

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

Die Bedeutung des Naturstoffes Shikonin in der Therapie des Taxan-resistenten
Prostatakarzinoms

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

Vorgelegt von
Kira Maria Buhr, geb. Jütter
aus Lübeck

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild (HS)

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 22.05.2024

Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
2. Literaturdiskussion	2
2.1 Das Prostatakarzinom	2
2.2 Therapien	4
2.2.1 Therapieoptionen des lokal begrenzten PCas	4
2.2.2 Therapieoptionen des lokal fortgeschrittenen PCas.....	5
2.2.3 Therapieoptionen für das fortgeschrittene und metastasierten PCa.....	6
2.2.3.2 Chemotherapeutika.....	7
2.2.4 Docetaxel-Resistenz und neue Therapieansätze	9
2.3 Komplementäre und alternative Medizin	10
2.3.1 Shikonin	11
2.3.2 Shikonin und seine Wirkung auf das PCa.....	13
2.4 Ziel der Studie	14
2 Material und Methoden.....	15
3.1 Material.....	15
3.2 Zelllinien.....	23
3.2.1 PC3.....	23
3.2.2 DU145.....	24
3.2.3 LNCaP.....	24
3.3 Methoden.....	24
3.3.1 Zellkultivierung.....	24
3.3.2 Zellzahlbestimmung.....	25
3.3.3 Tumorzellwachstum - MTT-Zellvitabilitätsassay	26
3.3.4 BrdU-Proliferationsassay	27
3.3.5 Analyse der Zellzyklusphasen	28

3.3.6 Bestimmung der Apoptoserate.....	29
3.3.7 Western-Blot-Analysen.....	30
3.3.7.1 Proteinisolation.....	30
3.3.7.2 Bradford Test.....	30
3.3.7.3 Gelelektrophorese und Blotvorgang.....	31
3.3.7.4 Blotvorgang.....	33
3.3.7.5 Antikörperbindung.....	33
3.3.10 Statistik.....	35
4. Ergebnisse.....	35
4.1 Shikonin induzierte eine zeit- und dosisabhängige Inhibition des Tumorzellwachstums.....	35
4.2 Shikonin inhibiert in parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen signifikant die Proliferation.....	37
4.3 Apoptose- und Nekroseinduktion in den PCa-Zellen durch Behandlung mit SHI.....	40
4.4 Einfluss von SHI auf die Verteilung der PCa-Zellen in den Zellzyklusphasen.....	43
4.5 Einfluss von SHI auf zellzyklusregulierende Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen.....	44
5 Diskussion.....	55
5.1 Einfluss von Shikonin auf das Tumorwachstum.....	56
5.2 Prozesse die nach Shikoninbehandlung zum Zelltod führen.....	57
5.3 Einfluss von Shikonin auf die Zellzyklusregulation.....	59
5.4 Limitationen und Ausblick.....	63
6 Zusammenfassung.....	64
7 Literaturverzeichnis.....	66
9 Danksagung.....	72
10 Tabellarischer Lebenslauf.....	73

Abkürzungsverzeichnis

ADT	Androgendeprivationstherapie
AKT	Proteinkinase B
Aqua dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgen-Rezeptor
ATG2	Autophagie 2
ATG3	Autophagie 3
ATO	Arsentrioxid
BAX	Bcl-2-assoziiertes X Protein
BAK	homologer BCL-2 Antagonist
Bcl-2	B-Zellen Lymphom 2
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CAM	Komplementäre und alternative Medizin
Cip/kip	CDK interagierendes Protein/ Kinase inhibierendes Protein
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CRPC	kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CX	Cabazitaxel
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DX	Docetaxel

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	Extrazelluläre Signal- regulierende Kinase
FACS	Durchflusszytometer, <i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FITS	Fluoresceinisothiocyanat
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g-Kraft	Erdbeschleunigung
GnRH	Gonadotropin- <i>Releasing</i> - Hormon
HEPES	2-(4-/2-Hydroxyethyl)-1- Piperazin)-Ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HK	<i>Housekeeper</i>
H ₂ O _{dd}	destilliertes Wasser
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
kDa	[Kilo Dalton]
KÖF	Körperoberfläche
LH	lutinisierendes Hormon

mCRPC	metastasiertes kastrationsresistentes Prostatakarzinom
MeOH	Methanol
mg	[Milligramm]
ml	[Milliliter]
MMP-2/-9	Matrix-Metallopeptidasen
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
M-Phase	Mitose-Phase
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyl tetrazoliumbromid
NF-kB	Zellkernfaktor <i>'kappa-light- chain-enhancer of activated B cells'</i>
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PCa ^{res}	Docetaxel-resistente Prostatakarzinomzellen
PCa ^{par}	parentale Prostatakarzinomzellen
PI	Propidiumiodid
PI3	Phosphoinositid-3-Kinase
PKM2	Pyruvatkinase M2
PSA	Prostata-spezifisches Antigen

PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium des Roswell Park Gedenkinstituts
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHI	Shikonin
S-Phase	Synthese-Phase
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TEMED	Tetra-N-Methyl-Ethylendiamin
TMB	Tetra-Methylbenzidin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Methylamin
u.a.	unter anderem
VEGF	Endothelwachstumsfaktor, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
μM	Mikromol
z.B.	zum Beispiel

5-FU

5-Fluorouracil

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1. Dosis-Wirkungskurven der parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen nach Behandlung mit SHI. S.36/37
- Abbildung 2. Proliferation der parentalen und DX-resistenten Zellen nach Behandlung mit SHI. S.39/40
- Abbildung 3. Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer PCa-Zellen nach SHI-Exposition. S.42/43
- Abbildung 4. Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen nach SHI-Behandlung. S.44
- Abbildung 5. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine nach 48 h SHI-Behandlung in den PC3-Zellen. S.46
- Abbildung 6. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie PC3. S.47-49
- Abbildung 7. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine nach 48 h SHI-Behandlung in DU145-Zellen. S.50
- Abbildung 8. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie DU145. S.51-53
- Abbildung 9. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie DU 145. S.53-55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung anhand des Gleason-Scores	S.3/4
Tabelle 2: Geräte	S.15-16
Tabelle 3: Programme	S.16
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien	S.16-18
Tabelle 5: Chemikalien	S.18-21
Tabelle 6: Antikörper	S.21-22
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	S.22-23
Tabelle 8: Trenngel (unterschiedlicher Konzentration entsprechend der Proteingröße)	S.32
Tabelle 9: Sammelgel (Zusammensetzung für je zwei Gele)	S.33
Tabelle 10: Antikörperliste	S.34/35

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt die häufigste Krebserkrankung des Mannes dar (1). Obwohl die Zahl der Todesfälle in den letzten 30 Jahren aufgrund verbesserter Diagnostik und Behandlungsmöglichkeiten rückläufig ist, gab es im Jahr 2015 weltweit noch 366.000 Todesfälle, die auf das Prostatakarzinom zurückzuführen waren (1, 2). Das Robert Koch Institut konnte Ende 2021 in „Krebs in Deutschland“ eine Sterberate von 36,7 je 100.000 Personen für das Jahr 2019 verzeichnen. Zudem gibt es prognostisch eine leicht steigende Inzidenz des Prostatakarzinoms für das Jahr 2022 an (3). Das Therapieregime ist abhängig vom Stadium der Erkrankung, der Prognose und dem Gesamtzustand des Patienten (4). Liegt ein lokal begrenztes Stadium vor, kommen kurative Therapiemaßnahmen, wie eine radikale Prostataektomie, Strahlentherapie oder eine Brachytherapie zur Anwendung (4-6). Liegt ein fortgeschrittenes oder metastasiertes Stadium vor, kann eine Androgendeprivationstherapie (ADT), eine Inhibition des Androgensignalwegs oder -rezeptors, eine Taxan-basierte Chemotherapie oder die Bestrahlung eingesetzt werden (7-9). Im Falle einer Androgenresistenz stellt das Chemotherapeutikum Docetaxel (DX) die Behandlungsmethode der ersten Wahl dar (6, 7, 10-14). Zudem konnte im Rahmen der CHAARTED Studie eine Verbesserung des Gesamtüberlebens von im Median 10,4 Monaten für die Kombinationstherapie mit ADT und DX gezeigt werden (15). Im Verlauf der Behandlung entwickeln jedoch viele Patienten eine Chemotherapieresistenz und es kommt zum Fortschreiten der Erkrankung. In diesem Fall können neuere Therapieverfahren, die gezielt die Androgensynthese (Abiraterone) oder den Androgenrezeptorsignalweg (Enzalutamide) angreifen (7, 12) oder das Chemotherapeutikum Cabazitaxel eingesetzt werden (16, 17). Allerdings entwickeln sich auch gegen diese unweigerlich Resistenzen, so dass weiterhin neue, wirkungsvollere Therapiekonzepte gefragt sind.

Aufgrund der limitierten Wirksamkeit und den häufig starken Nebenwirkungen der etablierten Therapien, steigt das Interesse der Patienten an alternativen Behandlungsmethoden. So wollen sie aktiv an der Behandlung ihrer Erkrankung beteiligt sein und/oder erhoffen sich dadurch eine Verbesserung der Wirksamkeit bei gleichzeitiger Verminderung der Nebenwirkungen der konventionellen Therapien (18-21). Zur alternativen Medizin wird auch die Traditionelle Chinesische Medizin gezählt, die verschiedene Behandlungskonzepte umfasst. Die Kräuter- und Pflanzenkunde macht dabei in der Behandlung von Erkrankungen einen großen Anteil aus (22-25). Hierzu gehört auch Shikonin (SHI), welches aus der getrockneten Wurzel von *Lithospermum erythrorhizon* gewonnen wird. Es hat antiinfektiöse, antibakterielle,

heilungsfördernde aber offensichtlich auch antitumorale Eigenschaften (26). Die antitumoralen Eigenschaften stehen aktuell im Fokus der Forschung (27).

Im Rahmen des Einsatzes von SHI konnte eine dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums für verschiedene Tumorentitäten, wie des Lungen- (28), Magen- (29) und Cholangiokarzinom (30) gezeigt werden. Die wachstumshemmenden Eigenschaften beruhten dabei auf unterschiedlichen Mechanismen, insbesondere der Apoptose (28), der Nekrose (31), der Nekroptose (27, 28, 31-33) und dem Zellzyklusarrest (28). Zudem konnte in der Zellkultur des Mammakarzinoms (34) eine Sensibilisierung und für das Oesophagus- (35) sowie das Ovarialkarzinom (36) eine Resensitivierung gegenüber einer Taxantherapie beobachtet werden.

Aufgrund der Daten postulieren wir, dass SHI innerhalb der etablierten Therapie des PCas ein wirkungsvolles Additivum, auch im DX-resistentem PCa, darstellen könnte. In der vorliegenden Arbeit sollte daher evaluiert werden, ob und inwiefern SHI Einfluss auf das therapiesensitive und DX-resistente PCa nimmt.

Dazu wurde ein Panel parental und DX-resistenter PCa-Zellen mit Shikonin behandelt und das Tumorzellwachstum, die Zellzyklusregulation sowie Prozesse, die zum Zelltod führen, untersucht.

2. Literaturdiskussion

2.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt mit 1.600 000 Fällen weltweit die häufigste Krebserkrankung des Mannes dar (1). Dabei ist vor allem die Altersgruppe der über 65-Jährigen von dieser Erkrankung betroffen (37). Für das Jahr 2018 konnte eine standardisierte Neuerkrankungsrate von 99,1 je 100.000 Personen gezeigt werden, die mit einer standardisierten Sterberate von 19,2 und einem mittleren Sterbealter von 80 Jahren einherging (3). Die Häufigkeit des PCa beträgt in der Altersgruppe der 50-59-Jährigen 50%, während in der Altersgruppe der über 80-Jährigen 80% der Männer betroffen sind (38). In den meisten Fällen entwickelt sich das PCa aus den epithelialen Zellen und wird somit zur Gruppe der Adenokarzinome gezählt (39).

Verschiedene Faktoren tragen zu einem erhöhten Risiko bei, im Laufe des Lebens an einem PCa zu erkranken. Zu diesen Faktoren gehören nicht beeinflussbare Risikofaktoren, wie das Alter, die Ethnie und die familiäre Vorgeschichte (40-44). Das höchste Risiko ein PCa zu

entwickeln, weisen dabei afro-amerikanische Männer auf (44). Zu den beeinflussbaren Faktoren zählen die Ernährung, Übergewicht, sexuell übertragbare Erkrankungen und Diabetes Mellitus Typ 2 (42, 45-48).

Die Erkrankung kann mit unspezifischen Symptomen, wie Miktionsbeschwerden, Hämaturie, erektilen Dysfunktionen und Gewichtsverlust einhergehen. Sie verläuft jedoch gerade im frühen Erkrankungsstadium häufig asymptomatisch (49).

Die Deutsche Gesellschaft für Urologie empfiehlt aufgrund des zunächst asymptomatischen Verlaufs und dem mit dem Alter steigenden Risiko an einem PCa zu erkranken in ihrer „S3-Leitlinie Prostatakarzinom“ eine Früherkennungsuntersuchung für Männer ab dem 45. Lebensjahr, die eine digital rektale Untersuchung und ein PSA-Screening beinhaltet (3). Fällt in diesem Rahmen ein erhöhter PSA-Wert auf, oder stellt sich eine karzinomverdächtige Tastuntersuchung dar, folgt eine weitere Abklärung mittels Stanzbiopsie oder Magnetresonanztomographie (MRT) (6).

Konnte mithilfe der Stanzbiopsie ein PCa bestätigt werden, sollten weitere Untersuchungen risikoadaptiert erfolgen. Zur Risikoabschätzung der Tumorausbreitung wird der PSA-Wert und der Gleason-Score hinzugezogen (4). Der Gleason-Score stellt dabei die histopathologische Einteilung des Tumorgewebes dar. Hierzu wird die Dedifferenzierung der Drüsenzellen beurteilt und bewertet. Dabei wird der Grad der häufigsten Veränderung mit dem Grad, der am meisten veränderten Drüsen addiert. Die Werte können fünf Gruppen mit unterschiedlicher Prognose zugeordnet werden (s. Tabelle 1) (4, 50).

Tabelle 1: Gruppeneinteilung anhand des Gleason-Scores mit Übersicht der histologischen Veränderungen der Drüsenzellen in Anlehnung an die Darstellung der histologischen Definition des neuen Einteilungssystem des PCas von Epstein et al. (50)

Gruppe	Zugehöriger Gleason-Score	Beschreibung der Histologie
1	6 (3+3)	Gut differenzierte Drüsen
2	7 (3+4)	Vor allem gut differenzierte Drüsen mit Anteilen aus schlechten differenzierten Drüsen mit kribriformen / verschmolzenen Drüsen
3	7 (4+3)	Vor allem schlechter differenzierte Drüsen mit kribriformen / verschmolzenen Drüsen mit Anteilen aus gut differenzierten Drüsen
4	8 (4+4, 3+5, 5+3)	Entweder nur schlecht differenzierte Drüsen mit kribriformen / verschmolzenen Drüsen oder vor

		<p>allem gut differenzierte Drüsen mit schlecht differenzierten wenig verbundenen Drüsen oder vor allem schlechte differenzierte wenig verbundene Drüsen mit geringem Anteil gut differenzierte Drüsen</p>
5	9-10	<p>Fehlende Drüsenbildung mit nekrotischen Anteilen mit oder ohne schlecht geformte, fusionierte und kribriiforme Drüsenanteile</p>

Zur Stadieneinteilung wird im weiteren Verlauf die UICC-Klassifikation herangezogen, sie beinhaltet die TNM-Klassifikation. Das T steht für die Ausbreitung des Primärtumors, während M die Metastasierung und N den Lymphknotenbefall beschreiben (51). Das PCa wird entsprechend in drei klinische Gruppen unterteilt. Ein lokal begrenztes Stadium wird durch die TNM-Klassifikation T1-2 N0 M0, ein lokal fortgeschrittenes durch T3-4 N0 M0 und das fortgeschrittene durch N1/M1 beschrieben. Dabei kann das lokal begrenzte PCa mithilfe des PSA-Wertes, des Gleason-Scores und der Tumorausdehnung des Primärtumors weiter in drei Gruppen nach d'Amicio unterteilt werden, die ein unterschiedlich hohes Risiko in Bezug auf die Entwicklung eines Progresses haben (6).

Die Behandlung des PCa ist abhängig von der Größe und dem Stadium des Tumors, dem Alter und dem Gesundheitszustand des Patienten sowie der Tumorrisikobewertung (4).

2.2 Therapien

2.2.1 Therapieoptionen des lokal begrenzten PCAs

Liegt ein lokal begrenztes PCa und ein geringes Risikoprofil nach d'Amicio vor, kann zwischen verschiedenen kurativen Therapieoptionen gewählt werden. Zu einem geringen Risikoprofil zählen Patienten mit einem PSA-Level unter 10 ng/ml, einem Gleason-Score von unter 6 sowie einem Tumorstadium cT1/2a, cN0 und cM0. Die zur Option stehenden Behandlungsmöglichkeiten wären die *Active Surveillance*, eine radikale Prostatektomie mit Lymphadenektomie sowie eine externe Bestrahlung oder die LDR-Brachytherapie (4-6). Im Rahmen der *Active surveillance* werden regelmäßige *Screening*untersuchungen durchgeführt und bei Fortschreiten der Erkrankung ein Therapiebeginn eingeleitet. Mit dieser Behandlungsstrategie soll ein zu aggressives Therapieregimes in einem lokal begrenzten Stadium vermieden werden und insbesondere jüngere Patienten vor den Nebenwirkungen

(bspw. Inkontinenz, Impotenz) der Therapien bewahrt werden (5). Ist eine kurative Behandlung aufgrund des Allgemeinzustandes des Patienten nicht indiziert, kann symptomatischen Patienten mit lokal begrenzter Erkrankung eine Androgeneprivationstherapie (ADT) angeboten werden (7). Androgene sind frei im Blut zirkulierende Steroidhormone. Zu ihnen gehört das Testosteron, das vor allem in den Leydig-Zellen des Hodens produziert wird und der Kontrolle durch die Thalamus-Hypophysen-Achse unterliegt (52, 53). Es gelangt durch Diffusion in seine jeweilige Zielzelle und wird dort mithilfe der 5 α -Reduktase in Dihydrotestosteron umgewandelt. Dihydrotestosteron kann an den Androgen-Rezeptor (AR) binden und die Signalkaskade in Gang setzen, die zur Transkription androgenabhängiger Gene führt, die u.a. verschiedene Aufgaben im Zellzyklus übernehmen (52, 54). Zu den Inhibitoren der Androgensynthese zählt beispielsweise Abirateron. Abirateron ist ein CYP17A1 Enzym, das die Testosteronbiosynthese hemmt und damit zu einer verminderten Testosteronproduktion sowohl im Nebennierenrindencortex als auch in den Hoden und der Prostata führt (55).

2.2.2 Therapieoptionen des lokal fortgeschrittenen PCas

Im Rahmen einer lokal fortgeschrittenen Situation mit einem mittleren bis hohen Risikoprofil, mit einem PSA über 10 ng/ml, einem Gleason-Score von über 6 oder einer cT2b- sowie ein cN1-Situation, stehen eine radikale Prostatektomie mit einer Lymphadenektomie sowie ergänzend eine adjuvante Strahlentherapie oder Hormontherapie zur Verfügung. Als Alternative kann eine externe Bestrahlung in Ergänzung mit einer Hormontherapie zum Einsatz kommen (4-6). Ziel der Hormontherapie stellt die Unterbindung der hormonabhängigen Zellproliferation der Tumorzellen dar. Dazu können verschiedene Therapeutika eingesetzt werden, die an unterschiedlichen Stellen in die hormonelle Achse eingreifen (7, 12). Hierzu zählen unter anderem die Gonadotropin-Releasing-Hormon-(GnRH)-Analoga sowie die GnRH-Antagonisten (7, 12). Der Vorteil dieser Therapie ist, dass sie das Langzeitüberleben verbessert, aber auch positive Effekte auf Knochenmetastasen und Knochenschmerzen hat, was insbesondere im fortgeschrittenen und metastasierten PCa von Bedeutung ist, und zu einer Verringerung des PSAs führt (55, 56) Im lokal fortgeschrittenen Stadium kann zunächst auch die *Active Surveillance* angewandt werden (4).

Wird im Verlauf ein biochemisches Rezidiv mit einem erneuten PSA-Anstieg festgestellt (7), kann im Rahmen eines kurativen Therapieansatzes zwischen einer Prostatektomie nach

vorheriger Bestrahlung oder einer Bestrahlung nach vorheriger radikaler Prostatektomie gewählt werden (4-6). Zudem wird die Hinzunahme einer ADT empfohlen.

2.2.3 Therapieoptionen für das fortgeschrittene und metastasierten PCa

Im Rahmen einer metastasierten, hormonsensitiven Situation stehen verschiedene Therapien, auch Kombinationstherapien aus Hormontherapie, insbesondere ADT und Chemotherapie, beispielsweise mit DX, zur Verfügung (7-9). Sweeney C.J. et al. konnten eine Verbesserung des Gesamtüberlebens für eine Kombination aus sechs Zyklen DX mit ADT im Vergleich zu einer alleinigen ADT zeigen (8). Dieses verbesserte sich für die Kombinationsgruppe von 44 Monaten auf 57,6 Monate.

Alle bisher etablierten Therapien sind jedoch durch das Auftreten von Resistenzen zeitlich limitiert, so dass sich unweigerlich das kastrationsresistente PCa ausbildet.

Man spricht von einem kastrationsresistenten PCa (CRPC), wenn es trotz eines erniedrigten Serum-Testosteron unter 50 ng/dl oder unter 1,7 nmol/l zu einem biochemischen Progress oder einem radiologischen Progress mit Auftreten von neuen Metastasen kommt (57-59). Ein Großteil der mit ADT-behandelten Patienten entwickelt dieses im Laufe von drei bis vier Jahren (60). Das mediane Überleben nach Entwicklung eines CRPCs liegt bei 15-36 Monaten (12).

Eine Kastrationsresistenz ist häufig durch Mutationen im Androgen-bindenden Bereich des ARs bedingt, die entweder zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Androgenen als auch zur einer Androgenunabhängigkeit führen kann (52, 60).

Verschiedene Erst- und Zweitlinientherapeutika stehen dem Patienten nach Entwicklung eines CRPCs zur Verfügung (13).

Zur Erstlinientherapie des CRPCs zählen unter anderem die Androgen- bzw. Androgen-Signalweg-Inhibitoren Abirateron und Enzalutamid aber auch das Chemotherapeutikum Docetaxel (61).

In Untersuchungen zu Abirateron konnte beobachtet werden, dass bereits ein Drittel der Patienten eine natürliche Resistenz gegenüber Abirateron aufwiesen und es innerhalb der ersten drei Monate unter Therapie zu einem Fortschreiten der Erkrankung kam (7, 12, 55)

Ein Androgenrezeptor-Blocker, wie das nicht-steroidale Enzalutamid, kann ebenfalls in der Therapie des CRPCs zur Anwendung kommen (7, 12, 55). Enzalutamid entfaltet seine

Wirkung durch kompetitive Hemmung des AR-Rezeptors sowie der Hemmung der Translokation des AR vom Zytoplasma in den Zellkern und durch Inhibition der nukleären Transkription AR-abhängiger DNA-Abschnitte (55).

Die Beobachtung einer natürlichen Resistenz konnte auch für den AR-Antagonist Enzalutamid gemacht werden. Trotz seiner höheren Bindungsaffinität zum AR und der Inhibierung der Translokation des ARs in den Nucleus und die dort stattfindende DNA-Bindung zeigten 25% der Patienten ein Fortschreiten der Erkrankung (7, 11, 12).

Die Resistenzentwicklung ist dabei auf ähnliche Mechanismen wie die Resistenzentwicklung zum CRPC zurückzuführen. So konnte ebenfalls eine Steigerung der Androgen-Biosynthese, Mutationen im AR-Gen, Veränderungen der AR-Signalkaskade, eine gesteigerte Expression von Glukokortikoid-Rezeptoren, eine Herunterregulation des Immunsystems und eine erhöhte Anzahl von neuroendokrinen Zellen nachgewiesen werden (7, 11, 12).

Auf Grund der Resistenzproblematik werden mittlerweile verschiedene Kombinationstherapien untersucht. In einer neueren Studie konnte eine Kombination von DX mit Abirateron im Vergleich zu einer alleinigen Abirateron-Therapie das Gesamtüberleben von 10,9 auf 14,8 Monate und eine Kombination von Enzalutamid plus DX im Vergleich zu Enzalutamid das Gesamtüberleben von 13,6 auf 18,6 Monate steigern (7, 11, 12). Kommt es zur Therapieresistenz im Rahmen der Behandlung mit Abirateron und Enzalutamid könnte eine Chemotherapie mit DX eingeleitet werden und umgekehrt (7, 11, 12).

2.2.3.2 Chemotherapeutika

Das halbsynthetische Chemotherapeutikum Docetaxel (DX) wird der Gruppe der Taxane zugeordnet und wurde ursprünglich aus der Rinde der pazifischen Eibe gewonnen (16). Es führt zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli und zum Einfrieren des Spindelapparates. Dadurch bedingt kommt es zu einem Stillstand der Mitose in der Metaphase, zur Inhibition der Zellteilung und in der Folge zur Apoptose-Induktion (10).

Die Therapie mit DX erfolgt mit 75 mg/m² Körperoberfläche (KÖF) alle drei Wochen in mehreren Zyklen und findet Anwendung bei verschiedensten Tumorerkrankung, unter anderem auch dem fortgeschrittenen PCa (10).

