

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Chirurgie
Klinik für Urologie
Direktor: Prof. Dr. Felix K.-H. Chun

**Bedeutung von Sulforaphan für das Wachstumsverhalten von
Prostatakarzinomzellen in vitro**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Sarah Thaler

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2019

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. Roman Blaheta

Korreferent/in: Prof. Dr. Udo Rolle

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms	1
1.2 Klassifikation, Staging/Grading	1
1.3 Symptomatik	3
1.4 Diagnostik.....	3
1.5 Therapie	4
1.6 Tumorwachstum und -invasion	5
1.7 Komplementärmedizin.....	7
1.8 Sulforaphan	8
1.9 Sulforaphan und HDAC bzw. HDAC-Inhibition	9
1.10 Ziel der Studie	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Zelllinien	13
2.1.1 DU145	13
2.1.2 PC3	13
2.2 Materialien und Geräte.....	14
2.3 Methoden.....	24
2.3.1 Zellen auftauen, Zellkultur	24
2.3.2 Zellen einfrieren	25
2.3.3 Zellzahlbestimmung.....	25
2.3.4 Behandlung der Zellen	26
2.3.5 Dauerbehandlung	27
2.3.6 MTT-Test.....	27
2.3.7 BrdU Assay	29
2.3.8 Apoptose Assay	30
2.3.9 Klonogenes Wachstum	31
2.3.10 Zellzyklus Assay.....	32
2.3.11 Proteinisolation	33
2.3.12 Proteinkonzentrationsbestimmung	33
2.3.13 Western Blot: Gelelektrophorese und Blotting.....	34
2.3.14 CD44-Messung.....	37
2.4 Statistik.....	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Einfluss von Sulforaphan auf Wachstum und Proliferation	39
3.1.1 MTT-Test	39
3.1.2 Apoptose Assay	41
3.1.3 BrdU Assay	41
3.1.4 Klonogenes Wachstum	44
3.2 Einfluss Sulforaphans auf Zellzyklus und Zellzyklus-relevante Proteine.....	45
3.2.1 Zellzyklus.....	45
3.2.2 Western Blot-Analyse Zellzyklus-regulierender Proteine	52

3.3 Einfluss von Sulforaphan auf den CD44-Rezeptor	55
3.3.1 FACS-Analyse der CD44-Oberflächenexpression	55
3.4 Einfluss von Sulforaphan auf die Resistenzentwicklung	62
3.4.1 MTT-Test Resistenz.....	62
4 Diskussion	65
4.1 Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Klonogenes Wachstum	65
4.1.1 MTT-Test.....	65
4.1.2 BrdU Assay	66
4.1.3 Klonogenes Wachstum	67
4.1.4 Apoptose Assay	67
4.2 Zellzyklus, Western Blot-Analyse Zellzyklus-regulierender Proteine.....	69
4.2.1 Zellzyklus Assay.....	69
4.2.2 Western Blot.....	70
4.3 CD44	75
4.4 Resistenz.....	78
5 Ausblick.....	80
6 Zusammenfassung	84
7 Summary	86
Literaturverzeichnis	88
Danksagung.....	107
Schriftliche Erklärung.....	109

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Destilliertes Wasser
aH3/aH4	Acetyliertes Histon 3/Acetyliertes Histon 4
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BD	Becton Dickinson
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumin aus Rinderserum)
Ca ²⁺	Calcium
CAM	Cell Adhesion Molecule (Zelladhäsionsmolekül)
CD	Cluster of Differentiation
Cdc	Cell division cycle
CDK	Cyclin-dependent Kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DRU	Digital Rektale Untersuchung
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
EZM	Extrazelluläre Matrix/Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FAK	Focal Adhesion Kinase (Fokale Adhäsions-Kinase)
FBS	Foetal Bovine Serum (fötales Rinderserum)
FITC	Fluorescein isothiocyanat
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
G0/G1- & G2-Phase	Gap-Phasen des Zellzyklus

H3/H4	Histon 3/Histon 4
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin)-Ethansulfonsäure
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
IC ₅₀	Inhibitory concentration of half-maximum effect
Ig	Immunglobulin
ILK	Integrin-linked Kinase (Integrin-gekoppelte Kinase)
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
Kip1	Kinase inhibitory protein
Mg ²⁺	Magnesium
mM	Millimol
μM/μMol	Mikromol
MPF	Mitosis-promoting factor
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
N-terminales Ende	Amino-terminales Ende
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
pCDK	Phosphorylated Cyclin-dependent Kinase (phosphorylierte Cyclin-abhängige Kinase)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pFAK	Phosphorylated Focal Adhesion Kinase (phosphorylierte Fokale Adhäsions-Kinase)

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin (mTOR)
RFE	Relative Fluoreszenzeinheit
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin (mTOR)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFN	Sulforaphan
Skp1	S phase kinase-associated protein
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
TEMED	Tetra-N-Methyl-Ethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN 20	Polysorbat 20
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 100-fache Vergrößerung unbehandelter Prostatakarzinomzellen der Zelllinien DU145 und PC3.....	13
Abbildung 2: Graphische Darstellung des Ergebnisses des MTT-Tests für die DU145-Zelllinie.....	39
Abbildung 3: Graphische Darstellung des Ergebnisses des MTT-Tests für die PC3-Zelllinie.....	40
Abbildung 4: Graphische Darstellung des BrdU-Einbaus für die DU145-Zellreihe nach 24 h, 48 h und 72 h.....	42
Abbildung 5: Graphische Darstellung des BrdU-Einbaus für die PC3-Zellreihe nach 24 h, 48 h und 72 h.....	43
Abbildung 6: Graphische Darstellung der gezählten Kolonien der Zelllinien DU145 und PC3 in Abhängigkeit von der SFN-Konzentration.....	44
Abbildung 7: Abbildung der DU145-Zell-Kolonien.....	45
Abbildung 8: Abbildung der PC3-Zell-Kolonien.....	45
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie DU145 durch Behandlung mit 5 μ M und 10 μ M SFN; Messzeitpunkt 24 h.....	46
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie DU145 durch Behandlung mit 5 μ M und 10 μ M SFN; Messzeitpunkt 48 h.....	47
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie DU145 durch Behandlung mit 5 μ M und 10 μ M SFN; Messzeitpunkt 72 h.....	48
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie PC3 durch Behandlung mit 5 μ M und 10 μ M SFN; Messzeitpunkt 24 h.....	49
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie PC3 durch Behandlung mit 5 μ M und 10 μ M SFN; Messzeitpunkt 48 h.....	50
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie PC3 durch Behandlung mit 5 μ M und 10 μ M SFN; Messzeitpunkt 72 h.....	51

Abbildung 15: Darstellung der Western Blot-Analyse der Zellzyklusproteine.....	52
Abbildung 16: Pixelanalyse der Zellzyklusproteine der Western Blot-Analyse für die PC3-Zelllinie.....	54
Abbildung 17: Pixelanalyse der Zellzyklusproteine der Western Blot-Analyse für die DU145-Zelllinie.....	54
Abbildung 18: Overlay-Bilder der Rezeptorexpression der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 für die Zelllinie DU145.....	55
Abbildung 19: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe DU145 unter 5 μ M und 10 μ M SFN nach 24 h	56
Abbildung 20: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe DU145 unter 5 μ M und 10 μ M SFN nach 48 h	57
Abbildung 21: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe DU145 unter 5 μ M und 10 μ M SFN nach 72 h	58
Abbildung 22: Overlay-Bilder der Rezeptorexpression der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 für die Zelllinie PC3.....	59
Abbildung 23: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe PC3 unter 5 μ M und 10 μ M SFN nach 24 h....	59
Abbildung 24: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe PC3 unter 5 μ M und 10 μ M SFN nach 48 h....	60
Abbildung 25: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe PC3 unter 5 μ M und 10 μ M SFN nach 72 h....	61
Abbildung 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse der MTT-Tests für die nicht-dauerbehandelten Zellen (A) und die über sechs Monate mit 5 μ M SFN dauerbehandelten Zellen (B) der Zelllinie DU145.....	62
Abbildung 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse der MTT-Tests für die nicht-dauerbehandelten Zellen (A) und die über sechs Monate mit 5 μ M SFN dauerbehandelten Zellen (B) der Zelllinie PC3.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte, Medien und Verbrauchsmaterial.....	14
Tabelle 2: Western Blot: Trenngel.....	17
Tabelle 3: Western Blot: Sammelgel.....	17
Tabelle 4: Western Blot: Pufferlösungen für SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese, Western-Hybridisierung und Immunfärbung.....	17
Tabelle 5: Western Blot: Zellzyklus-Proteine, Primär- und Sekundärantikörper mit Hersteller und Verdünnung.....	18
Tabelle 6: Lysispuffer.....	20
Tabelle 7: CD44 Durchfluss-Zytometrie: CD44-Subtypen, Isotyp, Lightning-Link mit Hersteller, Verdünnung und Menge.....	23

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms

Weltweit rangiert Krebs nach den kardiovaskulären Erkrankungen auf Platz zwei der häufigsten Todesursachen (Stand: 2015) (1). Krebs stellt daher eine der drängendsten gesundheitlichen Herausforderungen dar. 17,5 Mio. neue Krebsfälle traten im Jahr 2015 weltweit auf, 8,7 Mio. Krebstodesfälle wurden im selben Jahr registriert (1). Allein auf die USA entfielen 2015 ca. 1,6 Mio. neue Krebsfälle und knapp 600.000 Krebstote (2). In Deutschland belief sich 2014 die Anzahl der Krebsneuerkrankungen insgesamt auf ca. 476.000 (3) bei laut Bundesgesundheitsministerium ca. 223.000 krebsbedingten Todesfällen (4).

Mit ca. 1,6 Mio. Neuerkrankungen weltweit im Jahr 2015 ist das Prostatakarzinom die häufigste Krebserkrankung des Mannes (1). In Deutschland ist das Prostatakarzinom mit etwa 23% aller neu diagnostizierten Tumorerkrankungen ebenfalls führend (3); 2014 lag die Inzidenz bei ca. 57.400 Fällen, für 2018 wird mit etwa 60.700 Neuerkrankungen gerechnet (5). Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 72 Jahren (5). Unter den Krebstodesfällen ist das Prostatakarzinom mit etwa 11,3% an zweiter Stelle zu finden; in absoluten Zahlen bedeutet dies, dass jährlich in Deutschland ungefähr 13.000 Patienten am Prostatakarzinom sterben (3). Weltweit betrachtet liegt diese Zahl bei ca. 366.000 (6).

Hauptrisikofaktor für das Prostatakarzinom ist das Alter (7). Daneben gibt es eine familiäre Prädisposition bzw. genetische Komponente bei der Entstehung des Prostatakarzinoms (8). Eine geographische Ungleichverteilung der Krankheitshäufigkeit legt nahe, dass der ethnische Ursprung die Erkrankungswahrscheinlichkeit ebenfalls beeinflusst. (9). Darüber hinaus sind eine Vielzahl weiterer vor allem Ernährung und Lebensweise (Rauchen, Alkohol) betreffende Risikofaktoren Gegenstand der Forschung. Bei bislang noch nicht ausreichender bzw. eindeutiger Datenlage ist die Gültigkeit dieser Faktoren aber umstritten (10, 11).

1.2 Klassifikation, Staging/Grading

Histopathologisch lassen sich in der Prostata verschiedene Karzinome unterscheiden. Der mit Abstand häufigste Tumor der Prostata ist mit ca. 98% aller Prostatakarzinome

das Adenokarzinom; es geht aus entarteten Drüsenepithelzellen hervor (12). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Terminus „Prostatakarzinom“ bezieht sich ausschließlich auf das Adenokarzinom. Sarkome der Prostata und sekundäre Tumore, seien es Metastasen oder aus Nachbarorganen wie Kolon oder Blase in die Prostata wachsende Tumore, sollen hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle entstehen Adenokarzinome in der peripheren Zone der Prostata, während Transitional- und insbesondere Innenzone selten Ursprungsort des Prostatakarzinoms sind (13). Meist tritt das Adenokarzinom der Prostata nicht unifokal, sondern multifokal auf, wobei in den einzelnen Tumoranteilen oft unterschiedliche Differenzierungsgrade und Wachstumsmuster (glandulär/azinär, kribriform, anaplastisch) zu finden sind. (12).

Unter dem Staging bzw. der Stadieneinteilung versteht man die Beurteilung, wie weit eine Tumorerkrankung fortgeschritten ist; daraus ergibt sich die Zuordnung zu einem Krankheitsstadium, woraus sich wiederum Aussagen zu Prognose und Auswahl des geeigneten Therapiekonzepts treffen lassen. Klassifiziert wird das Prostatakarzinom, wie viele Tumorarten, nach dem international gültigen TNM-System der Union Internationale Contre le Cancer (UICC). T steht dabei für die Größe und Ausdehnung des Tumors, N für den Befall von Lymphknoten (Nodalstatus) und M für das Vorliegen von Metastasen.

Neben dem Staging wird für die Klassifikation eines Tumors das Grading als Maß für die Aggressivität und Malignität herangezogen. Dabei wird histologisch der Differenzierungsgrad des Tumorgewebes ermittelt, indem die Tumorzellen mikroskopisch mit gesunden Zellen desselben Gewebes verglichen werden. Bestimmt wird also, wie sehr sich das Tumorgewebe vom Normalgewebe unterscheidet. Für das Prostatakarzinom bedeutet das konkret eine histologische Beurteilung der Drüsenmorphologie, beruhend auf Proben einer Prostatastanzbiopsie oder eines Prostatektomiepräparats. Nach dem amerikanischen Pathologen Donald F. Gleason wird das Grading-System des Prostatakarzinoms Gleason-Score genannt (14). Dabei werden die Tumorzellen in fünf verschiedene Differenzierungsgruppen unterteilt, die jeweils den Entdifferenzierungsgrad angeben (Gleason-Grad). Durch Addition zweier solcher Gleason-Grade ergibt sich der Gleason-Score. Je höher der Gleason-Score, desto

schlechter ist der Tumor differenziert, desto schlechter ist dementsprechend auch die Prognose.

Insgesamt werden für die Einschätzung der Prognose des Prostatakarzinoms die TNM-Klassifikation, das Tumorgrading nach Gleason sowie, im Falle einer Operation, die chirurgischen Resektionsränder des Karzinoms berücksichtigt (7).

1.3 Symptomatik

Das Prostatakarzinom bleibt im frühen Stadium meist asymptomatisch. Da es in den allermeisten Fällen in der außenliegenden, peripheren Zone der Prostata entsteht, kann es relativ „ungestört“ wachsen, bevor es auf angrenzende Strukturen trifft und diese in Mitleidenschaft zieht; erst in diesem Fall treten Beschwerden auf (12). Symptome in fortgeschrittenem Stadium reichen von Miktionsbeschwerden durch Obstruktion der Urethra und Harninkontinenz durch Infiltration des Harnröhrensphinkters über eine, wenn auch seltene, Hämaturie/Hämatospermie bis hin zu sich komplikativ entwickelnden Harnstauungsnieren und Niereninsuffizienz. Die zumeist ossäre Metastasierung des Tumors kann Knochenschmerzen und auch pathologische Frakturen zur Folge haben, betroffen sind vorwiegend Becken und Wirbelsäule (12). Tumorunspezifische Anzeichen sind Leistungsminderung/Fatigue, Gewichtsverlust, erhöhte Temperatur, Anämie und paraneoplastische Syndrome wie z. B. erhöhte Thromboseneigung.

1.4 Diagnostik

Die Diagnostik des Prostatakarzinoms, sei es im Zuge des Früherkennungsscreenings oder bei bereits bestehendem klinischen Verdacht, beruht maßgeblich auf der Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blut und der digital-rektalen Untersuchung (DRU). Komplettierend erfolgt bei auffälligen Befunden – tastsuspekte Prostata bei DRU, erhöhter PSA-Wert ≥ 4 ng/ml – eine Prostatastanzbiopsie zur histologischen Untersuchung (7). Für das Staging kommen auch bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) zum Einsatz, die außer einer Einschätzung des lokalen Tumorwachstums auch eine Beurteilung der regionalen Lymphknoten

erlaubt (7). Großes Gewicht kommt bei fortgeschrittenem Verlauf auch der Skelettszintigraphie zu, um Metastasen in den Knochen zu detektieren (7).

1.5 Therapie

Zur Auswahl des passenden Therapiekonzepts müssen das Tumorstadium, das Tumorigrad sowie die geschätzte Lebenserwartung, d. h. Alter, Allgemeinzustand und Begleiterkrankungen des Patienten in Erwägung gezogen werden. Grundsätzlich wird zwischen kurativer und palliativer Therapie unterschieden. Abhängig davon, ob es sich um einen noch lokalisierten oder bereits metastasierten Befund handelt, stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Zu den kurativ intendierten Verfahren zählen die radikale Prostatektomie, die Strahlentherapie und die Active Surveillance (Aktive Überwachung). Watchful Waiting (Beobachtendes Abwarten) und Hormontherapie bzw. kombinierte Hormon-Chemo-Therapie bilden demgegenüber die palliativen Optionen der Therapie.

Das Prostatakarzinom wächst in den meisten Fällen testosteronabhängig. Die Hormontherapie beruht auf der Wirkung einer Kastration und der damit verbundenen Absenkung des Testosteron- bzw. Androgenspiegels im Blut (7). Dies kann auf chemisch-medikamentösem Weg durch an der Hypophyse wirkende Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) -Analoga oder GnRH-Blocker erreicht werden, die zu einer zentralen Hemmung der testikulären Hormonproduktion führen; oder durch Antiandrogene, die durch eine kompetitive Hemmung des Androgenrezeptors wirken und zur vollständigen Androgendeprivation auch in Kombination mit den vorigen Präparaten gegeben werden können (7). Alternativ kann die Kastration auch chirurgisch durch eine beidseitige Orchiectomie erzielt werden (7). Unerwünschte Folgen des Testosteronmangels sind z. B. Hitzewallungen, Gynäkomastie, Libidoverlust, erektile Dysfunktion sowie Osteoporose und Muskelatrophie.

Eine Chemotherapie richtet sich undifferenziert gegen schnell teilende Zellen. Wegen dieser ungezielten Wirkweise werden nicht nur Tumorzellen als gewünschtes Ziel, sondern auch gesunde, schnell teilende Zellen angegriffen, v. a. Haarzellen, Schleimhäute und blutbildendes System betreffend. Daraus erklären sich die

typischerweise mit einer Chemotherapie assoziierten Nebenwirkungen wie Haarausfall, Verdauungsstörungen und Blutbildungsstörungen (Anämie, Thrombozytopenie, Neutropenie). Auch die Ausbildung von Resistenzen gegen die verwendeten Chemotherapeutika ist eine weitere schwerwiegende Problematik bei der Chemotherapie. Die chronische Therapie geht dadurch mit einer nachlassenden Medikamentenwirkung einher. Das Hauptproblem der Chemotherapie ist daher nicht der Tumor selbst, sondern die Resistenzentwicklung. Eingesetzt wird beim Prostatakarzinom v. a. Docetaxel mit Prednison/Prednisolon. Mit Abirateron und Enzalutamid stehen daneben weitere Präparate zur Verfügung (7).

1.6 Tumorwachstum und -invasion

Bei der Tumormetastasierung und -invasion breitet sich ein Primärtumor über seine ursprüngliche Lokalisation hinaus im Körper aus und bildet Absiedlungen in anderen Regionen des Körpers. Abgesehen vom direkten Einwachsen des Tumors in angrenzende Strukturen und Gewebe erfolgt die Metastasierung über das Lymph- und Blutgefäßsystem. Dafür müssen Tumorzellen – neben der Fähigkeit sich aus ihrer ursprünglichen Zellformation abzulösen, die Gefäßsysteme aufzusuchen und sich während ihrer Migration des Immunsystems zu erwehren – zusätzlich über die Fähigkeit verfügen, an einem intakten Gewebe anzudocken, einzudringen und sich dort anzusiedeln.

Diese Prozesse werden von einer Reihe von Oberflächenrezeptoren, wie z. B. Cadherine, cell adhesion molecules (CAMs) und Integrine gesteuert. Von besonderer Bedeutung haben sich außerdem die CD44-Rezeptoren erwiesen. Bei CD44 handelt es sich um ein transmembranes Oberflächen-Glykoprotein, dessen Hauptligand Hyaluron ist (15). Durch alternatives Spleißen gibt es zahlreiche verschiedene Varianten bzw. Subtypen von CD44 (16). Für diese Arbeit wurden die Varianten v4, v5 und v7 untersucht. CD44 ist an einer Vielzahl von Zellfunktionen, darunter Zelldifferenzierung, -wachstum, -migration und -adhäsion beteiligt; über den CD44-Rezeptor entstehen Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte (15, 16). All diese über CD44 vermittelten Eigenschaften erfüllen physiologische Funktionen in gesunden Zellen, können aber auch zu den pathologischen Aktivitäten von maligne entarteten Krebszellen beitragen (17, 18).

Der Zellzyklus bzw. die zeitliche Dauer und Abfolge der Zellzyklus-Phasen wird durch phasenspezifische Proteinkomplexe, bestehend aus einem Cyclin und einer Cyclin-abhängigen Kinase (CDK = cyclin dependent kinase) reguliert (19). An definierten Kontrollpunkten bzw. Checkpoints überprüfen diese Komplexe, ob die bis dahin erforderlichen Schritte richtig abgelaufen sind, erst dann tritt der Zellzyklus in die nächste Phase ein. Während CDK konstant im gesamten Zellzyklus vorhanden ist, wird für jede Phase des Zellzyklus ein jeweils spezifisches Cyclin gebildet, das nach Beendigung der entsprechenden Phase wieder abgebaut wird. Nach der Zusammenlagerung werden die gebildeten Cyclin-CDK-Komplexe durch gezielte CDK-Phosphorylierungen und -Dephosphorylierungen aktiviert (19).

Im Zellzyklus gibt es drei wichtige Kontrollpunkte:

G1-Phase → S-Phase: Cyclin A/CDK 2

- Von der G1-Phase zur S-Phase steuert der Komplex aus Cyclin A/CDK 2 bspw. anhand der Zellgröße den Beginn der Replikationsphase.

G2-Phase → Mitose (M-Phase): Cyclin B/CDK 1 = Mitose Promoting Factor (MPF)

- Der Komplex aus Cyclin B/CDK 1, auch MPF genannt, reguliert den Übergang von der G2-Phase in die M-Phase und überprüft, ob keine DNA-Schäden aus der vorangegangenen S-Phase vorliegen und die Mitose eingeleitet werden kann.

M-Phase → G1-Phase: Cyclin D/CDK 4 bzw. 6

- Zwischen M-Phase und G1-Phase wird durch den Cyclin D/CDK 4 bzw. 6-Komplex die richtige Anordnung der beiden Chromosomensätze kontrolliert, sodass deren Aufteilung auf die beiden Tochterzellen und die Cytokinese stattfinden können.

Insgesamt sind mindestens acht Cyclin-Typen (A bis H) und neun CDKs (CDK 1-9) bekannt, von denen aber nur bestimmte Subtypen an der Zellzyklusregulation mitwirken (20, 21). Ihre regulative Aufgabe erfüllen die Cyclin-CDK-Komplexe dadurch, dass sie wiederum eine Vielzahl von Substraten phosphorylieren und damit aktivieren.

Kontrolliert wird der Zellzyklus und damit die Zellproliferation durch Tumorsuppressoren, die im Fall von Replikationsfehlern den Zellzyklus arretieren und Gelegenheit zu „Reparaturmaßnahmen“ geben oder die Apoptose einleiten. Des Weiteren greifen Tumorsuppressoren auch in Differenzierungsprozesse ein, verhindern ein ungehemmtes Zellwachstum und sorgen für ein balanciertes Gleichgewicht zwischen Proliferation und Wachstumsstopp (22). Ein Mangel an Tumorsuppressoren schlägt sich folglich in einer erhöhten Wachstumsrate und Entdifferenzierung der Zellen nieder. Prominente Vertreter aus der Gruppe der Tumorsuppressoren sind u. a. p53, p21 und das Retinoblastom-Protein sowie p19 und p27, die durch Interaktion mit den Cyclin-CDK-Komplexen wirken. p19 und p27 wirken als Inhibitoren von CDKs (CDK-Inhibitoren), indem sie deren enzymatische Aktivität hemmen (23, 24).

1.7 Komplementärmedizin

Die schulmedizinischen, sich stetig verbessernden Behandlungsverfahren wie Operation, Chemotherapie und Strahlentherapie, erhöhen Überlebenschancen und Lebensqualität für Patienten mit einem Prostatakarzinom. Wie die Resistenzproblematik verdeutlicht, stoßen jedoch auch schulmedizinische Verfahren an Grenzen. Daher könnten komplementärmedizinische Methoden dort zum Einsatz kommen, wo eine zielgenaue Ergänzung der Schulmedizin von Nutzen sein könnte. In diesem komplementärmedizinischen Rahmen bewegt sich die hier vorgelegte Studie.

Die Komplementärmedizin zielt nicht darauf ab, die Schulmedizin zu ersetzen, sondern mit ihr gemeinschaftlich zu wirken und so den Behandlungserfolg zu unterstützen (25, 26). Komplementärmedizinische Verfahren umfassen ein heterogenes Spektrum, u. a. Entspannungstechniken/Meditation, Yoga sowie Akupunktur und Traditionelle Chinesische Medizin (26, 27). Besonders Patienten mit Schmerzzuständen, chronischen Erkrankungen und Tumorerkrankungen greifen auf komplementärmedizinische Methoden zurück (28-30). Länderübergreifend verwenden fast die Hälfte aller Patienten und ca. 40% aller Krebspatienten komplementärmedizinische Methoden (31-33). Unter den Prostatakarzinompatienten liegt die Nutzungsrate bei 30-50% (27, 34). Die Gründe für das Interesse vieler Patienten an der Komplementärmedizin liegen in einer grundsätzlichen Skepsis gegenüber der

Schulmedizin (35, 36), dem Wunsch, aktiv an der eigenen Behandlung und Heilung mitzuwirken (32, 37) und Nebenwirkungen schulmedizinischer Verfahren (z. B. Chemotherapie) zu lindern (27, 37) sowie dem Bedürfnis nach einer umfassenderen Betreuung einschließlich psychischer und emotionaler Belange (27, 37).

Kritik an der Komplementärmedizin besteht vorwiegend aufgrund des Mangels evidenzbasierter Studien hinsichtlich der Wirksamkeit komplementärmedizinischer Maßnahmen. Außerdem werden eine zu unklare Indikationsstellung für den Einsatz der verschiedenen komplementärmedizinischen Optionen sowie das Risiko gefährlicher Wechselwirkungen mit Medikamenten bemängelt (38–40). Eine Verbesserung der Evidenzlage ist daher unabdingbar. Die vorliegende Studie möchte einen diesbezüglichen Beitrag leisten; die dazu durchgeführten Versuche fallen in den Bereich der Forschung mit Naturstoffen (Phytopharmaka). Konkret wurde die Wirksamkeit des Naturstoffs Sulforaphan hinsichtlich des Wachstumsverhaltens von Prostatakarzinomzellen untersucht.

