1,232-x) \times (-1,291))})$	$y = -36,38 \ln(x) + 163,23$



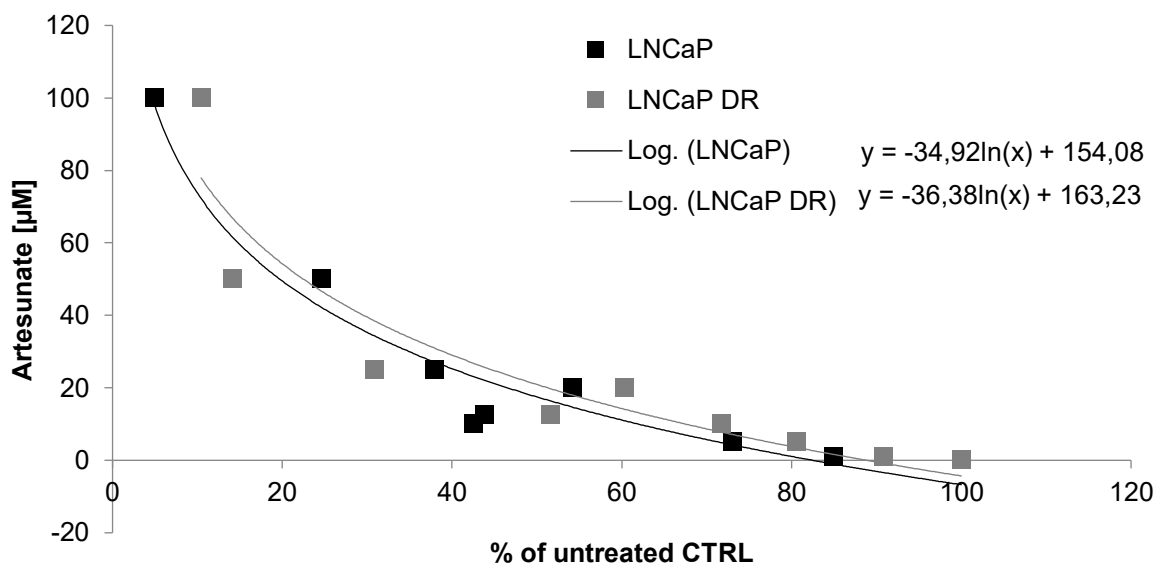
**Abbildung 10: LC50-Werte der parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen.**

Dosis-Wirkungskurve des Wachstums der parentalen und DX-resistenten (DR) PC3-Zellen nach 72 h Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von ART [1-100 µM]. X-Achse: Tumorzellwachstum / Viabilität der PC3-Zellen in Prozent. Y-Achse: Behandlungskonzentration von ART [1-100 µM]. Das Tumorzellwachstum / die Viabilität der unbehandelten Kontrolle wurde zum Zeitpunkt 72 h auf 100 % gesetzt. Für PC3 und PC3 DR wurde jeweils eine logarithmische Ausgleichsgerade gebildet, um die LC50 Werte bestimmen zu können. PC3 LC50 = 36,32 µM, PC3 DR LC50 = 25,33 µM. n = 6.



**Abbildung 11: LC50-Werte der parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen.**

Dosis-Wirkungskurve des Wachstums der parentalen (PAR) und DX-resistenten (DR) DU145-Zellen nach 72 h Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von ART [1-100 µM]. X-Achse: Tumorzellwachstum / Viabilität der DU145-Zellen in Prozent. Y-Achse: Behandlungskonzentration von ART [1-100 µM]. Das Tumorzellwachstum / die Viabilität der unbehandelten Kontrolle wurde zum Zeitpunkt 72 h auf 100 % gesetzt. Für DU145 und DU145 DR wurde jeweils eine logarithmische Ausgleichsgerade gebildet, um die LC50 Werte bestimmen zu können. DU145 LC50 = 5,38 µM, DU145 DR LC50 = 26,18 µM. n = 3.



**Abbildung 12: LC50-Werte der parentalen und DX-resistenten LNCaP-Zellen.**

Dosis-Wirkungskurve des Wachstums der parentalen (PAR) und DX-resistenten (DR) LNCaP-Zellen nach 72 h Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von ART [1-100 µM]. X-Achse: Tumorzellwachstum / Viabilität der LNCaP-Zellen in Prozent. Y-Achse: Behandlungskonzentration von ART [1-100 µM]. Das Tumorzellwachstum / die Viabilität der unbehandelten Kontrolle wurde zum Zeitpunkt 72 h auf 100 % gesetzt. Für LNCaP und LNCaP DR wurde jeweils eine logarithmische Ausgleichsgerade gebildet, um die LC50-Werte bestimmen zu können. LNCaP LC50 = 17,47 µM, LNCaP DR LC50 = 20,91 µM. n = 4.

## 10. Danksagung

## 11. Publikationsliste

**Bräunig V**, Markowitsch S, Erb H, Efferth T, Haferkamp A, Jünger E. V5.1 Präklinische Analyse zur antiproliferativen Wirkung von Artesunat im Docetaxel-resistenten Prostatakarzinom. In: Becker C, Burger M. Neue Ansätze in Diagnostik und Therapie uroonkologischer Erkrankungen. 10. AuF-Symposium in Mainz. Der Urologe. 2019;58(2):181-96.

Vakhrusheva O, Erb HHH, **Bräunig V**, Markowitsch SD, Schupp P, Baer PC, Slade KS, Thomas A, Tsaur I, Pühr M, Culig Z, Cinatl Jr. J, Michaelis M, Efferth T, Haferkamp A, Juenger E. Artesunate Inhibits the Growth Behavior of Docetaxel-Resistant Prostate Cancer Cells. *Front Oncol.* 2022;12:789284.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.789284>

## **12. Tabellarischer Lebenslauf**