Die Vorteile einer DX-basierten Therapie im Rahmen des mCRPC konnten erstmalig in der TAX 327 Studie aus dem Jahr 2004 gezeigt werden (62). In der dreiarmligen Studie wurde der Einsatz von DX alle 21 Tage, von DX alle 7 Tage und von Mitoxantron in Hinblick auf das

Gesamtüberleben, das Ansprechen von PSA und die PSA progressionsfreie Zeit untersucht. In allen drei Armen wurde zusätzlich Prednisolon gegeben (62). Für das Gesamtüberleben konnte ein signifikanter Unterschied für DX bei Verabreichung alle drei Wochen gezeigt werden. Hier betrug es 18,9 Monate, während es bei den Vergleichsgruppen mit Mitoxantron bei 16,5 Monaten und bei der wöchentlichen Gabe von DX bei 17,4 Monaten lag. Zudem konnte eine bessere Reduktion des PSA-Levels erreicht werden sowie eine verlängerte progressionsfreie Zeit. Seitdem wird DX als Erstlinientherapeutikum im Rahmen des mCRPC verwendet (14). Nach der S3-Leitlinie sollten Patienten mit metastasiertem, kastrationsresistentem PCa eine systemische Therapie mit DX angeboten werden (6). Bei einer symptomatischen Erkrankung sollte über die Möglichkeit einer systemischen Therapie in Kombination mit symptomatischen Therapieansätzen aufgeklärt werden (61). In der ergänzenden CHAARTED-Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten, die an einem hormonsensitiven, metastasierten Prostatakarzinom mit hoher Tumorlast erkrankt sind, von einer Kombinationstherapie aus ADT und DX profitieren (63). Das Gesamtüberleben konnte im Vergleich zu einer alleinigen ADT von 34,4 Monate auf 51,2 Monate im Median gesteigert werden, sodass diesen Patienten ein früherer Beginn mit DX empfohlen wird (63). Entsprechend findet sich in der S3-Leitlinie von 2021 die Empfehlung Patienten mit einem metastasierten, hormonsensitiven PCa mit hoher Tumorlast eine Kombinationstherapie aus ADT und DX anzubieten, während es bei einer niedrigen Tumorlast eine Kann-Entscheidung darstellt (61).

Dabei können verschiedene Nebenwirkungen beobachtet werden. Als Dosis-limitierende ist die Neutropenie anzuführen. Weitere Nebenwirkungen treten häufig im Rahmen von allergischen Reaktionen, Hautreaktionen, Mukositis und Sensibilitätsstörungen auf (10). Beim Auftreten von Dosis-limitierenden Nebenwirkung wie der Neutropenie oder dem neutropenischen Fieber, kann über eine Umstellung der Therapie auf einen zweiwöchigen Therapieabstand mit geringerer Dosis diskutiert werden (61). Es konnte gezeigt werden, dass eine Patientengruppe, die mit 50 mg/m² KÖF am 1. und 14. Tag behandelt wurde, im Gegensatz zur Standardtherapie eine geringere Rate an Neutropenie und Fieber in der Neutropenie bei einer ähnlichen Überlebensrate aufwies (64).

Das Chemotherapeutikum Cabazitaxel (CX) zählt im Gegensatz zu DX nicht zur Erstlinientherapie und kann in Patienten eingesetzt werden, die unter der Therapie mit DX einen weiteren Progress erleiden. Es gehört ebenfalls zur Gruppe der Taxane und unterscheidet sich von DX durch eine verminderte Affinität zum P-Glycoprotein, wodurch es auch nach DX-Resistenz eingesetzt werden kann (65). Auch hier stellt Neutropenie die Dosis-

limitierende Nebenwirkung dar. Zudem kann es zu Hypersensibilitätsreaktionen und Hautreaktionen kommen (16, 17). Es konnte dennoch in einer Phase III Studie eine Verbesserung des Gesamtüberlebens nach einer Therapie mit CX im Vergleich zu einer Therapie mit Mitoxantrone gezeigt werden (15,1 Monate vs 12,7 Monate) (16, 17).

2.2.4 Docetaxel-Resistenz und neue Therapieansätze

Die Chemotherapie mit DX gehört, wie beschrieben, zur Erstlinientherapie des mCRPC und geht mit einer Verbesserung des Gesamtüberlebens einher (7, 11-14). Im Laufe der Behandlung kommt es jedoch zu einer Resistenzentwicklung gegenüber der Taxan-basierten Chemotherapie, so dass nur wenige Optionen zur weiteren Behandlung des Patienten bleiben.

Tumorzellen weisen mehrere Mechanismen auf, die Wirksamkeit der Taxane zu reduzieren (66).

Zum einen kann eine Hochregulation des Effluxtransportes p-Glykoprotein, zu einem erhöhten Transport des Taxans aus der Zelle herausführen (12, 16, 66-68). P-Glykoproteine gehören zur Gruppe der *multi-drug-resistance* Proteine und resultieren in erhöhter Anzahl in einer verringerten intrazellulären Konzentration des Chemotherapeutikums. Dies trifft insbesondere auf DX zu, das im Vergleich zu CX eine deutlich höhere Affinität zu p-Glykoprotein aufweist (65).

Neben einer gesteigerten Anzahl an Efflux-Transportern kann auch eine verminderte Zahl an Influx-Transportern zu einer verringerten Taxan-Konzentration im Zytosol führen (12).

Des Weiteren können verschiedene Mechanismen, die die Mikrotubuli betreffen, zu einer Resistenzentwicklung beitragen. Zu diesen gehören Mutationen im Bereich der Bindungsstelle. Dadurch kommt es zu Veränderungen der molekularen Interaktion, sodass eine adäquate Bindung nicht stattfinden kann und damit der stabilisierende Effekt herabgesetzt wird (12, 16, 66-69). Zum anderen kann eine veränderte Zusammensetzung der Mikrotubuli in einem erhöhten Anteil an beta III-Tubulin und somit in einer erhöhten Instabilität des Mikrotubuli-Apparates resultieren, was ebenfalls dem Effekt der Taxane entgegen wirkt (66, 69).

Weiterhin kann eine erhöhte Aktivität des Mikrotubuli-Apparates zu einer Unwirksamkeit der Taxane führen (67). Dies konnte in Lungenkarzinomzellen beobachtet werden. Es kommt dabei zu einer Steigerung der Verlängerung und der Verkürzung der Mikrotubuli sowie zu

einem schnelleren Wechsel zwischen aufbauenden und abbauenden Phasen. Dieser Effekt wirkt ebenfalls der Stabilisierung durch die Taxane entgegen (67).

Zudem konnten Mechanismen beschrieben werden, die den Eintritt der Zelle in die Apoptose über eine Aktivierung und Hochregulation von Bcl-2 verhindern. Auch wird vermutet, dass eine Veränderung der Bindungsstelle an den Mikrotubuli für DX zu einer Verminderung der Mikrotubuli stabilisierenden Wirkung führt und damit der Übergang in den Zellarrest und die Apoptose verhindert wird (12).

Neben einer Hochregulation von Bcl-2 kann eine Aktivierung des PI3/Akt-Signalweges zu einer Wachstumsförderung von Tumorzellen führen. Dies findet über eine Hochregulation von pAKT und damit einhergehend mit einer Inaktivierung von PTEN statt und geht mit einer Inhibition der zellzyklusinhibierenden Prozesse einher und kann ebenfalls zu einer Taxanresistenz beitragen (66).

Weiterhin konnten Kreuzresistenzen zwischen kastrationsresistenten und DX-resistenten PCa-Zelllinien gezeigt werden. Taxane führen ebenfalls zu einer Inhibition des Androgenrezeptortransports in den Zellkern sowie zu einer Unterdrückung der Androgenrezeptorexpression. Der genaue Mechanismus der Kreuzresistenzentwicklung ist zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt (66).

Auch konnte sowohl an Melanom- als auch an PCa-Zellen gezeigt werden, dass das Auftreten von Karzinom-Stammzellen mit einer Taxanresistenz einhergehen kann (66).

Auf Grund der bisherigen Daten, vornehmlich in DX-Einzeltherapien, wird überprüft, ob Kombinationstherapien und eine Veränderung der Chemotherapiezyklen mögliche Strategien zur Vermeidung einer Taxanresistenz darstellen könnten (66, 68). Insgesamt wird weiterhin dringend nach neuen Therapieoptionen und ergänzenden Therapieansätzen gesucht.

2.3 Komplementäre und alternative Medizin

Die Bezeichnung komplementäre und alternative Medizin (CAM) umfasst u.a. die Behandlung mit Naturstoffen alternativ oder in Kombination mit den etablierten Therapien (18). Diese zusätzlichen Therapieansätze haben in den letzten Jahren zunehmend Aufmerksamkeit erlangt (19). So wünschten immer mehr Tumorpatienten die Einbeziehung alternativer Behandlungskonzepte. Dieser Patientenwunsch ergibt sich aus dem Bedürfnis, aktiv an der Behandlung ihrer Erkrankung beteiligt zu sein. Zudem werden alternative Therapien häufig als harmlos und frei von Nebenwirkungen empfunden. Die Patienten

erhoffen sich, durch ihre Anwendung eine Stärkung des Immunsystems, eine Verbesserung der Symptome, die durch die Erkrankung hervorgerufen werden, eine Reduktion von Nebenwirkungen der etablierten Therapien und eine allgemeine Stärkung dieser (20, 21). Nur wenige Patienten glauben dabei an eine Heilung allein durch alternative Verfahren (18-21).

Auch 25-50% mit PCa diagnostizierte Patienten wenden komplementäre Behandlungsmethoden an (70). In dieser Patientengruppe finden vor allem neben Antioxidantien, Granatapfelextrakt, Curry und verschiedenen Vitaminen Kräuter Anwendung. Für einige Pflanzenbestandteil, wie Curcumin, konnten bereits antitumorale Effekte in Zell- und Tierversuchen gezeigt werden (70-72). Klinische Studien zu den Naturstoffen sind in der Regel jedoch nicht vorhanden

Ebenfalls zur CAM zählt die Traditionelle Chinesischen Medizin (TCM) (22). Sie umfasst die Diagnostik, die Therapie und die Prävention von Erkrankungen. Die Grundlage stellt ein über 2.000 Jahre übermitteltes und gesammeltes Wissen dar (22-25). In den letzten Jahren hat die TCM auch in der westlichen Welt immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sie bietet ein breites Spektrum an Kräutern, die zur Therapie genutzt werden und die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente darstellen könnten. So kommt Artemisinin z.B. in der Malariatherapie zum Einsatz. Da evidenzbasierte Daten zu Naturstoffen bisher kaum oder gar nicht vorhanden sind, ist ihre Verwendung im klinischen Alltag nicht vertretbar. Aufgrund der vielfachen Nutzung der Stoffe und der steigenden Popularität, sind Studien notwendig, um wissenschaftlich fundierte Daten zu schaffen und die Wirkung bzw. mögliche Kontraindikationen durch die Naturstoffe bewerten zu können. So wäre statt der derzeitigen häufig heimlichen Einnahme zukünftig eine evidenzbasierte und kontrollierte Verabreichung möglich (22-25).

2.3.1 Shikonin

Shikonin (SHI), gewonnen aus der getrockneten Wurzel von *Lithospermum erythrorhizon*, stellt eine Hauptzutat in *Zicao*, einem Bestandteil der TCM, dar (73). *Zicao* findet seit Jahrhunderten in der TCM Anwendung und wird bei Wunden, Verbrennungen und Hauterkrankungen eingesetzt. Chemisch gehört es zur Gruppe der Naphtoquinone und stellt ein Enantiomer des Alkanins dar (26). Es konnten antimikrobielle sowie heilungsfördernde, antiinfektiöse aber auch erste Hinweise für antitumoröse Eigenschaften nachgewiesen werden (26, 74). Die bisher bekannten antitumoralen Eigenschaften von SHI werden auf vier Haupteffekte zurück geführt (27). Diese sind erstens die Beeinflussung der mitochondrialen

Funktion, zweitens die ROS-Induktion und DNA-Schädigung mit darauffolgender Apoptoseinduktion durch z.B. Inaktivierung von NF- κ B mit gleichzeitiger Aktivierung von Caspasen 9 und 3 und p53, drittens der Zellzyklusarrest sowie viertens die Interaktion mit dem Zytoskelett und damit verbunden die Veränderung der Zellmigration. Diese Effekte konnten bereits in verschiedenen Tumorentitäten, wie Adenokarzinom der Lunge, Brustkrebs, Pankreaskarzinom und Osteosarkom, gezeigt werden (27, 28, 32). So resultierte die Behandlung mit SHI in Zellen des Magenkarzinoms in einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase und Modulation zellzyklusregulierender Proteine (29). Weiterhin initiierte SHI in Studien an Zellen des Gallenblasenkarzinoms einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase (75). Zudem kann es konzentrationsabhängig auch zur Induktion von Nekrosen kommen (76). An Zelllinien des Adenokarzinoms der Lunge, des Brustkrebses, des Pankreaskarzinoms und des Osteosarkoms konnte zudem neben dem Zellzyklusarrest und der Wachstumsinhibition eine Induktion der Autophagie festgestellt werden (28).

Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms zeigten nach SHI-Gabe eine Inhibition der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), der Migration und der Invasion durch Inaktivierung von IL-6, das ein Schlüsselprotein der Tumorentwicklung- und Metastasierung ist (73). Zudem führte SHI dosis- und zeitabhängig im kleinzelligen Lungenkarzinom sowohl zu Apoptose als auch zu Nekrose, zu einer Erhöhung von p53 sowie zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase (77). Auch war es SHI möglich, eine Apoptose in Gefitinib-resistenten Nichtkleinzelligen-Lungenkarzinom-(NSCLC)-Zellen durch Steigerung von ROS zu induzieren, was ebenfalls in Zelllinien des Cholangiokarzinoms beobachtet werden konnte (30, 78). In einer klinischen Studie mit Lungenkarzinom-Patienten im palliativen *Setting* konnte durch SHI eine Verbesserung der Lebensqualität nachgewiesen werden (79).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SHI eine Chemotherapieresistenz bspw. in Brustkrebszellen durch Induktion von Nekroptose umkehren kann (33). Eine Resensitivierung konnte zudem durch SHI in Gefitinib-resistenten NSCLC-Zellen und Bortezomib-resistenten multiplen Myelomzellen detektiert werden (78, 80). Zudem konnte an Zelllinien des Ovarialkarzinoms eine Resensitivierung dieser gegenüber einer Taxantherapie durch Aktivierung von ROS in Kombination mit SHI beobachtet werden (36).

In verschiedenen Studien konnte zudem durch Kombination von SHI und dem entsprechenden Chemotherapeutikum ein besseres Ansprechen gezeigt werden. So konnte für das hepatozelluläre Karzinom und das Magenkarzinom eine Sensibilisierung gegenüber den jeweiligen Chemotherapeutika, hier Arsentrioxid (ATO) sowie 5-Fluorouracil (5-FU) und

Oxaliplatin festgestellt werden (81, 82). Die Kombination aus SHI und ATO führte zu einem selektiveren Ansprechen der Zellen des hepatozellulärem Karzinoms und zu proapoptotischen Effekten. Diese können durch die Erhöhung des oxidativen Stresses als auch des Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Stresses erklärt werden (81, 83). Im Magenkarzinom konnte eine Sensitivierung gegenüber 5-FU und Oxaliplatin bereits durch Hinzufügen einer niedrigen Dosis SHI beobachtet werden (82). Auch führte die Kombinationstherapie aus SHI und Paclitaxel zu einer verbesserten Wirkung des Paclitaxels gegenüber Ösophaguskarzinomzellen durch Apoptoseinduktion, die mit einer erhöhten p53- und verminderten Bcl-2-Expression einher gingen (35). Eine Sensitivierung durch SHI gegenüber einer Therapie mit Taxanen konnte an Zelllinien des Mammakarzinoms gezeigt werden (34).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SHI über verschiedene Mechanismen, insbesondere Zellzyklusarrest, Apoptose und Nekroptose, hemmend auf das Wachstum von Tumorzellen wirken kann (27, 73, 76). Weiterhin kann es eine Sensibilisierung und Resensibilisierung der Tumorzellen gegenüber etablierten Therapeutika bewirken (27, 73, 76-82, 84).

2.3.2 Shikonin und seine Wirkung auf das PCa

Erste Studien haben bereits einen Einfluss von SHI auf native (parentale) PCa zeigen können. So war nach SHI-Behandlung eine konzentrations- und dosisabhängige Wachstumsreduktion in DU145, PC3 und LNCaP zu beobachten (85-90).

Diese war auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen. Jang et al. postulierten eine Wachstumsinhibition durch Herunterregulierung der Konzentration des ARs sowohl im Zytosol als auch im Nukleus des PCas (85). Die Wachstumsinhibition fand dabei in einem Konzentrationsbereich von 2-4 μM SHI nach sechsständiger Behandlungsdauer statt (85). In einer weiteren Studie konnte die Wachstumsinhibition durch SHI auf eine Apoptoseinduktion zurückgeführt werden und die Wirkung durch Herunterregulation des Apoptoseinhibitors GRP78 aufgehoben werden (86). Zudem konnte sowohl eine Inhibition der Migration als auch der Metastasierung in parentalen PC3 und DU145 beschrieben werden (87). Die Zugabe von SHI führte zu Interaktionen im AKT/mTOR und ROS/ERK1/2 Signalweg. Dadurch bedingt kam es zu einer verminderten Expression von relevanten Mediatoren der Metastasierung. Zudem konnte ein Zellzyklusarrest und Modulation apoptoseregulierender Proteine gezeigt werden (87). Des Weiteren konnte eine Apoptoseinduktion der PCa-Zellen über den mitochondrialen Weg nachgewiesen werden (88).

Zudem konnten Wang et al. nach SHI-Gabe eine Resensibilisierung von CX-resistenten DU145-Zellen gegenüber CX und eine Wirkung auf die PCa-Stammzellen nachweisen (89). Es konnte dabei gezeigt werden, dass SHI die Proliferation, Migration und Invasion der Stammzellen inhibiert.

Daten zur Wirkung von SHI auf das progressive Wachstumsverhalten von DX-resistenten PCa waren bisher nicht publiziert.

Auf Grund der antitumoralen Effekte in anderen Tumorentitäten und parentalen PCa-Zellen postulieren wir, dass SHI auch bei bereits DX-resistenten PCas ein wirkungsvolles Additivum darstellen könnte. In der vorliegenden Arbeit sollte daher eruiert werden, ob und inwiefern SHI eine Resensibilisierung DX-resistenter PCa-Zellen zu bewirken vermag und welche Wirkung es auf das Wachstumsverhalten parentaler sowie DX-resistenter PCa-Zellen hat.

2.4 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es zu klären, ob und inwieweit SHI Einfluss auf das Wachstumsverhalten insbesondere auch DX-resistenter PCa-Zellen nimmt und die PCa-Zellen zu resensitivieren vermag.

Folgende Fragestellungen lagen der Studie zugrunde:

- 1) Welchen Einfluss übt SHI auf das Tumorzellwachstum und die Proliferation der parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen aus?
- 2) Wie beeinflusst SHI dabei die Verteilung der PCa-Zellen in den Zellzyklusphasen?
- 3) Mit welchen molekularen Veränderungen gehen die Veränderungen des Zellzykluses einher?
- 4) Welche Zelltode vermag SHI in parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen zu induzieren?

Dazu wurde

- 1) sowohl das Wachstum als auch die Proliferation der mit SHI behandelten PCa-Zellen mittels MTT- bzw. BrdU-Test untersucht.
- 2) durch die FACscan-Analyse der Anteil der Zellen in der G1-, G2/M- und S-Phase bestimmt.
- 3) die Expression und Aktivität zellzyklusregulierender Proteine mittels Western Blot Analyse analysiert.

- 4) der Anteil apoptotischer und nekrotischer PCa-Zellen mittels FACScan-Analyse evaluiert.

2 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Produkt.Nr.	Firma	Firmensitz
AE2000 Binocular	630-1316	Motic	Hongkong, China
Bunsenbrenner, FIREBOY eco	451-0136	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
CO ₂ Incubator HERAcell®VIOS 160i		Heraus Instruments	Hanau, Deutschland
Dichtung Mini- PROTEAN® Casting Stand Gaskets	1653305	Biorad	München, Deutschland
Durchflusszytometer Fortessa X20	X20	Becton Dickinson	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN Tetra Cell	1658000	Biorad	München, Deutschland
Gelgießrahmen	1658000	Biorad	München, Deutschland
Gelgießstand	1658000	Biorad	München, Deutschland
Gel Releaser	1653320	Biorad	München, Deutschland
Glasplatte (1 mm; 1,5 mm)	1653311	Biorad	München, Deutschland
Glasplatte <i>Short plate</i> 1653308		Biorad	München, Deutschland
Heraeus Megafuge 16R Zentrifuge	75004270	Heraus Instruments	Hanau, Deutschland
Herasafe™ KS Sicherheitswerkbank		Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Kamm 10 well	1653359	Biorad	München, Deutschland
Kamm 15 well	1653360	Biorad	München, Deutschland
LAUDA Aqualine AL 18	LCB0726	LAUDA DR. R: Wobser GmbH & CO. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
LUNA™ Automated Cell Counter	L10001	logos Biosystems	Villeneuve-d'Ascq, Frankreich
Megafuge® 1.0R	75003060 ⁰²	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Mikrozentrifuge Hereaus Fresco 21	75002425	Thermo Scientific Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe accu-jet® pro	26301	Brand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	1645050	Biorad	München, Deutschland
Rollenmischer Stuart SRT9	1126-302-02	Cole-Parmer	Stone, Großbritannien
Tecan-Reader, Spark 10M	33643,8	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	1704155	Biorad	München, Deutschland
VACUSAFE- Absaugsystem	158320	INTEGRA	Biebertal, Deutschland
Vortexer	RS-VA 10	Phönix Instruments	Garbsen, Deutschland

Tabelle 3: Programme

Name	Firma	Firmensitz
BD FACSDiva Software 8.0.2	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
FlowJo 10.5.3 public domain license	FlowJo LLC	Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism 7™	GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ 1.8.0_112 public domain license (Wayne Rasband)	National Institutes of Health	Bethesda, Maryland, USA
Magellan™	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel 2010	Microsoft Cooperation ©	Redmond, Washington, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Cooperation	Redmond, Washington, USA
Modfit 5.0.9 public domain license	Verity Software House	Topsham, Main, USA
Azure Capturing Software	Azure Biosystems	Dublin, Kalifornien, USA

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Name	Produktnr	Firma	Firmensitz
------	-----------	-------	------------

Cell Counting Slides	L12001	logos Biosystems	Villeneuve-d'Ascq, Frankreich
Eppendorf Tubes® 5.0 mL mit Schraubdeckel	30122305	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar® 25 cm ²	690175	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Filter Top Zellkulturflaschen Cellstar® 75 cm ²	658175	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Mikroreaktionsgefäß 0,5 ml	30108035	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	30108051	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 2 ml	30108078	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Nunc™ Kryoröhrchen	375418	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts
Petrischalen steril 145X20 mm	639160	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Pipetten (serologisch) 5 ml	606180	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Pipetten (serologisch) 10 ml	607180	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Pipetten (serologisch) 15 ml	760180	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Pipetten (serologisch) 25 ml	760180	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Pipetten (serologisch) 50 ml	768 180	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen 10 µl	VT0200	STARLAB GmbH	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 20 µl	VT0220	STARLAB GmbH	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 100 µl	VT0230	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	VT0240	STARLAB GmbH	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1.000 µl	S1126-7810	STARLAB GmbH	Hamburg, Deutschland

Falcon-Röhrchen mit runden Bündeln mit Kappe	51709950	Corning	New York, New York, USA
Falcon-Röhrchen 15 ml	188271	Greiner	Kremsmünster, Österreich
Falcon-Röhrchen 50 ml	227261	Greiner	Kremsmünster, Österreich
96-Well-Platte	657160	Greiner	Kremsmünster, Österreich

Tabelle 5: Chemikalien

Name	Produktnr.	Firma	Firmensitz
11875 RPMI 1640	R8758	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
1N HCl	K025.1	Roth Carl GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Accutase Enzyme cell Detachment	51782359	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA.
Ammoniumperoxisdsulfat (APS)	9592.3	Roth Carl GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa (H ₂ O ₂)	7151-5	Fresenius Kabi A	Bad Homburg, Deutschland
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	556547	BD Pharmingen	Allschwil, Schweiz
Antibiotic-Antimycotic (100 x)	15240062	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts
Aqua dest. / Ampuwa steril	53509414	Fresenius	Bad Homburg, Deutschland
BIO-RAD Trans-Blot Turbo 5 x Transfer Puffer	10026938	Biorad	München, Deutschland
BrdU Cell Proliferation Assay QIA58	51825229	Merck	Darmstadt, Deutschland
BSA	A2153	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Zell Proliferation ELISA BrdU COLORIM	51212477	Roche	Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G250	42655	Roth Carl GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8418	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Docetaxel purum 87 % 01885-5 mg	51778594	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
DTT	3483.12.3	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
EDTA	17892	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Essigsäure 100 %	51755481	Roth Carl GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol abs.	51768635	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
GlutaMAX	51232712	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
4 x/6 x Laemmli Sample Buffer Radiance plus (ECL Lösung)	512103	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Magermilchpulver (nfd Milchpulver)	A0830,0500	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Methanol	1060081000	Merck	Darmstadt, Deutschland
MTT-Formazan	M2003	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
NaCl	3957.2	Roth Carl GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Na-deoxycholat	89905	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
NP-40	492016	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	14190169	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Phosphorsäure	2608.1	Roth Carl GmbH & Co	Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	10837091001	Roche	Mannheim, Deutschland
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained	1610375	Biorad	München, Deutschland