1.8 Sulforaphan

Sulforaphan ist ein Isothiocyanat (Senföl), das v. a. in Kreuzblütengewächsen wie Broccoli und sämtlichen Kohlsorten oder auch in Radieschen, (Meer-) Rettich und Senf vorkommt. Diese Gemüsesorten enthalten das Glucosinolat (Senfölglycosid) Glucoraphanin (GFN), das durch das Enzym Myrosinase in seine aktive, wirksame Form Sulforaphan gespalten wird.

Den Kreuzblütengewächsen wird schon seit der Antike eine heilende Wirkung zugeschrieben; sie wurden als natürliche Antibiotika sowie zur antiviralen und antimykotischen Therapie angewendet (41). Nach der erstmaligen Isolierung 1948 aus Rettich (42), wurde Sulforaphan 1959 auch aus der Pfeilkresse isoliert (43). 1992 extrahierte der US-Pharmakologe Paul Talalay Sulforaphan aus Broccoli bzw. Broccolisprossen.

Er beschrieb eine von Sulforaphan vermittelte Induktion von Phase-II-Enzymen (44). Dadurch, so Talalay, wirkt Sulforaphan als ein starkes und auch langanhaltendes indirektes Antioxidans zur Eliminierung und Ausscheidung karzinogener Substanzen bzw. freier Radikale (45). Dies brachte Talalay mit einem verzögerten Tumorwachstum

in Zusammenhang (46). Epidemiologische Daten stützen die Vermutung, dass Sulforaphan eine Krebs-präventive Wirkung entfalten kann: Laut der Ergebnisse mehrerer Studien ist eine broccoli- und kohlrreiche Ernährung mit einem niedrigeren Risiko für Blasenkrebs assoziiert (47, 48). Darüber hinaus wurden im Laufe der Zeit potentiell antikarzinogene Eigenschaften von Sulforaphan entdeckt (49, 50):

- Hemmung von Tumorwachstum bzw. -proliferation und Tumorangiogenese
- Induktion der Apoptose
- Eindämmen der Tumormetastasierung

Talalay demonstrierte seine Ergebnisse an einem Hepatom-Maus-Modell. Primär unter in-vitro-Bedingungen, vereinzelt aber auch in Tiermodellen wurde mittlerweile die Wirksamkeit von Sulforaphan auch für weitere unterschiedliche Tumorentitäten bestätigt (51, 52), darunter Kolonkarzinom (53), Hautkrebs (54), Brustkrebs (55) und urologische Tumoren wie das Prostatakarzinom (56).

Aufgrund der genannten Effekte kann Sulforaphan möglicherweise auch therapeutisch wirksam sein: So wurde in einer klinischen Phase-II-Studie mit Prostatakarzinompatienten mit biochemischem Rezidiv nach radikaler Prostatektomie eine Verlängerung der PSA-Verdopplungszeit festgestellt (51, 57). Die beschriebene Datenlage erlaubt von einem antikarzinogenen Effekt Sulforaphans auszugehen. Noch nicht ausreichend verstanden sind jedoch die molekularen Mechanismen, die diesem antikarzinogenen Effekt zugrunde liegen.

1.9 Sulforaphan und HDAC bzw. HDAC-Inhibition

Nicht nur Mutationen der Gene, sondern auch die Zugänglichkeit, Aktivität und damit die Expression der Gene, d. h. epigenetische Faktoren, beeinflussen die Krebsentstehung (58). Zu den epigenetischen Faktoren zählen u. a. DNA-Methylierung und die Modifikation der Histone und dadurch der Chromatindichte, z. B. durch Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC). Aufgrund ihres Einflusses auf die Genexpression könnten epigenetische Modulationen gezielt zur Krebsbekämpfung genutzt werden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Histonmodifikation durch HDAC, die in einer Regulation von Zellzyklus und Zellwachstum ihre Entsprechung findet. Sulforaphan wirkt

auf epigenetischer Ebene (51). Es fungiert als HDAC-Inhibitor, verringert also die HDAC-Aktivität (59–61). Dabei verursacht Sulforaphan eine insgesamt nur sehr geringe Toxizität (51, 62).

In eukaryotischen Zellen liegt die DNA im Zellkern als Chromatin vor, also verpackt im Verbund mit Proteinen, allen voran mit Histonen, um die sich die DNA wie um Spulen windet. Durch modifizierende posttranslationale Faktoren ist der Verpackungsgrad des Chromatins beeinflussbar. An ihrem N-terminalen Ende sind Histone reich an basischen, also positiv geladenen Aminosäuren wie Arginin und Lysin, wodurch sie mit hoher Affinität an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden. Dadurch wird die DNA auf engem Raum kondensiert und dicht verpackt. Histone sind also von entscheidender Bedeutung für den Verpackungsgrad der DNA und damit einhergehend für die Expression bzw. Transkription der Gene. Dicht gepacktes Chromatin ist transkriptionsinaktiv (Heterochromatin). Demgegenüber ist das Euchromatin die aufgelockerte, transkriptionsaktive Form. Je nach „Aktivitätszustand“ der Zelle liegt die DNA dicht gepackt als Heterochromatin vor oder sie muss für die Transkription decondensieren, um die Gene zugänglich zu machen. Für diese Konversion zwischen Hetero- und Euchromatin können Histone und dadurch ihr Ladungszustand auf vielfältige Weise modifiziert werden, was wiederum Auswirkungen auf den Kondensationsgrad der DNA und die Expression von Genen hat (Histoncode) (63). Diese Modifikationen beinhalten z. B. Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und Acetylierung (64). Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf Letztgenanntes.

Der Acetylierungsgrad der Histone und damit das Ausmaß der Genexpression wird wesentlich von den untereinander konkurrierenden Enzymfamilien der Histonacetyltransferasen (HAT) und der Histondeacetylasen (HDAC) gesteuert (65, 66). Die HATs binden negativ geladene Acetylreste an die Histone bzw. deren N-terminales Ende und heben dadurch die eigentlich positive Ladung der Histone auf. Dies bewirkt eine Abstoßung der Histone von den ebenfalls negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA, Folge ist eine Auflockerung der DNA hin zum transkriptionsaktiven Euchromatin. So können Gene, z. B. für Tumorsuppressoren abgelesen und transkribiert werden. HDACs rufen den gegenteiligen Effekt hervor: Indem sie Acetylreste entfernen, bringen sie die positive Ladung der Histone wieder zum Vorschein und führen so wieder zu der

engen Bindung mit der DNA (Heterochromatin). In diesem Zustand ist das Gen „stillgelegt“, es erfolgt keine Transkription (67).

18 HDACs, eingeteilt in vier Klassen, sind bekannt (51, 68):

I: HDAC 1-3 und HDAC 8 fungieren als Triggerfaktoren für Zellwachstum, -proliferation, -differenzierung und Apoptose.

II: HDAC 4-7 und HDAC 9-10 sind beteiligt an der Tumorangio-genese.

III: Sirtuine 1-7 fördern Migration, Wachstum und Metastasierung.

IV: HDAC 11 ist noch nicht vollständig verstanden, vermutlich aber involviert in regulative Funktionen bei Zellzyklus und DNA-Schäden.

HATs und HDACs befinden sich in ihrem dynamischen Zusammenspiel in gesunden Zellen in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander (69, 70). Ein Ungleichgewicht zwischen beiden Enzymfamilien kann Auswirkungen bei der Tumorentstehung haben, sei es durch eine verringerte Bildung wachstumshemmender Proteine oder umgekehrt durch eine verstärkte Bildung wachstumsfördernder Proteine (70, 71).

Eine erhöhte HDAC-Expression führt zu einer Tumorprogression. Damit im Einklang wurde in vielen Tumoren, z. B. Blasen- Kolon- und Mammakarzinom, festgestellt, dass HDACs überexprimiert sind, was in weiterer Folge darin mündet, dass tumorsuppressive Gene unterdrückt werden (72–74). Auch für das Prostatakarzinom wurde eine HDAC-Überexpression beschrieben (75, 76). Eine geeignete und erfolgversprechende Therapiestrategie kann daher in einer HDAC-Inhibition liegen. In der Tat zeigen vier für das T-Zell-Lymphom bzw. das Multiple Myelom zugelassene pharmakologische HDAC-Inhibitoren (Vorinostat, Romidepsin und Belinostat bzw. Panobinostat) (69) vielversprechende Resultate im Hinblick auf Tumorwachstum, Apoptose, Tumorangio-genese, Zelldifferenzierung und Zellzyklusblockade (69, 77–79).

Nach derzeitigem Erkenntnisstand wirken HDAC-Inhibitoren vorwiegend gegen Tumorzellen, während ihre Toxizität gegenüber gesunden Zellen gering ausgeprägt ist (Tumorselektivität) (80–84). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass sie die Wirksamkeit konventioneller Therapien wie Chemotherapie oder auch Radiatio steigern können (69, 85–87), wodurch eine Einbindung von HDAC-Inhibitoren in die etablierten Therapieprotokolle aussichtsreich sein könnte. Als natürlicher HDAC-Inhibitor könnte

Sulforaphan durch seine antitumoralen Eigenschaften ein ergänzendes und unterstützendes Element in der Krebstherapie sein.

1.10 Ziel der Studie

Im Zentrum der hier vorgelegten Arbeit steht die Frage, inwiefern Sulforaphan als natürlicher HDAC-Inhibitor Einfluss auf Zellwachstum und -proliferation sowie den Zellzyklus von Prostatakarzinomzellen (Adenokarzinom der Prostata) zu nehmen vermag. Ergänzend soll im Zuge der Wachstumsversuche untersucht werden, ob die langfristige Behandlung der Zellen mit Sulforaphan (dauerbehandelte Zellen) zur Ausbildung einer Resistenz führt.

Angelegt ist die Arbeit als ein in-vitro-Zellkulturmodell unter Verwendung der zwei Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC3. Zur Überprüfung von Zellwachstum und -proliferation kommen MTT- und BrdU Assay zum Einsatz. Ersterer wird auch verwendet, um eventuelle Veränderungen im Wachstumsverhalten der dauerbehandelten Zellen zu ermitteln. Im Speziellen ist auch das klonogene Wachstum der Zellen Gegenstand dieser Arbeit. Der Überprüfung möglicher apoptotischer Ereignisse und dem Ausschluss nekrotischer Schäden dient der Apoptose Assay. Da Änderungen des Zellwachstums mit Änderungen des Zellzyklus verbunden sind, sollen mittels Durchflusszytometrie (FACS) die Zellzyklusphasen bzw. Sulforaphan-bedingte Verschiebungen der Phasenanteile bestimmt werden. Um detaillierteren Einblick in das Zellzyklusgeschehen zu gewinnen, wird eine Western Blot-Analyse Zellzyklus-regulierender Proteine durchgeführt, die das Expressionsprofil der Cycline A und B und von CDK 1 und 2 sowie deren aktivierter, phosphorylierter Form pCDK1 und 2 beinhaltet. Darüber hinaus werden die Tumorsuppressoren bzw. CDK-Inhibitoren p19 und p27 miteingeschlossen. Da Sulforaphan als HDAC-Inhibitor wirkt, sind auch die Histone H3 und H4 in ihrer acetylierten Form (aH3, aH4) Teil der Western Blot-Untersuchung. Daneben wird der als Differenzierungsmarker fungierende Oberflächenrezeptor CD44 (Subtypen v4, v5, v7) in die Arbeit miteinbezogen und dessen Expressionsprofil bzw. mögliche Veränderungen unter der Wirkung von Sulforaphan mittels FACS untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

2.1.1 DU145

Humanes Prostatakarzinom (**Abbildung 1 A**). Einschichtig wachsende Zelllinie mit moderatem Metastasierungspotential, gewonnen aus dem Patientenisolat der Hirnmetastase eines Prostatakarzinoms eines 69-jährigen Mannes.

2.1.2 PC3

Humanes Prostatakarzinom (**Abbildung 1 B**). Einschichtig wachsende Zelllinie mit hohem Metastasierungspotential, gewonnen aus dem Patientenisolat der Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms eines 62-jährigen Mannes.

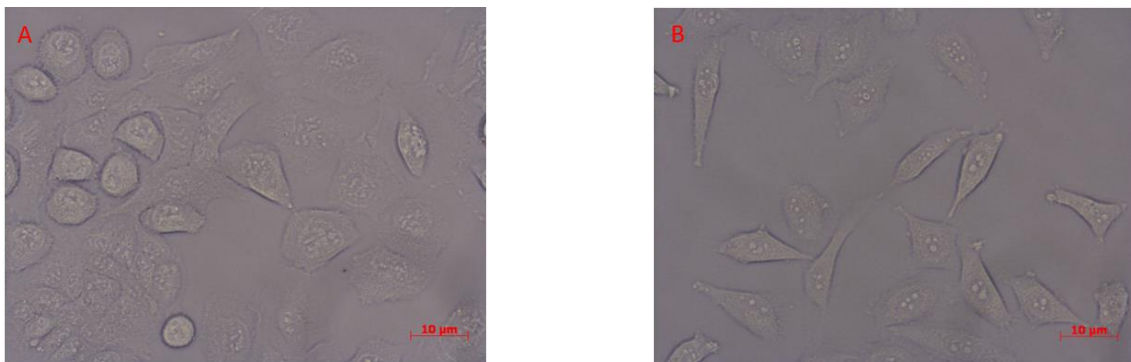


Abbildung 1: 100-fache Vergrößerung unbehandelter Prostatakarzinomzellen der Zelllinien DU145 (A) und PC3 (B).

2.2 Materialien und Geräte

Tabelle 1

Geräte, Medien und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
RPMI (500 ml)	Fa. Sigma-Aldrich, R8758
Fötale Kälber Serum (100 ml) (FBS)	Fa. Invitrogen, REF: 10500-056
HEPES Puffer 1M (100 ml)	Fa. Sigma-Aldrich, H0887
GlutaMAX 100x (100 ml)	Fa. Invitrogen, REF: 35050-038
Penicillin (5.000 U/ml) – Streptomycin (5.000 µg/ml) (100 ml) (P/S)	Fa. Sigma-Aldrich, P4458
PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (500 ml)	Gibco by life technologies, REF: 14190-094
Accutase (100 ml)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Kat#: L11-007
L-Sulforaphan, Lösung in Ethanol	Cayman Chemical, Item No. 14797
Dimethyl Sulfoxid (DMSO) >99,5%	Sigma #4169-100 ml
Destilliertes Wasser	Fresenius Kabi Ampuwa Spüllösung 1.000 ml
Plastikhülle/Müllbeutel	Sarstedt Vernichtungsbeutel, REF: 86.1197
Desinfektionsmittel	Schülke octeniderm
Handschuhe	Peha-soft nitrile, REF: 942190
Incidin	Ecolab Incidin Plus 2215MS2113
Incidintücher	Ecolab Incidin Wipes Dispenser
Cell Proliferations Kit 1 (MTT)	Roche, REF: 11465007001
Bromdesoxyuridin (BrdU) Cell Proliferations Assay	CALBIOCHEM, Kat#: QIA58
Cycle Test Plus	Fa. BD, Kat#: 340242 (Pufferlösung, Solution A, B und C)
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 1	Fa. BD Pharmingen Kat#: 556547
Werkbank	Heraeus Instruments Hera Safe Typ HS15
Inkubator	Heraeus Instruments Typ BB6220CU
Wasserbad	GRW 720-04 Fritz Gössner
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Premium
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific Typ HFU 686 Basic
Zellkulturflasche 75 cm² Wuchsfläche	Sarstedt, REF: 83.3911.302
Pipettierhilfe	Pipetus, Fa. Hirschmann Laborgeräte
Pipettenspitze	Fa. Costar, 5 ml stripette: Kat#: 4487, 10 ml stripette: Kat#: 4488

Material	Hersteller
Pipette	Fa. Biohit bzw. Eppendorf
Pipettenspitze	Fa. StarLab, Bevelled Filter Tip (1.000 µl Kat#: S1126-7810, 200 µl Kat#: S1120-880, 100 µl Kat#: S1120-1840, 20 µl Kat#: S1120-1810, 10 µl Kat#: S1121-3810)
Multipipette	Eppendorf Multipipette M4
Pipettenspitze Multipipette	Eppendorf Combitips advanced (10 ml Kat#: 0030089677; 5 ml Kat#: 0030089669; 2,5 ml Kat#: 0030089650; 1 ml Kat#: 0030089642; 0,5 ml Kat#: 0030089634)
Multikanalpipette	Thermo Labsystems N56 426 4510
Falcons/Cellstar-Röhrchen, 15 ml	Fa. Greiner bio-one, Kat#: 188271
Falcons/Cellstar-Röhrchen, 50 ml	Fa. Greiner bio-one, Kat#: 227261
1,5 ml-Reaktionsröhrchen	Eppendorf
0,2 ml-PCR-Röhrchen	Fa. Thermo Fisher Scientific. PC1066
1,8 ml-Kryoröhrchen	Fa. Nunc A/S, Denmark. Kat#: 377267
6-Well-Platte	Sarstedt, REF 83.3920.300
96-Well-Platte	Sarstedt, REF 83.3924.300
Zentrifuge	Rotina 380 R, Fa. Hettich
Zentrifuge	Zentrifuge 5402, Fa. Eppendorf
Eismaschine	Scotsman Frimont AF80 AS230/50/1
Waage	Denver Instrument S-234
Vortexer	MS1 Minishaker IKA
C-Chip Zählkammer	Fa. Digital Bio, DHC-N01
Trypanblau 0,4% (100 ml)	Fa. Invitrogen, 15250
Mikroskop	Zeiss, ID 03
Mikroskop/Foto	Zeiss, Observer Z1/AxioCam MRm
Mikroskopierprogramm	Axio vision
ELISA	Tecan, Infinite M200
ELISA Programm	Magellan Version 6.5
FACS-Röhrchen + Filter: 5 ml Polystyrene Rundboden-Röhrchen	Fa. BD Falcon, REF No.: 352235
FACS-Röhrchen ohne Filter 5 ml Polystyrene Rundboden-Röhrchen	Fa. BD Falcon, REF: 352052
FACS-Gerät	Becton Dickinson (Heidelberg) FACSCalibur
FACS-Gerät	Becton Dickinson (Heidelberg) FACScan
Insulinspritze (1 ml)	Fa. Becton, Dickinson, USA. REF: 324827
PMSF	Fa. Roth, Kat#: 6367.1
Coomassie Plus Protein Assay Reagenz (950 ml)	Thermo Scientific, Prod #: 1856210
Schwenktisch	Stuart, see-saw rocker SSL4
Thermoblock	Eppendorf Thermomixer comfort
Elektrophorese und Blottingstation	Bio Rad, Power Pac HC

Material	Hersteller
Isopropanol	Fa. Sigma-Aldrich, 33539-2.5L-R
SDS, granuliert	Fa. AppliChem, A7249, 1000
Acrylamid A	Fa. Roth, Art-Nr.: 3037.1
Bisacryl B	Fe. Roth, Art-Nr.: 3039.1
APDS	Fa. Roth, Art-Nr.: 9592.2
TEMED	Fa. Roth, Art-Nr.: 2367.1
Laemmli Sample Puffer	2x Laemmli Sample Puffer Bio Rad, Kat#: 161-0737
Tris	Fa. AppliChem, A1086, 1000
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich, LOT#: SZBE2460V
Magermilchpulver	Spinnrad L1115310181, Art-Nr.: 2231018
Blotting Papier	A. Hartenstein, Bestell-Nr.: GB58
Nitrozellulosemembran	Amersham Protran, Kat#: 1060016
Schwammtücher	Biorad München
ECL-Lösung	Millipore, LOT 17230 A2 bzw. 17230 B2
Rührer	Yellow line, yellow line Mag HS7
Entwicklungskammer	Fusion FX7 Peqlab
Entwicklungsprogramm	Fusion
Pixelanalyse-Programm	GIMP2
Evaluierungsprogramm	Systat Software SigmaPlot 11.0

Zellkulturmedien

500 ml RPMI Grundmedium zur Kultivierung der Zellen

430 ml RPMI 1640 Medium

50 ml FBS (= 10%)

10 ml HEPES-Puffer (= 2%)

5 ml P/S (= 1%)

5 ml GlutaMAX (= 1%)

Einfrüermedium zur Kryokonservierung der Zellen

70% RPMI 1640 Medium

20% FBS

10% DMSO

Tabelle 2

Western Blot: Trenngel

Lösung	7%	8%	10%	12%	15%
Aqua dest.	3,9 ml	3,5 ml	2,6 ml	1,75 ml	150 µl
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 µl
Acrylamid A	2,3 ml	2,6 ml	3,2 ml	3,9 ml	4,85 µl
Bisacryl B	1,1 ml	1,6 ml	1,6 ml	1,8 ml	2,25 µl
10% APDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 3

Western Blot: Sammelgel

Lösung	4%
Aqua dest.	5,4 ml
10% SDS	100 µl
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid A	1,3 ml
Bisacryl B	0,6 ml
10% APDS	100 µl
TEMED	20 µl

Tabelle 4

Western Blot: Pufferlösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Western-Hybridisierung und Immunfärbung

Lösung	Inhalt	Menge
Antikörperlösung	Blotpuffer BSA	90 ml 5 g in 100 ml Blotpuffer
Blotpuffer	10x Towbinpuffer Tween 20 Destilliertes Wasser	100 ml 5 ml 895 ml
Blocklösung	1x Towbinpuffer Milchpulver	100 ml 10 g
10x Elphopuffer (pH 8,3)	Tris Glycin SDS Destilliertes Wasser	30,3 g 144 g 10 g 1 l
1x Elphopuffer	10 x Elphopuffer Destilliertes Wasser	100 ml 900 ml

Lösung	Inhalt	Menge
10x Transferpuffer	Tris Glycin Destilliertes Wasser	30,3 g 144 g 1 l
1x Transferpuffer	10x Transferpuffer Methanol Destilliertes Wasser	100 ml 200 ml 700 ml
10x Towbinpuffer	Tris NaCl Destilliertes Wasser	12,1 g 90 g 1 l
1x Towbinpuffer	10x Towbinpuffer Destilliertes Wasser	100 ml 900 ml

Tabelle 5

Western Blot: Zellzyklus-Proteine, Primär- und Sekundärantikörper mit Hersteller und Verdünnung

Primärantikörper	Klon	kDa	Hersteller	Verdünnung
β-Aktin (Maus IgG1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
CDK1/Cdc2 (Maus IgG1)	1/CDK1/Cdc2	34	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
pCDK1/Cdc2(Maus IgG1)	44/CDK1/Cdc 2 (pY15)	34	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
CDK2 (Maus IgG2a)	55/CDK2	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
pCDK2 (Hase Thr160)		33	Cell Signaling	1:1.000
CDK4 (Maus IgG1)	97	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin A (Maus IgG1)	25/Cyclin A	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin B (Maus IgG1)	18/Cyclin B	62	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000

Primärantikörper	Klon	kDa	Hersteller	Verdünnung
Cyclin D3/Cyclin D1 (Maus IgG2b)	1	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
p19 [Skp1] (Maus IgG1)	52/p19	19	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
Kip1/p27 (Maus IgG1)	57	24	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
PKBα/Akt (Maus IgG1)	55	59	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
pAkt /p-Ser 472/473 (Maus IgG1)	104A282	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
RAPTOR 24C12 (Hase)		150	Cell Signaling	1:1.000
pRAPTOR/Ser 792 (Hase)		150	Cell Signaling	1:1.000
RICTOR (Hase)		200	Cell Signaling	1:1.000
pRICTOR/Thr1135/D30A3 (Hase IgG)		200	Cell Signaling	1:1.000
Acetyl-Histone H3 (aH3)/Lys9 (Hase)		17	Cell Signaling	1:1.000
Acetyl-Histone H4 aH4/Lys8 (Hase)		11	Cell Signaling	1:1.000
FAK (Maus IgG1)	77	125	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
pFAK (pY397) (Maus IgG1)	18	125	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
ILK (Maus IgG1)	3	50	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Bax (N-20) (Hase IgG): sc-493		23	Santa Cruz	1:200
Bcl-2 (N-19) (Maus IgG): sc-492		28	Santa Cruz	1:200
Sekundärantikörper			Hersteller	Verdünnung
Ziege-anti-Maus IgG HRP			Millipore	1:5.000
Ziege-anti-Hase IgG HRP			Chemicon	1:5.000

Marker	Hersteller	Verdünnung/ Menge
Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate, 5.000x 0,3 ml	BioRad Kat#:161-0380	1:10.000
Precision Plus Protein™ WesternCTM Standards 250 µl	BioRad Kat#: 161-0376	5 µl

Tabelle 6
Lysispuffer

Chemikalie	Konzentration	Lösemittel	Lagerung	Hersteller
EDTA	0,1 M (29,22 g/l), pH7,4	H ₂ O		Fa. Sigma; Kat#: ED455
NaCl				Fa. Merck
Na-deoxycholat	10% (g/v)	H ₂ O		Fa. Sigma; Kat#: D6750
NaF	0,2 M (8,398 g/l)	H ₂ O	RT	Fa. Sigma; Kat#: 1504
Tergitol NP40	10% (v/v)	H ₂ O	RT	Fa. Sigma; Kat#: 127087-87-0
Tris-base				Fa. USB
Phosphatase Inhibitor	Konzentration	Lösemittel	Lagerung	Hersteller
Na-orthovanadat	0.2 M (36.78 g/l)	H ₂ O	-20°C	Fa. Sigma; Kat#: S6508
Protease Inhibitor	Konzentration	Lösemittel	Lagerung	Hersteller
Leupeptin	1 mg/ml	H ₂ O	-20°C	Fa. Sigma; Kat#:2023
Pepstatin A	1 mg/ml	Methanol	-20°C	Fa. Sigma; Kat#:P5318
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,2 M (34,84 g/l)	Isopropanol	RT	Fa. Sigma; Kat#:P7626
Aprotinin	1 mg/ml	H ₂ O	-20°C	Fa. Sigma; Kat#:A1153

Herstellung von Lysispuffer

Stocklösungen der Protease-Inhibitoren herstellen

- Leupeptin:** 10 mg in 10 ml A. dest. lösen, Konzentration: 1 mg/ml, aliquotieren à 1 ml, Lagerung bei -20°C
- Aprotinin:** 10 mg in 10 ml A. dest. lösen, Konzentration: 1 mg/ml, aliquotieren à 1 ml, Lagerung bei -20°C
- Pepstatin:** 5 mg in 5 ml Methanol lösen, Konzentration: 1 mg/ml, aliquotieren à 1 ml, Lagerung bei -20°C
- PMSF:** 200 mM Stocklösung in Isopropanol ansetzen, Lagerung bei Raumtemperatur : 3,48 g PMSF (MW:174,2) mit Isopropanol auf 100 ml auffüllen

Stocklösungen der Phosphatase-Inhibitoren herstellen

- Na₃VO₄:** 200 mM Lösung herstellen (MW:183,9) 3,678 g (Endvolumen 100 ml) einwiegen, in A. dest. lösen, pH-Wert auf 10,0 (gelblich) einstellen. Die Lösung kochen, bis sie farblos wird (ca. 10 min.). Auf Raumtemperatur abkühlen, pH wieder auf 10,0 einstellen, die Lösung noch einmal kochen, bis sie farblos wird. pH prüfen, ggf. auf 10,0 einstellen. Bei Gelbfärbung wieder kochen, abkühlen und pH einstellen. Die aktivierte Natriumorthovanadat-Lösung à 10 ml aliquotieren und bei -20°C lagern.
- NaF:** 200 mM Lösung herstellen (MW:41,99) 0,84 g (Endvolumen 100 ml) einwiegen, mit A. dest. auf 100 ml auffüllen, aliquotieren à 10 ml, Lagerung bei -20°C.