Protein Standards			
Propidium Iodid (PI)	P1304MP	Molecular Probes	Eugene, Oregon, USA
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2	P5726-1ML	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Protease-Inhibitor-Cocktail	P8340-1Ml	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Radiance plus (ECL Lösung)	1704155	Biorad	München, Deutschland
RNase A	R5125-25MG	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Rotiphorese® 10 x SDS-PAGE	3060.1	Roth Carl GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel A	3037.1	Roth Carl GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel B	3039.1	Roth Carl GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
SDS	1610302	BioRad	München, Deutschland
Schwefelsäure 1N	51758582	Roth Carl GmbH & Co.	Karlsruhe, Deutschland
Shikonin S7576-10 mg	51823270	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	T 7042	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ RTA Midi PVDF Transfer Kit	1704273	Biorad	München, Deutschland
Tris-HCL	J67501	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Triton X-100	X100PC	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trizma® base (Tris)	T-8524	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau	15250	Invitrogen	Carlsbad, Kalifornien, USA
Trypsin EDTA 0,25 %	T4049	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland

Tween 20	A4974,0100	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
----------	------------	----------------	------------------------

Tabelle 6: Antikörper

Name	Produkt-Nr.	Firma	Firmensitz
Anti-β-Actin-AK	51284465	Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Anti-CDK1-Antikörper	51828272	BD Transduction Laboratories	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Anti-CDK2-Antikörper	51828273	BD Transduction Laboratories	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Anti-Cyclin-A-Antikörper	51828277	BD Transduction Laboratories	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Anti-Cyclin-B-Antikörper	51828276	BD Transduction Laboratories	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Anti-Cyclin-D1-Antikörper	554181	BD Transduction Laboratories	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Anti-mTOR-AK	ab2732	Abcam	Cambridge, UK
Anti-pmTOR-AK	#2971	Cell Signaling	Cambridge, UK
Anti-PTEN-AK	#9188	Cell Signaling	Cambridge, UK
Anit-p27 610242	51828279	BD Transduction Laboratories	Franklin Lakes, New Jersey, USA
pCDK1/CDC2 4539S	51780194	New England Biolabs	Ipswich, Massachusetts, USA
pCDK2 T160 2561S	51828475	Cell Signaling	Cambridge, UK

P21 Waf1/Cip1 12D1 2947“	51810685	New England Biolabs	Ipswich, Massachusetts, USA
-----------------------------	----------	------------------------	-----------------------------

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
10 % APS	0,1 g APS 1 ml H ₂ O _d
10 % SDS-Puffer	10 g SDS 100 ml H ₂ O SDS muss einmal bei 37°C gelöst werden
Solubilisierungspuffer	10 % SDS 0,01 N HCL
12 mM MTT ((4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	5 mg MTT 1 ml PBS
BrdU-Labeling Solution	BrdU-Labeling Soltuion 1:100 m mit DPBS
Extraktionspuffer	950 µl RIPA-Puffer (1 x) 10 µl DTT (0,5 mM) 10 µl Protease Inhibitor Cocktail 10 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 10 µl PMSF (100 mM) 10 µl Triton X-100
RIPA-Puffer	50 mM Tris HCL pH 7,4 5 ml NP-40 2,5 g Na-deoxycholate 0,5 g SDS 150 mM NaCl 2 mM EDTA Auf 500 ml Aqua dest auffüllen
5 x Bradfordreagenz	300 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 150 ml Methanol 150 ml Aqua dest. 300 ml 85 % Phosphorsäure
Sammelgel-Puffer	66,1 g Tris in 400 ml H ₂ O _d lösen pH auf 6,8 mit 5 M HCl einstellen auf 500 ml mit H ₂ O _d auffüllen
1 x Trans-Blot Turbo-Transfer-Puffer	200 ml 5 x Transferpuffer

	600 ml H ₂ O _{dd} 200 ml Ethanol absolut
1 x SDS-Laufpuffer	100 ml 10 x SDS-Laufpuffer 90 ml H ₂ O _{dd}
10 x TBS	Tris-HCl 26 g Tris 4,24 g NaCl 292,7 g pH auf 7,4 mit HCl einstellen auf 1 l mit H ₂ O _d auffüllen
1 x TBS	100 ml 10 x TBS 900 ml H ₂ O _d
1 x TBST	100 ml 10 x TBS 900 ml H ₂ O _d 1 ml Tween20
Blockierlösung	5 g nfd Milchpulver 50 ml TBS
Trenngel-Puffer	66,1 g Tris in 400 ml H ₂ O _d lösen pH auf 8,8 mit %M HCl einstellen auf 500 ml H ₂ O _d auffüllen

3.2 Zelllinien

Die verschiedenen PCa-Zelllinien, PC3, DU145 und LNCaP, wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erworben. Die jeweilige dazugehörige DX-resistente Untergruppe lieferte die *Resistant Cancer Cell Line (RCCL) Collection* (<https://research.kent.ac.uk/industrial-biotechnology-centre/the-resistant-cancer-cell-line-rccl-collection/>) (91).

3.2.1 PC3

Zelllinie aus der Knochenmetastase eines 62-jährigen kaukasischen Mannes, mit einem Adenokarzinom (G4) der Prostata. PC3-Zellen sind adhärent, wachsen als einschichtiger Zellrasen und sind androgenresistent (92).

3.2.2 DU145

Zelllinie aus der Hirnmetastase eines 69-jährigen kaukasischen Mannes, der an einem PCa erkrankt war (G2). DU145-Zellen sind adhärent, wachsen als einschichtiger Zellrasen und weisen ebenfalls eine Androgenresistenz auf (93).

3.2.3 LNCaP

PCa-Zelllinie aus dem Isolat einer Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen kaukasischen Mannes. LNCaP-Zellen sind, wie die anderen beiden, adhärent und wachsen als einschichtiger Zellrasen, sind jedoch androgensensitiv (94).

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultivierung

Aufgrund der Heterogenität des PCas wurde ein Zellpanel mit sowohl hormonnaiven (LNCaP) als auch kastrationsresistenten PCa-Zelllinien (PC3 und DU145) verwendet. Dabei kamen jeweils DX-sensitive (parentale) versus DX-resistente Zellen zum Einsatz. Zu Beginn der Studie wurden die Zellen, nach Lagerung in einem Flüssigstickstofftank (-196°C), aufgetaut. Als Einfriermedium wurde 70 % des Grundmediums gemischt mit 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Zum Auftauen wurde das jeweilige Kryoröhrchen, das die Zellen enthielt, für wenige Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben. Anschließend wurden die aufgetauten Zellen in eine 75 cm² Zellkulturflasche, in die 9 ml RPMI-Nährmedium vorgelegt wurde, überführt. Das Nährmedium war dabei mit 10 % fötalem Rinderserum, 2 % HEPES Puffer, 1 % GlutaMAX sowie 1 % Penicillin/Streptomycin ergänzt. Die DX-resistenten PCa-Zellen wurden zudem fortlaufend mit einer Erhaltungsdosis von 10 ng/ml DX behandelt. Nach Inkubation über Nacht im CO₂-Inkubator (37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂,) wurde das Medium komplett entfernt, die Flasche mit PBS gewaschen und 12 ml frisches Medium hinzugegeben.

Die Vitalität und Dichte des Zellrasens wurde in den darauffolgenden Tagen mithilfe eines binokularen Mikroskops beurteilt. Sobald ein konfluenter Zellrasen vorlag, konnten die Zellen sowohl umgesetzt als auch für Versuche verwendet werden. Die in dieser Studie verwendeten Zellreihen PC3 und DU145 wiesen bei einer Umsetzrate von 1/5-1/6 zumeist nach 2-3 Tage einen konfluenten Rasen auf, während die LNCaP Zellreihen bei einer Umsetzrate von 1/3-1/4 nach 3-4 Tagen einen konfluenten Zellrasen aufwiesen.

Der erste Schritt des Umsetzens stellte das Entfernen des alten Mediums und das Waschen mit ~4 ml PBS dar. Daraufhin wurden 2 ml Trypsin (EDTA 0,25 %) in die Flasche überführt und zur Beschleunigung des Ablösevorgangs die Flasche für 5-6 Minuten (min) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion mit 4 ml RPMI-Medium abgestoppt und die Zellen durch leichtes Abklopfen und Resuspendieren homogenisiert. In Abhängigkeit von der Umsetzrate wurde das Verhältnis von Zellsuspension zu frischem Medium gewählt.

3.3.2 Zellzahlbestimmung

Zur Vorbereitung verschiedenster Versuchsreihen gehörte die vorherige Einstellung der verwendeten Zellzahl / ml. Dazu wurden die Zellen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, vom Boden abgelöst und in 10 ml RPMI-Nährmedium aufgenommen. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau versetzt. Davon wurden 10 µL in die Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellen mithilfe eines automatischen Zellzählers (LUNA™ Automated Cell Counter) gezählt. Die toten Zellen konnten durch die Blaufärbung mit Trypanblau von den vitalen Zellen unterschieden werden. Das Gerät gab nun die Gesamtzahl der Zellen pro ml, sowie die Gesamtzahl der vitalen und die Gesamtzahl der gefärbten, toten Zellen an. Die Gesamtzahl der vitalen Zellen wurde zur Zellzahleinstellung verwendet. Die Anzahl der Zellen pro ml ergab sich aus der gewünschten Zellzahl / ml und der gezählten Zellzahl / ml.

Die Formeln hierfür lauteten:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{gezählte Zellen (Mittelwert)}}{\text{Fläche x Verdünnung x Kammerhöhe}}$$

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{gezählte Zellen (Mittelwert)}}{1 \text{ mm}^2 \times 1:10.000 \times 0,1 \text{ mm}}$$

Zellen pro ml einstellen:

$$\text{Anzahl der Zellen / ml} = \frac{\text{Gewünschte Zellzahl / ml} \times 1.000 \mu\text{l}}{\text{Gezählte Zellen / ml (Mittelwert)}}$$

3.3.3 Tumorzellwachstum - MTT-Zellvitabilitätsassay

Die Bestimmung des Einflusses von SHI auf das Wachstum der PCa-Zellen erfolgte durch indirekte Zellzahlbestimmung mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)-Assay (95, 96).

Dazu wurde das Tetrazoliumsalz MTT verwendet, das in vitalen Zellen zu einem wasserunlöslichen Formazan reduziert wird (95). Dadurch kommt es zu einer Farbänderung von gelb nach blau (88). Das Salz konnte nun mithilfe des Solubilisierungspuffers aus den vitalen Zellen gelöst und bei einer Wellenlänge von 579 nm im Multi-Mikroplatten-Lesegeräte (Tecan-Reader, Spark 10M) gemessen werden. Die Intensität des Farbumschlags unter Verrechnung mit einer Eichkurve ergab Aufschluss über die Anzahl vitaler Zellen.

Vor Versuchsbeginn wurde entsprechend eine Eichkurve für jede PCa-(Sub)Zelllinie erstellt.

Hierfür wurden die zu verwendeten PCa-Zellen vom Flaschenboden abgelöst, wie in 3.1.1 beschrieben, und wie in 3.1.2 beschrieben auf 1.600.000 Zellen pro ml Nährmedium eingestellt. Davon wurde zunächst 1 ml in ein 5 ml Eppendorf Gefäß überführt. In jedes weitere Eppendorf Gefäß wurde 1 ml Nährmedium vorgelegt und aus dem vorherigen Gefäß 1 ml Zellen in das nächste überführt und mithilfe eines Vortex vermischt. Hierdurch ergab sich eine Konzentrationsreihe, die von 1.600.000 Zellen pro ml auf 80.000, 40.000, 20.000, 10.000, 5.000, 2.500 Zellen / ml abfiel. Nun wurden 100 µl von jeder Verdünnung in einem dreifachen Ansatz auf die 96-Wellplatte überführt. Zusätzlich wurde ein „Blank“ als Hintergrundkontrolle mitgeführt. Den Eichkurvenzellen wurden direkt 10 µl MTT hinzugefügt und die Zellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach 4 h wurden 100 µl Solubilisierungspuffer in jedes Well pipettiert. Über Nacht wurden die 96-Wellplatten erneut bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen bei 570 nm im Tecan-Reader (Spark 10M) gemessen. Die daraus gewonnene Eichkurve konnte für die folgenden Messungen zur Zellzahlbestimmung in den Wells verwendet werden.

Die parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen wurden für die Versuchsreihen für 24, 48 und 72 h mit aufsteigenden Konzentrationen von SHI [0,1-1,5 μM / ml] behandelt. SHI-unbehandelte parentale und DX-resistente PCa-Zellen dienten als Kontrollen.

Zunächst erfolgte dazu die Einstellung der Zellzahl auf 100.000 Zellen pro ml. Daraufhin wurden je 50 μl dieser Zellsuspension (5.000 Zellen) in einem dreifachen Ansatz auf die 96-Wellplatten überführt. Dabei wurden die DX-resistenten Zellen fortlaufend mit DX behandelt. Da im Well eine 1:1 Verdünnung stattfand, wurden 50 μl einer doppelt konzentrierten Shikonin-Lösung in jedes Well pipettiert. Die Platten wurden dann jeweils für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert, um neben einer Dosis-Wirkung auch einen zeitlichen Verlauf aufzeigen zu können. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden 10 μl MTT in jedes Well pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C ebenfalls mit Solubilisierungspuffer gestoppt und am nächsten Morgen bei 570 nm (Referenz 700 nm) im Tecan-Reader (Spark 10M) gemessen. Die Ergebnisse konnten dann mit der entsprechenden Eichkurve verrechnet und die jeweilige Zellzahl ermittelt werden.

3.3.4 BrdU-Proliferationsassay

Der 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) – Test diente zur Quantifizierung der Proliferation.

BrdU wird als Analogon des Thymidins anstelle dessen in die DNA eingebaut und mithilfe eines Antikörpers sichtbar gemacht. An dem Antikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Nach Zugabe des Tetra-Methylbenzidine (TMB) kommt es, katalysiert durch die Peroxidase, zu einem Farbumschlag, der photometrisch gemessen werden kann (97).

Zur Vorbereitung wurde zunächst die BrdU-Arbeitslösung hergestellt und die Anti-BrdU Antikörper 1:100 verdünnt und bei -20°C gelagert. Zudem wurde 0,5 M H_2SO_4 angesetzt.

Der Versuchsaufbau ähnelte dem Aufbau des MTT-Assays. Auch hier wurde jede PCa-Zelllinie für 24 h, 48 h und 72 h mit einer aufsteigenden Konzentration SHI [0,5 μM / ml-0,8 μM / ml] behandelt. Dazu wurde für jede Zelllinie eine Platte für den Zeitpunkt 24 h, 48 h und 72 h angelegt. Hier war im Unterschied zum MTT-Assay eine weitere Kontrollreihe für die Kontrolle der unspezifischen Bindung des BrdU-Antikörpers nötig.

Die Behandlung mit BrdU erfolgte jeweils 24 h vor Versuchsende. Dazu wurden 10 μl BrdU-Arbeitslösung in jedes Well pipettiert und über 24 h bei 37°C inkubiert. Es musste darauf geachtet werden, dass immer eine Kontrollreihe ohne BrdU mitgeführt wurde.

Nach 24 h Inkubation mit BrdU wurde das Medium entfernt und anschließend mit 50 µl Fixierungspuffer fixiert. Das nach 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur ebenfalls entfernt wurde.

Die Färbung erfolgte nun durch Zugabe des verdünnten Anti-BrdU-Antikörper-Puffers. Davon wurden je 50 µl in jedes Well pipettiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde der Waschpuffer zubereitet, der 1:10 mit destilliertem H₂O verdünnt wurde. Die Platten wurden je Well dreimal mit 100 µl Waschpuffer gewaschen, anschließend mit 50 µl Substratlösung behandelt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 25 µl 0,5 M H₂SO₄ hinzu pipettiert und bei 300 min⁻¹ für eine Minute geschüttelt. Im Anschluss erfolgte die Messung des Farbumschlags am Tecan-Reader (Spark 10M) bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 650 nm).

3.3.5 Analyse der Zellzyklusphasen

Im Weiteren wurde der Einfluss von SHI auf die einzelnen Zellzyklusphasen G₀/1, S und G₂/M nach dem Protokoll von Riccardi & Nicoletti (98) analysiert. Dazu wurde mithilfe des Durchflusszytometer (BD Fortessa X20) bestimmt, wie viele Zellen sich prozentual in den verschiedenen Zellzyklusphasen befanden. Die Grundlage des Versuchs stellte dabei eine Änderung der Signalstärke des Propidiumiodids (PI) dar. PI weist eine DNA-bindende Eigenschaft auf. Aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehalts in den einzelnen Zellzyklusphasen variiert die Signalstärke des PIs in Abhängigkeit von der DNA-Menge und lässt so Rückschlüsse auf den prozentualen Anteil der Zellen bei gleicher Ausgangs-Zellzahl in den einzelnen Phasen zu (99). Während in der G₀-/G₁-Phase ein Chromatid pro Chromosom vorhanden ist, kommt es in der S-Phase zur Verdopplung der DNA, sodass zwei Chromatide pro Chromosom mit Eintritt in die G₂-Phase vorliegen (100). In der G₂-/M-Phase kommt es zur Zellteilung, und Aufteilung der DNA auf die Tochterzellen (100).

Die PCa-Zellen wurden für 48 h in einem SHI-Konzentrationsbereich von 0,5 µM / ml-0,8 µM/ ml behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte parentale und DX-resistente PCa-Zellen.

Für die Versuchsdurchführung wurden die Zellen, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben (siehe 3.3.1), mithilfe von Trypsin gelöst, danach in Medium aufgenommen und so die Reaktion gestoppt und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Dieses wurde bei 500 g für fünf min zentrifugiert. Daraufhin konnte man mithilfe des Absaugsystems das Pellet trockenlegen. Das Pellet wurde anschließend in 300 µl PBS gelöst und in ein 1,5 ml

Mikroreaktionsgefäß gegeben. 700 µl eiskaltes Ethanol wurde hinzugefügt und die Zellen für eine Stunde bei 4°C fixiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit PBS gewaschen, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Daraufhin wurden 50 µl RNase zur Entfernung von RNA-Resten hinzugegeben. Das RNase-Zellgemisch wurde für 60 min bei 37° inkubiert. Dann wurde 1:50 verdünntes PI hinzugefügt und das Gemisch in ein FACS-Röhrchen überführt und zur Inkubation im Dunkeln auf Eis gelagert. Mithilfe des Durchflusszytometer (BD Fortessa X20) wurden die Anteile der Zellen bestimmt, die sich in der G0/G1-, S- und M/G2-Phase befanden. Die zur Messung der Zellanteile verwendete Software war DIVA, während die Ergebnisauswertung mittels ModFit erfolgte.

3.3.6 Bestimmung der Apoptoserate

Um apoptotische und nekrotische Ereignisse nach SHI-Behandlung zu detektieren, analysierten wir mittels FITC-Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) (101) den Anteil FITC-Annexin und PI-positiver Zellen. In apoptotischen Zellen kommt es zur Präsentation von Phosphatidylserin auf der Zellmembran, das Annexin V bindet (102). Spät apoptotische und nekrotische Zellen weisen weiterhin einen fortschreitenden Verlust der Membranintegrität auf, wodurch PI in die Zellen eindringen kann. So sind vitale Zellen PI und Annexin V negativ, früh apoptotische Zellen Annexin V positiv, spät apoptotische PI und Annexin V positiv und nekrotische PI positiv (101, 103, 104). Für die Versuchsreihen wurden die PCa-Zellen erneut für 48 h mit SHI-Konzentrationen von 0,5 µM / ml-0,8 µM / ml behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte parentale und DX-resistente PCa-Zellen.

Für die Versuchsreihen wurde zunächst das alte Medium aus der Zellkulturflasche entnommen und die Flasche mit PBS gewaschen. Sowohl das alte Medium als auch das zum Waschen verwendete PBS wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Die Zellen wurden nun mithilfe von Accutase vom Zellboden gelöst und ebenfalls zum gesammelten Überstandgemisch hinzugefügt. Nun wurde das 50 ml Falcon-Röhrchen in die auf 4°C gekühlte Zentrifuge gegeben und bei 1.050 rpm für fünf min zentrifugiert. Die weiteren Schritte mussten auf Eis durchgeführt werden. Das Zellpellet wurde trockengelegt und zweimalig mit PBS ohne Ca²⁺ / Mg²⁺ gewaschen. Nun wurden die Zellen in 1 ml Bindepuffer (1:10 Aqua dest.) aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf 2 x 10⁶ Zellen / ml eingestellt. Je 100 µl (20.000 Zellen) dieser Zellsuspension wurden in ein FACS-Röhrchen überführt. Zu jedem Zellansatz gab es die Kontrollprobe ohne Zugabe von Annexin V und PI, die

Kontrollprobe nur mit Zugabe von Annexin V, die Kontrollprobe nur mit Zugabe von PI und die eigentliche Messprobe mit Zugabe von Annexin V und PI. Die Behandlung erfolgte im Dunkeln. Die FACS-Röhrchen wurden nach Zugabe der Behandlung mithilfe eines Vortexers vermischt. Daraufhin wurden die Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wieder auf Eis gestellt und je Probe 400 µl Bindepuffer hinzugegeben. Die Proben waren dann messbereit und für eine Stunde stabil. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer (BD Fortessa X20). Die zur Messung der Zellanteile verwendete Software war DIVA, während die Ergebnisauswertung mittels FlowJo erfolgte.

3.3.7 Western-Blot-Analysen

3.3.7.1 Proteinisolation

Die kastrationsresistenten PCa-Zellen wurden zur Versuchsvorbereitung in 145*20 mm großen Petrischalen ausgesät und mit Konzentrationen von 0,5-1 µM / ml SHI behandelt. Unbehandelte PCa-Zellen dienten als Kontrollen. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen, wie in den vorherigen Versuchen beschrieben, mithilfe von Trypsin vom Boden abgelöst und das Zellgemisch in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Diese wurden bei 1.050 rpm bei 4°C für fünf min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im nächsten Schritt getrocknet und in Abhängigkeit der Pellettgröße mit 100-200 µl Extraktionspuffer (s. Tabelle 7) resuspendiert. Daraufhin wurde das Gemisch für 30 min bei 4°C im ThermoCell Mixingblock mit einer Vibrationsgeschwindigkeit von 1.500 rpm inkubiert. Der Überstand konnte nun in Kryoröhrchen überführt werden. In diesem waren die gelösten Proteine enthalten. Die Proteine konnten bei -80°C gelagert oder direkt verarbeitet werden. Zudem wurden 4 µl Proteinlösung zur Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test in ein Eppendorfgefäß pipettiert.

3.3.7.2 Bradford Test

Der Bradford-Test diente der Bestimmung der Proteinkonzentration in dem Proteinlysate (105). Grundlage dazu ist die Komplexbildung von Coomassie Brilliant Blue G250 in sauren Lösungen mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm (96).

Zur Testvorbereitung wurde das Bradford-Reagenz (s. Tabelle 7) angesetzt. Zudem wurde eine Verdünnungsreihe bovinem Serumalbumin (BSA) mit den Konzentrationen 1000 ng / µl,

800 ng / μ l, 400 ng / μ l, 200 ng / μ l und 100 ng / μ l angesetzt. Diese konnte mehrfach verwendet werden und wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Testdurchführung wurde ein Leerwert in einem Dreifachansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden die zu untersuchenden Proben, die 1:10 verdünnt wurden, auf die Platte aufgetragen. In jedes Well wurden 300 μ l des Bradford-Puffers hinzugegeben. Nach Zugabe des Puffers wurde der Ansatz für fünf min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Messung am Tecan-Reader (Spark 10M) bei 595 nm. Mithilfe der Verdünnungsreihe konnte nun die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt werden.

3.3.7.3 Gelelektrophorese und Blotvorgang

Die Steuerung des Tumorzellwachstums erfolgt über die Aktivierung bzw. Deaktivierung zellzyklusregulierender Proteine. Im Folgenden sollten die zellzyklusregulierenden Proteine Cyklin A, Cyklin B, Cyklin D1 sowie die „cyclin dependent kinase“ (CDKs) CDK1, pCDK1 (phosphorylierte, aktive Form), CDK2, pCDK2 (phosphorylierte, aktive Form) nach SHI-Gabe untersucht werden. Zudem wurden die zellzyklushemmenden Steuerelemente p21 und p27 erfasst. Auch der Einfluss von SHI auf „*Mechanistic target of rapamycin*“ (mTOR), pmTOR (phosphorylierte, aktive Form) und „*Phosphatase and Tensin homolog*“ (PTEN) wurde untersucht. PTEN gilt als Tumorsuppressor und mTOR ist als Komplex (mTORC1 und mTORC2) in verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt (106, 107). So sollte der Einfluss von SHI auf die unterschiedlichen Schaltstellen des Zellzyklus näher evaluiert werden.

Die Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe (kDa) verwendet. Dazu wurden Bis-Acrylamidgele nach Laemmli (108), bestehend aus Sammelgel und Trenngel, verwendet. Die genaue Zusammensetzung kann den Tabellen 8 und 9 entnommen werden.

Bevor die Gele gegossen wurden, wurden Glaskammer und Kämmen mit 70 % Ethanol gereinigt und in eine Gelgießform eingesetzt. Nun konnte das vorbereitete Trenngel in die Kammer überführt werden. Die Konzentrationen der Trenngele orientiert sich dabei an den Proteingrößen. Tetra-N-Methyl-Ethylendiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS), als Polymerisierungskatalysator und Radikalstarter, wurden erst kurz vor dem Gießen hinzugefügt. Danach wurde das Trenngel zügig in die Kammern überführt und zur Vermeidung von Luftblasen und besseren Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde das Ethanol entfernt und mit H₂O nachgespült. Mit Hilfe eines Papiertuches wurde die Gelkammer getrocknet. Nun wurde das Sammelgel

zusammengestellt und die Gelkammern oberhalb des Trenngels aufgefüllt. Die Kämme für die Formung der Beladungstaschen mussten direkt eingesetzt werden. Nach der Polymerisation konnten die Gele direkt verwendet werden oder in mit H₂O durchtränkten Tüchern im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Gele konnten nun zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Page*) verwendet werden. Zur Auftrennung des Proteingemisches wurde die Eigenladung der Proteine mithilfe eines Ladepuffers, dem Laemmli Sample Buffer, der SDS enthält, überdeckt. Zudem half das ebenfalls im Ladepuffer enthaltene β -Mercaptoethanol durch Spaltung der Disulfidbrücken die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzuheben. Ein zusätzliches Erhitzen bei 95°C für fünf min führte zur vollständigen Denaturierung.

Die im Puffer gelösten Proteinlysate wurden vor der Weiterverarbeitung auf Eis gelagert und vor dem weiteren Gebrauch kurz zentrifugiert.

Nun mussten die Laufkammern vorbereitet werden. Dazu wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt, das Gel mit destilliertem H₂O gespült und in der Laufkammer befestigt. Die Kammer wurde nun mit Laufpuffer (s. Tabelle 7) gefüllt. Nun wurde 5 μ l des Größenstandards in die erste Tasche pipettiert. Daraufhin wurden die Taschen mit je 50 μ g Proteinprobe beladen. Anschließend erfolgte ein Anschluss der Laufkammern an eine Spannungsquelle. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V eingestellt, bis die Lauffront das Trenngel erreichte. Dann konnte eine Spannung von 150 V zum Durchlaufen des Trenngels eingestellt werden.

Nachdem die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die Spannungsquelle abgestellt und das Gel aus der Laufapparatur entnommen.

Tabelle 8: Trenngel (unterschiedlicher Konzentration entsprechend der Proteingröße)

Lösungen	7 %	8 %	10 %	12 %	15 %
kDa	30-100	20-80	15-60	10-50	5-30
Aqua dest.	3,9 ml	3,5 ml	2,6 ml	1,75 ml	150 μ L
10 % SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid A	2,3 ml	2,6 ml	3,2 ml	3,9 ml	4,85 ml
Bisacryl B	1,1 ml	1,2 ml	1,6 ml	1,8 ml	2,25 ml
10 % APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Tabelle 9: Sammelgel (Zusammensetzung für je zwei Gele)

Lösungen	4 %
Aqua dest.	2,7 ml
10 % SDS	50 µl
Sammelpuffer	1,25 ml
Acrylamid A	0,65 ml
Bisacryl B	0,3 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	10 µL

3.3.7.4 Blotvorgang

Der Blotvorgang fand direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese statt (109, 110).

Dazu mussten zunächst die PVDF-Membranen vorbereitet werden. Diese wurden für etwa eine min in MeOH aktiviert und dann in Turbo-Transfer-Puffer für zwei bis drei min (Zusammensetzung s. Tabelle.7) inkubiert. Zudem wurden zwei Filtersets in Trans-Blot Turbo-Transfer-Puffer (s. Tabelle 7) für fünf bis zehn min inkubiert.

Der Proteintransfer erfolgte in einer Schublade des Turbo-Blot-Systems, die immer nach dem gleichen Prinzip zu beladen war. Dazu wurde die Halterung mit H₂Odd befeuchtet. Ein Schwammtuch wurde auf den Boden gelegt, auf dieses wurde ein in Transfer-Puffer inkubierter Stapel Filterpapier, die aktivierte PVDF-Membran, das SDS-Gel, ein weiterer in Transfer-Puffer inkubierter Stapel Filterpapier und ein weiteres Schwammtuch gestapelt. Nach jeder Schicht wurden mit einem Blotroller die Luftblasen entfernt. Die Halterung wurde dann in eine Blot-Apparatur eingespannt. Diese wurde mit Transfer-Puffer aufgefüllt und mit Kühlakkus gekühlt. Der Blotvorgang fand für 1 h bei 100 V statt.

3.3.7.5 Antikörperbindung

Nach Abschluss des Proteintransfers wurden die Membranen der Blot-Apparatur entnommen und in Schalen überführt, mit 10 ml TBST (s. Tabelle 7) gewaschen und in einer Blockierlösung (s. Tabelle 7) für mindestens 1 h auf dem Schwenktisch inkubiert.

Die Primärantikörper wurden anhand der Antikörperliste hinsichtlich Verdünnung, Antikörperpuffer und Menge vorbereitet (s. Tabelle 10). Im nächsten Schritt wurde die Blockierlösung abgegossen und der Antikörperpuffer hinzugefügt.

Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Membranen dreimal mit 10 ml 1 x TBST für je zehn min gewaschen.

Anschließend erfolgte die Zubereitung des jeweiligen zum primären Antikörper gehörenden Sekundärantikörpers (s. Tabelle 10). Der Antikörperpuffer wurde auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde diese erneut dreimal mit 1 x TBST für zehn min gewaschen.

Nun konnte die Entwicklung mithilfe des Fluorochem Detektor gestartet werden. Dazu wurde die Membran mit H₂O₂ für maximal eine Minute gewaschen, in eine Petrischale (60 x 150 mm) gelegt und das ECL-Reagenz hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von einer min wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Folien gelegt und mithilfe des Fluorochem Detektors die Chemilumineszenz detektiert.

β-Aktin diene als Ladekontrolle. Dazu wurde die Membran erneut dreimal mit TBST für zehn min auf dem Schwenktisch gewaschen. Danach konnte diese mit einer Anti-Stripping-Lösung für zehn min inkubiert werden. Auf diesen Schritt folgte erneut ein dreimaliges Waschen mit TBS. Danach konnte die Membran, wie zuvor (Vorbereitung Primärantikörper und Entwicklung, s. 3.3.7.5), erneut für die Bindung des Antikörpers (β-Aktin) verwendet werden.

Tabelle 10: Antikörperliste mit Verdünnungen und dazugehörigen sekundären Antikörpern

Antikörper	Größe in kDa	Verdünnung	Quelle/ sekundär Antikörper	Lösung
Cyclin A	60	1:500	Maus	1 % Milch in TBST
Cyclin B	62	1:1.000	Maus	1 % Milch in TBST
Cyclin D1	36	1:1.000	Kaninchen	5% BSA in TBST
CDK1	34	1:2.500	Maus	1 % Milch in TBST
CDK2	33	1:2.500	Maus	1 % Milch in TBST
pCDK1	34	1:1.000	Kaninchen	5 % BSA in TBST
pCDK2	33	1:1.000	Kaninchen	5 % BSA in TBST
mTOR	170	1:1.000	Kaninchen	5 % BSA in TBST

pmTOR	170	1:1.000	Kaninchen	5 % BSA in TBST
PTEN	54	1:1.000	Kaninchen	5 % BSA in TBST
p27	27	1:500	Maus	1 % Milch in TBST
p21	21	1:1.000	Kaninchen	5 % BSA in TBST
β -Aktin		1:10.000	Maus	1 % Milch in TBST

3.3.10 Statistik

Um eine valide Aussage treffen zu können und Zufallsbefunde auszuschließen, wurde jeder Versuch mindestens dreimal wiederholt. Microsoft Excel diente der Berechnung von Mittelwerten, den jeweiligen Standardabweichungen sowie zur Normalisierung in Prozent. Zur Kalkulation der statistischen Signifikanz fand GraphPad Prism7.0 Anwendung. Dabei wurden die Ergebnisse des Western Blot-, Zellzyklus- und des Apoptose-Assays mithilfe des T-Tests, des BrdU-Assay mit dem one-way ANOVA-Test und des MTTs mit dem two-way-ANOVA-Test untersucht. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Shikonin induzierte eine zeit- und dosisabhängige Inhibition des Tumorzellwachstums

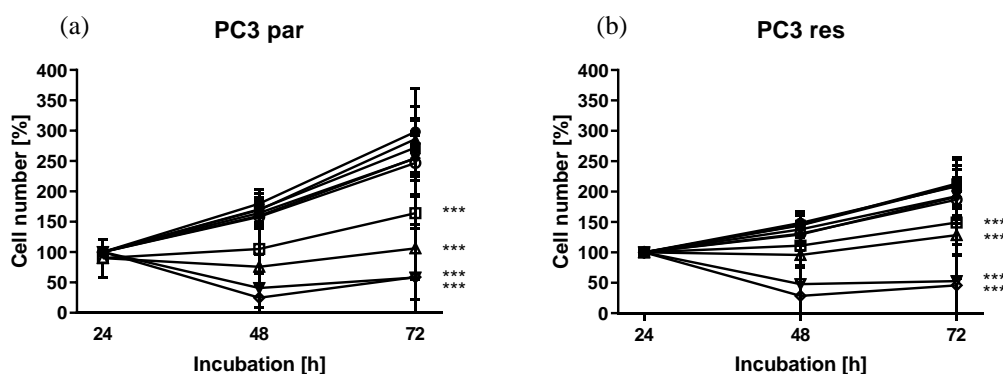
SHI konnte sowohl in parentalen als auch in DX-resistenten PCa-Zellen eine zeit- und dosisabhängige Inhibition des Tumorzellwachstums induzieren. Dabei sprachen die parentalen Zellen im Vergleich zu den jeweiligen DX-resistenten Zelllinien etwas sensitiver an (Abb.1).

Zur Bewertung der Wachstumsreduktion und vergleichenden Darstellung wurde der IC50-Wert nach 72 h bestimmt. Zunächst wurden die kastrationsresistenten Zelllinien, PC3 und DU145, untersucht, da ein ähnliches Wachstumsverhalten bei beiden Zelllinien festgestellt werden konnte (Abb.1a-d). So fand im Kontrollansatz der parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen sowie der DX-resistenten PC3 Zellen annähernd eine Verdopplung der Zellzahl nach 72 h und eine Verdreifachung der parentalen PC3 in den ersten 72 h statt. Hier

konnte eine signifikante Wachstumsreduktion für parentale PC3 und DU145 mit einem IC₅₀-Wert von 0,37 µM SHI nach 72 h gezeigt werden (Abb.1a, c). Im Vergleich dazu konnte eine signifikante Wachstumsinhibition in den DX-resistenten PC3- und DU145-Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 0,54 µM SHI für die PC3-Zellen und 0,55 µM für die DU145-Zellen erreicht werden (Abb.1b, d). Unabhängig vom IC₅₀-Wert der parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen konnte für beide Subzelllinien eine signifikante Wachstumsinhibition ab 0,5 µM SHI nach 72 h gezeigt werden (Abb.1a, b). Die DU145-Zellen sprachen ab einer Konzentration von 0,75 µM SHI nach 72-stündiger Behandlungsdauer signifikant an (Abb.1c, d).

Das Wachstum der androgensensitiven LNCaP-Zellen verhielt sich hingegen wie folgt. In den parentalen und DX-resistenten LNCaP-Zellen fand annähernd eine Verdopplung der Zellzahl bei sehr geringem Wachstum in den ersten 72 h statt (Abb.1e, f). Die DX-resistenten LNCaP wiesen dabei einen IC₅₀-Wert von 0,32 µM SHI nach 72-stündiger Behandlung auf, wohingegen der IC₅₀-Wert der parentalen LNCaP-Zellen nach 72 h bei 0,59 µM SHI lag (Abb.1e, f). Eine signifikante Wachstumsreduktion konnte für die DX-resistenten LNCaP-Zellen bereits bei einer Konzentration von 0,3 µM SHI beobachtet werden (Abb.1f). Im Gegensatz dazu zeigten die parentalen LNCaP nach 72 h eine signifikante Wachstumsreduktion ab einer Konzentration von 0,5 µM SHI (Abb.1e).

SHI führte somit zu einer signifikanten Wachstumsreduktion sowohl in allen parentalen als auch in allen DX-resistenten Zellen.



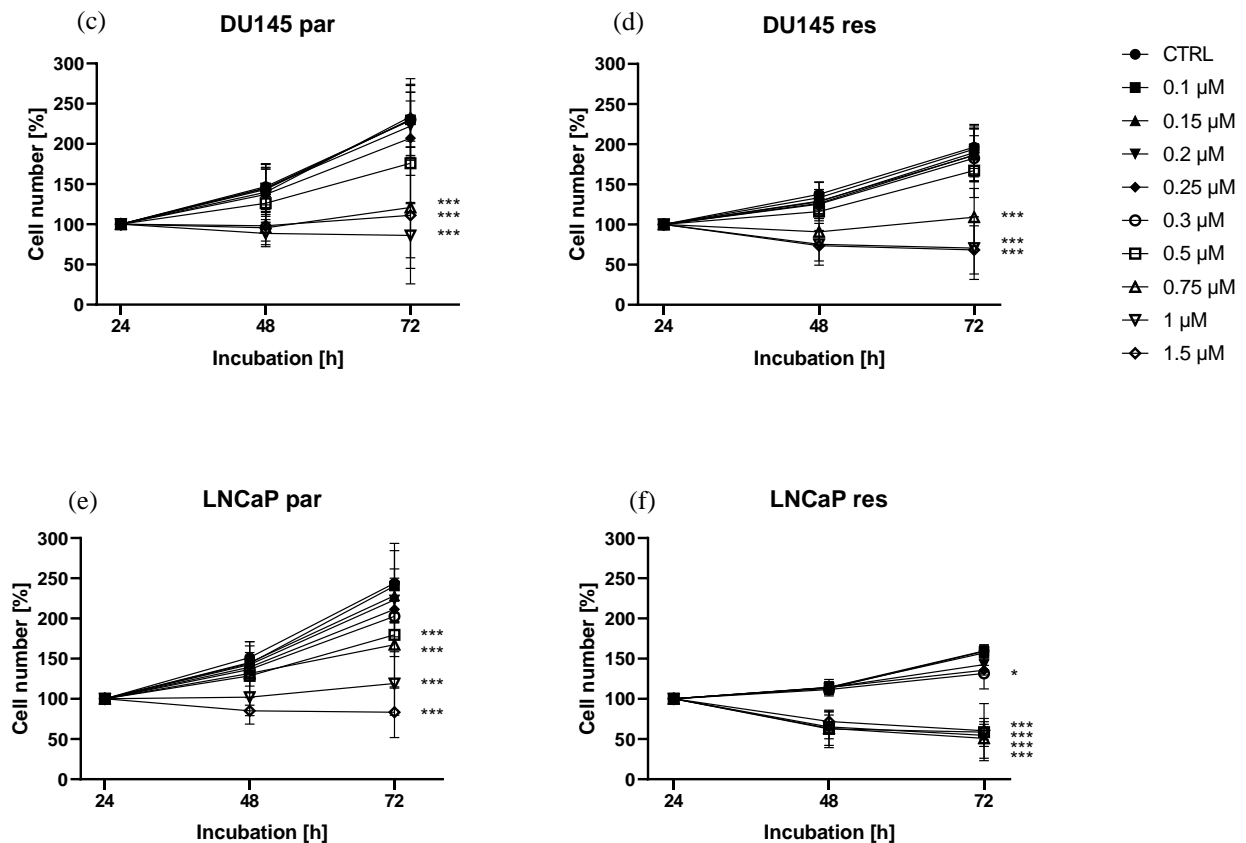


Abbildung 1: Dosis-Wirkungskurven der parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen nach Behandlung mit SHI. Tumorzellwachstum der parentalen (par) und DX-resistenten (res) PCa-Zelllinien PC3 (a,b), DU145 (c,d), LNCaP (e,f) nach 24, 48 und 72 h SHI-Behandlung [0,1-1,5 µM]. Die Zellzahl wurde für die kinetische Auftrennung nach 24 h Inkubation auf 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Signifikanzunterschied zur unbehandelten Kontrolle: *= $p \leq 0,05$, ***= $p \leq 0,001$. n=5.

4.2 Shikonin inhibiert in parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen signifikant die Proliferation

Die Proliferation der parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen konnte durch die Behandlung mit SHI im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen signifikant reduziert werden (Abb.2).

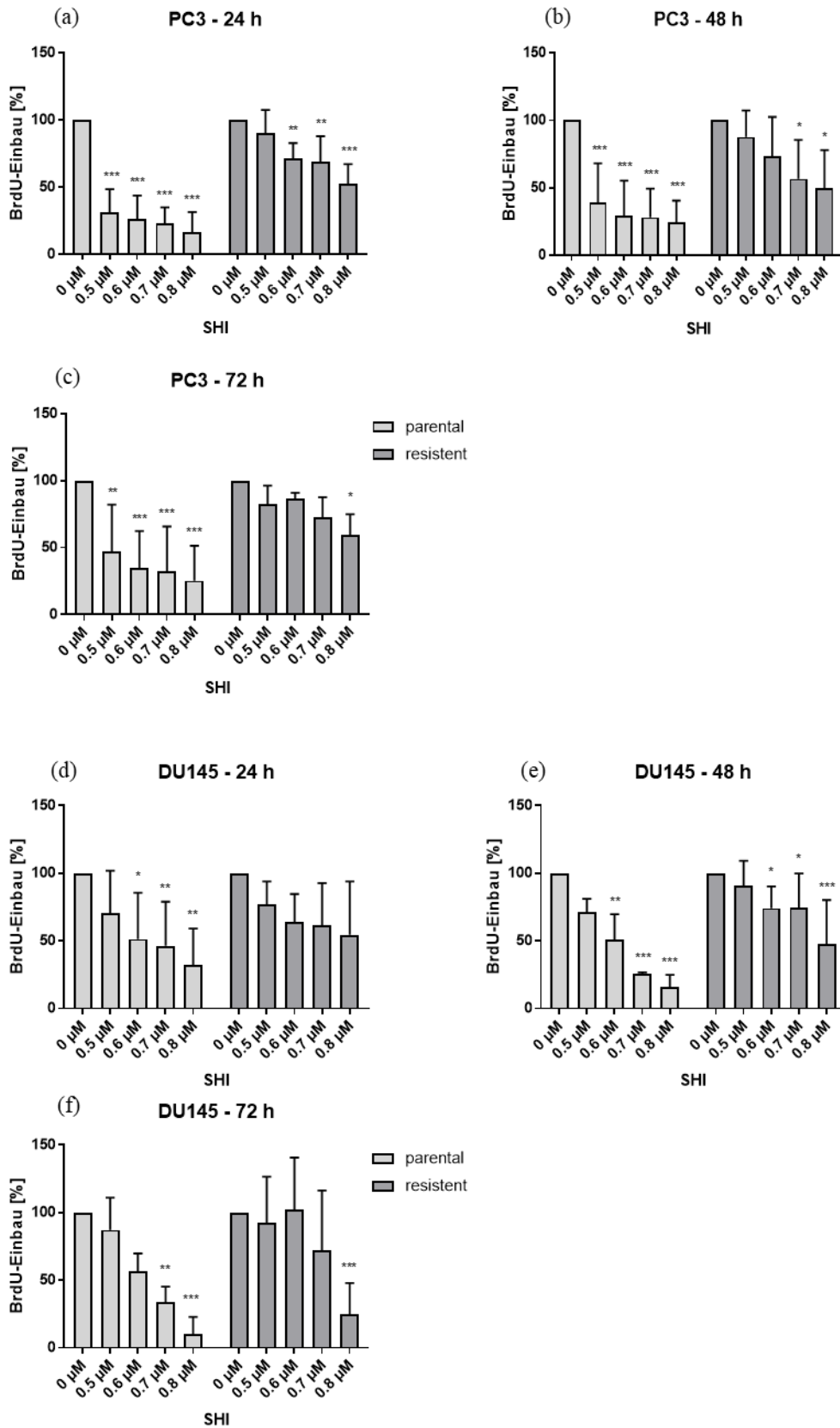
Bereits nach einer 24-stündigen Inkubationsdauer konnte bei den parentalen PC3-Zellen mit einer SHI-Konzentration von 0,5 µM / ml und bei den DX-resistenten PC3-Zellen mit 0,6 µM / ml SHI eine signifikante Reduktion gezeigt werden (Abb.2a). Nach einer SHI-Behandlung von 48 h und 72 h war ebenfalls eine signifikante Reduktion der Proliferation der parentalen

PC3-Zellen mit einer Konzentration von 0,5 μM / ml SHI zu beobachten (Abb.2b, c). In den DX-resistenten PC3 nahm der Effekt mit der Zeit etwas ab, so konnte nach 48-stündiger Behandlung ab einer Konzentration von 0,7 μM / ml SHI und 0,8 μM / ml SHI nach 72-stündiger Behandlung eine Signifikanz erreicht werden (Abb.2b, c).

Auch bei den parentalen DU145-Zellen konnten andere Effekte als bei den DX-resistenten Zellen beobachtet werden (Abb.2d, e, f). Nach einer 48-stündigen Inkubation kam es in der parentalen Zelllinie bereits mit einer SHI-Konzentration von 0,6 μM / ml zu einer signifikanten und mit einer Konzentration von 0,7 μM / ml SHI zu einer hoch signifikanten Proliferationsreduktion (Abb.2e). Die 72-stündige Behandlung der parentalen DU145 resultierte ab einer Behandlung mit 0,7 μM / ml SHI in einer signifikanten Proliferationshemmung (Abb.2f). In DX-resistenten DU145-Zellen induzierte nach 48 h eine SHI-Konzentration ab 0,6 μM / ml und nach 72 h ab einer SHI-Konzentration von 0,7 μM / ml eine signifikante Proliferationshemmung (Abb.2e, f).

Die androgensensitiven LNCaP-Zellen zeigten nach 24 h sowohl in den parentalen als auch in den DX-resistenten Zellen bereits ab einer SHI-Konzentration von 0,5 μM / ml eine signifikante Proliferationshemmung (Abb.2g). In den parentalen Zellen nahm dieser Effekt nach 48 h weiter zu, während er in den DX-resistenten LNCaP-Zellen abnahm (Abb.2h). Nach 72 h kam es auch in den parentalen LNCaP-Zellen zu einer Effektreduktion (Abb.2i).

Zusammenfassend konnte eine signifikante Proliferationsinhibition insbesondere in den parentalen Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den DX-resistenten PCa-Zellen nahm diese mit der Zeit in der Regel weiter zu.



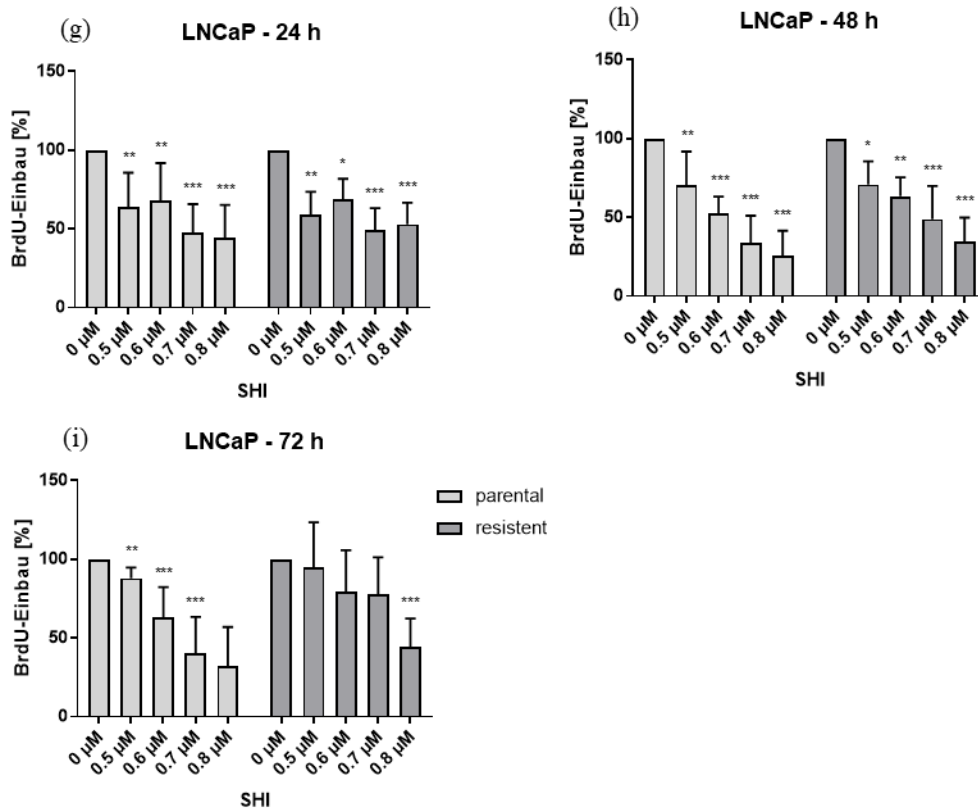


Abbildung 2. Proliferation der parentalen und DX-resistenten Zellen nach Behandlung mit SHI. Tumorzellproliferation der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinien PC3 (a,b,c), DU145 (d,e,f) und LNCaP (g,h,i) nach 24, 48 und 72 h Behandlung [0,1-0,8 µM] mit aufsteigenden SHI-Konzentrationen. Die unbehandelten Kontrollen wurden jeweils auf 100% gesetzt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen (SD) dar. Signifikanzunterschiede zur unbehandelten Kontrolle: * = $p \leq .05$, ** = $p \leq .01$, *** = $p \leq .001$. n=3.