1 Liter Lysis-Puffer ansetzen

- 7,9 g Tris-base in 750 ml Aqua dest. lösen
- 9 g NaCl zugeben und rühren
- Wenn die Substanzen vollständig gelöst sind, pH-Wert mit HCl auf 7,4 einstellen
- 100 ml einer 10%igen NP-40-Lösung zugeben, alternativ 10% Triton X-100 (10 ml Triton X-100 in 90 ml A. dest.)
- 25 ml 10% Na-deoxycholate (Ansatz: 0,3 g in 30 ml A. dest.) zugeben und rühren, bis die Lösung klar ist
- 10 ml 100 mM EDTA-Lösung zugeben, alternativ: 2 ml einer 0,5 M EDTA-Lösung von Gibco
- 1 ml Aprotinin (1 mg/ml) zugeben
- 1 ml Leupeptin (1 mg/ml) zugeben
- 1 ml Pepstatin (1 mg/ml Methanol) zugeben
- 5 ml 200 mM Na₃VO₄-Lösung zugeben
- 5 ml 200 mM NaF-Lösung zugeben
- Mit A. dest auf 1 Liter auffüllen.
- Puffer in 50 ml-Röhrchen aliquotieren, Lagerung bei -20°C
- 1,5 ml Aliquots in 1,8 ml Kryoröhrchen, Lagerung bei -20°C

PMSF: 7,5 µl der 200 mM PMSF-Stocklösung auf 1,5 ml Lysis-Puffer, erst vor Gebrauch zugeben. Endkonzentration: 1 mM

Tabelle 7

CD44 Durchfluss-Zytometrie: CD44-Subtypen, Isotyp, Lightning-Link mit Hersteller, Verdünnung und Menge

Antikörper	Klon	Herkunft	Verdünnung	Menge
CD44 v4		Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	gebrauchsfertig	Gesamtmenge 200 µl; Gebrauchsmenge 5 µl
CD44 v5		Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	gebrauchsfertig	Gesamtmenge 1.000 µl; Gebrauchsmenge 5 µl
CD44 v7		Invitrogen by Thermo Fisher Scientific	gebrauchsfertig	Gesamtmenge 100 µl; Gebrauchsmenge 5 µl
Isotyp	Klon	Herkunft	Verdünnung	Menge
Maus IgG1 R-PE	MOPC-21	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	Gesamtmenge 20 µl; Gebrauchsmenge 5 µl
Lighting-Link	Klon	Herkunft	Verdünnung	Menge
Allophycocyanin (APC) Conjugate Kit		Innova Bioscience	gebrauchsfertig	

2.3 Methoden

2.3.1 Zellen auftauen, Zellkultur

Zum Anlegen der Zellkulturen DU145 und PC3 wurden die bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen aufgetaut, in ein 15 ml-Falconröhrchen, in das bereits 9 ml RPMI 1640 Medium vorgelegt worden waren, gegeben und für fünf Minuten bei 4°C und 1.050 rpm zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde weggegossen und das übriggebliebene Restmedium mit einer Pipette abgesaugt, sodass das Zellpellet trockengelegt wurde. Dieses wurde nun mit 12 ml RPMI 1640 Medium resuspendiert und die gesamte Zell-Medium-Mischung in eine Zellkulturflasche (75 cm^2) überführt, die zur Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt wurde. Am darauf folgenden Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um eventuell verbliebene Reste des DMSO-enhaltenden Einfriermediums zu beseitigen. Dabei wurde das alte Medium entfernt und durch dieselbe Menge frischen Mediums ersetzt.

Sobald die Zellen konfluent den Boden bedeckten, wurden sie gesplittet; i. d. R. war dies, je nach Splitrates und Zellart, alle drei bis fünf Tage der Fall. Das Splitten diente einerseits dem Expandieren der Zellen, andererseits war es notwendig, um den Zellen neuen Platz zum Wachsen zu bieten und sie somit am Leben zu erhalten. Für das Splitten wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgezogen und verworfen und die Zellen wurden kurz mit 5 ml PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen, das danach ebenfalls entfernt wurde. Mittels 3 ml Accutase wurden die Zellen dann vom Flaschenboden gelöst, was durch kurzzeitiges Lagern der Zellkulturflasche im Inkubator, also in warmer Umgebung, beschleunigt werden konnte. Die gelösten Zellen wurden in der Zellkulturflasche mit einer der gewünschten Splitrates entsprechenden Menge RPMI 1640 Medium homogen gemischt und, je nach Versuchsansatz, auf eine oder mehrere neue Kulturflaschen verteilt, in die vorher Medium vorgelegt worden war. Abhängig von Wachstumsgeschwindigkeit und Dichte der Zellen wurde alle zwei bis drei Tage das Medium erneuert oder die Zellen wurden gesplittet und auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Die Prostatakarzinomzellen DU145 und PC3 wurden bis zur Passage 30 geführt.

2.3.2 Zellen einfrieren

Zum Einfrieren von Zellen wurde zunächst das Einfriermedium, wie unter Tabelle 1 beschrieben, hergestellt. Wie beim Splitten wurden die Zellen mittels PBS und Accutase aus den Zellkulturflaschen abgelöst und in ein 15 ml-Falconröhrchen gegeben, in das bereits 7 ml RPMI 1640 Medium vorgelegt worden waren. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten bei 4°C und 1.050 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und das Zellpellet trockengelegt worden war, wurde dieses mit dem zu Beginn angesetzten Einfriermedium benötigter Menge resuspendiert. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde dann in vorbereitete Kryoröhrchen aliquotiert. Diese wurden zum Einfrieren in einer Kryobox bzw. Einfrierhilfe bei -80°C gelagert. Die Einfrierhilfe sorgte für ein schonendes Einfrieren, indem die Zellen pro Minute um 1°C heruntergekühlt wurden. Für eine langfristige Lagerung wurden die gefrorenen Zellen anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Wie beim Splitten mussten für die Zellzahlbestimmung die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst werden. Die abgelösten Zellen wurden, mit 7 ml RPMI 1640 Medium vermischt, in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und zentrifugiert. Der flüssige Medium-Überstand wurde verworfen, ein eventuell verbliebener Flüssigkeitsrest mit einer Pipette abgesaugt und das Zellpellet somit trockengelegt. Je nach Versuchsanordnung wurde das Pellet nun mit 1.000 µl Medium oder Pufferlösung im Falconröhrchen resuspendiert und die entstandene Suspension durch Vortexen homogen gemischt. Von diesen 1.000 µl homogener Zellsuspension wurden 10 µl zu 90 µl 0,4%iger Trypanblau-Lösung in ein PCR-Röhrchen gegeben. Dieses Gemisch wurde ebenfalls durch Vortexen homogenisiert. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur defekte Zellmembranen penetrieren kann, während vitale Zellen für ihn unzugänglich sind. Beschädigte bzw. tote Zellen werden daher blau gefärbt, vitale Zellen bleiben ungefärbt. Von der homogenen Trypanblau-Zell-Mischung wurden wiederum 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert.

Unter dem Mikroskop konnten dann die vitalen Zellen in den vier großen Quadranten der Zählkammer mäanderförmig ausgezählt werden; die blau gefärbten defekten Zellen

blieben unberücksichtigt. Ein großes Quadrat entspricht einer Fläche von 1 mm² und hat eine Tiefe von 0,1 mm. Bezieht man die Verdünnung der Zellen in Medium/Pufferlösung und Trypanblau mit ein, ergibt sich daraus ein Faktor von 10⁴. Die Gesamtzellzahl errechnet sich demnach mit der Formel:

$$G=n*10^4*F$$

G=Gesamtzellzahl/ml

n= Durchschnittliche Zellzahl der vier großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer

F= Verdünnungsfaktor (in Trypanblau) =10

2.3.4 Behandlung der Zellen

Zwei Gruppen von Zellen pro Zellreihe waren für die Versuche erforderlich: Eine mit Sulforaphan unterschiedlicher Konzentrationen behandelte Zellgruppe (Sulforaphangruppe) und eine (unbehandelte) Kontrollgruppe. Das Sulforaphan, bereits in Ethanol gelöst, war als „ready-to-use-Produkt“ in flüssigem Zustand gebrauchsfertig und bedurfte keiner weiteren Präparation. Gelagert wurde es bei -20°C.

Die Zellen der Kontrollgruppe wurden die ganze Zeit über mit RPMI 1640 Medium bei 37°C im Inkubator kultiviert und erhielten sonst keine Behandlung. Für die Sulforaphangruppe wurde das Sulforaphan auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und zu den Zellen hinzugefügt. Dafür wurde zunächst ein Sulforaphan-Zwischenstock mit einer Konzentration von 1.000 µMol angesetzt. Aus diesem konnten dann durch ein entsprechendes Mischungsverhältnis mit RPMI 1640 Medium die gewünschten Sulforaphankonzentrationen hergestellt werden, mit denen die Zellen behandelt wurden. Wie die Zellen der Kontrollgruppe, so wurden auch die Zellen der Sulforaphangruppe im Brutschrank bei 37°C gelagert. Für die Versuche wurden die Zellen beider Gruppen für 24 h, 48 h bzw. 72 h inkubiert.

Abhängig vom Versuchsaufbau wurden die Zellen der Sulforaphangruppe entweder im entsprechenden Zeitfenster von 24 h bis 72 h vor dem eigentlichen Versuch behandelt und dann bis zum Versuchsbeginn im Brutschrank verwahrt oder die Sulforaphanbehandlung wurde unmittelbar zu Versuchsbeginn auf die Zellen gegeben.

2.3.5 Dauerbehandlung

Die Dauerbehandlung der Zellen diente der Überprüfung, ob die Zellen durch eine langfristige Behandlung mit Sulforaphan eine Resistenz entwickeln. Das Sulforaphan wurde wie unter 2.3.4 ausgeführt in der jeweiligen Konzentration angesetzt und den Zellen im Nährmedium zugegeben. Bei jeder Zellversorgung wurde die Sulforaphanbehandlung erneuert. Die Dauerbehandlung mit Sulforaphan wurde mit einer Konzentration von 1 μMol eingeleitet. Die Konzentration wurde dann schrittweise bis auf die Zielkonzentration von 5 μMol erhöht und anschließend über einen Zeitraum von sechs Monaten stabil gehalten. Sowohl die dauerbehandelten Zellen als auch die unbehandelten Vergleichszellen wurden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Sulforaphankonzentration wurde bis auf 5 μMol immer dann erhöht, wenn die Zellen sich an die jeweils aktuelle Konzentration adaptiert hatten, wenn also im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine Unterschiede in Wachstumsgeschwindigkeit und Zelldichte mehr zu sehen waren. Mittels MTT-Test (s. u.) wurden dann das Wachstumsverhalten und die Vitalität der dauerbehandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen untersucht.

2.3.6 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Zellviabilitäts- und Zytotoxizitätstest und dient der Untersuchung des Wachstumsverhaltens bzw. der Vitalität unbehandelter und Sulforaphan-behandelter Zellen anhand der metabolisch-enzymatischen Aktivität der Zellen. Dazu verwendet man gelbliches MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium Bromid), das von den Zellen enzymatisch in unlösliches blau-lila Formazan umgesetzt wird. Da die metabolisch-enzymatische Aktivität in toten bzw. abgeschwächten Zellen gegenüber lebenden Zellen reduziert ist, dementsprechend also weniger Formazan anfällt, „färbt“ MTT v. a. lebende Zellen. Die Menge an umgesetztem und mittels ELISA gemessenen Formazan entspricht daher der Vitalität der Zellen. Des Weiteren erlaubt der MTT-Test die Bestimmung des IC₅₀ (inhibitory concentration of half-maximum effect), also der Sulforaphankonzentration, die die Anzahl lebender Zellen um 50% senkt.

Zum Erstellen der Eich- bzw. Standardkurve, dem ersten Part der MTT-Messung, wurde mit einer Verdünnungsreihe gearbeitet: Ausgangspunkt war eine Zellmenge von $32 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml RPMI 1640 Medium. Aus dieser wurden alle anderen Zellmengen gewonnen. Durch jeweilige Halbierung der Menge wurden die für die Eichkurve benötigten Zellzahlen hergestellt, d. h. je 1 ml der Zellsuspension wurde in 1 ml frisches Medium gegeben, wodurch sich die Zellzahl halbierte. Von dieser neuen Zellsuspension, zuvor durch Vortexen homogenisiert, wurde wiederum 1 ml in 1 ml frischen Mediums gegeben, was wiederum eine Halbierung der Zellzahl zur Folge hatte. So wurde weiter verfahren, bis eine Verdünnungsreihe von $16 \cdot 10^5$ bis $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/ml angelegt war. Von jeder Verdünnung wurden im nächsten Schritt Triplikate von 100 μ l pro Well sowie ein Blank-Triplikat von 100 μ l RPMI 1640 Medium pro Well auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. 10 μ l MTT wurden unmittelbar folgend in jedes Well pipettiert, die Platte für vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert und zum Schluss 100 μ l Solubilisierungspuffer zum Abstoppen hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurde die Platte am nächsten Tag bei einer Wellenlänge von 550 nm mit dem ELISA-Gerät gemessen. Die so gewonnene Eichkurve diente der späteren Verrechnung der Messergebnisse.

Benötigt wurde für den eigentlichen MTT-Versuch eine Anzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml, sodass bei homogener Durchmischung 50 μ l Zellsuspension 5.000 Zellen enthielten. Die Zellen (Sulforaphan-behandelte und Kontrollzellen) wurden, wie bereits unter 2.3.1 und 2.3.3 beschrieben, abgelöst, ausgezählt und anschließend auf die benötigte Menge von $1 \cdot 10^5$ eingestellt. Für die Durchführung des Versuchs wurden 96-Well-Platten benutzt, für die drei zu messenden Zeitpunkte 24 h, 48 h bzw. 72 h je eine eigene. Jede „Anwendung“ auf den Platten wurde jeweils als Triplikat aufgetragen: Zuerst wurde ein Blank bzw. Leerwert, bestehend aus Medium, je 100 μ l pro Well, ausplattiert. Daneben gab es eine Kontrolle unbehandelter Zellen, zusammengemischt aus 50 μ l der Zellsuspension mit 50 μ l RPMI 1640 Medium. Schließlich wurden sechs Zellserien, mit jeweils steigender Sulforaphankonzentration behandelt, aufgetragen, wobei 50 μ l Zellsuspension mit 50 μ l Sulforaphanlösung der entsprechenden Konzentration vermengt wurden. In jedem Well war also letztlich ein Volumen von 100 μ l enthalten.

Die getesteten Sulforaphankonzentrationen beliefen sich auf 1 μ Mol, 5 μ Mol, 10 μ Mol, 15 μ Mol, 20 μ Mol und 25 μ Mol. Diese wurden, wie unter 2.3.4 beschrieben,

angesetzt. Zur Kultivierung wurden die Platten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zum entsprechenden Zeitpunkt, d. h. nach 24 h, 48 h bzw. 72 h wurden 10 µl MTT in jedes Well gegeben. Nach Zwischeninkubation von vier Stunden im Brutschrank wurde der in Gang gesetzte enzymatische Prozess der MTT-Umwandlung in Formazan durch 100 µl Solubilisierungspuffer pro Well abgestoppt. Erneut wurden die Platten im Inkubator gelagert und am nächsten Tag mittels ELISA-Gerät bei 550 nm Wellenlänge ausgelesen. Mit der zuvor erstellten Eichkurve wurden die Ergebnisse abschließend verrechnet.

2.3.7 BrdU Assay

Beim BrdU (Bromdesoxyuridin) handelt es sich um ein Thymidin-Analogon, das bei der DNA-Synthese proliferierender Zellen eingebaut wird. Durch Antikörper- (AK) vermittelte Messung des BrdU kann dadurch eine kolorimetrische Quantifizierung der Zellproliferation gelingen.

Wie beim MTT-Test wurden die Zellen (Sulforaphan-behandelte und Kontrollzellen) aus den Kulturflaschen abgelöst (s. 2.3.1), ausgezählt (s. 2.3.3) und auf $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Die Aussaat der Zellen auf 96-Well-Platten – für jeden der drei zu messenden Zeitpunkte 24 h, 48 h bzw. 72 h wurde eine eigene Platte verwendet – erfolgte in Triplikaten. Folgendes Pipettierschema ergab sich dabei:

- ein Blank bzw. Leerwert von 100 µl RPMI 1640 Medium
- ein BrdU-Blank, bei dem zusätzlich zu den 100 µl Medium noch 20 µl BrdU-Label pro Well zugesetzt wurden
- eine Kontrolle unbehandelter Zellen, zusammengesetzt aus 50 µl Zellsuspension und 50 µl Medium pro Well
- eine BrdU-Kontrolle unbehandelter Zellen, der zusätzlich 20 µl BrdU-Label pro Well zugesetzt wurden
- die mit Sulforaphan behandelten Zellen (50 µl Zellsuspension und 50 µl Sulforaphanlösung entsprechender Konzentration), die alle ebenfalls 20 µl BrdU-Label pro Well erhalten haben

Bei den getesteten Sulforaphankonzentrationen handelte es sich um 1 µMol, 5 µMol und 10 µMol. Diese wurden, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, angesetzt. Zusätzlich war es notwendig, das BrdU-Label-Reagenz 1:2.000 mit RPMI 1640 Medium zu verdünnen.

Die ausplattierten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Zum entsprechenden Zeitpunkt, d. h. nach 24 h, 48 h bzw. 72 h, wurden die Platten in jedem Well mit 200 µl FixDenat, einem BrdU-Fixierungspuffer, behandelt, der 30 Minuten bei Raumtemperatur einwirkte, bevor er durch Herausklopfen aus den Kavitäten der Platte wieder entfernt wurde. Die fixierten Platten wurden dann bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, bis die zuletzt anstehende Färbung und Messung initiiert wurde.

Dafür wurden 100 µl Anti-BrdU-Lösung (d. h. der BrdU-AK zur Detektion), 1:100 verdünnt und in jedes Well der Platten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Platten drei Mal mit je 300 µl BrdU-Waschpuffer pro Well gewaschen. Als nächste Substanz wurden 100 µl Peroxidase-Lösung, 1:1.000 verdünnt, in jedes Well gegeben. Wieder folgte eine Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Erneut wurden daraufhin die Platten gewaschen, dreimal mit je 300 µl BrdU-Waschpuffer sowie einmal mit je 300 µl destilliertem Wasser pro Well. Zum Schluss wurden 100 µl Substrat-Solution pro Well aufgetragen. Nach einer neuerlichen Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 100 µl BrdU-Stop-Solution pro Well abgestoppt und sofort die optische Dichte am ELISA-Gerät bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

2.3.8 Apoptose Assay

Der Apoptose-Versuch wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob es durch die Behandlung mit Sulforaphan zu einem vermehrten Absterben vitaler Zellen kommt; dabei wurde zwischen Früh-, Spätapoptose und Nekrose differenziert.

Die Zellen wurden in den Zellkulturflaschen für 24 h, 48 h bzw. 72 h mit Sulforaphan der Konzentrationen 5 µMol und 10 µMol behandelt und im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Herstellen der Sulforaphankonzentrationen ist in Kapitel 2.3.4 nachzulesen. Auf Eis wurden die Zellen (Sulforaphan-behandelte und Kontrollzellen) aus den Zellkulturflaschen abgelöst und in ein 50 ml-Falconröhrchen gegeben, wobei jegliche Zellüberstände aus der Kulturflasche, d. h. altes Medium und zum Waschen verwendetes PBS, in diesem Falle nicht verworfen, sondern mit in das

Falcon überführt wurden. Dreimal wurden die Zellen dann mit PBS gewaschen und für fünf Minuten bei 4°C und 1.050 rpm zentrifugiert. Nach Trockenlegen des entstandenen Zellpellets wurden die Zellen mit 1 ml Bindepuffer, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt, resuspendiert, unter dem Mikroskop, wie in 2.3.3 beschrieben, ausgezählt und in einem 15 ml-Falconröhrchen mit Bindepuffer auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Je 100 µl, also $2 \cdot 10^5$ Zellen dieser eingestellten Zellsuspension, zuvor durch Vortexen homogen gemischt, wurden in vier FACS-Röhrchen überführt: K1, K2, K3 und P.

- K1 war eine Kontrolle ohne Zugaben, bestand also nur aus Zellen.
- K2 war die Kontrolle für die frühe Apoptose; dazu wurden 5 µl Annexin V-FITC, das an externe Proteine auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen bindet, zugegeben.
- K3 diente als Kontrolle der späten Apoptose; dazu wurden 5 µl Propidiumiodid, das die perforierte Membran toter Zellen, nicht jedoch die intakte Membran lebender Zellen passieren kann, zugesetzt.
- P war die eigentliche Messprobe, um sowohl Früh- als auch Spätapoptose zu detektieren. Dementsprechend wurde P mit 5 µl Annexin V-FITC und 5 µl Propidiumiodid behandelt.

Die Zugabe von Annexin V-FITC und Propidiumiodid erfolgte im Dunkeln. Die FACS-Röhrchen wurden behutsam gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Wieder auf Eis, wurden anschließend je 400 µl Bindepuffer in jedes der vier FACS-Röhrchen pipettiert und die Proben abschließend innerhalb einer Stunde am FACS-Gerät gemessen.

2.3.9 Klonogenes Wachstum

In einem weiteren Versuch wurde der Effekt von Sulforaphan unterschiedlicher Konzentrationen auf das klonogene (d. h. Kolonie-bildungsfähige) Wachstum frisch in Nährmedium ausgesäeter Prostatakarzinomzellen (DU145 und PC3) untersucht. Gewertet wurden dabei nur solche Kolonien, die aus mindestens 50 Zellen bestanden. Nachdem die Zellen zunächst aus den Zellkulturflaschen, wie in Kapitel 2.3.1 und 2.3.3 beschrieben, abgelöst und ausgezählt worden waren, wurden sie auf die erforderliche Anzahl von $1 \cdot 10^3$ Zellen/ml Nährmedium eingestellt und in eine 6-Well-Platte ausgesät.

Neben einer Kontrolle unbehandelter Zellen gab es solche, denen Sulforaphan der Konzentrationen 1 μMol , 5 μMol und 10 μMol zugesetzt wurde. Das Ansetzen der Sulforaphankonzentrationen erfolgte, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Anschließend wurde die Platte im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit für 7-14 Tage gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden dann zum Schluss alle Kolonien, die aus mindestens 50 Zellen bestanden, unter dem Mikroskop gezählt.

2.3.10 Zellzyklus Assay

Um den Einfluss von Sulforaphan auf die Phasen des Zellzyklus der DU145- und PC3-Zellen zu überprüfen, wurde der Zellzyklus-Versuch durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen für 24 h, 48 h bzw. 72 h mit Sulforaphan der Konzentrationen 5 μMol und 10 μMol behandelt und bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Die Sulforaphankonzentrationen wurden, wie in Kapitel 2.3.4 bereits dargestellt, angesetzt. Nachdem die Zellen (Sulforaphan-behandelte und Kontrollzellen) zum entsprechenden Zeitpunkt, d. h. nach 24 h, 48 h bzw. 72 h, mittels 3 ml Accutase vom Flaschenboden abgelöst, in PBS aufgenommen und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt worden waren, wurden sie dreimal für jeweils fünf Minuten bei 4°C und 1.050 rpm zum Waschen zentrifugiert. Anschließend wurde unter dem Mikroskop die Zellzahl ermittelt (s. 2.3.3) und auf $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml Pufferlösung in einem 15 ml-Falconröhrchen eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das dadurch gebildete Zellpellet im Falconröhrchen trockengelegt, indem der flüssige Überstand verworfen und ein evtl. verbliebener Flüssigkeitsrest abpipettiert wurde.

Das trockengelegte Zellpellet wurde im Anschluss mit 250 μl Lösung A (Trypsinpuffer) behandelt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen permeabler zu machen. Danach wurden 200 μl Lösung B (Trypsininhibitor und RNase Puffer) zugegeben, was dazu diente, die Trypsinwirkung zu stoppen und noch vorhandene RNA-Reste zu entfernen. Nach erneuter zehnminütiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde das gesamte Gemisch mit 200 μl Lösung C (Propidiumiodid) angefärbt und noch einmal für zehn Minuten abgedunkelt auf Eis inkubiert. Die so behandelte Zellsuspension wurde durch einen Filter in ein FACS-Röhrchen pipettiert

und innerhalb von drei Stunden die (prozentuale) Aufteilung des Zellzyklus in G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase am FACS-Gerät gemessen.

2.3.11 Proteinisolation

Die Proteinisolation diente der Gewinnung der für den Western Blot notwendigen Proteine. Dafür wurden zunächst die Zellen in den Zellkulturflaschen für 48 h mit Sulforaphan der Konzentrationen 5 µMol und 10 µMol behandelt und im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit gelagert. Hergestellt wurden die Sulforaphankonzentrationen wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Das gesamte Prozedere der Proteingewinnung erfolgte auf Eis. Nachdem die Zellen (Sulforaphan-behandelte und Kontrollzellen), wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, zum entsprechenden Zeitpunkt nach 48 h mittels Accutase aus den Kulturflaschen abgelöst, in Medium aufgenommen und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt worden waren, wurden sie für fünf Minuten bei 4°C und 1.050 rpm zentrifugiert und das gebildete Zellpellet wurde trockengelegt. Zur chemischen Extraktion der Proteine wurde das Pellet je nach Größe mit 100-300 µl Lysis-Puffer (+0,2 M PMSF) (s. Tabelle 6) resuspendiert und das Lysat in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben. Es folgte daraufhin eine Inkubationszeit von zehn Minuten auf Eis, bevor die Zellsuspension zur ergänzenden mechanischen Extraktion der Proteine mehrmals (sechs bis sieben Mal) mit einer Insulinspritze durchmischt wurde, bis das Lysat schaumig war. Erneut war ein Zentrifugationsschritt nötig, dieses Mal für zehn Minuten bei 4°C und 10.000 rpm, um den infolge der Extraktionsschritte entstandenen Zelldetritus als Pellet vom Überstand zu trennen, in dem sich die gelösten Proteine befanden. Der Überstand mit den Proteinen wurde in ein beschriftetes Kryoröhrchen gegeben; 3 µl des Proteinisolats wurden in einem PCR-Röhrchen für die Proteinkonzentrationsbestimmung, die entweder unmittelbar im Anschluss oder zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen konnte, verwahrt. Bis zum Gebrauch beim Western Blot wurden die isolierten Proteine bei -80°C aufbewahrt.