Aufgrund der Daten aus dem Wachstums- und Proliferationstests wurden die PCa-Zellen in den nachfolgenden Untersuchungen für 48 h mit SHI-Konzentrationen zwischen 0,5-1 µM / ml behandelt.

4.3 Apoptose- und Nekroseinduktion in den PCa-Zellen durch Behandlung mit SHI

Nach einer 48-stündigen Behandlung mit SHI zeigte sich eine Zunahme apoptotischer parentaler PC3-Zellen ab einer Konzentration von 0,5 µM / ml SHI (Abb.3a). Die Zunahme ging mit einer signifikanten Abnahme des Anteiles vitaler Zellen einher (Abb.3a).

Konzentrationsabhängig nahm die Anzahl apoptotischer parentaler PC3-Zellen weiter zu. In DX-resistenten PC3-Zellen konnte ab einer SHI-Konzentration von 0,6 μM / ml eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen detektiert werden, die mit einer signifikanten Abnahme vitaler Zellen einherging (Abb.3b).

Auch der Anteil der apoptotischen Zellen in den parentalen DU145 nahm ab einer Konzentration von 0,5 μM / ml SHI signifikant und mit einer Konzentration von 0,6 μM / ml hochsignifikant zu (Abb.3b). Gleichzeitig ließ sich eine Reduktion der vitalen DU154-Zellen nachweisen (Abb.3c). Analog dazu konnte in den DX-resistenten DU145-Zellen eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen ab einer SHI-Konzentration von 0,5 μM / ml gezeigt werden, die ebenfalls mit einer Abnahme der vitalen Zellanteile einherging (Abb.3c, d). Die Apoptoseinduktion nahm hier ebenfalls konzentrationsabhängig zu.

Auch in den LNCaP-Zellen hatte SHI einen Einfluss auf den Anteil vitaler und apoptotischer Zellen (Abb.3e, f). So konnte ab einer Konzentration von 0,8 μM / ml SHI in der parentalen LNCaP-Subzelllinie eine signifikante Abnahme der vitalen Zellanteile verzeichnet werden (Abb.3e). Diese Abnahme ging nicht mit einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen einher. Stärker sprachen die DX-resistenten LNCaP an (Abb.3f). Diese zeigten ab einer Konzentration von 0,7 μM / ml SHI eine Zunahme apoptotischer Zellanteile auf, bei gleichzeitiger Abnahme vitaler Zellen (Abb.3f). Anders als in den vorherigen Versuchsreihen (Wachstum & Proliferation) zeigten die LNCaP in Bezug auf die Apoptoseinduktion somit geringere Effekte von SHI als die androgenresistenten PCa-Zellen.

Nekrotische Ereignisse waren insgesamt selten und wurden in keiner der PCa-Zelllinien durch SHI signifikant erhöht (Abb.3).

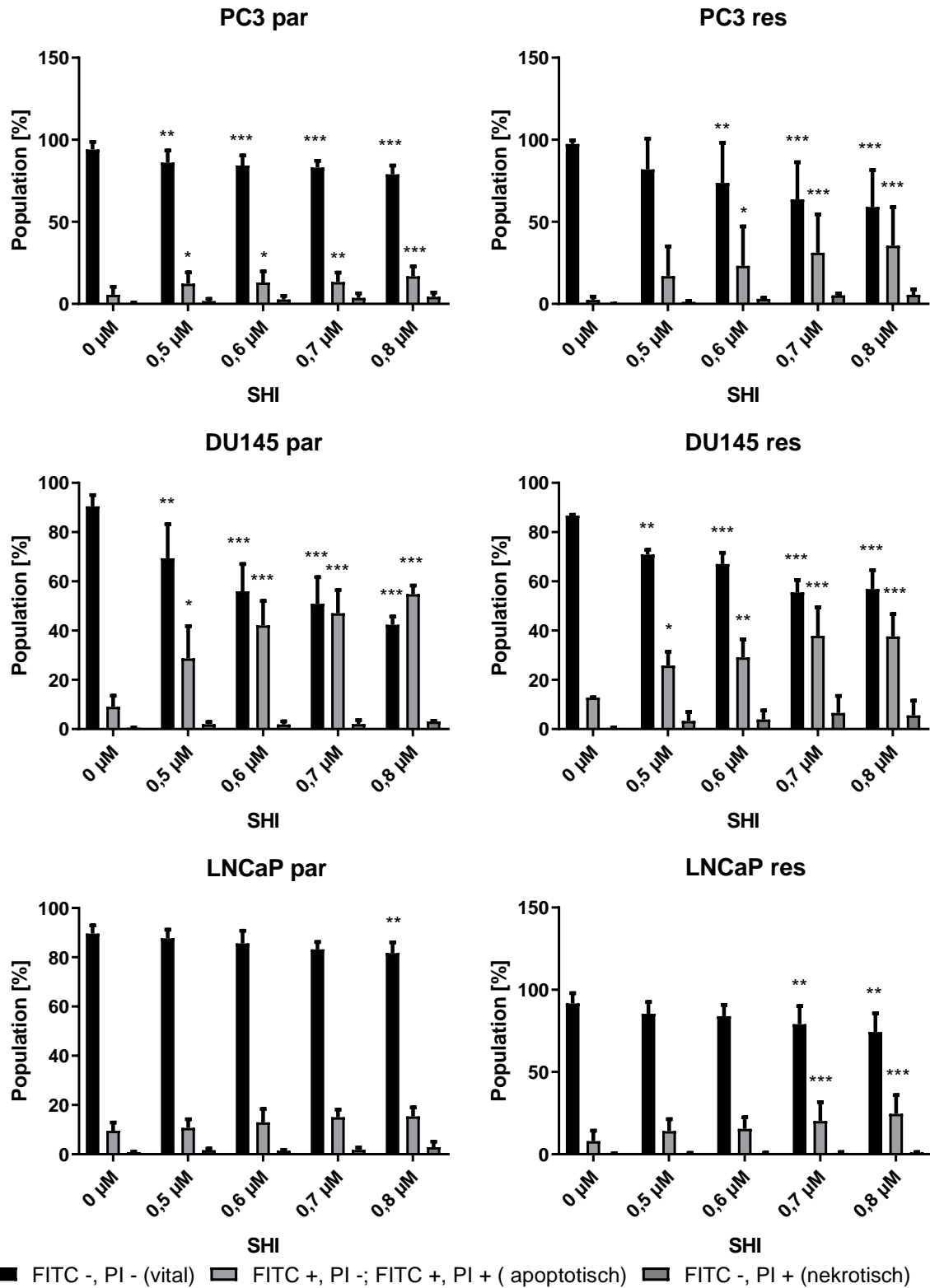


Abbildung 3. Anteil vitaler, apoptotischer und nekrotischer PCa-Zellen nach SHI-Exposition. Darstellung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellanteile der parentalen und DX-resistenten (DR) PCa-Zelllinien PC3 (a,b), DU145 (c,d) und LNCaP (e,f) nach SHI-Behandlung [0,5-0,8 μM] über 48 h. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD)

dar. Signifikanzunterschied zur unbehandelten Kontrolle [0 μ M]: *= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$. n=5.

4.4 Einfluss von SHI auf die Verteilung der PCa-Zellen in den Zellzyklusphasen

Die 48-stündige Behandlung mit SHI zeigte weiterhin Einfluss auf die einzelnen Zellzyklusphasen der PCa-Zellen (Abb.4). So kam es in den parentalen PC3- und DX-resistenten DU145-Zellen, im Vergleich zur Kontrolle, zu einem G2/M-Phase-Arrest (Abb.4a, d). Eine signifikante Zunahme der G2/M-Phase-Zellen konnte dabei bei beiden Zelllinien ab einer Konzentration von 0,5 μ M / ml SHI beobachtet werden. Die parentalen PC3-Zellen zeigten dabei ab einer Konzentration von 0,7 μ M / ml SHI eine höchst signifikante Zunahme, die DX-resistenten DU145-Zellen ab einer Konzentration von 0,6 μ M / ml SHI, unter gleichzeitiger Abnahme des Anteils an S-Phase-Zellen (Abb.4a, d).

In den anderen Sub-Zelllinien konnte SHI hingegen die Zellzyklusphasen nicht signifikant beeinflussen (Abb.4 b, c, e, f).

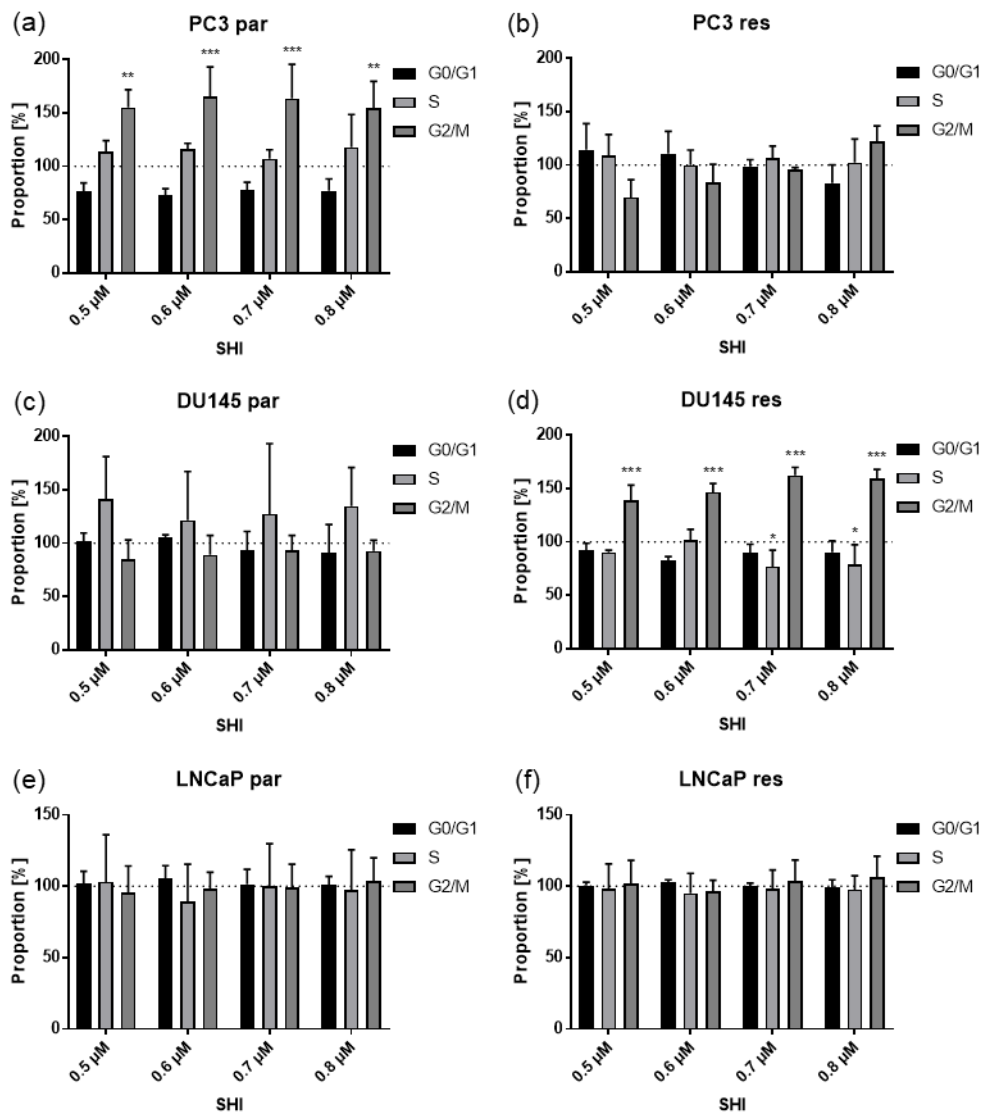


Abbildung 4. Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen nach SHI-Behandlung. Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen G0/G1, S, G2/M der parentalen (par) und DX-resistenten (res) PCa-Zelllinien PC3 (a,b), DU145 (c,d), LNCaP (e,f) nach 48 h SHI-Behandlung [0,5-0,8 µM]. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Signifikanzunterschiede zur unbehandelten Kontrolle (100 %, gepunktete Linie): *=p<0,05, **=p<0,01, ***= p<0,001. n=3.

4.5 Einfluss von SHI auf zellzyklusregulierende Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen

Da ausschließlich PC3- und DU145-Zellen in den Zellzyklusphasen auf SHI angesprochen hatten, wurden nur in diesen die Expression und Aktivität zellzyklusregulierender Proteine untersucht.

Sowohl für die parentalen als auch DX-resistenten PC3-Zellen konnte eine signifikante Reduktion von CDK1, pCDK1, CDK2, Cyclin B, p27 und pmTOR gezeigt werden (Abb.5, Abb.6a, b, c, f, h, l). Während eine signifikante Reduktion der Proteinexpression von CDK1, pCDK1 und CDK2 in den PC3-Zellen bereits ab einer Konzentration von 0,5 μM / ml SHI zu beobachten war (Abb.5, Abb.6a, b, c), trat diese bei Cyclin B erst ab einer Konzentration von 0,8 μM / ml SHI auf (Abb.5, Abb.6f). Eine signifikante Reduktion von mTOR konnte in der resistenten PC3-Zelllinie ab einer Konzentration von 0,8 μM / ml SHI detektiert werden (Abb.5, Abb.6k), während in der parentalen Linie ein signifikanter Anstieg des p21 ab 1 μM / ml SHI nachweisbar war (Abb.5, Abb.6i). Die Expression von Cyclin A, Cyclin D₁, pCDK2 und PTEN wurde in den PC3-Zellen durch SHI tendenziell, aber nicht signifikant, verändert (Abb.5, Abb.6e, g, d, j), wobei die Cycline und pCDK2 reduziert und der Akt-Inhibitor PTEN erhöht wurden. (Abb.5, Abb.6d, e). Zusammengefasst zeigten die parentalen PC3-Zellen nach SHI-Behandlung etwas mehr Effekte als die DX-resistente Subzelllinie.

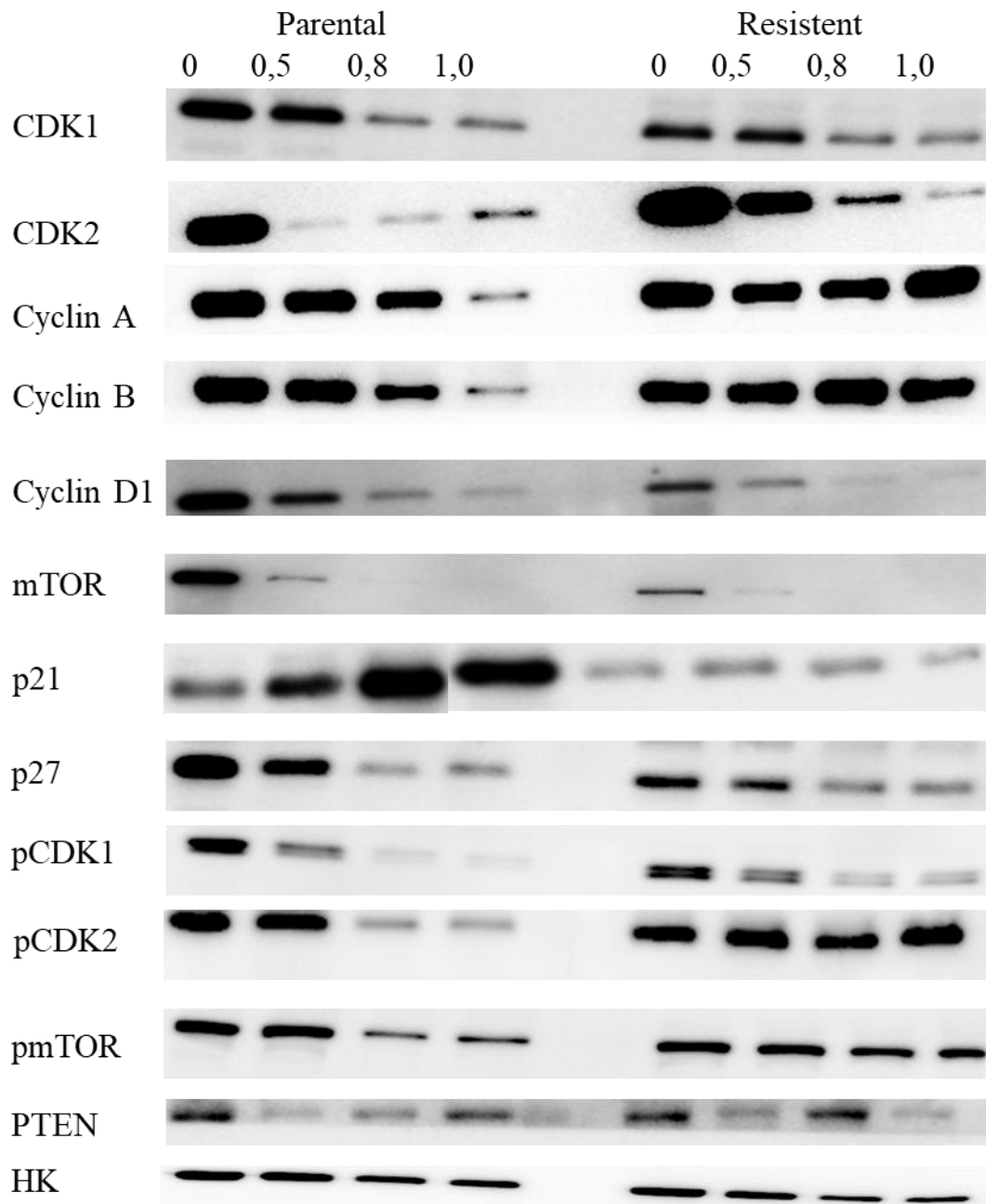
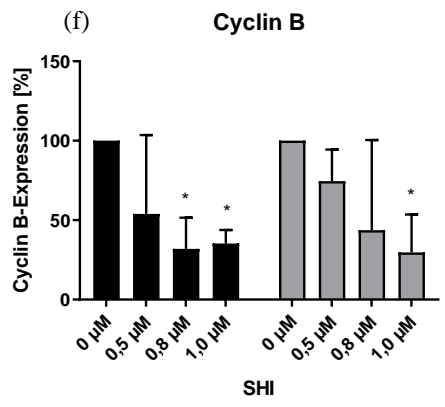
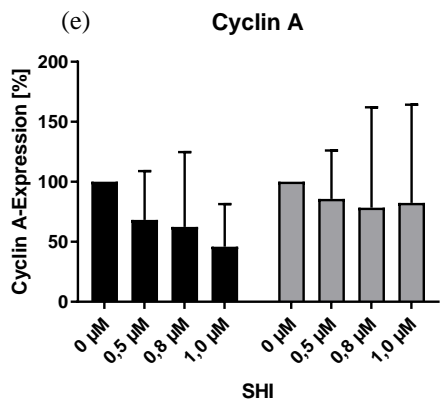
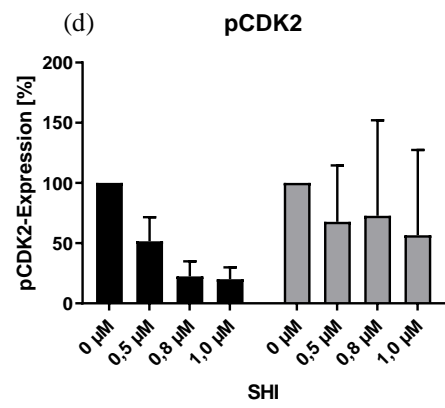
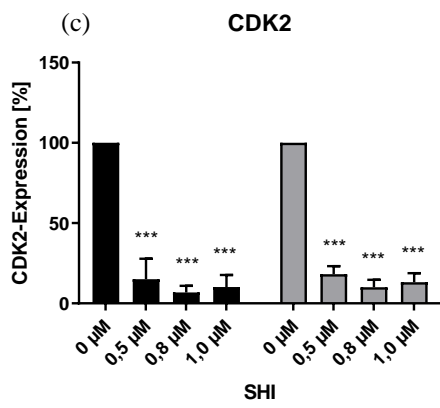
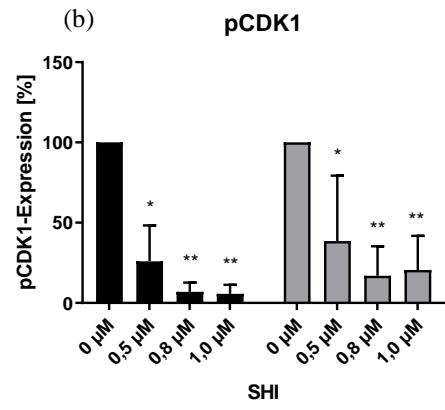
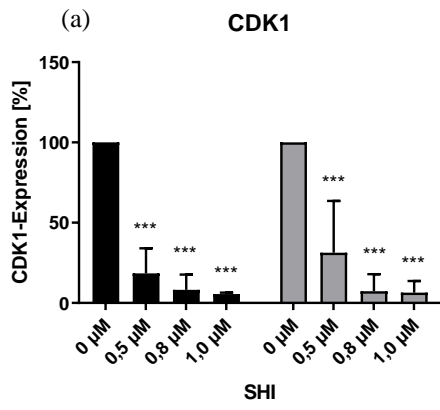


Abbildung 5. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine nach 48 h SHI-Behandlung in den PC3-Zellen. Repräsentative Darstellung der zellzyklusregulierenden Proteine (Western Blot Analyse) in parentalen und DX-resistenten PC3 nach 48 h SHI-Behandlung [0,5-1 μM], aus n=3. HK = *Housekeeper*; hier: β-Aktin.



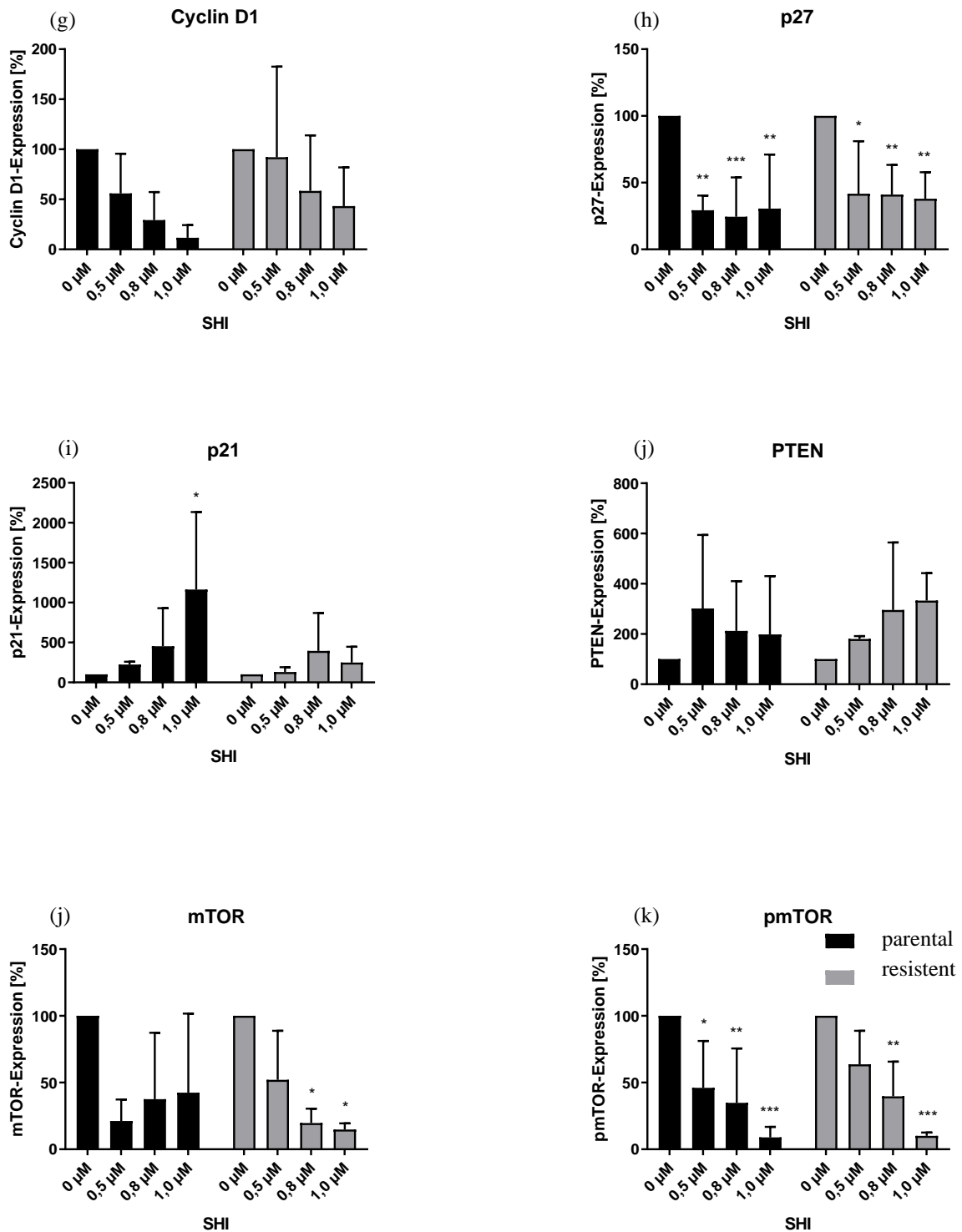


Abbildung 6. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie PC3. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie PC3 nach 48 h SHI-Behandlung [0,5-1 μM]. Pixel-Dichte-Analyse (Western Blot) der Proteine CDK1 (a), pCDK1 (b), CDK2 (c), pCDK2 (d), Cyclin A (e), Cyclin B (f), Cyclin D1 (g), p27 (h), p21 (i), PTEN (j), mTOR (k), pmTOR

(l). Normalisierung durch Verrechnung mit dem *Housekeeper* β -Aktin. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Signifikanzunterschiede zur unbehandelten Kontrolle [0 μ M]: *= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$. n=3.

SHI hatte in den DU145-Zellen, zumindest partiell, offensichtlich auch Einfluss auf den *Housekeeper* β -Aktin. So konnte in den parentalen und DX-resistenten DU145-Zellen in der Auswertung ein deutlicher Unterschied für die Bestimmung des Proteingehaltes mit Bezug auf β -Aktin und ohne Bezug auf β -Aktin gezeigt werden (Abb.7, 8, 9).

Fand die Auswertung mit Bezug auf den *Housekeeper* statt, konnte lediglich ein signifikanter Anstieg des Cyclins A und des Cyclins B bei einer Konzentration von 0,8 μ M / ml SHI in den parentalen DU145-Zellen gezeigt werden (Abb.8e, f). Keine signifikanten Effekte waren auf den Proteingehalt der anderen untersuchten Proteine messbar (Abb.8).

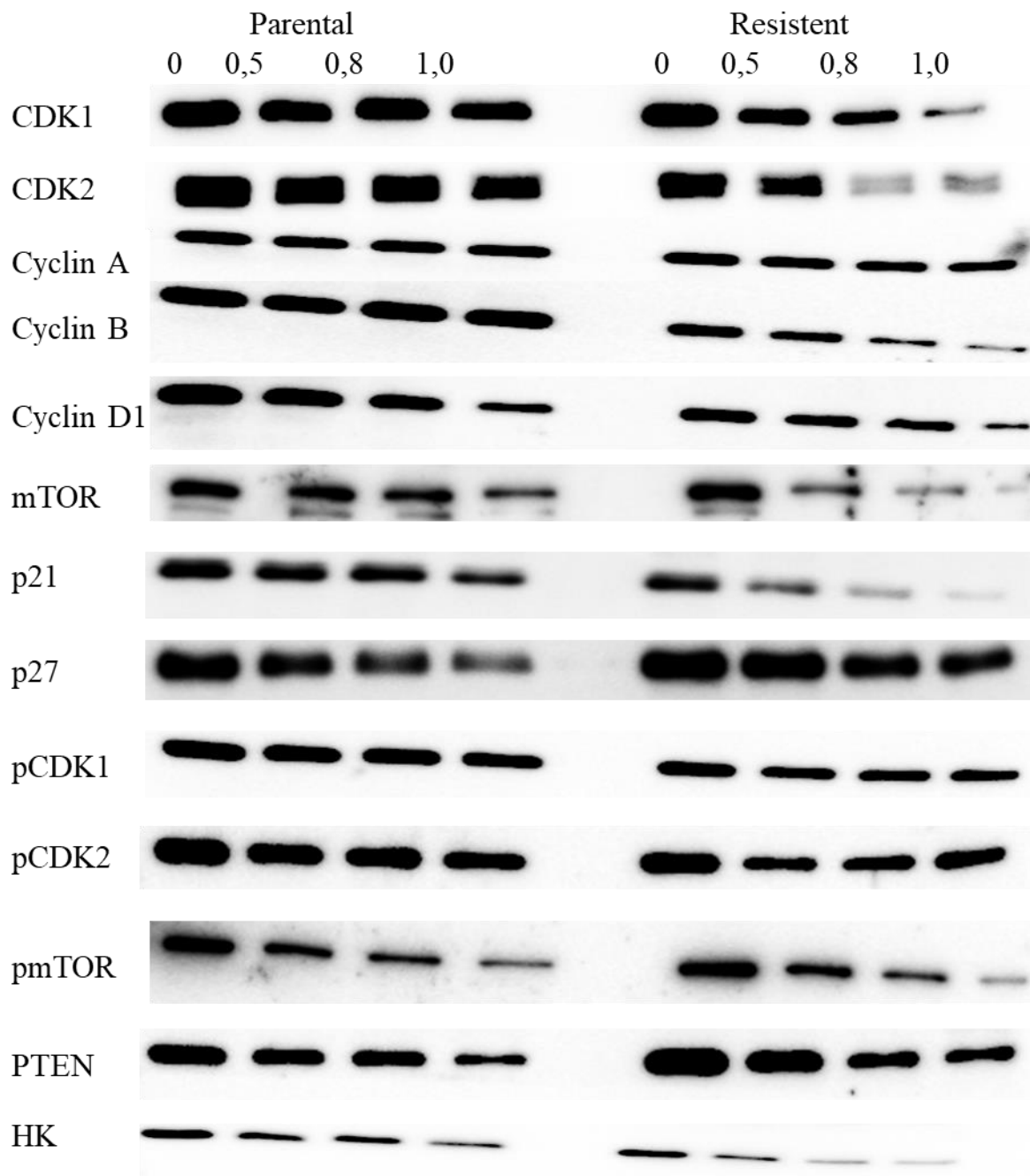
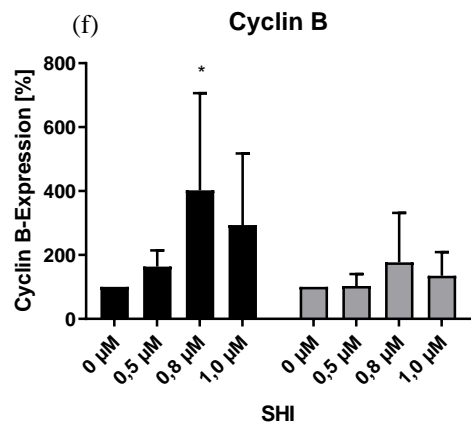
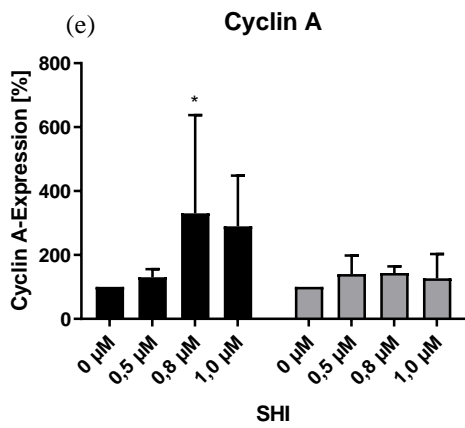
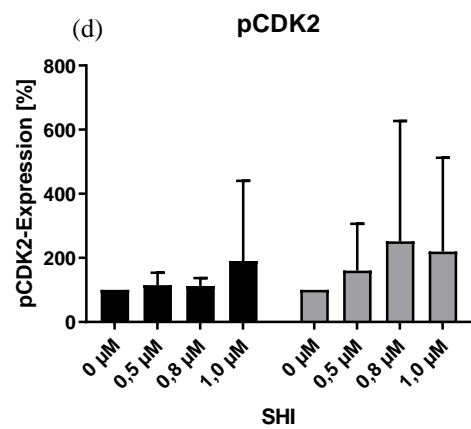
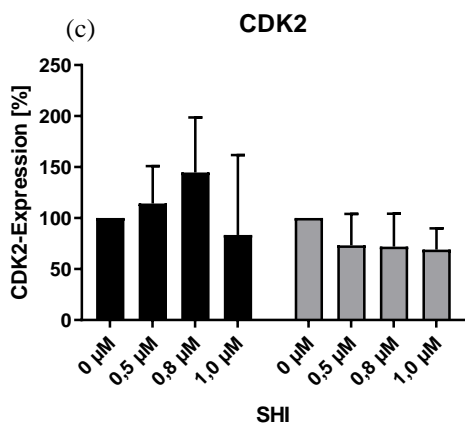
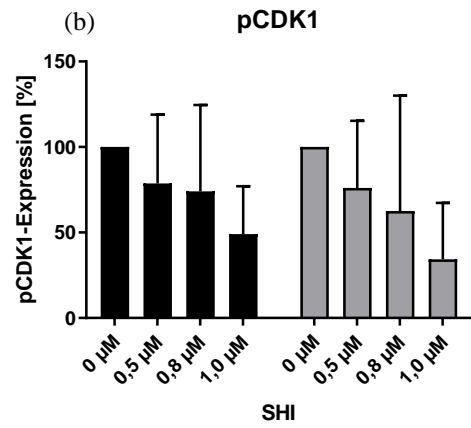
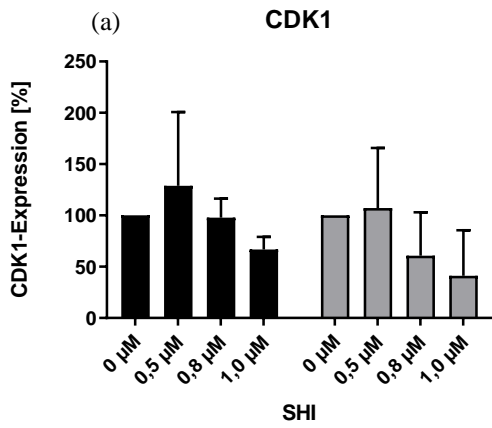


Abbildung 7. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine nach 48 h SHI-Behandlung in DU145-Zellen. Repräsentative Darstellung der zellzyklusregulierenden Proteine (Western Blot Analyse) in parentalen und DX-resistenten DU145 nach 48 h SHI-Behandlung [0,5-1 μM], aus n=3.



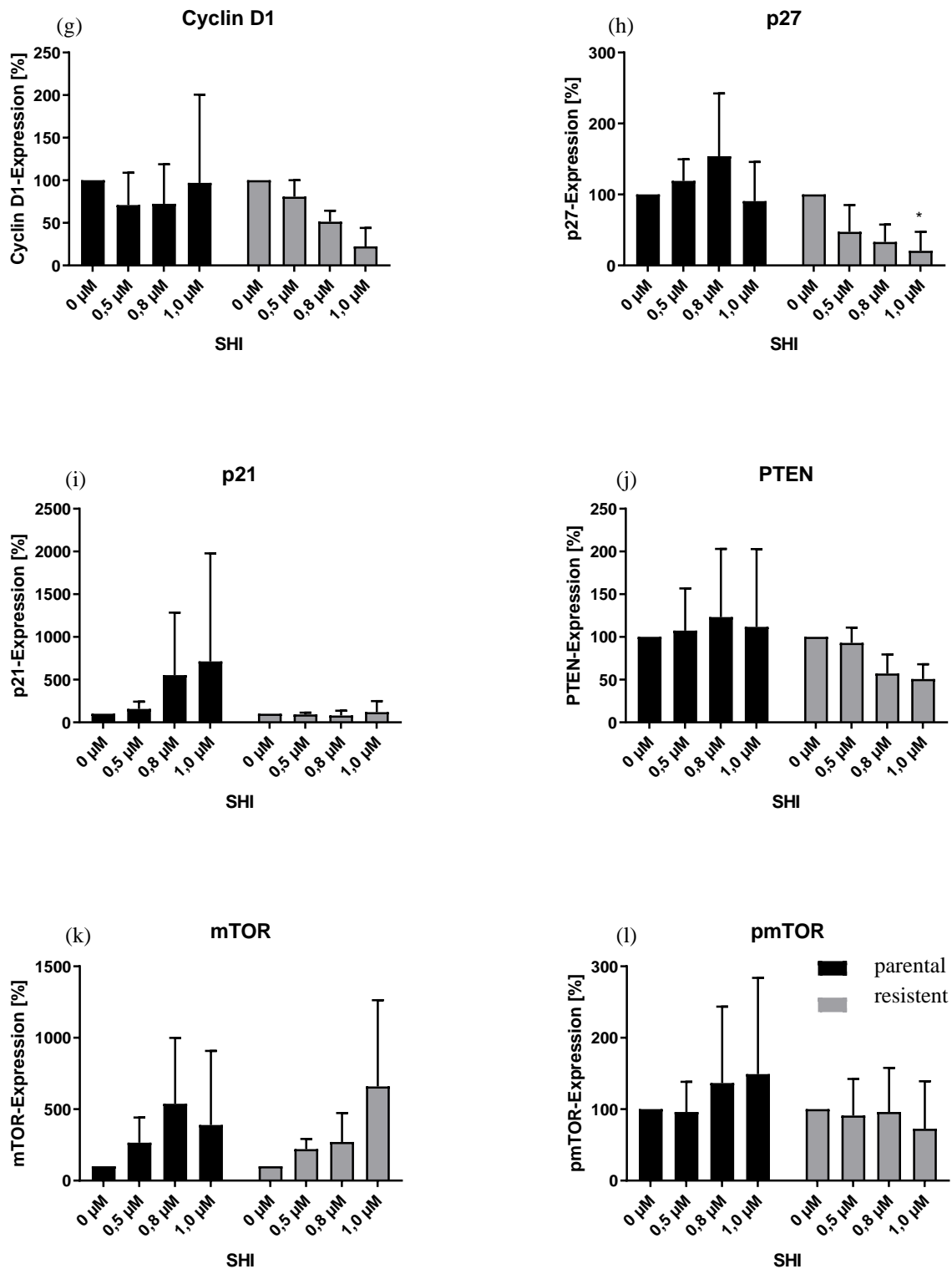
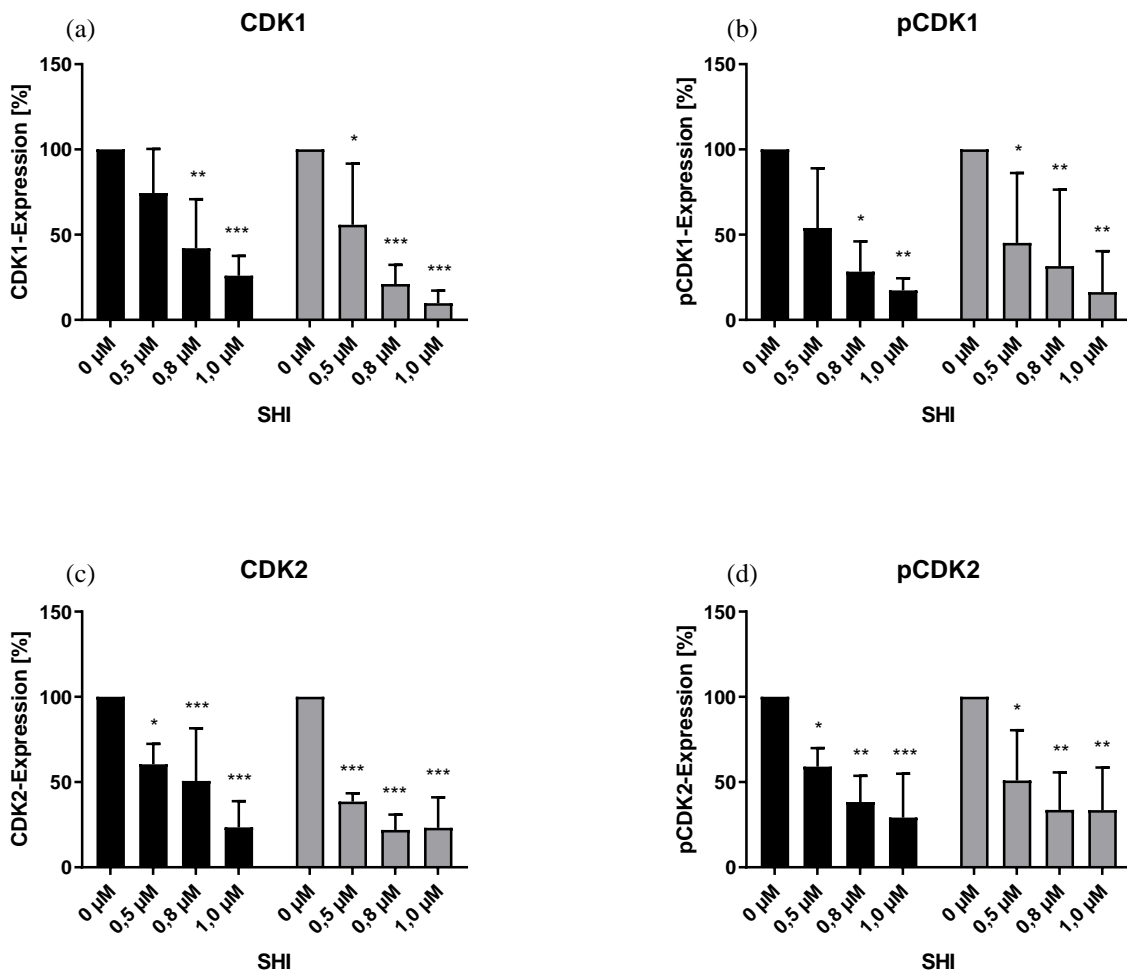


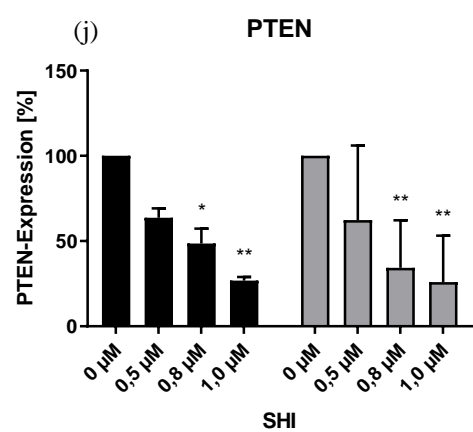
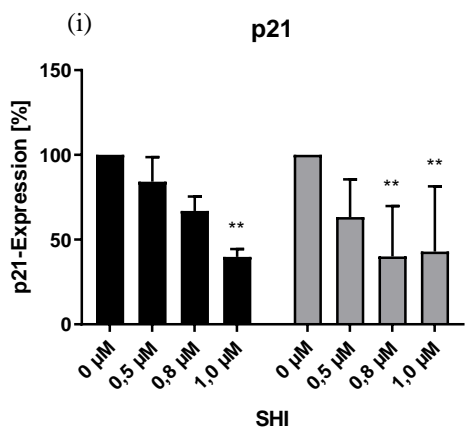
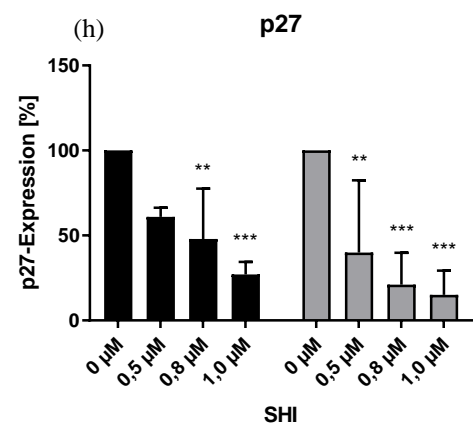
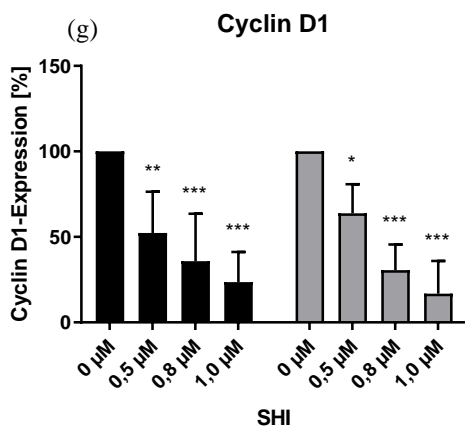
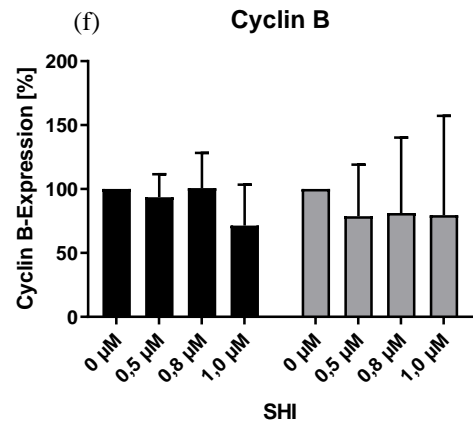
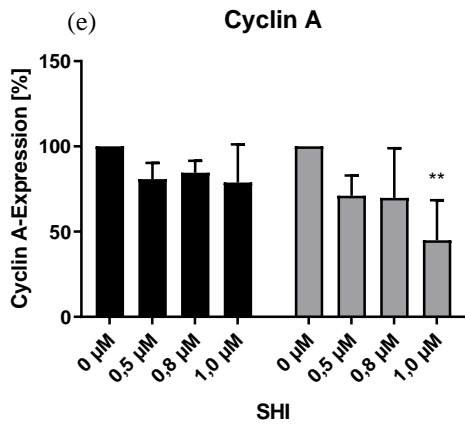
Abbildung 8. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie DU 145. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie DU 145 nach 48 h SHI-Behandlung [0,5-1 μM]. Pixel-Dichte-Analyse (Western Blot) der Proteine CDK1 (a), pCDK1 (b), CDK2 (c), pCDK2

(d), Cyclin A (e), Cyclin B (f), Cyclin D1 (g), p27 (h), p21 (i), PTEN (j), mTOR (k), pmTOR (l). Normalisierung durch Verrechnung mit dem *Housekeeper* β -Aktin. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Signifikanzunterschiede zur unbehandelten Kontrolle [0 μ M]: *= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$. n=3.

Fand die Auswertung ohne Bezug auf den *Housekeeper* statt, konnte durch die Behandlung mit SHI eine signifikante Reduktion des Proteingehaltes von CDK1, CDK2, Cyclin D1, mTOR, p21, p27, pCDK1, pCDK2, pmTOR und PTEN sowohl in den parentalen als auch DX-resistenten DU145-Zellen gezeigt werden (Abb.9). Eine signifikante Veränderung des Proteingehaltes erfolgte für Cyclin A in den resistenten Zellen bei einer Konzentration von 1,0 μ M / ml SHI (Abb.9e). Cyclin D wurde in keiner der beiden DU145-Subzelllinien durch SHI verändert (Abb.9f).

Insgesamt waren nach SHI-Exposition mehr Effekte in den DX-resistenten DU145-Zellen detektierbar.





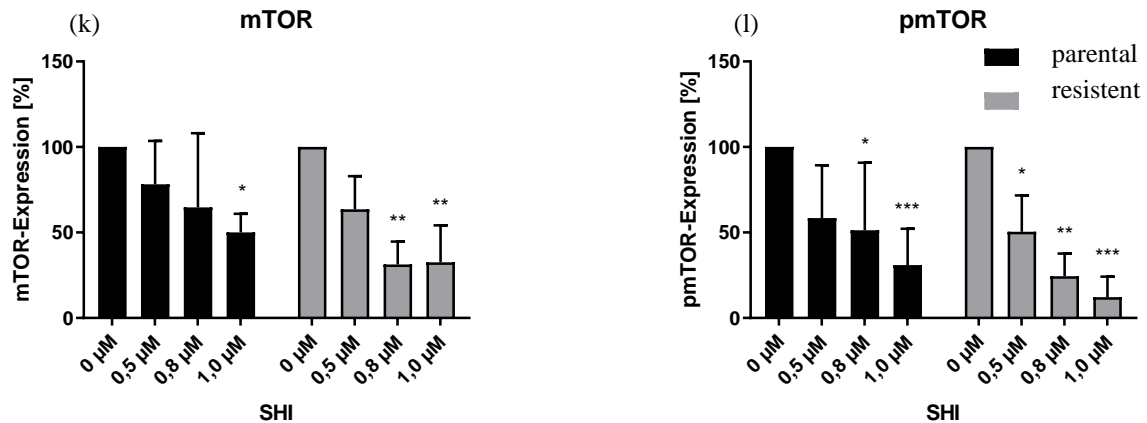


Abbildung 9. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie DU 145. Expression der zellzyklusregulierenden Proteine der parentalen und DX-resistenten PCa-Zelllinie DU 145 nach 48 h SHI-Behandlung [0,5-1 µM]. Pixel-Dichte-Analyse (Western Blot) der Proteine CDK1 (a), pCDK1 (b), CDK2 (c), pCDK2 (d), Cyclin A (e), Cyclin B (f), CyclinD1 (g), p27 (h), p21 (i), PTEN (j), mTOR (k), pmTOR (l). Normalisierung zum Gesamtprotein. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Signifikanzunterschied zur unbehandelten Kontrolle [0 µM]: *= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$. n=3.

5 Diskussion

Das PCa stellt die häufigste Krebserkrankung des Mannes dar (1). Trotz verbesserter Diagnostik und Therapiemethoden liegt noch kein kurativer Therapieansatz für das fortgeschrittene PCa vor, sodass ein palliatives Therapiekonzept Anwendung findet. Zwar können die eingesetzten Therapeutika, wie DX als Erstlinientherapie oder eine neuere androgenrezeptorblockierende Therapie, zur Verlängerung des Gesamtüberlebens führen, jedoch sind die Erfolge häufig durch Resistenzentwicklung limitiert (7-9, 12). Ziel der vorliegenden Studie war es zu überprüfen, inwieweit SHI ein Additivum in der Therapie des fortgeschrittenen PCas darstellen könnte und ob es zu einer Resensibilisierung DX-resistenter PCa-Zellen führen kann.