2.3.12 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die photometrische Bradford-Methode angewendet. Im ersten Schritt wurden 3 µl der isolierten Proteinlösung mit

57 µl destilliertem Wasser gemischt, um eine Verdünnung von 1:20 zu erzielen. In Triplikaten wurden nun auf eine 96-Well-Platte aufgetragen: je 10 µl pro Well destilliertes Wasser als Leerwert und je 10 µl pro Well verdünnte Proteinlösung. In jedes Well wurden dann jeweils 300 µl Coomassie-Brillant-Blau pipettiert. Zur Inkubation wurde die 96-Well-Platte anschließend lichtgeschützt für zehn Minuten auf einem Schwenker bei Raumtemperatur gelagert. Am ELISA-Gerät wurde dann bei einer Wellenlänge von 595 nm die optische Dichte der Extinktion gemessen. Das Messergebnis wurde mit einer aus verschiedenen Konzentrationen von Albumin erstellten Eichkurve verrechnet und dadurch die Proteinkonzentration ermittelt.

2.3.13 Western Blot: Gelelektrophorese und Blotting

Das Prozedere des Western Blots setzte sich zusammen aus der Gelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe und dem Blotting, d. h. der Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit anschließender Detektion der Proteine. Für die Auftrennung kamen Glycinele mit 4%igem Sammelgel und 7- 15%igem Trenngel, abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine, zum Einsatz. Für die Zusammensetzung der Gele siehe Tabelle 2 und Tabelle 3. Proteinisolation und -konzentrationsbestimmung erfolgten, wie in Kapitel 2.3.11 und 2.3.12 ausgeführt. Für den Versuch war festgelegt, dass 50 µg Protein pro Geltasche benötigt wurden bzw. die Menge an Proteinlösung, die 50 µg Protein enthielt. Dies war anhand der Ergebnisse der Proteinkonzentrationsbestimmung im Vorfeld auszurechnen.

Zur Herstellung der Gele wurden die Trenngel-Komponenten nach Tabelle 2 zusammengemischt und die zuvor aufgebauten Gelkammern mit 7 ml Trenngel gefüllt. Zur Vermeidung von Luftblasen wurden ca. 200 µl Isobutanol darüber pipettiert. Es dauerte ca. 15 Minuten, bis das Trenngel bei Raumtemperatur polymerisiert war. Das Isobutanol wurde mit destilliertem Wasser ausgespült und ein evtl. verbliebener Flüssigkeitsrest mit Filterpapier aufgesogen. Nachdem daraufhin die Sammelgel-Komponenten entsprechend der Tabelle 3 gemischt worden waren, wurde das Sammelgel über das Trenngel in die Gelkammer gegeben. Sofort im Anschluss, bevor das Sammelgel polymerisieren konnte, wurde ein Gelkamm eingesetzt, um die Taschen,

in die später die Proteine pipettiert werden, zu bilden. Der Gelkamm wurde nach der Polymerisation wieder entfernt. Mit destilliertem Wasser wurden die entstandenen Taschen von evtl. verbliebenen Gelresten gereinigt.

Für die Elektrophorese wurden die bei -80°C gelagerten Proteine auf Eis schonend aufgetaut und entsprechend der vorher errechneten Menge 1:1 mit 2-fach Laemmli-Puffer gemischt, der seinerseits aus 19 Teilen Laemmli-Puffer und einem Teil β -Mercaptoethanol zusammengesetzt war. Zur Denaturierung wurden die Proteine im Thermoblock für fünf Minuten bei 95°C erhitzt. Die Gele wurden in einer Kammer fixiert und diese mit 1x Elphopuffer gefüllt. Anschließend wurden die Geltaschen mit den denaturierten Proteinen beladen: Dazu wurden zunächst in die erste Tasche $5\ \mu\text{l}$ einer Leiter (peqGold Protein Marker IV) pipettiert, bevor nacheinander die übrigen Taschen mit der $50\ \mu\text{g}$ Protein enthaltenden Menge gefüllt wurden. Nun wurde durch Anlegen des Stroms die Elektrophorese gestartet. Im ersten Schritt durchliefen die Proteine das Sammelgel bei einer Spannung von $80\ \text{V}$ für ca. 45 Minuten. Dann erfolgte die Auftrennung der Proteine im Trenngel bei einer Spannung von $120\ \text{V}$ für weitere ca. 1- 1,5 Stunden.

Nach vollständiger Proteinauftrennung wurden die Gele für das im Folgenden anstehende Blotting verwendet, für das es zuerst nötig war, die Nitrozellulosemembranen, das Blotting-Papier und die Schwammtücher in 1x Transferpuffer für mindestens 15 Minuten einzuweichen. Als nächstes wurden die „Blotting-Sandwiche“ in einer Gelkammer zusammengesetzt: Ein Schwammtuch und zwei Blotting-Papiere bildeten den Boden, darauf kam das Gel mit den aufgetrennten Proteinen zu liegen und auf diesem wiederum die Nitrozellulosemembran. Etwaige Luftblasen, die der Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran hinderlich sein könnten, wurden entfernt, indem sie unter sanftem Druck mit einer Pipette „herausgerollt“ wurden. Komplettiert wurde das „Sandwich“ mit zwei weiteren Blotting-Papieren und einem Schwammtuch auf der Membran. Die so fertiggestellten „Blotting-Sandwiche“ wurden, zusammen mit einem Eispack gegen Überhitzung, in eine mit 1x Transferpuffer gefüllte Vorrichtung eingespannt. An diese wurde zum Transfer der Proteine auf die Membranen für ca. eine Stunde eine Spannung von $100\ \text{V}$ angelegt.

Um die Banden der nun auf den Membranen befindlichen Proteine messbar zu machen, folgte im nächsten Schritt eine Immunfärbung mit spezifischen AK. Dafür

wurden die Membranen einmal kurz mit 1x Towbin-Puffer gewaschen und anschließend für eine Stunde auf dem Schwenktisch mit 1 g/10 ml Milchpulver (Blockierlösung) behandelt, um ein unspezifisches Binden der AK zu vermeiden. Die Blockierlösung wurde dann verworfen, die Membranen wurden mit 1x Blotpuffer gewaschen, um restliches Milchpulver abzuspielen. Der Primär-AK wurde entsprechend der Verdünnung in Tabelle 5 angesetzt und nun auf die Membranen gegeben: 10 ml der entsprechenden Primär-AK-Lösung auf die jeweilige Membran. Die nun anstehende Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden dann dreimal für je 15 Minuten mit 1x Blotpuffer auf dem Schwenker gewaschen; unterdessen wurde der Sekundär-AK angesetzt. Je 10 ml des entsprechenden Sekundär-AK mit dem Markerenzym Horseradishperoxidase bzw. Streptactin zur Sichtbarmachung der Leiter wurden auf die jeweilige Membran gegeben und diese wurde für 30 Minuten auf dem Schwenktisch inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen erneut auf dem Schwenker dreimal für je 15 Minuten mit 1x Blotpuffer gewaschen und einmal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser. Zur Detektion der Proteinbanden auf der Membran wurde die Chemolumineszenzlösung (ECL-Lösung) angesetzt: Detektionsreagenz 1 und Detektionsreagenz 2 wurden im Verhältnis 1:1 miteinander gemischt und auf Raumtemperatur erwärmt. Je Membran wurde 1 ml ECL-Lösung gleichmäßig auf die Membran verteilt und diese eine Minute inkubiert. Die behandelte Membran wurde dann in der Entwicklungseinheit Fusion FX7 gemessen. Die Entwicklungs- bzw. Messzeit betrug abhängig vom zu messenden Protein bzw. AK zwischen fünf Sekunden und drei Minuten. Fertig gemessene Membranen wurden zum Feuchthalten bis zur weiteren Verwendung wieder mit Blot-Puffer benetzt.

Nach Messung aller Membranen bzw. Proteine wurde zum Schluss noch eine Ladekontrolle mittels β -Aktin durchgeführt. Dazu wurden pro Membran 10 ml β -Aktin-Lösung auf alle Membranen gegeben, gefolgt von einer Einwirkzeit von einer Stunde auf dem Schwenktisch. Wieder wurden danach die Membranen dreimal für je 15 Minuten mit 1x Blotpuffer gewaschen und einmal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser. Erneut wurden die Membranen wie oben ausgeführt mit ECL-Lösung behandelt, eine Minute inkubiert und abschließend noch einmal mit dem Fusion FX7 gemessen. Mittels GIMP 2-Programm wurde eine Pixelanalyse der Proteinbanden vorgenommen.

2.3.14 CD44-Messung

Bei der CD44-Messung ging es darum, die Expression der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 zu untersuchen. Zu Beginn des Versuchs mussten die jeweiligen AK zur Detektion der CD44-Subtypen mit einem Fluoreszenzfarbstoff für die Messung am FACS-Gerät präpariert werden. Dazu wurden die bei -20°C gelagerten AK aufgetaut und, abhängig von der Menge des AKs (100 µl bzw. 200 µl), mit 10 µl bzw. 20 µl LL-Modifier behandelt. Diese Mischung wurde dann in Gänze in eine Glasfiole mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff gegeben und bei 4°C im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde zum Abschluss der AK-Präparation der LL-Quencher in derselben Menge wie der LL-Modifier zugesetzt.

Wie beim Zellzyklus- und Apoptose-Versuch sind die Zellen in den Zellkulturflaschen für 24 h, 48 h bzw. 72 h mit Sulforaphan der Konzentrationen 5 µMol und 10 µMol behandelt und im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert worden. Die Sulforaphankonzentrationen wurden, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, angesetzt. Der gesamte CD44-Versuch wurde auf Eis durchgeführt. Nach Ablauf des entsprechenden Zeitraums, d. h. nach 24 h, 48 h bzw. 72 h, wurden die Zellen (Sulforaphan-behandelte und Kontrollzellen), wie in Kapitel 2.3.1 ausgeführt, aus den Kulturflaschen abgelöst, in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 4°C und 1.050 rpm zentrifugiert. Das so gebildete Zellpellet wurde in 2 ml FACS-Puffer (PBS+0,5% BSA) aufgenommen, erneut zentrifugiert und das neuerlich entstandene Pellet trockengelegt, indem der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet wurde nun in 4 ml FACS-Puffer resuspendiert, passend zu der Anzahl der zu detektierenden CD44-Subtypen (drei Subtypen) plus ein Isotyp, der als Standard-Kontrolle mitgeführt wurde (insgesamt also vier Proben).

Je 1 ml der so präparierten Zellsuspension wurde auf FACS-Röhrchen verteilt. Es folgte wieder eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 4°C und 1.050 rpm mit anschließender Trockenlegung des Pellets. Die Zellen wurden dann mit 5 µl des entsprechenden, anfangs vorbereiteten AK-Subtyps bzw. dem Isotyp vermischt und im Kühlschrank bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Zwei Mal wurden danach die Zellen mit je 2 ml FACS-Puffer durch Zentrifugation gewaschen, um nicht gebundene AK zu beseitigen. Je nach Größe des Pellets wurde es mit 250-500 µl FACS-Puffer resuspendiert und abschließend am FACS-Gerät gemessen.

2.4 Statistik

Der Mittelwert und die jeweilige +/- – Standardabweichung wurden ermittelt. Um Zufälle auszuschließen, wurden die Versuche mindestens fünf- bis siebenmal wiederholt. Die Überprüfung nach der statistischen Signifikanz wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Anhand dieses Tests kann man zwei unabhängige Gruppen ohne Normalverteilung untersuchen. Da biologische Phänomene nicht der Gauß-Verteilung folgen, ist es ratsam diesen Test zu verwenden. Für die Auswertung der Western Blot-Ergebnisse wurde der t-test angewendet. Ein p-Wert von 0,05 oder niedriger wurde als signifikant anerkannt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Sulforaphan auf Wachstum und Proliferation

3.1.1 MTT-Test

Mit dem MTT-Test wurde das Wachstumsverhalten der Prostatakarzinomzellen über die Zeit unter dem Einfluss von Sulforaphan unterschiedlicher Konzentrationen untersucht; gemessen wurde zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h. Für jede der getesteten Sulforaphankonzentrationen und die Kontrolle wurde der jeweilige 24 h-Wert als 100% definiert, die Zellzahlen der beiden späteren Messzeitpunkte sind dazu in Relation gesetzt (**Abbildungen 2 und 3**).

DU145:

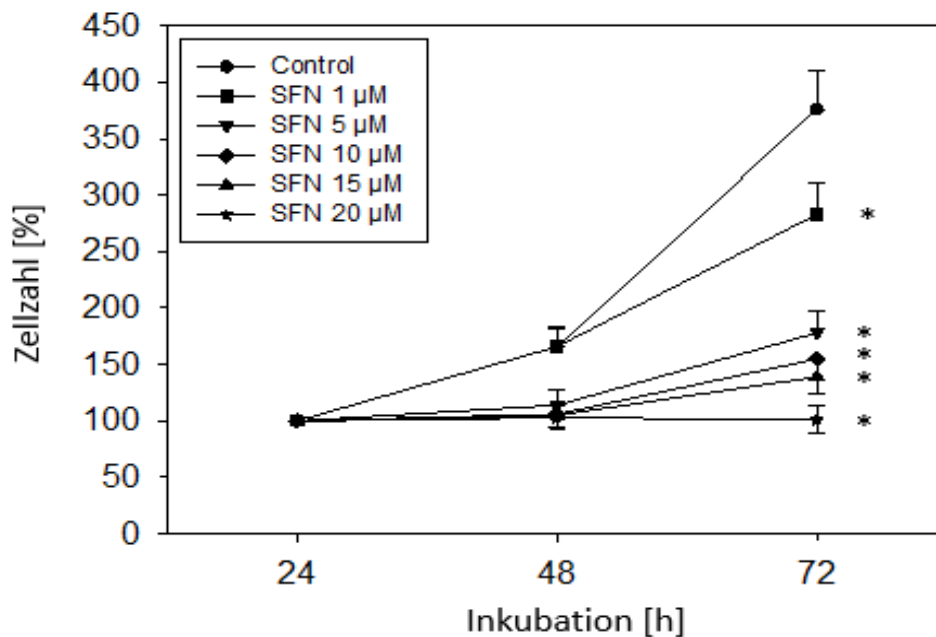


Abbildung 2: Graphische Darstellung des Ergebnisses des MTT-Tests für die DU145-Zelllinie. Die Zellen wurden mit SFN der Konzentrationen 0 µM (Kontrolle/Control) bis 25 µM behandelt (Abbildung nur bis 20 µM). Der 24 h-Wert wurde jeweils als 100% definiert. Die X-Achse gibt die Inkubationszeit in Stunden an, die Y-Achse die Zellzahl in Prozent. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus n=6. * zeigt Signifikanzen an.

Abbildung 2 gibt die MTT-Resultate für die Prostatakarzinomzellreihe DU145 an. Graphisch aufgetragen sind die Daten bis zu einer Sulforaphanbehandlung von 20 µMol, Ergebnisse einer weiteren höheren Dosis von 25 µMol sind zur besseren Übersicht nicht

abgebildet, sie zeigten einen so starken Abfall der Zellzahl, dass diese unter die Nachweisgrenze fiel.

Abgesehen von der 20 μM -Konzentration findet unter allen Bedingungen Zellwachstum statt. Im zweiten Intervall von 48 h auf 72 h ist es stärker ausgeprägt als im ersten Intervall von 24 h auf 48 h. Mit steigender Sulforaphankonzentration fällt das Zellwachstum jedoch zunehmend schwächer aus. Das Wachstum für die Kontrolle und die niedrigste Sulforaphandosis von 1 μM weist über die Zeit einen steilen Verlauf auf; nach 72 h ist die Zellzahl auf knapp 400% bzw. 300% gegenüber dem 24 h-Ausgangswert gesteigert. Für die Sulforaphanbehandlungen von 5 μM und 10 μM verläuft das Wachstum deutlich schwächer, nach 48 h liegt es fast unverändert auf dem 24 h-Ausgangsniveau und steigert sich moderat nach 72 h auf ca. 170% bzw. 150%. Der 20 μM -Wachstumsverlauf bleibt über die gesamte Zeit konstant auf dem Ausgangslevel von 24 h. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen erhebliche Wachstumsunterschiede auftreten.

PC3:

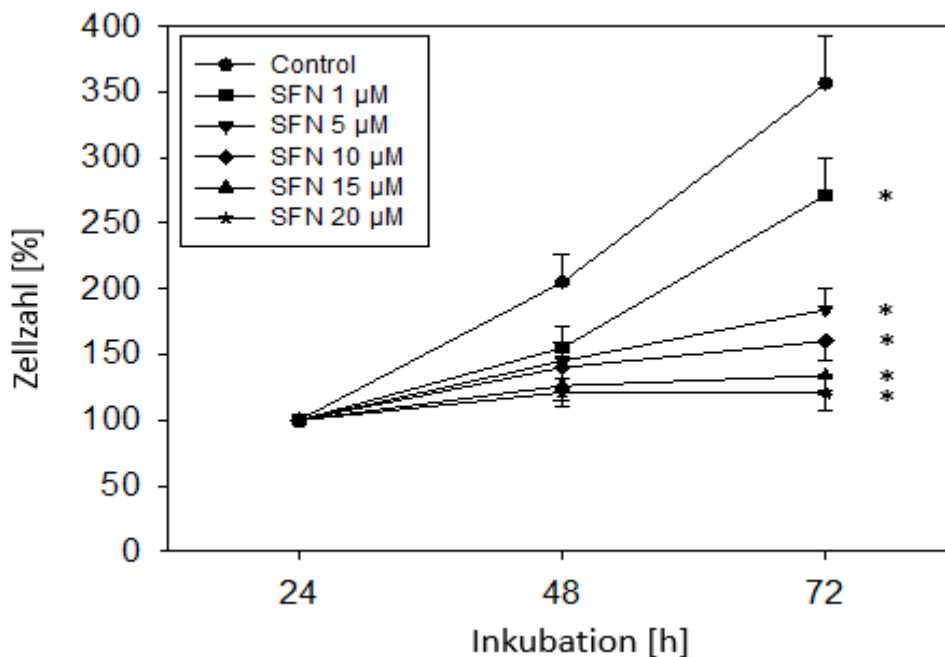


Abbildung 3: Graphische Darstellung des Ergebnisses des MTT-Tests für die PC3-Zelllinie. Die Zellen wurden mit SFN der Konzentrationen 0 μM (Kontrolle/Control) bis 25 μM behandelt (Abbildung nur bis 20 μM). Der 24 h-Wert wurde jeweils als 100% definiert. Die X-Achse gibt die Inkubationszeit in Stunden an, die Y-Achse die Zellzahl in Prozent. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus n=6. * zeigt Signifikanzen an.

Abbildung 3 zeigt die MTT-Ergebnisse der PC3-Zellreihe. Die Modalitäten der Darstellung entsprechen denen der DU145-Graphik, die jeweiligen 24 h-Werte sind als 100% definiert. Wie bei den DU145-Zellen ist auch bei der PC3-Zelllinie unter 25 μMol Sulforaphan die Zellzahl in den nicht mehr messbaren Bereich gesunken, die Werte sind nicht dargestellt.

Das Wachstumsverhalten der PC3-Zellen ähnelt dem der DU145-Zellen, unter allen Bedingungen findet Zellwachstum statt. Mit Ausnahme der 1 μMol -Konzentration ist dieses in der ersten Periode von 24 h auf 48 h stärker ausgeprägt als in der zweiten Periode von 48 h auf 72 h. In Abhängigkeit von der Sulforaphandosis fällt das Zellwachstum zunehmend geringer aus. Die Kontrollzellen zeigen einen annähernd linearen, sehr steilen Anstieg über ca. 200% nach 48 h bis auf ca. 360% nach 72 h. Verläuft das Wachstum für die 1 μMol Sulforaphanbehandlung noch relativ ähnlich wie das der Kontrolle, wenn auch etwas schwächer, so ist das Wachstum für 5-20 μMol Sulforaphan deutlich geringer als das der Kontrolle. Bei 20 μMol Sulforaphan findet fast kein Zellwachstum mehr statt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen erhebliche Wachstumsunterschiede auftreten.

Aus dem MTT-Test haben sich 5 μMol und 10 μMol als ideale Arbeitskonzentrationen ergeben. Nachfolgende Versuche sind daher alle mit den Sulforaphankonzentrationen 5 μMol und 10 μMol und teilweise zusätzlich mit 1 μMol durchgeführt worden.

3.1.2 Apoptose Assay

Für beide Zellreihen, sowohl DU145 als auch PC3, haben sich im Apoptose-Versuch bei Sulforaphankonzentrationen von 5 μMol und 10 μMol keine signifikanten Ergebnisse bei Früh- und Spätapoptose ergeben (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 BrdU Assay

Zur Bestimmung der Zellproliferation der Prostatakarzinomzellen wurde der BrdU Assay verwendet.

DU145:

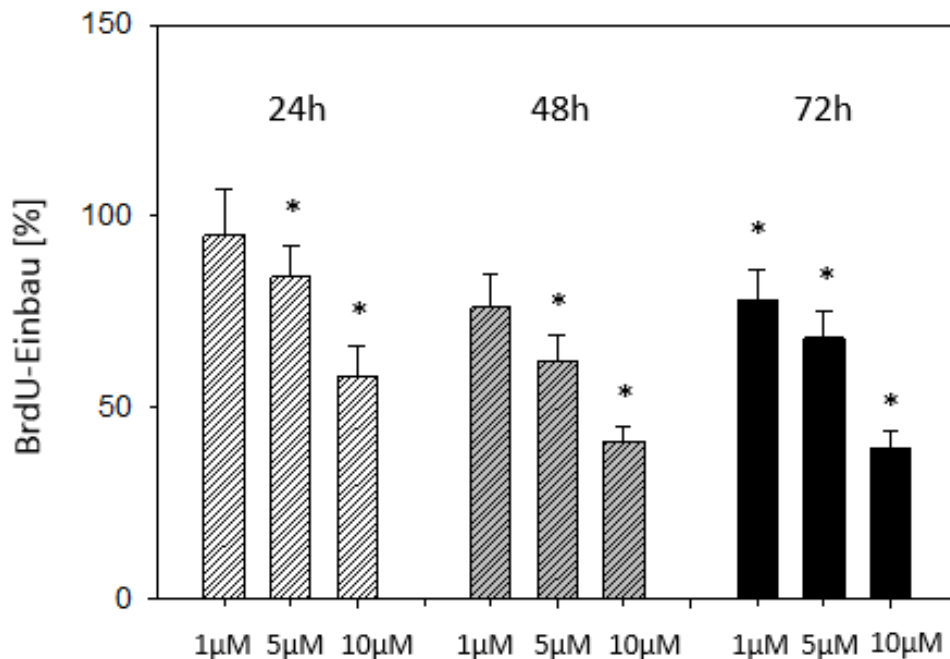


Abbildung 4: Graphische Darstellung des BrdU-Einbaus für die DU145-Zellreihe nach 24 h, 48 h und 72 h. Die Zellen wurden mit 1 µM, 5 µM und 10 µM SFN behandelt, die als 100% definierte Kontrolle ist der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. X-Achse: die Proben mit den unterschiedlichen SFN-Konzentrationen, Y-Achse: BrdU-Einbau in Prozent-Relation zur Kontrolle. Resultate ermittelt als Mittelwert aus n=6. * zeigt Signifikanzen.

Abbildung 4 veranschaulicht die Daten der mit 1 µMol, 5 µMol und 10 µMol Sulforaphan behandelten DU145-Zellen über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h. Als Kontrolle dienten für den jeweiligen Zeitpunkt unbehandelte Zellen mit BrdU, die als 100% gesetzt wurden; der Übersicht halber sind sie hier nicht abgebildet.

Mit steigender Sulforaphankonzentration nimmt der BrdU-Einbau zu jedem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle ab. Die Verminderung des BrdU-Einbaus verläuft nicht linear, sondern fällt innerhalb eines Messzeitpunktes mit steigender Konzentration stärker aus. Konkret bedeutet dies, dass der Abstieg von 5 µMol auf 10 µMol deutlicher ist als von 1 µMol auf 5 µMol.

Nicht nur mit der Sulforaphankonzentration, auch in Abhängigkeit von der Zeit nimmt der BrdU-Einbau ab: Verglichen mit den jeweiligen Daten des 24 h-Blocks sind die Werte bei 48 h und 72 h für jede der jeweils gemessenen Sulforaphankonzentrationen niedriger, wobei sich zwischen 48 h und 72 h keine Änderung des BrdU-Einbaus mehr ergibt.

PC3:

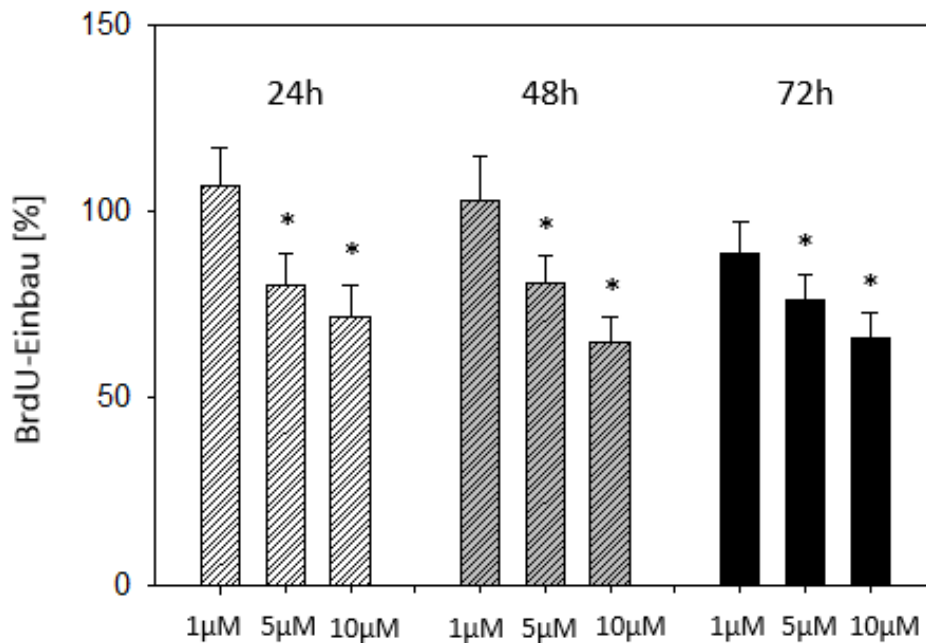


Abbildung 5: Graphische Darstellung des BrdU-Einbaus für die PC3-Zellreihe nach 24 h, 48 h und 72 h. Die Zellen wurden mit 1 µM, 5 µM und 10 µM SFN behandelt, die als 100% definierte Kontrolle ist der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt. X-Achse: die Proben mit den unterschiedlichen SFN-Konzentrationen, Y-Achse: BrdU-Einbau in Prozent-Relation zur unbehandelten Kontrolle. Resultate ermittelt als Mittelwert aus n=6. * zeigt Signifikanzen.

Abbildung 5 zeigt den über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h gemessenen Einbau von BrdU in PC3-Zellen, die mit 1 µMol, 5 µMol und 10 µMol Sulforaphan behandelt worden sind. Unbehandelte PC3-Zellen mit BrdU wurden als 100% definiert und als Kontrolle genutzt, sind aber aus Übersichtsgründen nicht abgebildet.

Innerhalb eines jeden Zeitpunkts ist der BrdU-Einbau in die Zellen mit steigender Sulforaphankonzentration reduziert. Die Reduktion vollzieht sich nicht linear, sondern fällt innerhalb eines Messzeitpunkts mit steigender Konzentration schwächer aus.

Zeitabhängig zeigt sich nur bei der 1 µMol-Konzentration ein leichter Effekt, die 5 µMol- und 10 µMol-Konzentrationen bleiben über die Zeit konstant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei beiden Zellreihen, DU145 und PC3, der konzentrationsabhängige Effekt auf den BrdU-Einbau stärker ist als der zeitabhängige Effekt.

3.1.4 Klonogenes Wachstum

Die Koloniebildungsfähigkeit der Prostatakarzinomzellen DU145 und PC3 unter der Wirkung von Sulforaphan wurde anhand des klonogenen Wachstums ermittelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle, die getesteten Sulforaphankonzentrationen waren 1 μ Mol, 5 μ Mol und 10 μ Mol.

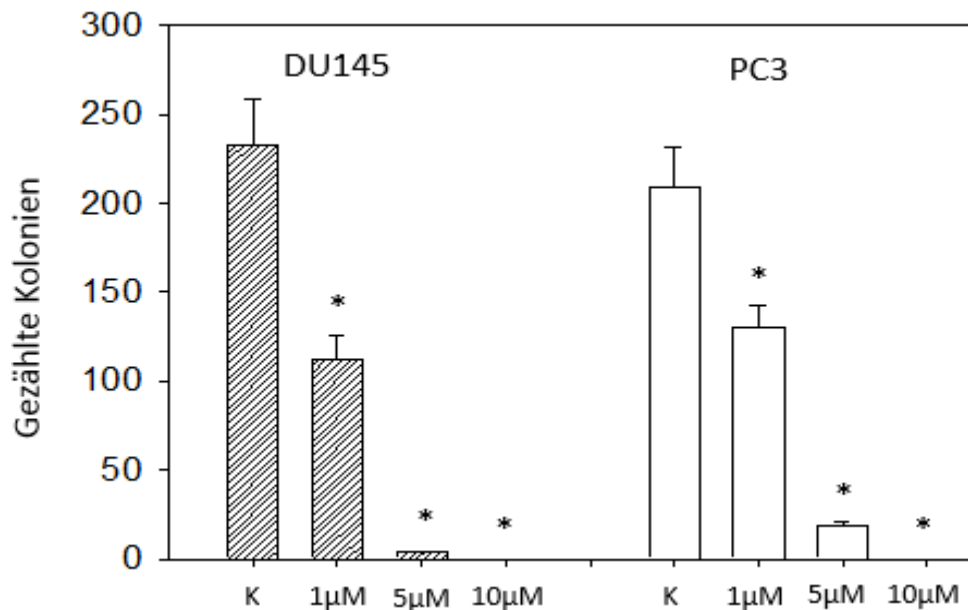


Abbildung 6: Graphische Darstellung der gezählten Kolonien der Zelllinien DU145 (links, schraffiert) und PC3 (rechts, weiß) in Abhängigkeit von der SFN-Konzentration. Die Kontrollzellen K blieben unbehandelt, die übrigen Proben wurden mit 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M SFN angesetzt. Auf der X-Achse sind die Proben mit den unterschiedlichen SFN-Konzentrationen aufgetragen, auf der Y-Achse die gezählten Zellkolonien. Abbildung repräsentativ aus n=3. * steht für Signifikanzen.

DU145:

Wie aus **Abbildung 6** hervorgeht, nimmt die Anzahl der Zellkolonien mit steigender Sulforaphandosis deutlich ab. Bereits bei 1 μ Mol Sulforaphan zeigen sich für die Zelllinie DU145 verringerte Werte gegenüber der Kontrolle, die Anzahl der Zellkolonien ist um über 50% reduziert. Bei einer Dosis von 10 μ Mol sind gar keine Kolonien mehr vorhanden.

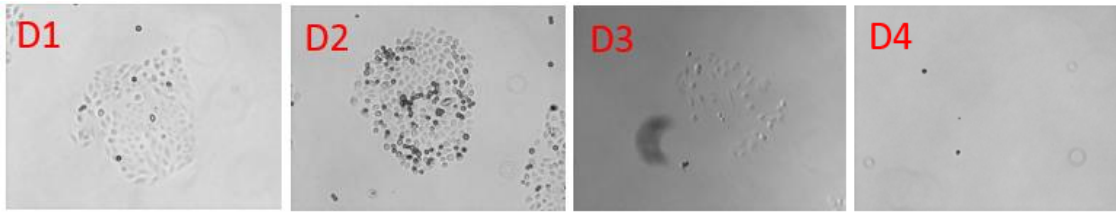


Abbildung 7: Abbildung der DU145-Zellkolonien. Zu sehen ist jeweils eine repräsentative Zellkolonie der Kontrolle (D1) sowie der SFN-Konzentrationen 1 μ M (D2), 5 μ M (D3) und 10 μ M (D4).

PC3:

Bei der PC3-Zelllinie ist dieselbe Tendenz wie bei der DU145-Zellreihe erkennbar (**Abbildung 6**). In Abhängigkeit von der Sulforaphankonzentration nimmt die Zahl der Kolonien von ca. 210 bei der Kontrolle bis auf null bei einer Sulforaphandosis von 10 μ Mol ab.

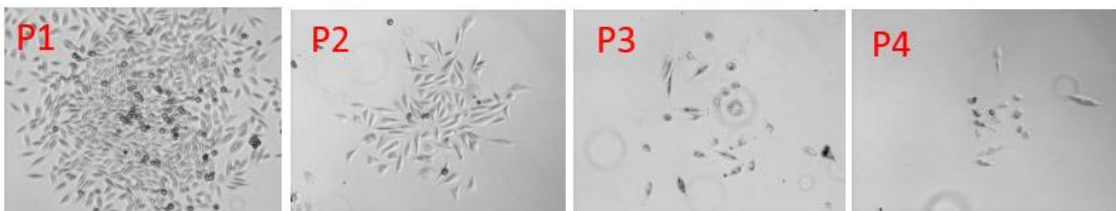


Abbildung 8: Abbildung der PC3-Zellkolonien. Zu sehen ist jeweils eine repräsentative Zellkolonie der Kontrolle (P1) sowie der SFN-Konzentrationen 1 μ M (P2), 5 μ M (P3) und 10 μ M (P4).

3.2 Einfluss Sulforaphans auf Zellzyklus und Zellzyklus-relevante Proteine

3.2.1 Zellzyklus

Der Einfluss von Sulforaphan der Konzentrationen 5 μ Mol und 10 μ Mol auf die Phasen des Zellzyklus der Prostatakarzinomzellen DU145 und PC3 über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h wurde durch den Zellzyklus Assay bestimmt. Unbehandelte Zellen stellten jeweils die Kontrolle dar (**Abbildungen 9 bis 14**).

DU145:

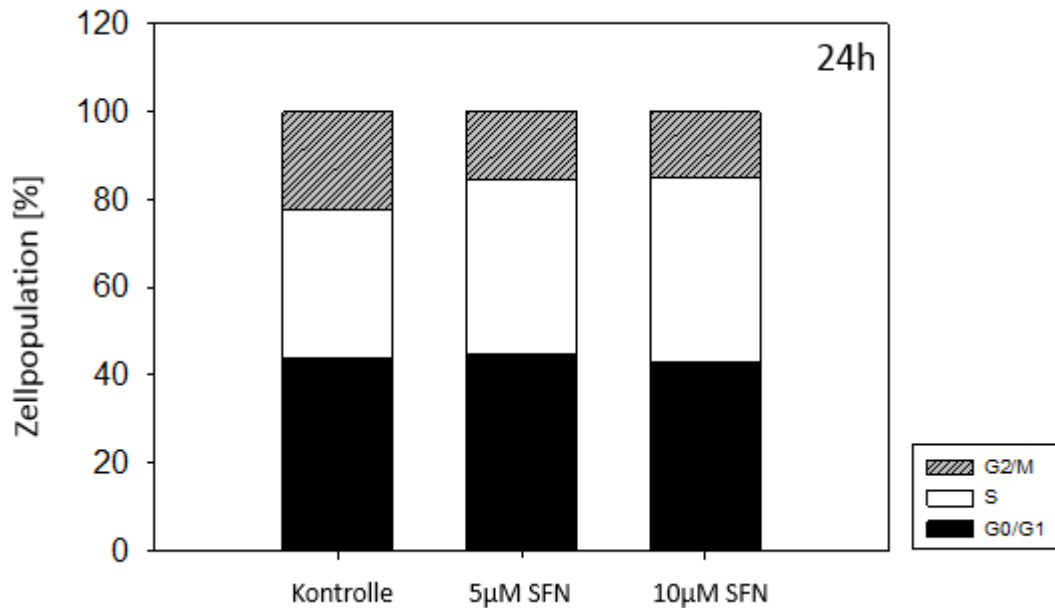


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie DU145 durch Behandlung mit 5 µM und 10 µM SFN; Messzeitpunkt 24 h. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Gemessen wurden die Verschiebungen der G0/G1-, S- und G2/M-Phase. Die X-Achse zeigt die Proben mit den unterschiedlichen Behandlungskonzentrationen und die Y-Achse den Anteil an Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase in Prozent. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6.

Abbildung 9 zeigt die Resultate für den Messzeitpunkt 24 h. Bei der Kontrolle macht die G0/G1-Phase mit ca. 45% den größten Anteil aus, etwa 35% der Zellen befinden sich in der S-Phase und ca. 20% in der G2/M-Phase. Im Vergleich dazu entwickeln sich bei beiden Behandlungen gleichermaßen nur leichte Verschiebungen der Phasenanteile in die S-Phase bei gleichzeitiger Abnahme der G2/M-Phase. Gänzlich unverändert bleibt die G0/G1-Phase. Beim Vergleich der mit 5 µMol und 10 µMol Sulforaphan behandelten Zellen untereinander zeigen sich nahezu keine Veränderungen zwischen den Konzentrationen.

Insgesamt treten zu diesem frühesten Messzeitpunkt nur geringfügige Unterschiede zwischen der Kontrolle und den behandelten Zellen auf.

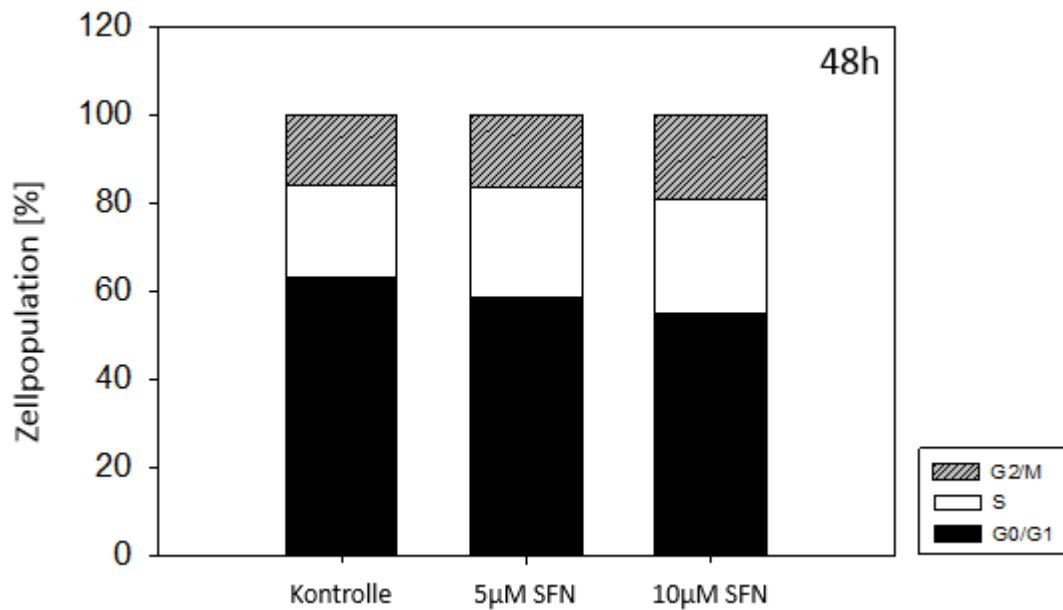


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie DU145 durch Behandlung mit 5 μ M und 10 μ M SFN; Messzeitpunkt 48 h. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Gemessen wurden die Verschiebungen der G0/G1-, S- und G2/M-Phase. Die X-Achse zeigt die Proben mit den unterschiedlichen Behandlungskonzentrationen und die Y-Achse den Anteil an Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase in Prozent. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6.

Nach 48 h kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Verringerung der G0/G1-Phase. Durch die Behandlung mit Sulforaphan vergrößert sich der Anteil der Zellen in der S-Phase gemessen an der Kontrolle, die Höhe der Sulforaphankonzentration hat darauf allerdings keinen Einfluss. Bleibt die G2/M-Phase unter der Einwirkung von 5 μ Mol Sulforaphan unverändert gegenüber der Kontrolle, entwickelt sich unter 10 μ Mol eine leichte Zunahme der G2/M-Phase (**Abbildung 10**).

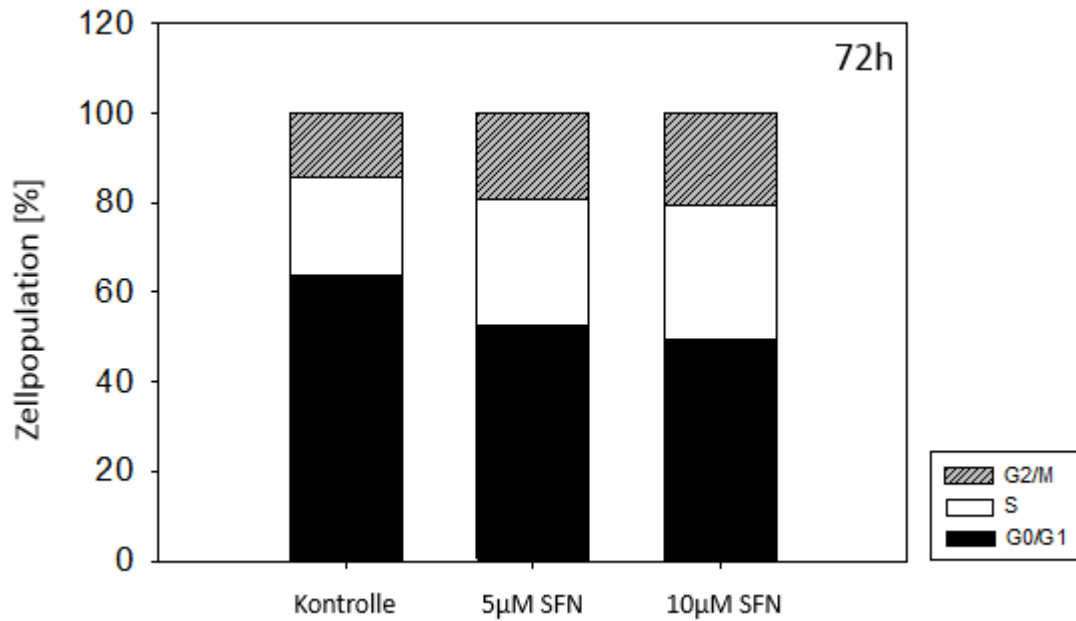


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie DU145 durch Behandlung mit 5 µM und 10 µM SFN; Messzeitpunkt 72 h. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Gemessen wurden die Verschiebungen der G0/G1-, S- und G2/M-Phase. Die X-Achse zeigt die Proben mit den unterschiedlichen Behandlungskonzentrationen und die Y-Achse den Anteil an Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase in Prozent. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6.

Bei der 72 h-Messung, dargestellt in **Abbildung 11**, sinkt der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase konzentrationsabhängig. Die S-Phase vergrößert sich durch die Behandlung mit Sulforaphan, die Höhe der Sulforaphankonzentration hat darauf allerdings keinen Einfluss. Es kommt zu einer konzentrationsabhängigen Verschiebung in die G2/M-Phase, wobei der Unterschied zwischen 5 µMol und 10 µMol sehr gering ausgeprägt ist.

PC3:

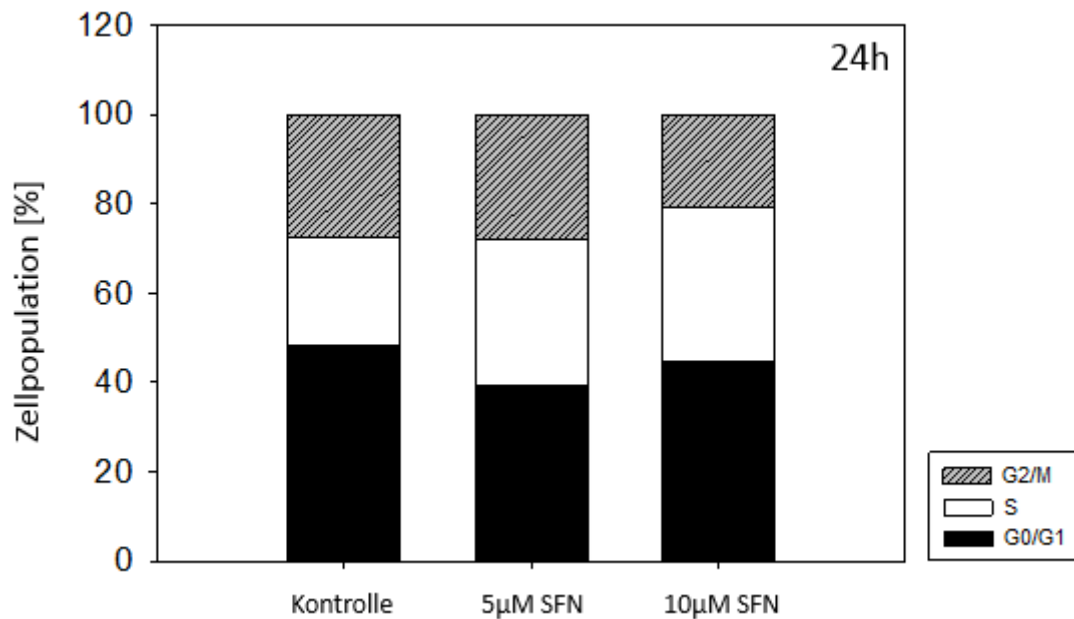


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie PC3 durch Behandlung mit 5 µM und 10 µM SFN; Messzeitpunkt 24 h. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Gemessen wurden die Verschiebungen der G0/G1-, S- und G2/M-Phase. Die X-Achse zeigt die Proben mit den unterschiedlichen Behandlungskonzentrationen und die Y-Achse den Anteil an Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase in Prozent. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6.

Nach 24 h, dem frühesten Messzeitpunkt, ergibt sich noch ein relativ inhomogenes Bild der Phasenaufteilung (**Abbildung 12**), eine Tendenz im Hinblick auf Phasenverschiebungen der behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen lässt sich noch nicht ablesen. Sinkt bei 5 µMol Sulforaphan die G0/G1-Phase um ca. 10%-Punkte verglichen mit der Kontrolle, steigt die G0/G1-Phase bei 10 µMol wieder etwas an, ohne aber das Ausgangsniveau der Kontrolle zu erreichen. Die S-Phase erhöht sich durch die Behandlung mit Sulforaphan konzentrationsunabhängig gegenüber der Kontrolle um ca. 10%-Punkte. Die G2/M-Phase bleibt bei 5 µMol verglichen mit der Kontrolle konstant und nimmt bei 10 µMol um ca. 5%-Punkte ab.

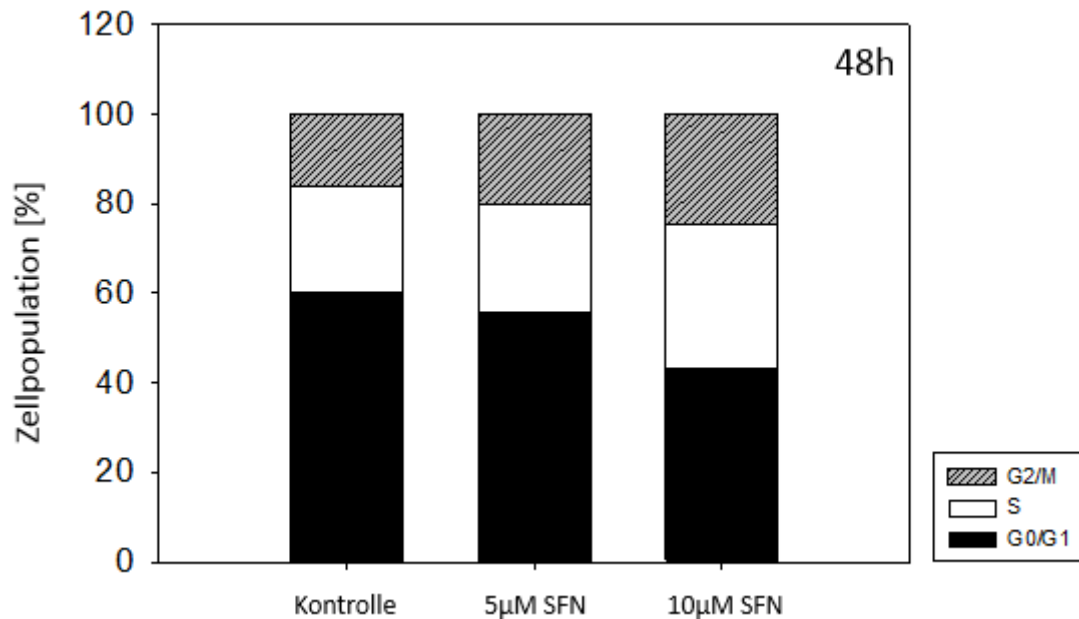


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie PC3 durch Behandlung mit 5 µM und 10 µM SFN; Messzeitpunkt 48 h. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Gemessen wurden die Verschiebungen der G0/G1-, S- und G2/M-Phase. Die X-Achse zeigt die Proben mit den unterschiedlichen Behandlungskonzentrationen und die Y-Achse den Anteil an Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase in Prozent. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6.

Bei der Messung nach 48 h zeigt sich, wie in **Abbildung 13** dargestellt, eine Tendenz in den Verschiebungen der Phasenanteile des Zellzyklus: Mit steigender Sulforaphandosis kommt es zu einer Abnahme der G0/G1-Phase, das geht einher mit einer Zunahme der S- und der G2/M-Phase. Sind diese Veränderungen bei 5 µMol noch leicht ausgeprägt, fallen sie bei 10 µMol deutlicher aus: So reduziert sich der Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase bei der 10 µMol-Sulforaphankonzentration im Vergleich zur Kontrolle um rund 17%-Punkte, die S-Phase nimmt um ca. 11%-Punkte und die G2/M-Phase um ca. 6%-Punkte zu.

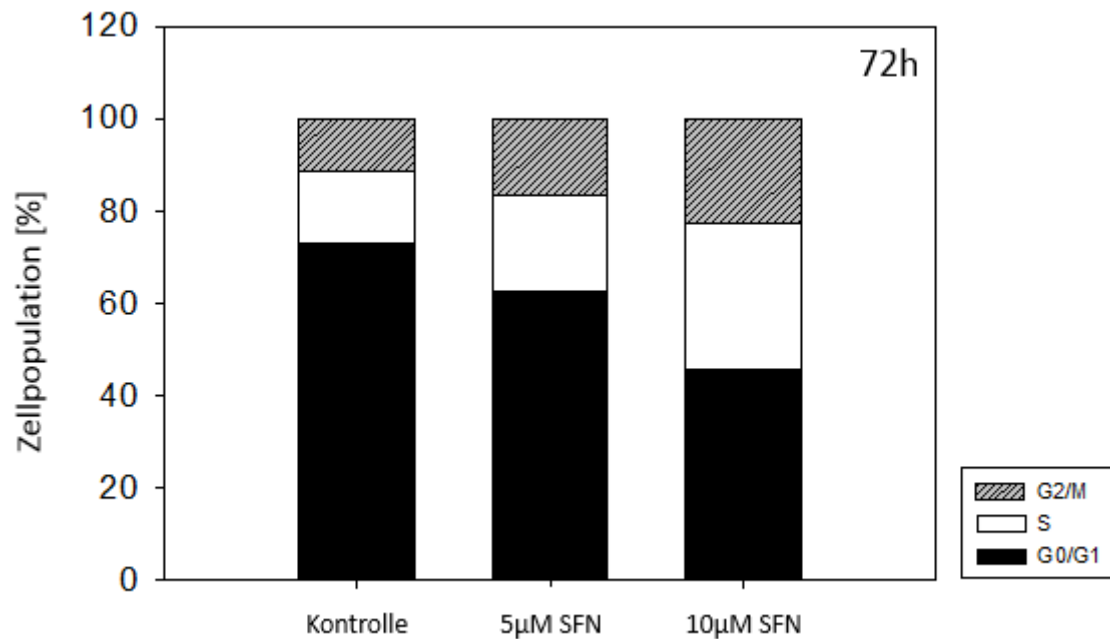


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Verschiebungen der Anteile der Zellzyklusphasen in der Zelllinie PC3 durch Behandlung mit 5 µM und 10 µM SFN; Messzeitpunkt 72 h. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Gemessen wurden die Verschiebungen der G0/G1-, S- und G2/M-Phase. Die X-Achse zeigt die Proben mit den unterschiedlichen Behandlungskonzentrationen und die Y-Achse den Anteil an Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase in Prozent. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6.

In **Abbildung 14** sind die Ergebnisse der 72 h-Messung dargestellt. Konzentrationsabhängig sinkt die G0/G1-Phase ab, verbunden mit einem Anstieg der S-Phase und der G2/M-Phase. Bereits bei der Konzentration von 5 µMol Sulforaphan ist dieser Verlauf deutlich zu erkennen, bei 10 µMol zeigt er sich noch ausgeprägter: Die G0/G1-Phase sinkt um ca. 12%-Punkte unter 5 µMol Sulforaphan und um weitere 18%-Punkte unter 10 µMol Sulforaphan. Die S-Phase steigt unter 5 µMol um ungefähr 5%-Punkte und um weitere 13%-Punkte unter 10 µMol Sulforaphan. Die G2/M-Phase nimmt unter 5 µMol Sulforaphan um ca. 7%-Punkte und unter 10 µMol um weitere 5%-Punkte zu.

Die Tendenz in den Phasenverschiebungen, die nach 48 h bereits erkennbar war, hat sich somit in noch deutlicherer Ausprägung bei der 72 h-Messung fortgesetzt.

3.2.2 Western Blot-Analyse Zellzyklus-regulierender Proteine

Verschiebungen und Veränderungen in den Phasenanteilen des Zellzyklus durch die Behandlung der Prostatakarzinomzellen mit Sulforaphan konnten im Zellzyklus Assay festgestellt werden. Der Western Blot diente nun dazu, durch eine Analyse der Zellzyklus-regulierenden Proteine diese Veränderungen auf molekularer Ebene abzubilden (**Abbildung 15**).