Für die Versuchsreihen in den parentalen und DX-resistenten PCa-Zellen wurde ein Konzentrationsbereich zwischen 0,1 - 1,5 µM SHI ausgewählt. In einer vorausgegangenen Untersuchung an parentalen DU145- und PC3-Zellen konnte bereits für eine Konzentration

von über 2 μM / ml SHI zytotoxische Effekte gezeigt werden (87). Weiterhin konnte in dem Konzentrationsbereich zwischen 0,375-1,5 μM / ml eine Wachstumsinhibition für parentale DU145-Zellen beobachtet werden. Für parentale PC3-Zellen waren höhere Konzentrationen beschrieben worden, so konnte eine 50 %ige Wachstumsreduktion in einem Bereich von 5 μM erreicht werden (89). In einer weiteren Studie induzierte SHI in einem Bereich zwischen 1 – 4 μM in parental LNCaP eine zeit- und konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (85). Bei der Untersuchung anderer therapieresistenter Zelllinien, wie dem Harnblasenkarzinom, konnte eine Wirksamkeit von SHI in einem Bereich von 0,4 μM erreicht werden (111). Insgesamt liegen die ausgesuchten Konzentrationen somit im vergleichbaren Bereich wie in vorherigen Studien. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Zelllinien zu erlangen, wurden die gleichen Konzentrationsbereiche für alle drei PCa-Zelllinien (bzw. die sechs Subzelllinien) gewählt.

5.1 Einfluss von Shikonin auf das Tumorwachstum

In Dosis-Wirkungskurven konnte zeit- und dosisabhängige Wachstums- und Proliferationsinhibitionen sowohl für die parentalen als auch DX-resistenten PCa-Zellen gezeigt werden. Die DX-resistenten PCa-Zellen sprachen dabei in der Regel etwas weniger sensitiv als die parentalen Zellen an. Denkbar, dass die geringere Teilungsrate der DX-resistenten PCa-Zellen für diesen Effekt mitverantwortlich war. Auch eine zeit- und dosisabhängige Inhibition der Proliferation konnte bestätigt werden. Diese war in parentalen Zellen bereits in den ersten 24 h zu beobachten, während im resistenten Gegenpart eine Reduktion erst nach längerer Inkubationsdauer erreicht werden konnte. Daher wurde für die nachfolgenden Versuchsreihen eine Inkubationszeit von 48 h gewählt. Ein Erklärungsansatz für das frühe Ansprechen der LNCaPs könnte in der Hormonabhängigkeit dieser und einer möglichen Beeinflussung des Androgenrezeptors (AR) durch SHI begründet liegen, was bereits in vorausgegangenen Studien gezeigt worden war (85, 94). Zu erwähnen bleibt weiterhin, dass die parentalen und DX-resistenten LNCaP-Zellen im MTT-Assay ein sehr geringes Wachstumsverhalten gezeigt haben und somit das frühe Ansprechen auch auf das insgesamt geringere Wachstumsverhalten zurückzuführen sein könnte.

In guter Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Arbeit konnten auch Untersuchungen mit SHI in verschiedenen anderen Zelllinien vergleichbare Ergebnisse zeigen. Effekte waren in Zellen des Harnblasenkarzinoms nach Zugabe von 0,4 μM und einer Inkubationsdauer von 24 h (111), des Glioms in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,1 –

4 μM SHI über einen Zeitraum von 6 -72 h (112), des Endometriuskarzinoms in einem Konzentrationsbereich von 1 – 20 μM und einer Inkubationsdauer von 24 h (113) und akuter promyeloischer Leukämiezellen in einem Konzentrationsbereich von 0,2 – 0,4 μM über 36h (114) zu beobachten. Auch in diesen Tumorentitäten konnte eine zeit- und dosisabhängige Inhibition des Wachstums nach Zugabe von SHI detektiert werden, wobei eine breite Streuung des notwendigen Konzentrationspektrums vorlag (111, 112, 114). Die Ursache für eine Wachstumsinhibition durch SHI ist hier laut Autoren insbesondere auf die Apoptoseinduktion und den Eingriff in zellzyklusregulierende Prozesse zurückzuführen (112, 113).

Auch in Untersuchungen an PCa-Stammzellen und CX-resistenten DU145- und PC3-Zellen konnte mit SHI eine Wachstums- und Proliferationsinhibition gezeigt werden (89). Zur Wachstumsinhibition der PCa-Stammzellen musste dazu eine deutlich höhere SHI-Konzentration aufgewendet werden, was offensichtlich auf eine niedrigere Teilungsrate der Stammzellen zurückzuführen war. In weiteren Studien wurde die Wachstumsinhibition durch SHI in PC3- und DU145-Zellen zum einen auf eine Interaktion im BCL2/BAX- und AKT/mTOR-Signalwegs (87) und zum anderen auf eine Apoptoseinduktion durch ROS-Induktion und Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (88) zurückgeführt. Zudem konnte eine Exposition von LNCaP und 22RV1 mit SHI durch Reduktion des Androgenrezeptors in einer Wachstumsinhibition resultieren (85).

5.2 Prozesse die nach Shikoninbehandlung zum Zelltod führen

In der vorliegenden Studie sollte weiterhin untersucht werden, ob die Wachstums- und Proliferationsinhibition durch SHI auf die Induktion einer Apoptose zurückzuführen ist.

Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltodes dar. Sie erfüllt verschiedene Funktionen z.B. im Rahmen der Aufrechterhaltung der Homöostase bei Wachstums- und Alterungsprozessen, der Immunantwort oder der Reaktion auf Zellschädigungen (102). Auch können Störungen im Apoptosesignalweg zur Entstehung und zum Progress von malignen Erkrankungen und zur Bildung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika beitragen (115).

Apoptose erfüllt die Funktion eines kontrollierten Zelltodes, der einzelne Zellen oder Zellcluster betreffen kann. Im Gegensatz dazu kommt es im Rahmen der Nekrose zu einem unkontrollierten Zelluntergang, der viele Zellen betrifft und mit Zellschwellung, Karyolyse und dem Freiwerden von Entzündungsfaktoren einhergeht (102, 115).

Der programmierte Zelltod kann durch den intrinsischen oder den extrinsischen Signalweg eingeleitet werden. Verschiedene Signale wie Hitze, Strahlung, Medikamente oder mitochondriale Störungen können zur Aktivierung des extrinsischen oder des intrinsischen Signalwegs führen (102).

Tatsächlich konnte eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen und eine signifikante Abnahme vitaler Zellen in den androgenresistenten PCa-Zellen DU145 und PC3 (sowohl parentale als auch DX-resistente) beobachtet werden. Auch in den androgensensitiven LNCaP konnte eine Zunahme der apoptotischen Zellen in der DX-resistenten Zelllinie bei einer Konzentration von 0,7 μM / ml SHI beobachtet werden. Nekrotische Effekte konnten weder in den parentalen noch in den DX-resistenten PCa-Zelllinien nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass SHI keine Effekte induziert, die auch Normalzellen betreffen könnten.

Eine Apoptoseinduktion nach Behandlung mit SHI konnte bereits für unterschiedlichste Tumorzellen gezeigt und auf verschiedenste Mechanismen zurückgeführt werden. In Mammakarzinomzellen (116), in Zelllinien des Magenkarzinoms (82, 117), des Glioms (112) und des Melanoms (118) konnte SHI ebenfalls eine Apoptose induzieren (118). In Zelllinien des Mammakarzinoms (116), des Ovarialkarzinoms (119) und des Hepatozellulären Karzinoms (120) resultierte SHI dabei in einer intrinsischen Apoptose. Auch führte SHI zu einer Begünstigung apoptotischer Effekte und einer Beeinflussung sowohl des extrinsischen als auch des intrinsischen Weges in Zellen des Lungen- und Magenkarzinoms (117, 121). Dabei wurden die untersuchten Tumorentitäten mit unterschiedlichsten SHI-Konzentrationen behandelt. In Magenkarzinomzellen (BBG-823) konnte beispielsweise mit einer SHI-Konzentration von 10 μM nach 24 h eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden (82, 117). In Gliomzellen (112) sowie in Melanomzellen (122) konnte in einem niedrigeren Konzentrationsbereich zwischen 0,4 – 1 μM SHI ebenfalls nach 24 h Inkubation eine Apoptoseinduktion gezeigt werden. Dabei waren der Untersuchung der Apoptose ebenfalls Vitabilitäts- und Proliferationsstudien vorausgegangen, die ebenso, wie in der vorliegenden Studie, eine zeit- und dosisabhängige Reduktion erbrachten (112, 122).

Auch Untersuchungen an parentalen und CX-resistenten PCa-Zellen konnten eine Apoptoseinduktion durch die Behandlung mit SHI zeigen und stützen damit die Untersuchungsergebnisse in der vorliegenden Studie (88, 89). In diesen Studien konnten für parentale DU145-Zellen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,375 - 3,0 μM SHI sowie für parentale PC3 in einem Konzentrationsbereich zwischen 2,5 – 20 μM SHI eine Zunahme apoptotischer Zellen zeigen (89).

Wang et al. untersuchten dabei den Effekt auf PCa-Stammzellen und auf CX-resistente Zelllinien (89). Dabei reagierten die Stammzellen weniger sensitiv auf die Behandlung mit SHI. Jedoch konnte sowohl in PC3 und DU145 als auch den Stammzellen eine Apoptose beobachtet werden (89). Zudem wurde postuliert, dass SHI durch Modulation des PI3K/AKT-ABCG2-ALDH3A1 Signalweges eine Chemotherapieresistenz umkehren kann (89). Auch Gara et al. konnten einen Einfluss von SHI auf PCa-Zellen (DU145 und PC3) über Apoptose nachweisen (88). Eine Untersuchung der Wirkung von SHI auf DX-resistente PCa-Zellen auch im Vergleich zu den parentalen Zelllinien, wie in der vorliegenden Studie, wurde hier jedoch nicht durchgeführt.

Die moderaten apoptotischen Effekte in den LNCaP-Zellen lassen darauf schließen, dass die Wachstums- und Proliferationsinhibition hier primär auf anderen Mechanismen, wie z.B. einem Zellzyklusarrest, beruhen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SHI zu einer Apoptoseinduktion insbesondere in den kastrationsresistenten Zelllinien führte und die Wachstums- und Proliferationsinhibition nicht auf nekrotische Prozesse zurückzuführen ist.

5.3 Einfluss von Shikonin auf die Zellzyklusregulation

In den Zellzyklusanalysen konnte für die parentalen PC3 und DX-resistenten DU 145 Zellen nach SHI-Gabe ein signifikanter Arrest in der G2/M-Phase gezeigt werden.

Der Zellzyklus spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Zellduplikation. Die Zellduplikation stellt normalerweise einen entscheidenden Faktor in der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur und der Differenzierung dar. Entscheidend dabei ist die Regulation des Zellzyklus durch verschiedene Signalwege und Kontrollstellen, wodurch eine unkontrollierte Teilung und ein Übergang in Karzinomzellen verhindert werden soll (123). Die Einteilung des Zellzyklus erfolgt in vier Phasen. Man differenziert zwischen der S-Phase zur Genomreplikation, der M-Phase zur Zellteilung und den zwischengeschalteten G-Phasen. Im Rahmen von Differenzierungsprozessen oder Wachstumsfaktormangel kann die Zelle in die G0-Phase, auch Ruhephase, überführt werden (124). Die G1- und G2-Phasen dienen der Vorbereitung auf die nachfolgende Phase und der Kontrolle einer ungehinderten Zellteilung. Gesteuert werden die einzelnen Phasen durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs). CDKs sind Serin/Threonin-Kinasen, die abhängig von ihrem Phosphorylierungszustand aktiv oder passiv vorliegen können. Die Aktivierung der CDKs erfolgt über Cycline (123, 125). CDKs sind in

verschiedene Prozesse innerhalb der Zelle, wie Zellzyklus, Transkription und Apoptose, involviert. Das Genom codiert für 21 CDKs (126).

Analog zur vorliegenden Studie konnte ein G2/M-Phase-Arrest durch die Behandlung mit SHI in Zellen des Adenokarzinoms der Lunge, des Mammakarzinoms, des Pankreaskarzinoms, des Osteosarkoms und des Magenkarzinoms beobachtet werden (26, 28). Dabei konnte insbesondere für das Adenokarzinom des Magens sowie das Pankreaskarzinom eine Zunahme in der G2/M-Phase in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 - 10 μM SHI und 12 – 24 h gezeigt werden. Damit war auch der Anteil der G2/M-Phase-Zellen, analog zur vorliegenden Studie konzentrationsabhängig und zusätzlich zeitabhängig (28). Zeitgleich kam es zu einer Reduktion der G1-Phase-Zellen (28).

Zudem konnte Chen et al. eine Zunahme der G2-Phase-Zellen für DU145 und PC3 nach einer 48-stündigen Behandlung mit SHI in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,5-2 μM / ml zeigen (87).

Im Unterschied dazu konnte in Zelllinien des Melanoms ein G0/G1-Phase-Arrest nach SHI-Exposition (5 μM) nach 12 h beobachtet werden (127). Gleiches war in Zellen des Mammakarzinoms, des Ösophaguskarzinoms und des Kolonkarzinoms nach entsprechender SHI-Gabe nachweisbar (128-130).

Eine signifikante Veränderung der Expression zellzyklusregulierender Proteine konnte in der vorliegenden Studie, entsprechend den beobachteten Effekten von SHI auf den Zellzyklus, vor allem für die parentalen PC3 und DX-resistenten DU145 gezeigt werden. Betroffen von der Expressionsveränderung waren insbesondere CDK 1 und 2, deren aktivierte Formen, pCDK 1 und 2, sowie die Cycline A und B, PTEN und mTOR. Überraschenderweise konnten auch Veränderungen in den DX-resistenten PC3 und parentalen DU145 beobachtet werden, auch wenn keine signifikante Veränderung der Zellanteile in den unterschiedlichen Phasen im Rahmen der FACS-Analyse nachgewiesen werden konnte. Insgesamt waren jedoch deutlichere Effekte in den Zelllinien zu beobachten, in denen auch ein Zellzyklusarrest gezeigt worden war.

CDKs, wie CDK4, CDK6, CDK1 und CDK2 gehören zu den klassischen Zellzyklusproteinen, die durch Komplexbildung mit den jeweiligen Cyclinen den Übergang und das Fortschreiten des Zellzyklus regulieren. In Tumorzellen konnte gehäuft eine Deregulation dieser beobachtet werden, weswegen sie auch als ein mögliches Ziel in der Tumorthherapie diskutiert werden (131). Die Aktivität der CDKs wird innerhalb des Zellzyklus durch die unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Cycline im Laufe des Zyklus

reguliert (132). Das Voranschreiten in der G1-Phase wird durch die Aktivierung von CDK4/6 in Assoziation mit Cyclin D1 gesteuert, das beispielsweise in den PC3-Zellen tendenziell durch SHI herab reguliert wurde. Der dann folgende Übergang in die S-Phase und der Replikationsbeginn ist abhängig von CDK2. Eine signifikante Herabregulation von CDK2 war in parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen sowie in den DU145 zu erkennen. CDK2 interagiert je nach Phase einmal mit Cyclin E zu Beginn der S-Phase und innerhalb der S-Phase und der G2-Phase sowohl mit Cyclin A als auch Cyclin B, welches in den DX-resistenten PC3 signifikant reduziert wurde. Eine Inhibition der Aktivität des CDK-Cyclin-Heterodimers kann durch die Aktivierung von p21 und p27 erfolgen (133). p21 und p27 gehören mit p57 zur Cip/Kip-Familie und stellen Inhibitoren im Zellzyklus dar (131). Hier konnte eine Hochregulation von p21 für die parentalen PC3 nachgewiesen werden. Der Eintritt in die M-Phase wird durch die Aktivität von CDK1 kontrolliert, das sowohl mit Cyclin A als auch Cyclin B interagiert. Es wird zudem vermutet, dass CDK1 auch am Übergang von der G1 in die S-Phase beteiligt ist (133). Eine signifikante Reduktion von CDK1 war in allen Zelllinien nachweisbar.

In parentalen und DX-resistenten PC3-Zellen konnte eine signifikante Reduktion für CDK1, CDK2, Cyclin B in nach SHI-Exposition nachgewiesen werden. In guter Übereinstimmung korreliert diese Inhibition mit dem G2/M-Phase-Arrest nach SHI-Gabe in den parentalen PC3-Zellen. Insbesondere CDK1 und Cyclin B sind dabei für den G2/M-Phase-Progress entscheidend (132, 133). Analog hierzu konnte ebenfalls in einer Studie mit parentalen und Sunitinib-resistenten Nierenzellkarzinomzellen (Caki-1) ein G2/M-Phase-Arrest nach Zugabe von 1,5 µM SHI nach 48 h Inkubation nachgewiesen werden, der mit einer Reduktion von Cyclin B, CDK1 und pCDK1 einherging (134). Eine Hemmung der CDKs und Cycline ist somit ein guter Indikator für den beobachteten Arrest, aber nicht allein. So konnte die Inhibition auch in den resistenten PC3-Zellen detektiert werden, die keinen signifikanten G2/M-Phasen-Arrest aufwiesen. Die für das Cyclin A beobachtete Reduktionstendenz gibt ebenfalls einen Hinweis auf einen möglichen Arrest in der G2/M-Phase (133). Da Cyclin A mit CDK2 auch in den Progress der S-Phase involviert ist, könnte eine Hemmung ebenso die nachgeschalteten Phasen hemmen (127). Ausschließlich in den parentalen PC3-Zellen konnte eine erhöhte Expression des Zellzyklusinhibitors p21 nachgewiesen werden, der den Zellzyklusprogress von Beginn an zum Erliegen bringt (132). Eine Erhöhung der Proteinkonzentration von p21 konnte, nach der Behandlung mit SHI, auch in Adenokarzinomzellen der Lunge (28), des Mammakarzinoms (28), des Pankreaskarzinoms (28), des Osteosarkoms (28) und des Magenkarzinoms (28) beobachtet und analog zur

vorliegenden Studie mit einem Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase in Zusammenhang gebracht werden (25,26). p27 wird ebenfalls häufig als Inhibitor des Zellzyklus dargestellt (132). Eine Reduktion von p27, wie sie in den PC3-Zellen detektierbar war, konnte in Endothelzellen (135) und Pankreaskarzinomzellen (136) auch mit einem Zellzyklusarrest in Zusammenhang gebracht werden.

In Einklang mit der Zellzyklusanalyse zeigten DX-resistente DU145-Zellen ein besseres Ansprechen der Zellzyklusproteine nach Behandlung mit SHI als die parentalen DU145. Auch hier war eine signifikante Reduktion von CDK1, CDK2, p21 und p27, sowie eine Reduktionstendenz von Cyclin A und B zu sehen.

Interessant war die Beobachtung, dass SHI hier auch Einfluss auf den *Housekeeper* β -Aktin nahm, was die Auswertung erschwerte. β -Aktin ist im Rahmen der Western Blot Analyse ein etabliertes *Housekeeping*-Protein (137). Dennoch ist es so, dass die Konzentration des β -Aktins von verschiedenen Faktoren, wie Medikamenteneinfluss, Zellgewebe, Differenzierung und Zellstress, abhängig sein kann (137). Da die Wirkung des SHI weitgehend unbekannt ist, könnten hier Mechanismen induziert worden sein, die eine Reduktion des Proteingehaltes von β -Aktin nach sich gezogen haben. Die Effekte von SHI auf die DU145-Zellen sind somit deutlich stärker als sich nach der Verrechnung mit β -Aktin zeigt. In Folgeuntersuchungen der Arbeitsgruppe wurde dieser Umstand berücksichtigt und statt *Housekeeper*-Proteinen das Gesamtprotein zur Verrechnung heran gezogen (137).

Die ermittelten Veränderungen ohne β -Aktin zeigen reproduzierbar Veränderungen der Expression von CDK1, CDK2, Cyclin A, Cyclin B sowie p21 und p27. Diese stimmten gut mit dem beobachteten Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase überein.

Um zu überprüfen, ob ein Einfluss von SHI auf den PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs, relevant für das Überleben und Wachstum der Zellen (113), stattfindet, wurde im Weiteren die Expression und Aktivität von mTOR nach Zugabe von SHI überprüft. Hier konnte für alle Zellen konzentrationsabhängig eine Reduktion der Expression und Stärke der Aktivität von mTOR gezeigt werden. Da der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle im Zellwachstum und Zellzyklus (107, 128, 138) spielt, wird mTOR auch hier als mögliches Ziel einer zielgerichteten Tumortherapie diskutiert (138, 139). Auch in Nierenzellkarzinomzellen (parentale und Sunitinib-resistente Caki-1 und 786-0) resultierte eine Behandlung mit SHI in einer signifikanten Reduktion von AKT/mTOR (134). Die Behandlung mit SHI erfolgte dabei in einem Konzentrationsbereich von 0,5 – 2,0 μ M über eine Inkubationsdauer von 48 h (134). Weiterhin konnte in Zervixkarzinomzellen durch die Hinzugabe von SHI nach 48 h eine

Reduktion von AKT/mTOR beobachtet werden (140). Der hierzu notwendige Konzentrationsbereich lag jedoch mit 5 – 10 μ M SHI über dem in der vorliegenden Studie (140). So nimmt SHI möglicherweise Einfluss auf den PI3/AKT/mTOR-Signalweg durch die Regulation von mTOR und hat so ebenfalls einen wachstumsregulierenden Einfluss auf die PCa-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der durch SHI induzierte Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase der parentalen PC3 und der DX-resistenten DU145-Zellen auf die Modulation verschiedener zellzyklusregulierender Proteine zurückzuführen ist. Von Bedeutung sind dabei offensichtlich die Veränderungen von CDK1, CDK2, Cyclin A, Cyclin B sowie p21 und p27. Weiterhin nimmt SHI Einfluss auf mTOR und könnte darüber ebenfalls auf den Zellzyklus einwirken.

5.4 Limitationen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Wachstums- und Proliferationsinhibition der PCa-Zelllinien durch SHI sowohl auf Zellzyklus-inhibierende als auch Apoptose-induzierende Prozesse zurückgeführt werden kann. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Western Blot Analysen und des Apoptose-Assays bestehen Limitationen.

Interessant war zum einen die Beobachtung, dass SHI auch Einfluss auf den *Housekeeper* β -Aktin hatte, wodurch von einer stärkeren Wirkung des SHI insbesondere auf DU145-Zellen auszugehen ist. In Folgeuntersuchungen sollte daher statt dem *Housekeeper*-Protein das Gesamtprotein zur Verrechnung herangezogen werden.

Zudem sollten in Folgeuntersuchungen auch pro- und antapoptotische Proteine im Rahmen einer Western Blot Analyse untersucht werden, um die molekularen Hintergründe der Apoptoseinduktion zu klären. Zur genaueren Differenzierung zwischen Apoptose und anderen Zelltoden (z. Bsp. Nekroptose) sollten zudem weitere Zelltodanalysen zur Verifizierung der Daten erfolgen (115).

Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien sind die LNCaP-Zellen AR-positiv und hormonsensibel (94). SHI führt zu einer AR-abhängigen Wachstumsinhibition durch Verminderung der Transkription und Expression der ARs (85). Zudem postulierten Wen et al., dass der AR Einfluss auf verschiedene Arten des Zelltods, nicht nur auf die Apoptose, nehmen könnte und sowohl positiv als auch negativ regulierende Einflüsse hätte (141). Inwieweit SHI Einfluss auf andere Zelltodarten über Regulation des ARs, wie z.B. die

Nekroptose, nimmt und damit wachstumsregulierend auf LNCaP-Zellen wirkt, werden weitere Untersuchungen zeigen müssen.

Um die Studien translational zu gestalten, sollten zudem tierexperimentelle Versuche durchgeführt werden. Erste Untersuchungen mit SHI im Mausmodell hepatozellulärer Karzinome konnte eine Reduktion des Tumolvolumens für eine SHI-Konzentration von 5-10 mg / kg zeigen (142). Auch konnte eine Reduktion der Tumorgröße in Mäusen für das ösophageale Karzinom nach SHI-Applikation beobachtet werden (130). Einschränkend waren hier jedoch die Nebenwirkungen, wie Gewichtsverlust, Antriebslosigkeit und Tod der Versuchstiere. *In vivo* Untersuchung zum PCa mit SHI gibt es bisher nicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SHI ein erfolgsversprechendes Additivum zur Therapie des DX-resistenten PCas darstellen könnte, da eine signifikante Inhibition des Wachstums und der Proliferation für alle PCa-Zellen gezeigt werden konnte. Weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche sind notwendig, um die ersten Daten zu SHI im PCa, insbesondere auch im DX-resistentem PCa, verifizieren zu können.

6 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom (PCa) stellt mit ~366.000 Todesfällen weltweit die häufigste Krebserkrankung des Mannes dar. Das Therapieregime ist maßgeblich abhängig vom Stadium der Erkrankung. Docetaxel (DX) kann im lokal fortgeschrittenen und metastasierten oder Androgen-resistenten PCa zum Einsatz kommen. Wie in den anderen Therapien kommt es jedoch zur Resistenzentwicklung, die sich therapielimitierend auswirkt. Shikonin (SHI), ein Naturstoff, konnte bereits vielversprechende antitumorale Effekte für verschiedenste Karzinome zeigen. Daten zum DX-resistenten PCa lagen bisher jedoch nicht vor. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob und inwiefern SHI Einfluss auf das progressive Wachstumsverhalten parentaler und DX-resistenter PCa-Zellen nimmt.