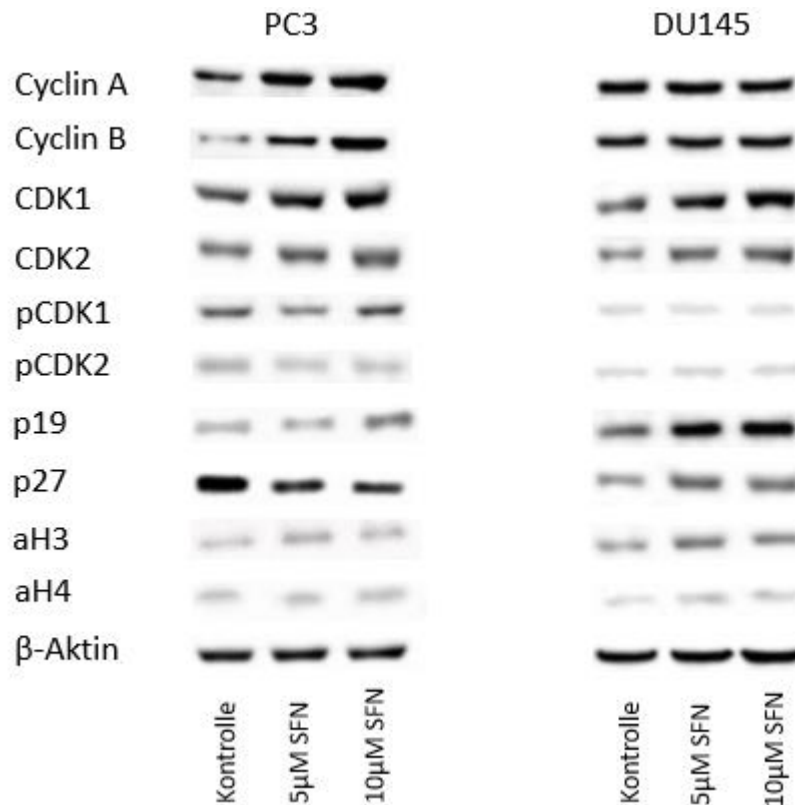


Abbildung 15: Darstellung der Western Blot-Analyse der Zellzyklusproteine. Abgebildet ist das Expressionslevel der Proteine der Kontrollzellen sowie der mit 5 μ M und 10 μ M SFN behandelten Zellen für die DU145- und PC3-Zellreihe nach 48 h. β -Aktin, einmal repräsentativ dargestellt, fungierte als Ladekontrolle, für jede Probe wurden 50 μ g Protein verwendet. Alle Banden repräsentativ aus n=3.

Die Zellen, aus denen die Proteine gewonnen wurden, sind über einen Zeitraum von 48 h mit Sulforaphan der Konzentrationen 5 μ Mol und 10 μ Mol behandelt worden. Um zu gewährleisten, dass Bandenunterschiede und -veränderungen nicht durch Beladungsfehler zustande gekommen sind, sondern die erforderliche Proteinmenge von 50 μ g pro Geltasche verwendet worden ist, wurde bei jedem Western Blot-Versuch eine β -Aktin-Probe gemessen; für jede Zellreihe ist eine repräsentative Probe abgebildet. Daneben ist eine Pixelanalyse der Proteine vorgenommen worden, um die

Veränderungen im Expressionslevel der Proteine durch Sulforaphan zu verdeutlichen (**Abbildungen 16 und 17**).

Cyclin A und B sind bei der PC3-Zelllinie durch die Sulforaphanbehandlungen verglichen mit der Kontrolle im Expressionslevel deutlich gestiegen. Bei den DU145-Zellen entwickelt sich infolge der Sulforaphanbehandlung nur ein leichter Anstieg der Proteinexpression von Cyclin A und B.

CDK 1 und 2 zeigen bei beiden Zelllinien konzentrationsabhängig eine verstärkte Expression gegenüber der Kontrolle. Das Expressionslevel von CDK 2 ist in beiden Zellreihen insgesamt schwächer ausgeprägt als bei CDK 1.

Das Expressionsniveau der phosphorylierten Varianten pCDK 1 und pCDK 2 ist in beiden Zelllinien schwächer ausgebildet als das der unphosphorylierten, insbesondere bei den DU145-Zellen. Dort verringert sich das Expressionslevel von pCDK 1 geringfügig unter den Sulforaphanbehandlungen gegenüber der Kontrolle, während pCDK 2 einen leichten Anstieg aufweist. Auch in der PC3-Zelllinie ergeben sich Änderungen in der Ausprägung der pCDKs unter den Sulforaphanbehandlungen: Sowohl pCDK 1 als auch pCDK 2 verzeichnen mit Zunahme der Sulforaphankonzentration eine leichte Abnahme des Expressionsniveaus.

Die DU145-Zellen reagieren auf die Behandlung mit Sulforaphan mit einem klaren Anstieg des Expressionslevels von p27 und noch deutlicher von p19. Ebenso verhält es sich bei p19 auch in der PC3-Zellreihe, wenn auch das Expressionsniveau insgesamt etwas niedriger ist als bei den DU145-Zellen. Durch die Zunahme der Sulforaphandosis, der die Zellen ausgesetzt waren, wird p27 in den PC3-Zellen erkennbar nach unten reguliert.

In beiden Zellreihen sind die acetylierten Histone aH3 und aH4 relativ schwach exprimiert. Insbesondere bei den DU145-Zellen wurde, verglichen mit der Kontrolle, eine stark ausgeprägte Hochregulation der Histone in ihrem acetylierten Zustand durch die Behandlungen mit Sulforaphan gemessen. Bei den PC3-Zellen ist der Expressionsanstieg von aH3 vergleichbar mit dem der DU145-Zelllinie, der Anstieg der Proteinexpression von aH4 fällt demgegenüber etwas geringer aus.

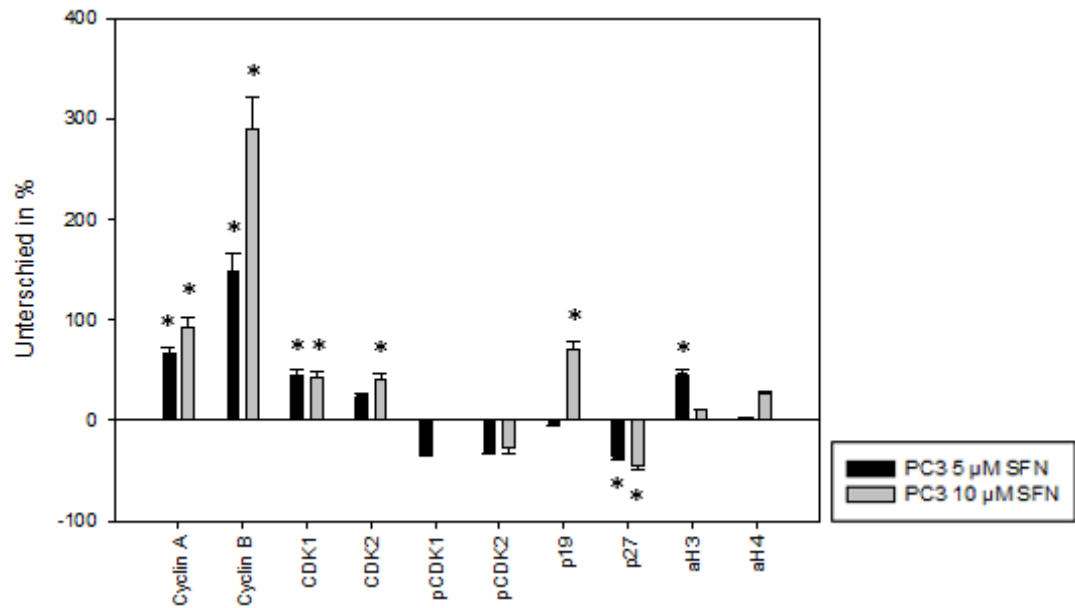


Abbildung 16: Pixelanalyse der Zellzyklusproteine der Western Blot-Analyse für die PC3-Zelllinie. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung im Expressionslevel der Proteine in Abhängigkeit von der SFN-Konzentration. Die X-Achse gibt die jeweiligen Proteine an, auf der Y-Achse ist der Unterschied des Expressionslevels in Prozent angegeben.

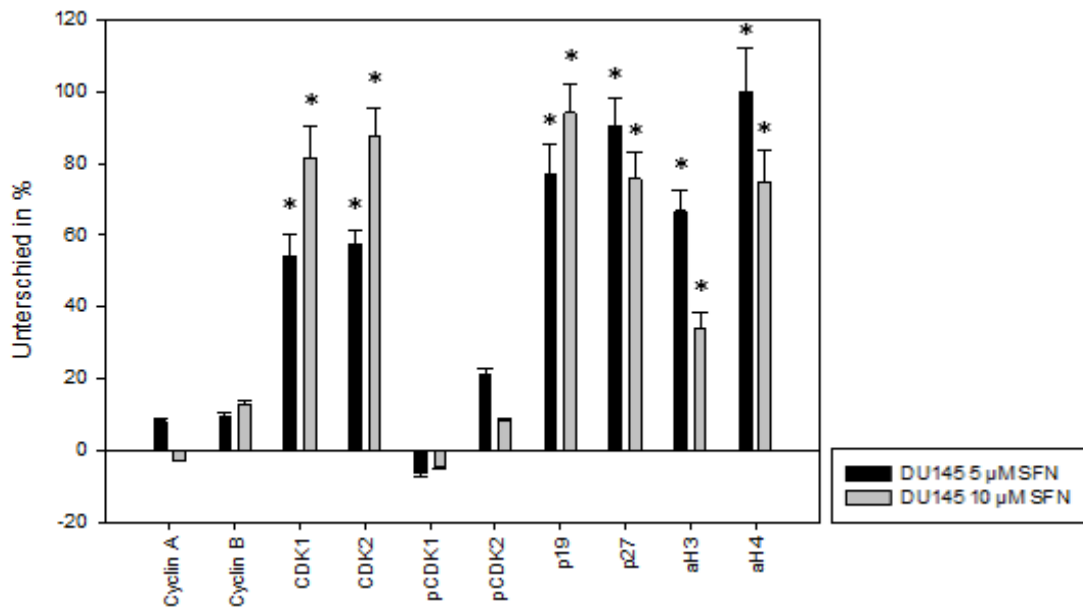


Abbildung 17: Pixelanalyse der Zellzyklusproteine der Western Blot-Analyse für die DU145-Zelllinie. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung im Expressionslevel der Proteine in Abhängigkeit von der SFN-Konzentration. Die X-Achse gibt die jeweiligen Proteine an, auf der Y-Achse ist der Unterschied des Expressionslevels in Prozent angegeben.

3.3 Einfluss von Sulforaphan auf den CD44-Rezeptor

3.3.1 FACS-Analyse der CD44-Oberflächenexpression

Als Oberflächenrezeptor ist CD44 in eine Reihe von Zellfunktionen involviert, darunter Zelldifferenzierung, -migration und -invasion sowie Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion. Mittels FACS-Analyse wurde der Einfluss von Sulforaphan der Konzentrationen 5 μMol und 10 μMol auf das Expressionsprofil der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 über einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h untersucht und mit dem der Kontrollzellen verglichen. Die Kontrolle ist jeweils als 100% definiert, sie ist aus Übersichtsgründen nicht abgebildet. Die Resultate sind in den **Abbildungen 19, 20 und 21** sowie in den **Abbildungen 23, 24 und 25** wiedergegeben.

Zur Veranschaulichung des Ausgangslevels der Rezeptorexpression der unbehandelten Kontrollzellen der jeweiligen Zelllinie wurden Overlay-Bilder erstellt (**Abbildungen 18 und 22**): Zu sehen sind die Basiswerte der Kontrolle und die unspezifische Hintergrundfluoreszenz des Isotyps.

DU145:

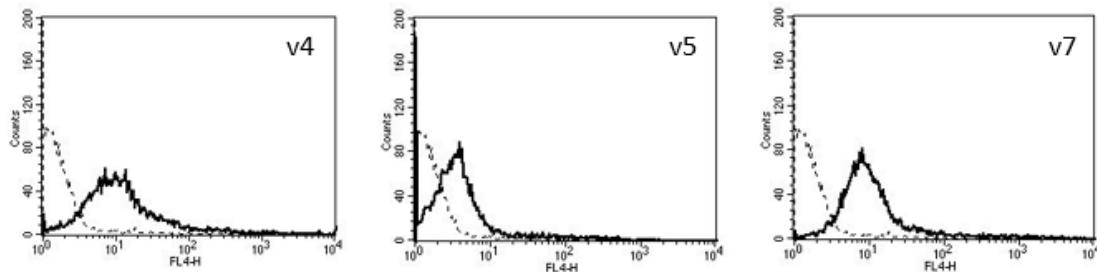


Abbildung 18: Overlay-Bilder der Rezeptorexpression der CD44-Subtypen v4, v5, v7 für die Zelllinie DU145; Messung erfolgte am Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Kontrolle als dicke, durchgezogene Linie und der Isotyp IgG1 als dünne, gestrichelte Linie. Auf der X-Achse ist die relative logarithmische Verteilung der relativen Fluoreszenzintensität von v4, v5 und v7 aufgetragen; die Y-Achse zeigt die Anzahl an Zellen. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen. Abbildung repräsentativ aus n=6.

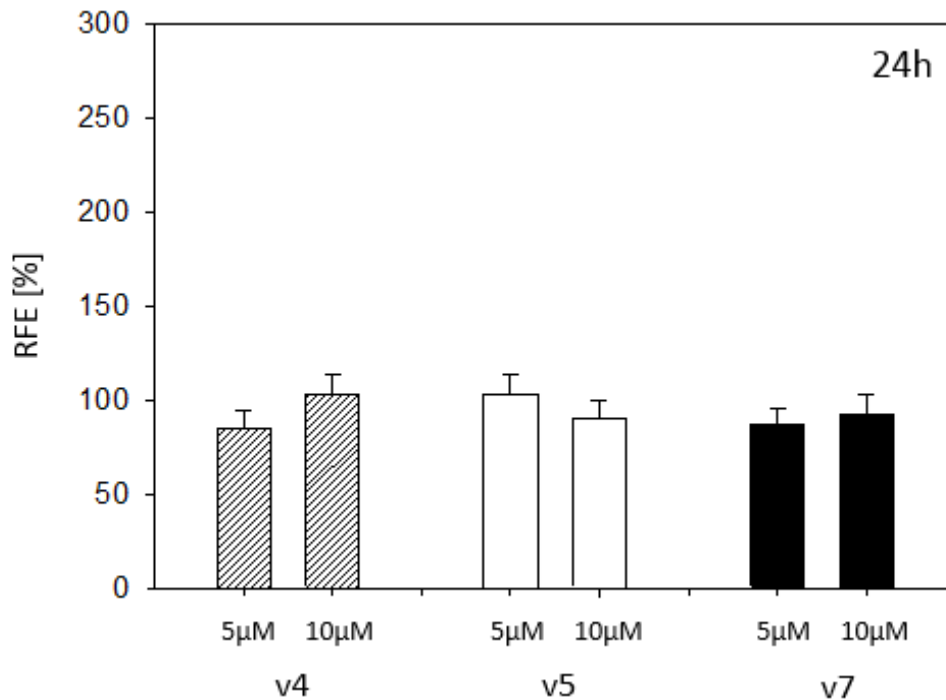


Abbildung 19: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe DU145 unter 5 μM und 10 μM SFN nach 24 h. Die nicht abgebildete Kontrolle ist als 100% gesetzt, die beiden Behandlungen sind im Verhältnis dazu angegeben. Die X-Achse gibt die Proben mit den SFN-Konzentrationen an, die Y-Achse die relative Fluoreszenzeinheit RFE in Prozent. Unterhalb der X-Achse ist der jeweilige CD44-Subtyp angegeben. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6. * markiert Signifikanzen.

Alle drei Subtypen sind in ähnlich starker Ausprägung auf den DU145-Zellen ausgebildet (**Abbildung 19**). Beim v4-Subtyp steigt nach 24 h die Oberflächenexpression mit steigender Sulforaphandosis um ca. 20% an. Bei v5 verhält es sich genau umgekehrt: Eine steigende Sulforaphandosis führt zu einer Verringerung von v5 um ca. 15%. Kaum beeinflusst durch eine Erhöhung der Sulforaphandosis zeigt sich der v7-Subtyp, lediglich ein sehr leichter Anstieg bei 10 μMol ist gegenüber 5 μMol Sulforaphan zu beobachten. Insgesamt sind bei allen Subtypen die Veränderungen nach 24 h nur gering ausgeprägt.

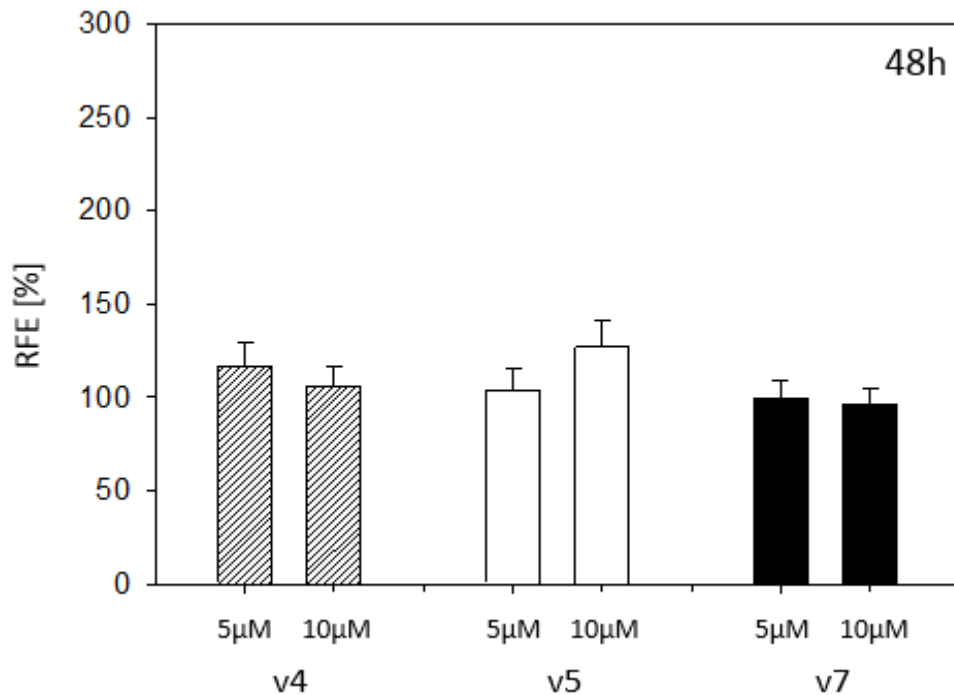


Abbildung 20: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe DU145 unter 5 μM und 10 μM SFN nach 48 h. Die nicht abgebildete Kontrolle ist als 100% gesetzt, die beiden Behandlungen sind im Verhältnis dazu angegeben. Die X-Achse gibt die Proben mit den SFN-Konzentrationen an, die Y-Achse die relative Fluoreszenzeinheit RFE in Prozent. Unterhalb der X-Achse ist der jeweilige CD44-Subtyp angegeben. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6. * markiert Signifikanzen.

Nach 48 h befinden sich alle drei Subtypen im Vergleich zur 24 h-Messung auf einem im Durchschnitt etwas höheren Expressionslevel. Anders als nach 24 h geht nach 48 h die Expression von v4 auf der Zelloberfläche bei der höheren Sulforaphankonzentration von 10 μMol um ca. 10% zurück im Vergleich zur niedrigeren Konzentration von 5 μMol. v5 verzeichnet mit steigender Sulforaphandosis einen Anstieg um gut 20%. Ähnlich wie nach 24 h ändert sich am Expressionsniveau von v7 durch die Sulforaphanbehandlungen kaum etwas. (**Abbildung 20**). Auch nach 48 h sind die Veränderungen im Expressionslevel aller Subtypen relativ schwach ausgeprägt.

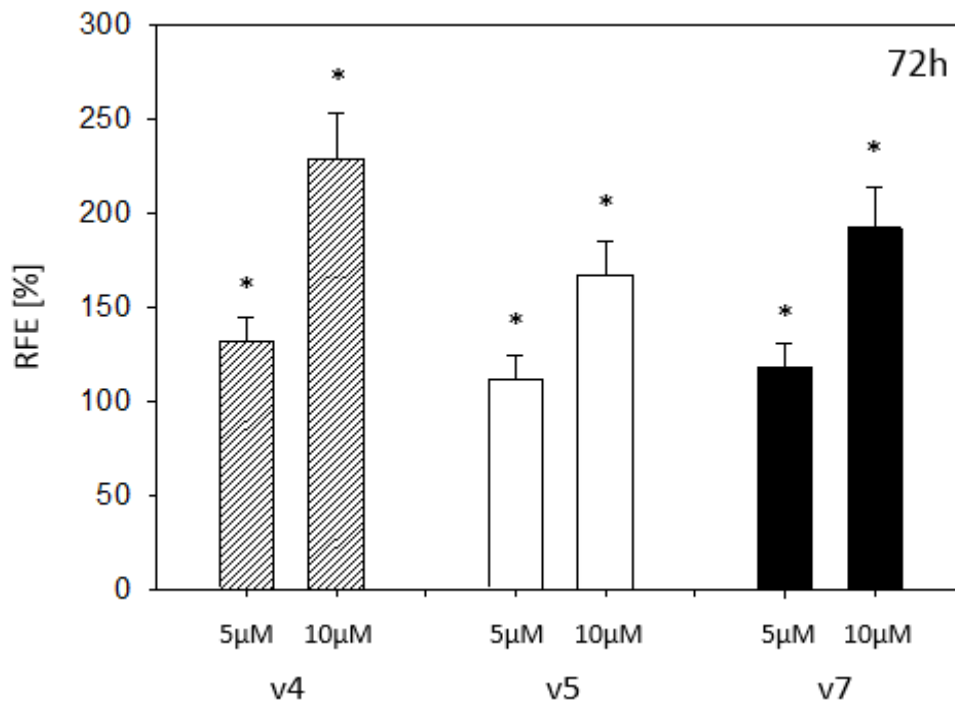


Abbildung 21: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe DU145 unter 5 µM und 10 µM SFN nach 72 h. Die nicht abgebildete Kontrolle ist als 100% gesetzt, die beiden Behandlungen sind im Verhältnis dazu angegeben. Die X-Achse gibt die Proben mit den SFN-Konzentrationen an, die Y-Achse die relative Fluoreszenzeinheit RFE in Prozent. Unterhalb der X-Achse ist der jeweilige CD44-Subtyp angegeben. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6. * markiert Signifikanzen.

Nach 72 h weisen die CD44-Subtypen verglichen mit den vorangegangenen Messzeitpunkten ihr höchstes Expressionslevel auf, wie aus **Abbildung 21** hervorgeht. Alle drei Subtypen zeigen dieselbe Tendenz: Mit steigender Sulforaphankonzentration kommt es zu einem deutlichen Anstieg des Expressionslevels. v4 erhöht sich am ausgeprägtesten um gut 70%, v5 um ca. 50% und v7 um über 60%.

Zeigen sich bei den früheren Messzeitpunkten noch keine einheitlichen Änderungen des Expressionslevels, ist nach 72 h die klare, statistisch signifikante Tendenz zu erkennen, dass mit steigender Sulforaphankonzentration das Expressionslevel aller gemessenen Subtypen ansteigt.

PC3:

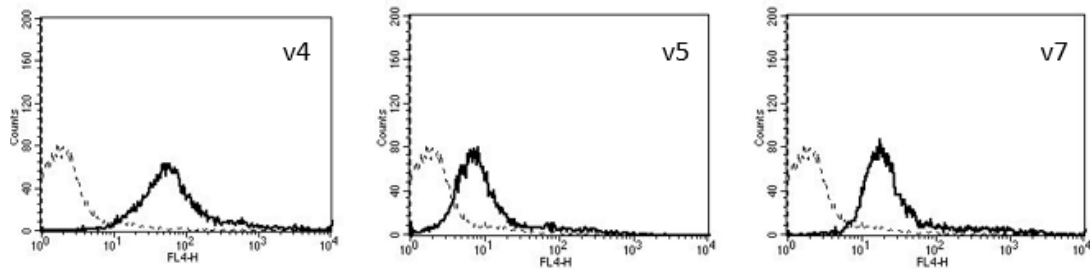


Abbildung 22: Overlay-Bilder der Rezeptorexpression der CD44-Subtypen v4, v5, v7 für die Zelllinie PC3; Messung erfolgte am Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Kontrolle als dicke, durchgezogene Linie und der Isotyp IgG1 als dünne, gestrichelte Linie. Auf der X-Achse ist die relative logarithmische Verteilung der relativen Fluoreszenzintensität von v4, v5 und v7 aufgetragen; die Y-Achse zeigt die Anzahl an Zellen. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen. Abbildung repräsentativ aus n=6.

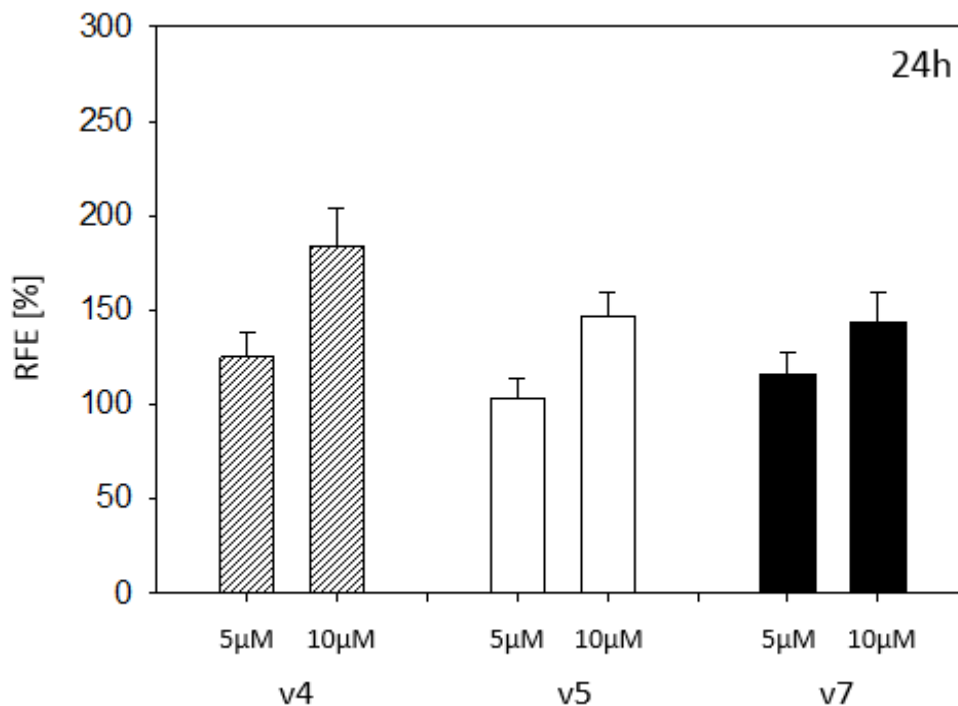


Abbildung 23: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe PC3 unter 5 μM und 10 μM SFN nach 24 h. Die nicht abgebildete Kontrolle ist als 100% gesetzt, die beiden Behandlungen sind im Verhältnis dazu angegeben. Die X-Achse gibt die Proben mit den SFN-Konzentrationen an, die Y-Achse die relative Fluoreszenzeinheit RFE in Prozent. Unterhalb der X-Achse ist der jeweilige CD44-Subtyp angegeben. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6. * markiert Signifikanzen.

Auf der Zelloberfläche der Zelllinie PC3 sind die drei Subtypen v4, v5 und v7 ausgeprägt. Wie **Abbildung 23** für den 24 h-Messzeitpunkt zeigt, beeinflusst die Höhe der Sulforaphankonzentration das Expressionsniveau der CD44-Subtypen: je höher die

Konzentration, desto stärker die Präsenz der Rezeptoren. Das Expressionslevel von v4 und v5 erhöht sich um jeweils ca. 50%, das von v7 um ca. 30%.

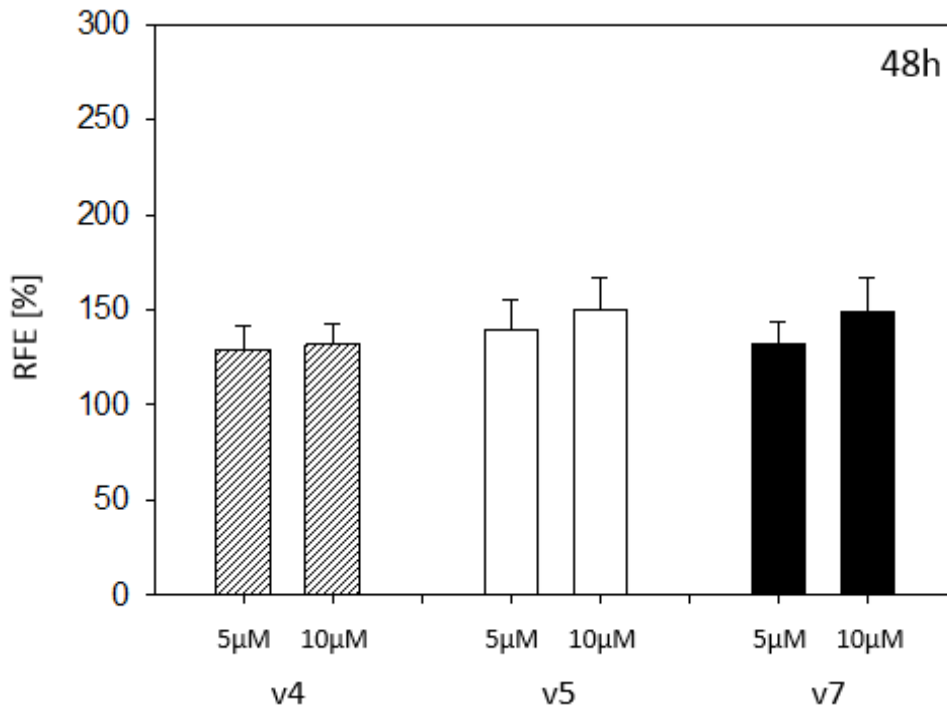


Abbildung 24: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe PC3 unter 5 µM und 10 µM SFN nach 48 h. Die nicht abgebildete Kontrolle ist als 100% gesetzt, die beiden Behandlungen sind im Verhältnis dazu angegeben. Die X-Achse gibt die Proben mit den SFN-Konzentrationen an, die Y-Achse die relative Fluoreszenzeinheit RFE in Prozent. Unterhalb der X-Achse ist der jeweilige CD44-Subtyp angegeben. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6. * markiert Signifikanzen.

Nach 48 h zeigt sich konzentrationsabhängig ein höheres Expressionsniveau der Rezeptoren, der Anstieg fällt bei allen Subtypen deutlich geringer aus als nach 24 h (**Abbildung 24**). v4 hält sich nach 48 h nahezu konstant, das Expressionsniveau von v5 und v7 steigt leicht an.

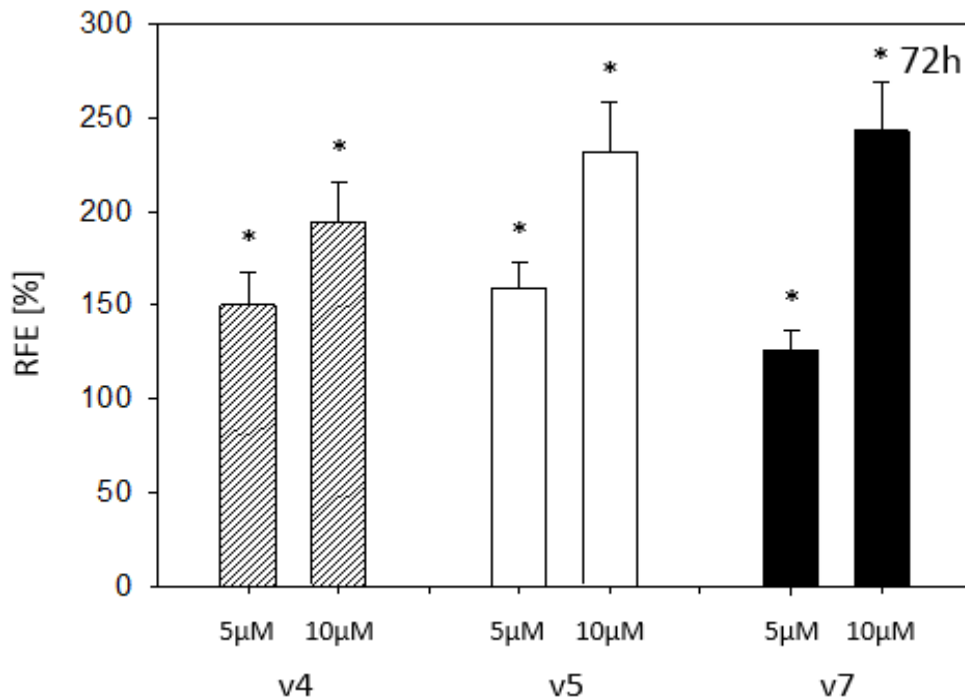


Abbildung 25: Graphische Darstellung des Expressionsprofils der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 der Zellreihe PC3 unter 5 μM und 10 μM SFN nach 72 h. Die nicht abgebildete Kontrolle ist als 100% gesetzt, die beiden Behandlungen sind im Verhältnis dazu angegeben. Die X-Achse gibt die Proben mit den SFN-Konzentrationen an, die Y-Achse die relative Fluoreszenzeinheit RFE in Prozent. Unterhalb der X-Achse ist der jeweilige CD44-Subtyp angegeben. Ergebnisse als Mittelwerte aus n=6. * markiert Signifikanzen.

Nach 72 h kommt es sehr deutlich konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung des Expressionslevels jedes einzelnen Subtyps (**Abbildung 25**). Am ausgeprägtesten zeigt sich der Sulforaphaneinfluss bei v7, dessen Expressionslevel sich mehr als verdoppelt mit einer Zunahme von ca. 120%. Auch bei v4 und v5 bewirkt die höhere Sulforaphandosis einen deutlichen Expressionsanstieg von ca. 50% bzw. 70%.

Zusammenfassend ist bei allen Messzeitpunkten die klare Tendenz zu erkennen, dass mit steigender Sulforaphankonzentration das Expressionslevel jeweils aller gemessenen Subtypen ansteigt; am ausgeprägtesten zeigt sich das bei der 72 h-Messung, bei der alle Ergebnisse statistisch signifikant sind.

3.4 Einfluss von Sulforaphan auf die Resistenzentwicklung

3.4.1 MTT-Test Resistenz

Um festzustellen, ob Prostatakarzinomzellen, die über einen längeren Zeitraum von sechs Monaten einer Dauerbehandlung von 5 μMol Sulforaphan ausgesetzt waren, eine Resistenz entwickeln, wurde ein MTT-Test durchgeführt. Über einen Zeitraum von 24 h, 48 h bzw. 72 h wurden dafür je Zelllinie die dauerbehandelten Zellen „akut“ mit Sulforaphan der Konzentrationen 1 μMol , 5 μMol , 10 μMol , 15 μMol , 20 μMol und 25 μMol inkubiert. Nicht-dauerbehandelte Vergleichszellen sind über denselben Zeitraum von sechs Monaten mitgeführt und ebenfalls „akut“ mit Sulforaphan der genannten Konzentrationen inkubiert worden. Graphisch aufgetragen sind die Werte nur bis zur 15 μMol -Behandlung. Für jede getestete Konzentration wurde der 24 h-Wert jeweils als 100% definiert, die Zellzahlen der späteren Messzeitpunkte 48 h und 72 h sind dazu ins Verhältnis gesetzt.

DU145:

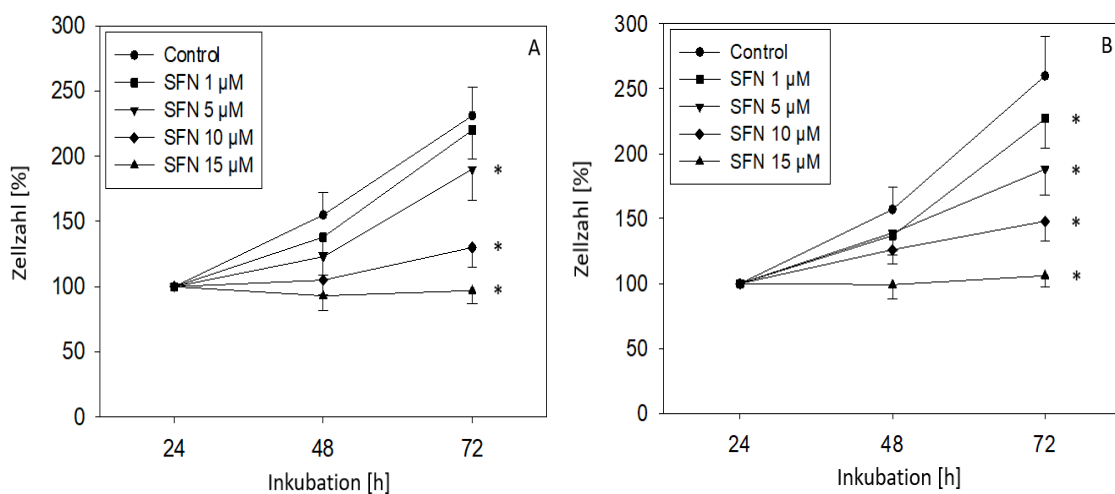


Abbildung 26: Graphische Darstellung der Ergebnisse der MTT-Tests für die nicht-dauerbehandelten Zellen (A) und die über sechs Monate mit 5 μM SFN dauerbehandelten Zellen (B) der Zelllinie DU145. Die nicht-dauerbehandelten Zellen wurden über sechs Monate ohne SFN geführt. Für den Versuch wurden nicht-dauerbehandelte wie dauerbehandelte Zellen „akut“ mit SFN bis 25 μM behandelt (Abbildung nur bis 15 μM), die Kontrollzellen (Control) blieben jeweils „akut“ unbehandelt. Der 24 h-Wert wurde jeweils als 100% definiert. Die X-Achse gibt die Inkubationszeit in Stunden an, die Y-Achse die Zellzahl in Prozent. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus n=6. * steht für Signifikanzen.

In **Abbildung 26 A** ist der Wachstumsverlauf der nicht-dauerbehandelten DU145-Zellen wiedergegeben. Abgesehen von der 15 μMol -Konzentration findet in jeder Gruppe, die Kontrolle eingeschlossen, Zellwachstum statt. Konzentrationsabhängig schwächt sich das Zellwachstum im Vergleich zur Kontrolle ab: Die Kontrolle zeichnet eine annähernd lineare Wachstumsrate über ca. 150% nach 48 h bis ca. 240% nach 72 h ausgehend vom 24 h-Wert. Unter 5 μMol und 10 μMol Sulforaphan fällt die Zuwachsrate deutlich geringer aus, unter 15 μMol Sulforaphan findet kein Zellwachstum mehr statt, die Gerade bleibt konstant auf dem 24 h-Ausgangslevel.

Abbildung 26 B zeigt im Vergleich dazu den Wachstumsverlauf der dauerbehandelten DU145-Zellen. Abgesehen von der 15 μMol -Konzentration findet in jeder Gruppe, die Kontrolle eingeschlossen, Zellwachstum statt. Abhängig von der Sulforaphankonzentration fällt das Wachstum unterschiedlich stark aus: Bei der Kontrolle nimmt die Zellzahl über die Zeit kontinuierlich zu auf ca. 260% nach 72 h ausgehend vom 24 h-Wert. Mit steigender Sulforaphankonzentration wird die Zuwachsrate der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle in deutlichem Umfang geringer, bei 10 μMol Sulforaphan liegt sie nach 72 h nur noch bei knapp 50%. Bei der 15 μMol -Sulforaphandosis kommt es zu einer kompletten Wachstumshemmung, das Wachstum verharrt auf dem 24 h-Ausgangsniveau.

Im Wachstumsverhalten gibt es keinen wesentlichen Unterschied zwischen dauerbehandelten und nicht-dauerbehandelten DU145-Zellen.

PC3:

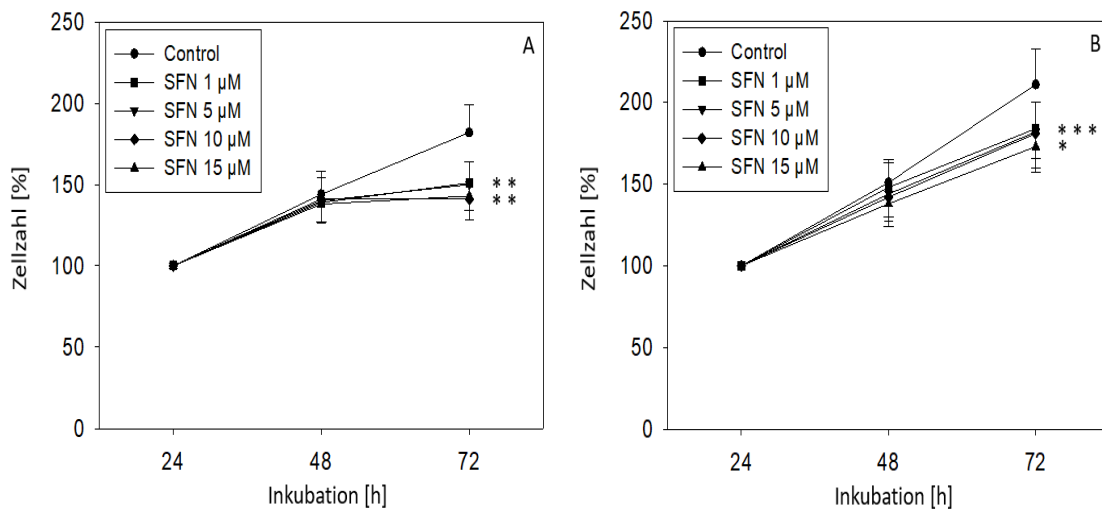


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse der MTT-Tests für die nicht-dauerbehandelten Zellen (A) und die über sechs Monate mit 5µM SFN dauerbehandelten Zellen (B) der Zelllinie PC3. Die nicht-dauerbehandelten Zellen wurden über sechs Monate ohne SFN geführt. Für den Versuch wurden nicht-dauerbehandelte wie dauerbehandelte Zellen „akut“ mit SFN bis 25 µM behandelt (Abbildung nur bis 15 µM), die Kontrollzellen (Control) blieben jeweils „akut“ unbehandelt. Der 24 h-Wert wurde jeweils als 100% definiert. Die X-Achse gibt die Inkubationszeit in Stunden an, die Y-Achse die Zellzahl in Prozent. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus n=6. * steht für Signifikanzen.

Abbildung 27 A stellt die Ergebnisse der nicht-dauerbehandelten PC3-Zellen dar. Wachstum findet in allen Gruppen einschließlich der Kontrolle statt. Die Kontrolle weist eine annähernd lineare Wachstumsrate über ca. 140% nach 48 h bis auf ca. 180% nach 72 h auf. Im Vergleich zur Kontrolle fällt die Wachstumsrate aller Konzentrationen schwächer aus. Die Höhe der Sulforaphankonzentration beeinflusst die Wachstumsrate nur geringfügig. Im Intervall von 24 h auf 48 h ist die Wachstumsrate für alle Gruppen gleich. Danach gehen die mit Sulforaphan behandelten Zellen in eine Plateauphase über.

Abbildung 27 B zeigt im Vergleich dazu den Wachstumsverlauf der dauerbehandelten PC3-Zellen. In allen Gruppen, einschließlich der Kontrolle, findet über die Zeit Zellwachstum statt. Die Kontrolle verzeichnet eine annähernd lineare Wachstumsrate über ca. 150% nach 48 h bis auf ca. 210% nach 72 h. Im Vergleich zur Kontrolle fällt die Wachstumsrate aller Konzentrationen schwächer aus. Die Höhe der Sulforaphankonzentration beeinflusst die Wachstumsrate nur geringfügig: Auch unter 15 µMol Sulforaphan wachsen die Zellen ähnlich gut wie unter 1 µMol Sulforaphan.

4 Diskussion

4.1 Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Klonogenes Wachstum

4.1.1 MTT-Test

Dem MTT-Test war zu entnehmen, dass die wachstumshemmende Wirkung von Sulforaphan mit steigender Konzentration zunimmt. DU145- und PC3-Zellen reagierten dabei in ähnlicher Weise, was für ein vergleichbar sensibles Ansprechen beider Zelllinien auf die Behandlung mit Sulforaphan spricht. Besonders ab einer Konzentration von 5 μMol trat eine deutliche Verringerung der Zellzahl auf.

Im Einklang damit wurde in einer Studie mit humanen Prostatakarzinomzellen ein dosisabhängiger, wachstumshemmender Effekt von Sulforaphan an PC3-Zellen beschrieben, wobei ein Konzentrationsbereich von 5-50 μMol festgelegt war (88). Dass Sulforaphan einen wachstumshemmenden Einfluss auf Zellen ausüben kann, wird auch durch zahlreiche weitere Studien gestützt: In Neuroblastomzellen der Zelllinie SH-SY5Y konnte Sulforaphan bis 40 μMol über 24-72 h konzentrationsabhängig das Wachstum vermindern (89). Auch bei anderen Tumorentitäten konnte eine wachstumshemmende Wirkung von Sulforaphan festgestellt werden, so z. B. beim Vestibularisschwannom, wenngleich ein gutartiger Tumor: In einem Bereich von 5-25 μMol über 48 h bewirkte Sulforaphan eine dosisabhängige Verringerung der Zellviabilität (90). Daneben wies diese Studie auch antiproliferative Effekte von Sulforaphan in Form einer Verringerung des BrdU-Einbaus nach. Nicht nur im humanen in-vitro-Modell, auch in vivo am Mausmodell wurde eine Hemmung des Tumorwachstums infolge der Sulforaphanbehandlung ermittelt (90). Und auch bei zwei Zelllinien des kolorektalen Karzinoms, RKO und HCT 116, wurde unter dem Einfluss von 10 μMol Sulforaphan eine ausgeprägte Reduktion der Zellviabilität und des Zellwachstums festgestellt (60).

Demgegenüber spricht eine andere Studie, durchgeführt an drei Hunde-Osteosarkomzelllinien, von einem nur moderaten Effekt von Sulforaphan im Hinblick auf eine Hemmung des Zellwachstums (91). Bei zwei der Zelllinien wurde eine antiproliferative Wirkung erst bei sehr hohen Sulforaphandosen von 25-100 μMol , über 48 h hinweg verabreicht, gemessen, bei der dritten blieb selbst bei diesen hohen Dosierungen der antiproliferative Effekt nur moderat.

Die dargestellten Differenzen in der Ausprägungsstärke der Wirkung von Sulforaphan bzw. in der Höhe der Sulforaphankonzentration könnten darauf zurückzuführen sein, dass jeweils unterschiedliche Tumorentitäten untersucht wurden. Ergebnisse sind daher nur in begrenztem Umfang auf andere Tumorentitäten übertragbar, zumal bereits innerhalb einer Tumorentität zelllinienspezifische Unterschiede auftreten können (91, 92). Auch muss berücksichtigt werden, dass Zellen je nach Tumorart und Eigenschaft unterschiedlich schnell bzw. aggressiv wachsen und sich durch eine unterschiedliche proliferative Aktivität auszeichnen. Der Einfluss einer wachstumshemmenden Substanz wie Sulforaphan kann dann dementsprechend unterschiedlich schwer ins Gewicht fallen und mit der Wachstumsgeschwindigkeit korrelieren: Gerade schnell wachsende, aggressive Tumore wie Karzinome könnten, laut der dargestellten Datenlage, besonders gut auf Sulforaphan ansprechen (91–93). Diese unterschiedliche Sensitivität verschiedener Tumorentitäten gegenüber Sulforaphan lässt die Vermutung schlüssig erscheinen, dass Patienten mit bestimmten Tumoren in besonderem Maße von Sulforaphan profitieren könnten. So lassen klinische Daten für das Prostatakarzinom einen Effekt auf die PSA-Verdopplungszeit durch die tägliche Einnahme von Sulforaphan erkennen (57, 94); Prostatakarzinompatienten sprechen daher möglicherweise gut auf eine Behandlung mit Sulforaphan an.

4.1.2 BrdU Assay

Mit steigender Sulforaphankonzentration kam es bei beiden Zellreihen zu einer Verminderung des BrdU-Einbaus, es lässt sich daraus eine konzentrationsabhängige Einschränkung der DNA-Synthese und also der Zellproliferation ableiten.

Eine andere an den Prostatakarzinomzellen DU145 und PC3 durchgeführte Studie beschreibt ebenfalls eine Proliferationsminderung unter Sulforaphan (Konzentration $\leq 45 \mu\text{Mol}$) (95). Übereinstimmende Ergebnisse sind für Kolonkarzinomzellen beschrieben (96). Antikarzinogene und -proliferative Effekte von Sulforaphan sind auch für das Blasenkarzinom festgestellt worden: Versuche, durchgeführt mit Konzentrationen, vergleichbar den hier verwendeten, zeigten eine Hemmung der Zellproliferation (97, 98). Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Versuchsergebnisse bestätigen daher frühere Forschungserkenntnisse zur Wirkung von Sulforaphan.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass die zur Erzielung einer Wirkung benötigten Sulforaphankonzentrationen je nach Tumorentität variieren. Ein genaueres Wissen darüber, welche Charakteristika die Tumorentitäten verbinden bzw. trennen, könnte daher hilfreich sein, um diejenigen Entitäten zu identifizieren, bei denen ein Sulforaphaneinsatz besonders vielversprechend, weil wirkungsvoll sein könnte.

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Daten geschlussfolgert werden, dass durch Sulforaphan der BrdU-Einbau reduziert wird, wodurch sich wiederum die Proliferationsminderung der Zellen erklären lässt.

4.1.3 Klonogenes Wachstum

Im Speziellen wird durch Sulforaphan auch das klonogene Wachstum, also die Fähigkeit Zellkolonien zu bilden, beeinflusst: Wie an anderer Stelle an Kolonkarzinomzellen gezeigt (96), führte Sulforaphan analog auch in der hier vorgestellten Arbeit dosisabhängig zu einer Verringerung der Zellkolonieanzahl. Sulforaphan beeinträchtigt offensichtlich die Fähigkeit von klonogenen Tumorzellen Tochterzellen zu bilden. Daher kann angenommen werden, dass durch Sulforaphan das Selbsterneuerungspotential des Tumorgewebes begrenzt wird. Bei der Prävention und Behandlung von Tumorrezidiven und Metastasen könnte Sulforaphan daher eine wichtige Rolle zukommen.

4.1.4 Apoptose Assay

Entgegen zahlreicher Hinweise in der Literatur auf eine Sulforaphan-vermittelte Apoptoseinduktion konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Steigerung der Apoptose festgestellt werden. Lediglich ein Versuch erbrachte einen Anstieg der Apoptose (Früh- und Spätapoptose), in nachfolgenden Versuchen wurde dieser Mechanismus aber nicht bestätigt.

Umfassend beschrieben ist eine Sulforaphan-bedingte Apoptoseinduktion in zahlreichen Studien: Nicht nur für das Prostatakarzinom (95, 99–101), auch für das Kolonkarzinom (96), das Blasenkarzinom (98), das Osteosarkom (102), das Melanom (103), das Magenkarzinom (104) und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (105) konnte eine Apoptoseinduktion gezeigt werden. Angesichts dieser Studienlage liegt der

Schluss nahe, dass die Apoptose durch Sulforaphan gesteigert werden kann. Dass sich diese Tendenz in der hier vorgelegten Arbeit nicht ergeben hat, könnte mit der hohen Passage der Zellen zu tun haben, wodurch die Zellen weniger sensibel auf den Versuch reagiert haben.

Außerdem ist für diese Arbeit ein unspezifischer Apoptose Assay zur Anwendung gekommen, der lediglich Hinweise geben kann auf Integrität und „Zerfallserscheinungen“ der Zellmembran bzw. Veränderungen der Positionierung von Phosphatidylserin in der Membran. Andere Bestandteile des Apoptoseablaufs, wie die Expression der Apoptose-relevanten Proteine Bax und Bcl oder der Caspasen-Familie sind nicht Gegenstand der Untersuchung gewesen. Veränderungen der genannten Proteine, konkret eine Sulforaphan-bedingte Aktivierung von Bax und den Caspasen 3, 8 und 9 sowie eine Herunterregulation von Bcl-2, sind aber in zahlreichen anderen Studien u. a. am Prostatakarzinom (95, 99–101), dem Blasenkarzinom (98), dem Melanom (103) und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (105) als molekulare Manifestation der Apoptose festgestellt worden. So verweisen die hier vorgestellten Daten zwar nicht auf eine Induktion der Apoptose, jedoch können Sulforaphan-vermittelte Modifikationen Apoptose-spezifischer Signalwege nicht ausgeschlossen werden.

Die molekularen Wirkmechanismen von Sulforaphan und die in Gang gesetzten Signalwege könnten auch von der verwendeten Sulforaphankonzentration abhängig sein, was für Verschiebungen der Zellzyklusphasen und die Induktion der Apoptose von Bedeutung sein kann. So löste der natürliche HDAC-Inhibitor Curcumin in Osteosarkom-Tumorzellen in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis eine Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus aus, mit nachfolgender Aktivierung apoptotischer Prozesse (106). Von konzentrationsabhängigen Veränderungen der Zellzyklusphasen und einer Apoptoseinduktion wird auch im Zusammenhang mit Sulforaphan berichtet (107), u. a. bei der Anwendung an Prostatakarzinomzellen (108). Das Ausbleiben der Apoptose in der hier vorgelegten Arbeit kann also auch auf die zur Anwendung gekommenen Sulforaphankonzentrationen zurückzuführen sein.

Auch in dem Phänomen der zellulären Seneszenz, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht untersucht wurde und daher an dieser Stelle auch nur angeschnitten wird, kann eine mögliche Erklärung liegen: Laut einer Studie könnte statt der Apoptose

die zelluläre Seneszenz über eine Aktivierung des Immunsystems und eine Beeinflussung der Tumormikroumgebung eine stärkere Wirkung zur Reduzierung der Tumorlast entfalten, insbesondere wenn es sich um eine begrenzte Zellzahl handelt und die Apoptose nicht in koordinierter Weise abläuft (109). So wurde in einer an Brustkrebszellen durchgeführten Studie unter niedrigen Sulforaphankonzentrationen von 5-10 μMol (also der Konzentrationsbereich, der auch für diese Arbeit verwendet wurde) eine Sulforaphan-induzierte Seneszenz festgestellt, während eine Sulforaphan-bedingte Apoptoseinduktion erst bei höheren Dosierungen von 20 μMol zu messen war (110). Hier bedarf es weiterer Forschung, um die Abgrenzung oder möglicherweise das Zusammenspiel zwischen Apoptose und Seneszenz bei Krebszellen zu ergründen.