Dazu wurde an einem Panel parentaler und DX-resistenter PCa-Zellen das Wachstum (MTT-Test) und die Proliferation (BrdU-Assay) nach 24-72 h SHI-Exposition evaluiert. In weiterführenden Studien wurden weiterhin die zugrundeliegenden Mechanismen und involvierten Proteine untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Induktion von Zelltoden (Apoptose und Nekrose) und der Regulation des Zellzykluses (Durchflusszytometrie). Auf Proteinebene wurden insbesondere die Expression und Aktivität zellzyklusregulierender Proteine sowie Proteine des Akt / mTOR-Signalwegs (Western Blot Analyse) analysiert.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte SHI eine zeit- und dosisabhängige Wachstums- und Proliferationsinhibition sowohl für parentale als auch DX-resistente PCa-Zellen induzieren. Dies ging insbesondere in den androgenresistenten Zelllinien, PC3 und DU145, mit einer Apoptoseinduktion einher, unter gleichzeitiger signifikanter Reduktion des vitalen Zellanteils. In den androgensensitiven LNCaP-Zellen konnte in den DX-resistenten Subzellen für die höchste SHI-Konzentration ebenfalls eine signifikante Apoptoseinduktion gezeigt werden. In den PC3 und DU145-Zellen war weiterhin ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase zu beobachten, der mit entsprechender Modulation der zellzyklusregulierenden Proteine einherging. Da in den LNCaP-Zellen nur eine moderate Zelltodinduktion und kein Zellzyklusarrest detektiert werden konnte, wird hier ein anderer regulierter Zelltod, wie beispielsweise die Nekroptose, postuliert. Weiterführende Untersuchungen werden dies klären.

Zusammengefasst könnte SHI somit ein erfolgsversprechendes Additivum in der Therapie gerade des fortgeschrittenen, DX-resistenten PCas darstellen. Weitere Untersuchungen zur Verifizierung des antitumoralen Effekts von SHI in parentalen und insbesondere DX-resistenten PCa-Zellen *in vitro* und *in vivo* sind notwendig, um dies zu klären.

7 Literaturverzeichnis

1. Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):524-48.
2. McDavid K, Lee J, Fulton JP, Tonita J, Thompson TD. Prostate cancer incidence and mortality rates and trends in the United States and Canada. *Public Health Rep.* 2004;119(2):174-86.
3. Erdmann Fea. Krebs in Deutschland für 2017/2018: Robert Koch Institut; 2021 [01.02.2022]. Available from: https://www.gekid.de/wp-content/uploads/2022/01/krebs_in_deutschland_2021.pdf. Stand: Januar 2022
4. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2017;71(4):618-29.
5. Klotz L. Active surveillance for prostate cancer: for whom? *J Clin Oncol.* 2005;23(32):8165-9.
6. Deutsche Gesellschaft für Urologie. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms: Deutsche Gesellschaft für Urologie (DGU); 2019 [Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-022OLk_S3_Prostatakarzinom_2019-06.pdf. Stand: Novmeber 2022)
7. Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, De Santis M, Gross T, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol.* 2017;71(4):630-42.
8. 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.
9. 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.
10. Cortes JE, Pazdur R. Docetaxel. *J Clin Oncol.* 1995;13(10):2643-55.
11. Buttiglierio C, Tucci M, Bertaglia V, Vignani F, Bironzo P, Di Maio M, et al. Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(10):884-92.
12. Dong L, Zieren RC, Xue W, de Reijke TM, Pienta KJ. Metastatic prostate cancer remains incurable, why? *Asian J Urol.* 2019;6(1):26-41.
13. Zheng H, Chen J, Qiu W, Lin S, Chen Y, Liang G, et al. Safety and Efficacy of First-Line Treatments for Chemotherapy-Naive Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Systematic Review and Indirect Comparison. *Biomed Res Int.* 2017;2017:3941217.
14. 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.
15. Thomas C, Baunacke M, Erb HHH, Fussel S, Erdmann K, Putz J, et al. Systemic Triple Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer (mHSPC): Ready for Prime Time or Still to Be Explored? *Cancers (Basel).* 2021;14(1).
16. Abidi A. Cabazitaxel: A novel taxane for metastatic castration-resistant prostate cancer-current implications and future prospects. *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):230-7.
17. Paller CJ, Antonarakis ES. Cabazitaxel: a novel second-line treatment for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2011;5:117-24.
18. Angell M, Kassirer JP. Alternative medicine--the risks of untested and unregulated remedies. *N Engl J Med.* 1998;339(12):839-41.
19. Johnson SB, Park HS, Gross CP, Yu JB. Use of Alternative Medicine for Cancer and Its Impact on Survival. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(1).
20. Risberg T, Kaasa S, Wist E, Melsom H. Why are cancer patients using non-proven complementary therapies? A cross-sectional multicentre study in Norway. *Eur J Cancer.* 1997;33(4):575-80.
21. Richardson MA, Sanders T, Palmer JL, Greisinger A, Singletary SE. Complementary/alternative medicine use in a comprehensive cancer center and the implications for oncology. *J Clin Oncol.* 2000;18(13):2505-14.
22. Liu SH, Chuang WC, Lam W, Jiang Z, Cheng YC. Safety surveillance of traditional Chinese medicine: current and future. *Drug Saf.* 2015;38(2):117-28.
23. Ma Y, Zhou K, Fan J, Sun S. Traditional Chinese medicine: potential approaches from modern dynamical complexity theories. *Front Med.* 2016;10(1):28-32.
24. Wang J, Wong YK, Liao F. What has traditional Chinese medicine delivered for modern medicine? *Expert Rev Mol Med.* 2018;20:e4.
25. Xu Q, Bauer R, Hendry BM, Fan TP, Zhao Z, Duez P, et al. The quest for modernisation of traditional Chinese medicine. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:132.

26. Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999;38(3):270-301.
27. Andujar I, Recio MC, Giner RM, Rios JL. Traditional chinese medicine remedy to jury: the pharmacological basis for the use of shikonin as an anticancer therapy. *Curr Med Chem.* 2013;20(23):2892-8.
28. Wang F, Mayca Pozo F, Tian D, Geng X, Yao X, Zhang Y, et al. Shikonin Inhibits Cancer Through P21 Upregulation and Apoptosis Induction. *Front Pharmacol.* 2020;11:861.
29. Kim SJ, Kim JM, Shim SH, Chang HI. Shikonin induces cell cycle arrest in human gastric cancer (AGS) by early growth response 1 (Egr1)-mediated p21 gene expression. *J Ethnopharmacol.* 2014;151(3):1064-71.
30. Thonsri U, Seubwai W, Warasawapati S, Wongkham S, Boonmars T, Cha'on U, et al. Antitumor Effect of Shikonin, a PKM2 Inhibitor, in Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Anticancer Res.* 2020;40(9):5115-24.
31. Lu B, Gong X, Wang ZQ, Ding Y, Wang C, Luo TF, et al. Shikonin induces glioma cell necroptosis in vitro by ROS overproduction and promoting RIP1/RIP3 necrosome formation. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(11):1543-53.
32. Wiench B, Eichhorn T, Paulsen M, Efferth T. Shikonin directly targets mitochondria and causes mitochondrial dysfunction in cancer cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:726025.
33. Wu H, Xie J, Pan Q, Wang B, Hu D, Hu X. Anticancer agent shikonin is an incompetent inducer of cancer drug resistance. *PLoS One.* 2013;8(1):e52706.
34. Li W, Liu J, Jackson K, Shi R, Zhao Y. Sensitizing the therapeutic efficacy of taxol with shikonin in human breast cancer cells. *PLoS One.* 2014;9(4):e94079.
35. Du W, Hao X, Yuan Z, Wang Y, Zhang X, Liu J. Shikonin potentiates paclitaxel antitumor efficacy in esophageal cancer cells via the apoptotic pathway. *Oncol Lett.* 2019;18(3):3195-201.
36. Wang Z, Yin J, Li M, Shen J, Xiao Z, Zhao Y, et al. Combination of shikonin with paclitaxel overcomes multidrug resistance in human ovarian carcinoma cells in a P-gp-independent manner through enhanced ROS generation. *Chin Med.* 2019;14:7.
37. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet.* 2003;361(9360):859-64.
38. Grozescu T, Popa F. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life.* 2017;10(1):5-12.
39. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
40. Zeegers MP, Jellema A, Ostrer H. Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. *Cancer.* 2003;97(8):1894-903.
41. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int.* 2003;91(9):789-94.
42. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol.* 2012;4:1-11.
43. Rebbeck TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol.* 2017;27(1):3-10.
44. Shavers VL, Underwood W, Moser RP. Race/ethnicity and the perception of the risk of developing prostate cancer. *Am J Prev Med.* 2009;37(1):64-7.
45. Archer M, Dogra N, Kyprianou N. Inflammation as a Driver of Prostate Cancer Metastasis and Therapeutic Resistance. *Cancers (Basel).* 2020;12(10).
46. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):256-69.
47. Allott EH, Masko EM, Freedland SJ. Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. *Eur Urol.* 2013;63(5):800-9.
48. Wang K, Chen X, Gerke TA, Bird VY, Ghayee HK, Prosperi M. BMI trajectories and risk of overall and grade-specific prostate cancer: An observational cohort study among men seen for prostatic conditions. *Cancer Med.* 2018;7(10):5272-80.
49. Merriel SWD, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther.* 2018;35(9):1285-94.
50. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol.* 2016;69(3):428-35.
51. Varma M, Cochlin D, Delahunt B, Kynaston H, Rees J, Rous B, et al. TNM clinical staging of prostate cancer: issues and solutions. *BJU Int.* 2019;123(3):382-4.
52. Grossmann ME, Huang H, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(22):1687-97.
53. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:451-86.
54. Debes JD, Tindall DJ. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(15):1488-90.
55. Benoist GE, Hendriks RJ, Mulders PF, Gerritsen WR, Somford DM, Schalken JA, et al. Pharmacokinetic Aspects of the Two Novel Oral Drugs Used for Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: Abiraterone Acetate and Enzalutamide. *Clin Pharmacokinet.* 2016;55(11):1369-80.

56. Harris WP, Mostaghel EA, Nelson PS, Montgomery B. Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol.* 2009;6(2):76-85.
57. Trock BJ, Han M, Freedland SJ, Humphreys EB, DeWeese TL, Partin AW, et al. Prostate cancer-specific survival following salvage radiotherapy vs observation in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA.* 2008;299(23):2760-9.
58. Amling CL, Bergstralh EJ, Blute ML, Slezak JM, Zincke H. Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point? *J Urol.* 2001;165(4):1146-51.
59. Roach M, 3rd, Hanks G, Thames H, Jr., Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006;65(4):965-74.
60. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol.* 2015;4(3):365-80.
61. Deutsche Gesellschaft für Urologie: S3-Leitlinie Prostatakarzinom.; Deutsche Gesellschaft für Urologie; 2021.
62. Oudard S, Medioni J, Scotte F, Banu E. [Prostate cancer: update]. *Bull Cancer.* 2005;92(10):865-73.
63. Kyriakopoulos CE, Chen YH, Carducci MA, Liu G, Jarrard DF, Hahn NM, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHAARTED Trial. *J Clin Oncol.* 2018;36(11):1080-7.
64. Kellokumpu-Lehtinen PL, Harmenberg U, Joensuu T, McDermott R, Hervonen P, Ginman C, et al. 2-Weekly versus 3-weekly docetaxel to treat castration-resistant advanced prostate cancer: a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(2):117-24.
65. Komura K, Sweeney CJ, Inamoto T, Ibuki N, Azuma H, Kantoff PW. Current treatment strategies for advanced prostate cancer. *Int J Urol.* 2018;25(3):220-31.
66. Bumbaca B, Li W. Taxane resistance in castration-resistant prostate cancer: mechanisms and therapeutic strategies. *Acta Pharm Sin B.* 2018;8(4):518-29.
67. Goncalves A, Braguer D, Kamath K, Martello L, Briand C, Horwitz S, et al. Resistance to Taxol in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11737-42.
68. Madan RA, Pal SK, Sartor O, Dahut WL. Overcoming chemotherapy resistance in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(12):3892-902.
69. Huzil JT, Chen K, Kurgan L, Tuszynski JA. The roles of beta-tubulin mutations and isotype expression in acquired drug resistance. *Cancer Inform.* 2007;3:159-81.
70. Eng J, Ramsum D, Verhoef M, Guns E, Davison J, Gallagher R. A population-based survey of complementary and alternative medicine use in men recently diagnosed with prostate cancer. *Integr Cancer Ther.* 2003;2(3):212-6.
71. Klempner SJ, Bublely G. Complementary and alternative medicines in prostate cancer: from bench to bedside? *Oncologist.* 2012;17(6):830-7.
72. Singh H, Maskarinec G, Shumay DM. Understanding the motivation for conventional and complementary/alternative medicine use among men with prostate cancer. *Integr Cancer Ther.* 2005;4(2):187-94.
73. Pan T, Zhang F, Li F, Gao X, Li Z, Li X, et al. Shikonin blocks human lung adenocarcinoma cell migration and invasion in the inflammatory microenvironment via the IL6/STAT3 signaling pathway. *Oncol Rep.* 2020;44(3):1049-63.
74. Lu L, Qin A, Huang H, Zhou P, Zhang C, Liu N, et al. Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts anti-inflammatory effect via proteasome inhibition. *Eur J Pharmacol.* 2011;658(2-3):242-7.
75. Zhai T, Hei Z, Ma Q, Liang H, Xu Y, Zhang Y, et al. Shikonin induces apoptosis and G0/G1 phase arrest of gallbladder cancer cells via the JNK signaling pathway. *Oncol Rep.* 2017;38(6):3473-80.
76. Zhang S, Gao Q, Li W, Zhu L, Shang Q, Feng S, et al. Shikonin inhibits cancer cell cycling by targeting Cdc25s. *BMC Cancer.* 2019;19(1):20.
77. Yeh YC, Liu TJ, Lai HC. Shikonin Induces Apoptosis, Necrosis, and Premature Senescence of Human A549 Lung Cancer Cells through Upregulation of p53 Expression. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:620383.
78. Li X, Fan XX, Jiang ZB, Loo WT, Yao XJ, Leung EL, et al. Shikonin inhibits gefitinib-resistant non-small cell lung cancer by inhibiting TrxR and activating the EGFR proteasomal degradation pathway. *Pharmacol Res.* 2017;115:45-55.
79. Guo XP, Zhang XY, Zhang SD. [Clinical trial on the effects of shikonin mixture on later stage lung cancer]. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 1991;11(10):598-9, 80.
80. Wada N, Kawano Y, Fujiwara S, Kikukawa Y, Okuno Y, Tasaki M, et al. Shikonin, dually functions as a proteasome inhibitor and a necroptosis inducer in multiple myeloma cells. *Int J Oncol.* 2015;46(3):963-72.
81. Song J, Zhao Z, Fan X, Chen M, Cheng X, Zhang D, et al. Shikonin potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 2016;7(43):70504-15.

82. Liang W, Cai A, Chen G, Xi H, Wu X, Cui J, et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity of gastric cancer through reactive oxygen species. *Sci Rep.* 2016;6:38267.
83. Additional Study Contributors Reported After Publication. *JAMA Oncol.* 2017;3(3):418.
84. Hou Y, Xu J, Liu X, Xia X, Li N, Bi X. Shikonin induces apoptosis in the human gastric cancer cells HGC-27 through mitochondria-mediated pathway. *Pharmacogn Mag.* 2015;11(42):250-6.
85. Jang SY, Jang EH, Jeong SY, Kim JH. Shikonin inhibits the growth of human prostate cancer cells via modulation of the androgen receptor. *Int J Oncol.* 2014;44(5):1455-60.
86. Kuo LJ, Huang CY, Cheng WL, Hung CS, Wu CT, Lin FY, et al. Glucose-regulated protein 78 mediates the anticancer efficacy of shikonin in hormone-refractory prostate cancer cells. *Tumour Biol.* 2015;36(7):5063-70.
87. Chen Y, Zheng L, Liu J, Zhou Z, Cao X, Lv X, et al. Shikonin inhibits prostate cancer cells metastasis by reducing matrix metalloproteinase-2/-9 expression via AKT/mTOR and ROS/ERK1/2 pathways. *Int Immunopharmacol.* 2014;21(2):447-55.
88. Gara RK, Srivastava VK, Duggal S, Bagga JK, Bhatt M, Sanyal S, et al. Shikonin selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through the endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptotic pathway. *J Biomed Sci.* 2015;22:26.
89. Wang L, Stadlbauer B, Lyu C, Buchner A, Pohla H. Shikonin enhances the antitumor effect of cabazitaxel in prostate cancer stem cells and reverses cabazitaxel resistance by inhibiting ABCG2 and ALDH3A1. *Am J Cancer Res.* 2020;10(11):3784-800.
90. Gaddipati JP, Mani H, Shefali, Raj K, Mathad VT, Bhaduri AP, et al. Inhibition of growth and regulation of IGFs and VEGF in human prostate cancer cell lines by shikonin analogue 93/637 (SA). *Anticancer Res.* 2000;20(4):2547-52.
91. Michaelis M, Wass MN, Cinatl J. Drug-adapted cancer cell lines as preclinical models of acquired resistance. *Cancer Drug Resistance.* 2019;2(3):447-56.
92. 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.
93. 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.
94. Gibas Z, Becher R, Kawinski E, Horoszewicz J, Sandberg AA. A high-resolution study of chromosome changes in a human prostatic carcinoma cell line (LNCaP). *Cancer Genet Cytogenet.* 1984;11(4):399-404.
95. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986;89(2):271-7.
96. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986;93(2):157-65.
97. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982;218(4571):474-5.
98. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458-61.
99. Ormerod MG, Tribukait B, Giaretti W. Consensus report of the task force on standardisation of DNA flow cytometry in clinical pathology. DNA Flow Cytometry Task Force of the European Society for Analytical Cellular Pathology. *Anal Cell Pathol.* 1998;17(2):103-10.
100. Mathiassen SG, De Zio D, Cecconi F. Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Front Oncol.* 2017;7:51.
101. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(5):1415-20.
102. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
103. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger 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.
104. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(11).
105. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
106. Chen Y, Wang T, Du J, Li Y, Wang X, Zhou Y, et al. The Critical Role of PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway in Shikonin-Induced Apoptosis and Proliferation Inhibition of Chronic Myeloid Leukemia. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(3):981-93.
107. Chen CY, Chen J, He L, Stiles BL. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:338.
108. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

109. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112(2):195-203.
110. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(7):3116-20.
111. Wang Y, Hao F, Nan Y, Qu L, Na W, Jia C, et al. PKM2 Inhibitor Shikonin Overcomes the Cisplatin Resistance in Bladder Cancer by Inducing Necroptosis. *Int J Biol Sci.* 2018;14(13):1883-91.
112. Guo N, Miao R, Gao X, Huang D, Hu Z, Ji N, et al. Shikonin inhibits proliferation and induces apoptosis in glioma cells via downregulation of CD147. *Mol Med Rep.* 2019;19(5):4335-43.
113. Huang C, Hu G. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in endometrioid endometrial cancer cells via modulating miR-106b/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. *Biosci Rep.* 2018;38(2).
114. Shan ZL, Zhong L, Xiao CL, Gan LG, Xu T, Song H, et al. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in human leukemia NB4 cells through modulation of MAPKs and cMyc. *Mol Med Rep.* 2017;16(3):3055-60.
115. Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016;8(4):603-19.
116. Shahsavari Z, Karami-Tehrani F, Salami S, Ghasemzadeh M. RIP1K and RIP3K provoked by shikonin induce cell cycle arrest in the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-468: necroptosis as a desperate programmed suicide pathway. *Tumour Biol.* 2016;37(4):4479-91.
117. Ko H, Kim SJ, Shim SH, Chang H, Ha CH. Shikonin Induces Apoptotic Cell Death via Regulation of p53 and Nrf2 in AGS Human Stomach Carcinoma Cells. *Biomol Ther (Seoul).* 2016;24(5):501-9.
118. Liu Y, Kang X, Niu G, He S, Zhang T, Bai Y, et al. Shikonin induces apoptosis and prosurvival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):626-35.
119. Shilnikova K, Piao MJ, Kang KA, Ryu YS, Park JE, Hyun YJ, et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and attenuates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Oncol Lett.* 2018;15(4):5417-24.
120. Wang H, Liu Z, Li X, Zhao R, Pu Y, Wu H, et al. Shikonin causes apoptosis by disrupting intracellular calcium homeostasis and mitochondrial function in human hepatoma cells. *Exp Ther Med.* 2018;15(2):1484-92.
121. Jeung YJ, Kim HG, Ahn J, Lee HJ, Lee SB, Won M, et al. Shikonin induces apoptosis of lung cancer cells via activation of FOXO3a/EGR1/SIRT1 signaling antagonized by p300. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(11):2584-93.
122. Lee JH, Han SH, Kim YM, Kim SH, Yoo ES, Woo JS, et al. Shikonin inhibits proliferation of melanoma cells by MAPK pathway-mediated induction of apoptosis. *Biosci Rep.* 2021;41(1).
123. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia.* 2000;2(4):291-9.
124. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncol.* 2004;5(1):27-36.
125. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem.* 1995;58(2):175-80.
126. Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol.* 2009;11(11):1275-6.
127. Wu Z, Wu L, Li L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by shikonin via a caspase-9-dependent mechanism in human malignant melanoma A375-S2 cells. *J Pharmacol Sci.* 2004;94(2):166-76.
128. Li MY, Mi C, Wang KS, Wang Z, Zuo HX, Piao LX, et al. Shikonin suppresses proliferation and induces cell cycle arrest through the inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha signaling. *Chem Biol Interact.* 2017;274:58-67.
129. Lin KH, Huang MY, Cheng WC, Wang SC, Fang SH, Tu HP, et al. RNA-seq transcriptome analysis of breast cancer cell lines under shikonin treatment. *Sci Rep.* 2018;8(1):2672.
130. Tang JC, Zhao J, Long F, Chen JY, Mu B, Jiang Z, et al. Efficacy of Shikonin against Esophageal Cancer Cells and its possible mechanisms in vitro and in vivo. *J Cancer.* 2018;9(1):32-40.
131. Malumbres M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014;15(6):122.
132. Roskoski R, Jr. Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacol Res.* 2019;139:471-88.
133. Bashir T, Pagano M. Cdk1: the dominant sibling of Cdk2. *Nat Cell Biol.* 2005;7(8):779-81.
134. Markowitsch SD, Vakhrusheva O, Schupp P, Akele Y, Kitanovic J, Slade KS, et al. Shikonin Inhibits Cell Growth of Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma by Activating the Necrosome Complex and Inhibiting the AKT/mTOR Signaling Pathway. *Cancers (Basel).* 2022;14(5).
135. Trochon V, Blot E, Cymbalista F, Engelmann C, Tang RP, Thomaidis A, et al. Apigenin inhibits endothelial-cell proliferation in G(2)/M phase whereas it stimulates smooth-muscle cells by inhibiting P21 and P27 expression. *Int J Cancer.* 2000;85(5):691-6.

136. Yadav V, Sultana S, Yadav J, Saini N. Gatifloxacin induces S and G2-phase cell cycle arrest in pancreatic cancer cells via p21/p27/p53. *PLoS One*. 2012;7(10):e47796.
137. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*. 2005;5(2):566-71.
138. Hua H, Kong Q, Zhang H, Wang J, Luo T, Jiang Y. Targeting mTOR for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):71.
139. Magaway C, Kim E, Jacinto E. Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations. *Cells*. 2019;8(12).
140. Lu D, Qian J, Li W, Feng Q, Pan S, Zhang S. beta-hydroxyisovaleryl-shikonin induces human cervical cancer cell apoptosis via PI3K/AKT/mTOR signaling. *Oncol Lett*. 2015;10(6):3434-42.
141. Wen S, Niu Y, Lee SO, Chang C. Androgen receptor (AR) positive vs negative roles in prostate cancer cell deaths including apoptosis, anoikis, entosis, necrosis and autophagic cell death. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(1):31-40.
142. Gong K, Li W. Shikonin, a Chinese plant-derived naphthoquinone, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through reactive oxygen species: A potential new treatment for hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(12):2259-71.

9 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Fertigstellung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter für die Themenbereitstellung und Betreuung meiner Promotionsarbeit bedanken.

Mein Dank gilt zudem dem Zweitbegutachter.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den medizinisch-technischen Assistenten, die mir jederzeit mit Tipps und Tricks bei der Versuchsdurchführung zur Seite standen.

10 Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Kira Maria Buhr, geb. Jütter

Geburtsdatum: 14.11.1996

Beruflicher Werdegang

Seit Oktober 2021 Assistenzärztin für Neurologie im Klinikum Osnabrück

Bildungsweg

2006-2014 Besuch des Gymnasiums Leoninum Handrup

2014-2021 Medizinstudium an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

September 2016 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)

WS 2016/2017 Physiologie-Tutor

April 2018 – April 2019 Labortätigkeit im Rahmen einer laufenden Promotionsarbeit zum Thema der Bedeutung des Naturstoffes Shikonin in der Therapie des Taxan-resistenten Prostatakarzinoms in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Eva Jüngel

Frühjahr 2020 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note:2)

Frühjahr 2021 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note:1)

Praktisches Jahr

18.05.2020-12.07.2020 Diakonie Krankenhaus Bad Kreuznach, Abteilung Chirurgie

13.07.2020-06.09.2020 Spital Zofingen, Abteilung Chirurgie

07.09.2020-27.12.2020 Universitätsklinikum Köln, Abteilung Neurologie

28.12.2020-18.04.2021 Diakonie Krankenhaus Bad Kreuznach, Abteilung Innere Medizin

Famulaturen

März 2016 Famulatur in der Landarztpraxis Berge

September 2016 Famulatur in der Hämatologie und Onkologie der Uniklinik Mainz

März 2018 Famulatur in der gynäkologischen Abteilung des Charles S. Curtis Memorial Hospital in St. Anthony, Neufundland

September 2019 Famulatur in der Radiologie des Christlichen Krankenhaus Quakenbrück

Engagement: Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

Sprachkenntnisse: Englisch, Französisch, Latein