4.2 Zellzyklus, Western Blot-Analyse Zellzyklus-regulierender Proteine

4.2.1 Zellzyklus Assay

Die vier Phasen des Zellzyklus – G1-, S-, G2- und M-Phase – werden über Cyclin-CDK-Proteinkomplexe gesteuert (19). Bei den für diese Arbeit verwendeten Prostatakarzinomzelllinien war durch die Behandlung mit Sulforaphan eine Änderung der Phasenaufteilung zu verzeichnen. Konzentrationsabhängig stellte sich ein G2/M-Arrest ein, also eine Verschiebung in die Phase, in der die Mitose vorbereitet und anschließend mit Beginn der Prophase vollzogen wird. Gleichzeitig war zu sehen, dass die Anzahl der Zellen in der S-Phase, also der DNA-Replikationsphase, konzentrationsabhängig ebenfalls zunahm; umgekehrt verhielt es sich mit der G0/G1-Phase, einer Ruhephase außerhalb des Replikationszyklus, deren Anteil konzentrationsabhängig abnahm. Insbesondere nach 48 h und 72 h traten die dargelegten Änderungen deutlich hervor.

Die Ausbildung eines G2/M-Arrests unter Sulforaphan ist für viele Tumorentitäten dokumentiert: So wurde in anderen Prostatakarzinomstudien ebenfalls ein G2/M-Arrest demonstriert (82, 111). Ähnlich ist eine durch Sulforaphan ausgelöste Akkumulation in der G2/M-Phase für Magenkarzinom- (104), Melanom- (103), Osteosarkom- (102) sowie Brustkrebszellen (110) beschrieben. Da die Behandlung mit Sulforaphan in den für diese Studie durchgeführten Versuchen mit einer deutlichen Reduktion von Zellwachstum und -proliferation einherging, lässt sich schlussfolgern, dass die Akkumulation der Zellen in

der G2/M-Phase nicht mit einer Zunahme der mitotischen Aktivität und der Teilungsrate verbunden war, sondern vielmehr eine Abnahme derselben zur Folge hatte. Die Zellen scheinen also in der G2/M-Phase „hängen“ zu bleiben bzw. es scheint eine „Blockade“ nach der G2/M-Phase zu geben, sodass das Fortführen des Zellzyklus und damit einhergehend der Zellteilung nicht möglich ist.

Ein G2/M-Arrest tritt im Fall von DNA-Schäden oder Schäden am Spindelapparat bzw. Mikrotubulus auf (102, 112). Möglicherweise verursacht Sulforaphan solche Schäden. Tatsächlich wurde in Studien am Prostatakarzinom (95) sowie am nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (113) ein Zusammenbruch des Mikrotubulusapparates durch eine Herunterregulierung von α -Tubulin infolge einer Sulforaphanbehandlung festgestellt.

Die Zellzyklusanalyse beider Prostatakarzinomzelllinien, DU145 und PC3, ergab neben den erläuterten konzentrationsabhängigen Phänomenen auch zeitabhängige Veränderungen in der Aufteilung der Zellzyklusphasen. Während die Frühmessung nach 24 h eine Verschiebung in die S-Phase aufwies, vergrößerte sich zu den späteren Zeitpunkten nach 48 h und 72 h sowohl der Anteil der G2/M- als auch der G0/G1-Phase. Das Auftreten zeitabhängiger Veränderungen der Zellzyklusphasen bei gleichzeitig zeitunabhängig bestehender Wachstumsinhibition ist in ähnlicher Weise bei Kolonkarzinomzellen beobachtet worden (114). Trotz der molekularen Unterschiede zwischen kurz- und langfristiger Behandlung, bleibt die wachstums- und proliferationshemmende Wirkung von Sulforaphan über die Zeit erhalten.

4.2.2 Western Blot

Die Western Blot-Analysen der Zellzyklus-regulierenden Proteine verweisen darauf, dass der im Zellzyklus Assay erhobene G2/M-Arrest mit einem Anstieg der Cycline A und B sowie der CDKs 1 und 2 korreliert. Passend also zur arretierten Phase des Zellzyklus sind mit Cyclin B und CDK 1 jene Proteine erhöht, die, zu einem gemeinsamen Komplex zusammengelagert, eben diese Phase des Zellzyklus steuern.

Für jede Phase des Zellzyklus erfolgt eine jeweils spezifische Komplexbildung von Cyclin und CDK: Die bereits erwähnte Verbindung aus Cyclin B und CDK 1 findet ihren Platz beim Übergang von der G2-Phase in die Mitose, die S-Phase mit der DNA-

Replikation wird über den Cyclin A/CDK 2-Komplex kontrolliert. Ihre Wirkung üben diese (und auch andere, hier nicht untersuchte) Komplexe an zwischen den Zellzyklusphasen befindlichen Checkpoints bzw. Restriktionspunkten aus, die von den Komplexen kontrolliert werden: Im Fall von Replikationsfehlern wird die nächste Phase nicht eingeleitet und die Zelle in der jeweils aktuellen Phase arretiert, um in der Folge Reparaturmaßnahmen oder die Eliminierung der betroffenen Zelle zu ermöglichen. Auf diese Weise wird das Forttragen von Replikationsfehlern und Mutationen von Zellgeneration zu Zellgeneration vermieden; umgekehrt ist das Nicht-Funktionieren dieser Kontrollmechanismen dazu angetan, Schäden zu verfestigen. Ein Merkmal von Krebszellen ist eine insuffiziente Checkpoint-Kontrolle (115). Die Hemmung der Zellzyklusprogression durch Arretierung in einer Phase könnte daher ein effektiver Weg sein, das Tumorwachstum einzugrenzen (116, 117). Über die erhöhte Expression von Cyclin B und CDK 1 lässt sich die Arretierung in der G2/M-Phase erklären.

In ähnlicher Weise stellen andere Studien ebenfalls eine Verbindung her zwischen der Erhöhung des Cyclin B1-Expressionslevels und dem G2/M-Arrest, so z. B. beschrieben für humane Magenkrebszellen (104) oder auch für Kolonkarzinomzellen der Zelllinie HT29 unter dem Einsatz von 15 μ Mol Sulforaphan (118). Gleiches gilt für Untersuchungen an verschiedenen Brustkrebszelllinien (119).

Die Datenlage zur Korrelation zwischen G2/M-Arrest und dem Expressionslevel der Cycline und CDKs ist allerdings nicht einheitlich. Andere Studien formulieren, dass der Sulforaphan-bedingte G2/M-Arrest mit einer Abnahme der Proteinexpression der Cycline und CDKs assoziiert ist, dass also der G2/M-Arrest invers mit der Proteinexpression korreliert ist (102, 103, 110). Möglicherweise ergeben sich auch Modulationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der verwendeten Sulforaphankonzentration.

Eine andere mögliche Erklärung für die Akkumulation in der G2/M-Phase bzw. für die Unterdrückung der Zellzyklusprogression und den Beginn der Mitose könnte darin liegen, dass zwar nicht die Komplexbestandteile selbst (also Cycline und CDKs) herunterreguliert werden, wohl aber in der Signalkette vorgelagerte Substrate, wie cdc25, das für die Aktivierung von CDK 1 benötigt wird. Unterbleibt also die Aktivierung von CDK 1 kann der Zellzyklus nicht fortschreiten, sondern wird arretiert. In der Tat

wurde in verschiedenen Studien eine Sulforaphan-bedingte Inaktivierung von cdc25 festgestellt, verbunden mit einer Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase (111, 116).

Auch der Phosphorylierungsgrad der CDKs muss bei der Beurteilung der Western Blot-Analyse mit in Erwägung gezogen werden. Unter dem Einfluss von Sulforaphan sind in der hier vorliegenden Arbeit die phosphorylierten, also aktivierten CDKs fast unverändert geblieben. Am Aktivitätszustand der CDKs hat sich also kaum etwas geändert. Auch darin könnte ein Grund für die Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase bzw. Hemmung der Mitose liegen: Im Gegensatz zum Gesamtgehalt der Cycline und CDKs haben die phosphorylierten und damit aktivierten CDKs unter Sulforaphan abgenommen bzw. in einem Fall nur leicht zugenommen. Das Verhältnis zwischen den aktivierten CDKs und der totalen CDK-Proteinexpression ist somit gesunken, sodass – so lässt sich vermuten – der Restriktionspunkt hin zur Mitose nicht überwunden werden konnte.

Von wesentlicher Bedeutung für den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus ist der Komplex aus Cyclin A und CDK 2. Werden diese beiden Bestandteile verstärkt exprimiert, können die Zellen vermehrt in die S-Phase übergehen, deren Anteil vergrößert sich somit.

So deckt sich der Cyclin A- und CDK 2-Anstieg im Western Blot mit der im Zellzyklus Assay gemessenen konzentrationsabhängigen Steigerung der S-Phase. Dieser Umstand einer gesteigerten S-Phase, also der Phase der DNA-Replikation, scheint im Widerspruch zu stehen zu der in den Wachstumsversuchen festgestellten Wachstums- und Proliferationshemmung. Die Tatsache, dass die S-Phase gesteigert ist, impliziert aber nicht automatisch, dass die Zellen auch in der Lage sind, einen vollständigen Mitosezyklus zu durchlaufen. Schließlich folgt danach, wie bereits beschrieben, die Arretierung der Zellen in der G2/M-Phase.

Unabhängig davon besteht eine Diskrepanz zwischen der im Zellzyklus Assay ermittelten, konzentrationsabhängigen Zunahme der S-Phase und der gleichzeitigen konzentrationsabhängigen Verringerung der Zellproliferation im BrdU Assay. Wenn auch ein vollständiger Mitosezyklus aufgrund des G2/M-Arrests nicht vollzogen wird, so müsste sich doch zumindest im BrdU Assay eine verstärkte Proliferationsrate zeigen, und zwar als Folge der vermehrten DNA-Replikation in der S-Phase. Dies war aber nicht der Fall, die Proliferationsrate im BrdU Assay ist gesunken. Dieses Phänomen wurde in

einer anderen Krebsstudie ebenfalls beobachtet (120). Als mögliche Erklärung führen die Autoren eine ektopische p16-Überexpression an, infolge derer eine S-Phase-Verlängerung auftritt. Da p16 und dessen Interaktionssubstrate nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, bedarf die Frage, ob und inwiefern Sulforaphan Einfluss darauf zu nehmen vermag, vertiefender Forschung.

Im Zusammenhang mit Cyclin A/CDK 2 spielt auch p19 Skp1 (S phase kinase-associated protein) eine Rolle: Gemeinsam mit dem genannten Komplex ist p19 beteiligt an der Steuerung der S-Phase (23). Das Protein p19 agiert als CDK-Inhibitor (24). Unter dem Einfluss von Sulforaphan wurde p19, wie im Western Blot zu sehen, bei den DU145-Zellen noch deutlicher als bei den PC3-Zellen hochreguliert; eine Beobachtung, die im Kontext der Zellzyklusblockade die bereits geschilderte wachstumslimitierende Wirkung von Sulforaphan bestätigt.

Neben p19 übernimmt auch p27 (Kip1) eine regulative Funktion im Zellzyklus als CDK-Inhibitor und fungiert als Tumorsuppressor (24). Im Falle von DNA-Schäden wird der Zellzyklus verlangsamt bzw. angehalten und so eine wachstumshemmende Wirkung von p27 ausgeübt. Insofern ist die für die DU145-Zellen im Western Blot gemessene p27-Erhöhung kompatibel mit der durch Sulforaphan entfalteten Proliferationshemmung. Dieses Resultat lässt sich mit Ergebnissen anderer Studien vereinbaren: Antiproliferative Effekte wurden an Brust- (110) und Kolonkarzinomzellen (96) nachgewiesen, bei denen durch Behandlung mit Sulforaphan ebenfalls eine erhöhte p27-Expression vorlag. In diesem Zusammenhang zeigen Experimente an unterschiedlichen Tumorentitäten einschließlich des Prostatakarzinoms (121–124), dass mit einem verminderten p27-Expressionsspiegel ein aggressiveres Tumorwachstum und eine schlechtere Prognose verbunden sind (125–128).

Auf der anderen Seite ist der Western Blot-Analyse für die PC3-Zelllinie mit steigender Sulforaphankonzentration eine Abnahme des p27-Expressionslevels zu entnehmen, dennoch wurde auch für diese Zelllinie in den vorangegangenen Versuchen eine Reduktion der Proliferation festgestellt. Wie passt dieser Befund mit den zuvor beschriebenen Ausführungen zusammen? Eine mögliche Antwort könnte darin liegen, dass dem p27-Protein bei der Tumorentstehung eine duale Rolle zukommt (129): Neben seiner Tumorsuppressorfunktion durch Interaktion mit Cyclin-CDK-Komplexen verfügt

p27, so die Studie, auch über eine Funktion als Onkogen (unabhängig von der Cyclin-CDK-Interaktion). Dieser Umstand könnte erklären, weshalb das für p27 kodierende Gen in Tumoren nur selten inaktiviert oder verändert ist (129). Auch andere Studien formulieren diese Multifunktionalität von p27 und weisen darauf hin, dass die konkrete Funktion des p27-Proteins von dessen Lokalisation in der Zelle abhängt (130, 131). Als Tumorsuppressor wirkt p27 demnach im Nukleus, wo es mit Cyclin-CDK-Komplexen interagieren und diese ggf. hemmen kann. Im Zytoplasma hingegen liegt eine Fehllokalisierung von p27 ohne Tumorsuppressorfunktion vor, da eine Komplexinteraktion aufgrund der räumlichen Trennung nicht möglich ist. In diesem Fall kann eine erhöhte Expression von p27 sogar mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein, wie für das diffuse, großzellige B-Zell-Lymphom (132) oder die Chronisch Lymphatische Leukämie (133) gezeigt. Studien an Brustkrebsgewebe verweisen darauf, dass eine Translokation von p27 aus dem Zellkern in das Zytoplasma in Zusammenhang mit einer gesteigerten p27-Phosphorylierung durch AKT (Proteinkinase B) steht (131).

Untersuchungen zum Einfluss von Sulforaphan auf den AKT-Signalweg, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden, könnten neue Erkenntnisse über die intrazelluläre Verteilung und damit verbunden über die spezifische Wirkweise von p27 in den verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien liefern. Da beide Zelllinien trotz der divergierenden Entwicklung der p27-Expression durch Sulforaphan eine Wachstums- und Proliferationsminderung erfahren haben, lässt sich mutmaßen, dass Varianzen der beschriebenen Art vorliegen (evtl. der verschiedenen genetischen Ausstattung der Zelllinien geschuldet). In Brustkrebsgewebe förderte Sulforaphan tatsächlich eine Dämpfung des AKT-Signalweges (110), wie dies in ähnlicher Weise auch bei Nierenkarzinomzellen festgestellt wurde (134).

Die im Western Blot ermittelte, durch Sulforaphan verstärkte Expression der Histone in ihrem acetylierten Zustand, v. a. Histon H3, bestätigt die in der Literatur häufig beschriebene Funktion von Sulforaphan als HDAC-Inhibitor. Wie bspw. für das Lungenkarzinom (61) und das Kolonkarzinom (53, 135), so wurde auch für das Prostatakarzinom eine Verminderung bzw. Hemmung der HDAC-Aktivität gezeigt, verbunden mit einer erhöhten Expression der acetylierten Histone H3 und H4 (aH3, aH4) (82, 136). Als Bestandteil der Histonkomplexe sind die Kernhistone H3 und H4 wichtige

Faktoren für den Kondensationsgrad und damit die Zugänglichkeit der DNA zur Transkription. Veränderungen von H3 und H4 können dementsprechend gravierende Konsequenzen für die Genexpression mit sich bringen und daher ein Mechanismus bei der Tumorentstehung sein (137, 138).

Die Hemmung der HDAC-Aktivität führt dazu, dass die Histone H3 und H4 vermehrt acetyliert vorliegen und die DNA dadurch in ihre aufgelockerte, transkriptionsaktive Form versetzt wird, sodass die Expression z. B. von Tumorsuppressorgenen möglich ist. So können durch die Sulforaphan-bedingte HDAC-Inhibition unterschiedliche, bei der Tumorentstehung teils „stillgelegte“ bzw. „fehlgeleitete“ Gene reaktiviert werden, z. B. für Zelldifferenzierung, Zellzyklusregulation oder Apoptose (139). Mehrere Studien beschreiben eine durch die Behandlung mit Sulforaphan verstärkte Acetylierung der Histone H3 bzw. H4, speziell im Bereich der Promotorregionen der p21- und Bax-Gene (53, 82, 135, 136), sowie eine Sulforaphan-vermittelte Unterdrückung des Gens für die human telomerase reverse transcriptase (hTERT), einem Baustein des Telomerase-Enzyms (140). Der bereits dargestellte Anstieg der p19- und p27-Expression könnte so auf die durch Sulforaphan verbesserte Zugänglichkeit zu den für diese Proteine kodierenden Genen zurückzuführen sein.

Die genauen Mechanismen, durch die die HDAC-Modulation und die Wachstumsrestriktion, beide initiiert durch Sulforaphan, ineinandergreifen und zusammenspielen, sind noch nicht abschließend verstanden. Beschrieben ist aber bereits eine Interaktion zwischen epigenetischen, HDAC-involvierenden Abläufen bzw. der Acetylierung der Histone H3 und H4 und dem AKT-Signalweg, der in diverse Zellprozesse, darunter auch Zellwachstum und -proliferation physiologisch eingebunden und in vielen Tumoren pathologisch hochreguliert ist (110, 141 – 144). Eine wechselseitige Beeinflussung beider Systeme durch Sulforaphan ist deshalb nicht auszuschließen.

4.3 CD44

Bei den für diese Arbeit untersuchten Zelllinien kam es durch die Behandlung mit Sulforaphan zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Erhöhung der Expression der CD44-Subtypen v4, v5 und v7. CD44 ist ein Oberflächenprotein, das auf den meisten

Zellen exprimiert wird und durch alternatives Splicing viele Subtypen aufweist (16). So vielfältig das Expressionsmuster dieses Proteins, so vielfältig auch die Funktionen, in die es eingebunden ist: Über seinen Hauptliganden Hyaluronsäure ist CD44 in Zell-Zell-Kontakte, Kontakte zur Extrazellulärmatrix (EZM) sowie Zelladhäsion und -migration involviert (15). Außerdem werden Zellproliferation und Zelldifferenzierung über CD44 mitbeeinflusst (18, 145). CD44 ist sowohl mit physiologischen als auch pathologischen Zellaktivitäten assoziiert (17, 18, 146, 147).

Tatsächlich spiegelt sich diese Diversität auch in der Literatur wider, die Angaben zum Einfluss von CD44 auf das Tumorgeschehen bzw. die Prognose variieren stark. Einige Studien stellen eine Korrelation zwischen CD44-Expression bzw. der Expression verschiedener CD44-Subtypen (z. B. v3, v6, v9) und einer schlechteren Tumorprognose her. Dies ist beschrieben für das kolorektale Karzinom (148, 149), das Melanom (150), das Pankreaskarzinom (151) und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (152, 153), bei denen eine Tumorprogression, -metastasierung und eine insgesamt kürzere Überlebenszeit mit CD44 in Zusammenhang gebracht wurden. Auf der anderen Seite finden sich Studien an Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen (154), dem Zungenkarzinom (155) sowie Brustkrebs (156), die für den genau umgekehrten Fall, also eine Herunterregulierung der CD44-Expression eine schlechtere Tumordifferenzierung und eine Tumormetastasierung sowie eine kürzere mittlere Überlebenszeit, insgesamt also ein ungünstigeres Outcome anführen. Als Folge einer verringerten CD44-Expression wird eine Reduktion der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion angenommen, infolgedessen eine Ablösung der Tumorzellen aus ihrem Verband und somit eine Tumordinvasion und -metastasierung erleichtert werden. Daher könnte ein niedriger CD44-Spiegel als Indikator für Tumordinvasivität und hohes Metastasierungspotential fungieren (155, 157).

Teils differierend sind die Befunde sogar innerhalb einer Tumorentität. So wird z. B. beim Ovarialkarzinom ein hohes CD44-Level einerseits mit Tumorproliferation und -invasion assoziiert (158), andererseits mit guter Tumordifferenzierung und besserem 5-Jahres-Überleben (159, 160). Ähnlich widerstreitende Ergebnisse liegen auch für das Mammakarzinom (161, 162) und das Osteosarkom (163, 164) vor. Beim Prostatakarzinom werden v. a. mit dem CD44-Subtyp v6 die Tumorprognose negativ beeinflussende Faktoren assoziiert, seien es Tumorproliferation, -invasion oder

- metastasierung (165). Folgerichtig zeigt eine Studie, dass sich eine durch Sulforaphan induzierte Herunterregulation besagten Subtyps v6 positiv auswirkt (166). Dazu scheinbar im Widerspruch steht, dass in der hier vorgelegten Arbeit durch Sulforaphan die CD44-Subtypen v4, v5 und v7 hochreguliert wurden und sich dies mit Blick auf Zellwachstum und -proliferation nicht negativ ausgewirkt hat. Es lässt sich somit die Schlussfolgerung ziehen, dass CD44 eine Erhöhung der Zelldifferenzierung bewirkt, wodurch sich das Zellwachstum reduziert.

Welcher CD44-Subtyp aktiv ist, scheint demnach für das Tumorgeschehen und die Prognose relevant zu sein. Weitere Studien sind notwendig, um die Bedeutung spezifischer CD44-Varianten für die Tumorgenese und -progression im Detail herauszuarbeiten. Zu berücksichtigen sind dabei auch Tumor-spezifische Expressionsmuster, deren Modulierung in Abhängigkeit von der Tumorentität onkogene oder tumorsuppressive Signalwege aktivieren könnte. Erhebungen an Brustkrebs- (162) und Pankreaskarzinomgewebe (151) liefern bereits dahingehende Anhaltspunkte.

Welchen Einfluss CD44 auf das Tumorgeschehen hat, könnte auch von der Interaktion mit anderen Rezeptoren abhängen, z. B. mit CD24. Während eine Studie an Mammakarzinomzellen die Konstellation CD44⁺/CD24⁻ mit einer schlechteren Prognose assoziiert (167), verweist eine andere Studie, ebenfalls an Brustkrebszellen, auf einen tumorsuppressiven Effekt (168). Auch in diesem Kontext bedarf es weiterer Forschungsbemühungen. So ist z. B. die Frage, welche Signalkaskaden in den Tumorzellen durch die einzelnen CD44-Subtypen an- bzw. abgeschaltet werden, noch ungeklärt.

Aus den hier erzielten Ergebnissen lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass die Sulforaphan-vermittelte Steigerung der CD44-Expression über eine Erhöhung der Zelldifferenzierung eine Reduktion von Zellwachstum und -proliferation bewirkt.

Als langfristiges therapeutisches Ziel sollte die Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe stehen, die selektiv durch CD44 getriggerte onkogene Signalwege blockieren bzw. durch CD44 induzierte tumorsuppressive Signalmechanismen forcieren. Mit Bivatuzumab, einem monoklonalen Antikörper, der speziell gegen den CD44-Subtyp v6 gerichtet ist, haben diese Forschungsbemühungen bereits erste Ergebnisse gezeitigt (169). In ähnlicher Weise könnte auch Sulforaphan einen wichtigen therapeutischen Beitrag leisten.

4.4 Resistenz

Die abschließenden Untersuchungen dieser Arbeit widmeten sich der Frage, ob es infolge einer langfristigen Sulforaphanbehandlung zur Entwicklung einer Resistenz kommt. Über sechs Monate dauerbehandelte Zellen wurden dafür mit nicht-dauerbehandelten Zellen in ihrem jeweiligen Wachstumsverhalten verglichen. Bei der DU145-Zelllinie zeigte sich unter beiden Bedingungen (dauerbehandelte wie nicht-dauerbehandelte Zellen) in ähnlicher Weise eine konzentrationsabhängige Verringerung der Wachstumsrate. Es gab also bei dieser Zelllinie keinen wesentlichen Unterschied im Wachstumsverhalten dauerbehandelter versus nicht-dauerbehandelter Zellen. Es kam auch bei der PC3-Zelllinie sowohl bei den dauerbehandelten als auch bei den nicht-dauerbehandelten Zellen zu einer Wachstumsreduktion infolge der Sulforaphanbehandlung, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei den DU145-Zellen. Allerdings gab es bei den PC3-Zellen im Wachstumsverhalten keine Abhängigkeit von der Sulforaphankonzentration.

Für die klassischen Therapieverfahren wie Chemotherapie und Bestrahlung, die beide ein fester Bestandteil in vielen Therapieprotokollen gegen Tumorerkrankungen sind, stellt die Entwicklung einer Resistenz ein ernsthaftes Problem dar, limitiert sie doch die Wirksamkeit der Therapie. Wenige Daten liegen vor, die Auskunft darüber geben, ob sich auch gegen den Naturstoff Sulforaphan durch langfristige Einnahme eine Resistenz ausbildet. Eine Studie, für die Pankreaskarzinomzellen für mehr als ein Jahr steigenden Konzentrationen von Sulforaphan ausgesetzt wurden, kommt zu dem Schluss, dass die Zellen ihre Sensitivität auch unter Langzeitanwendung beibehalten und die kontinuierliche Sulforaphanzufuhr dementsprechend keine Resistenz induziert (170). Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse für die DU145- und die PC3-Zelllinie, deren Wachstumsdaten ebenfalls nicht auf eine Resistenzentwicklung hindeuten, stehen damit im Einklang. Das bereits erwähnte Fehlen einer konzentrationsabhängigen Wirkung von Sulforaphan bei den dauerbehandelten PC3-Zellen könnte an dem insgesamt schwächeren Wachstum dieser Zellreihe liegen, reagieren die nicht-dauerbehandelten Zellen doch ähnlich wie die dauerbehandelten. Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass die Zelllinien unterschiedlich auf die langfristige Exposition mit Sulforaphan reagieren. Für die klinische Praxis, so kann man folgern,

könnten die zwischen den Zelllinien festgestellten Unterschiede bedeuten, dass Patienten je nach „Tumorgenetik“ in unterschiedlichem Maße auf eine langfristige Behandlung mit Sulforaphan ansprechen und von dessen Wirkung profitieren. Vertiefende Studien sollten diesen Gedanken aufgreifen und insbesondere den langfristigen Einfluss von Sulforaphan auf die Zellzyklusregulation untersuchen.

Zudem legen Studien nahe, dass Sulforaphan einer bereits bestehenden Resistenz gegen Chemotherapeutika entgegenwirken und so zu einer Re-Sensibilisierung gegenüber der Tumorthherapie führen kann. Beschrieben ist dies bspw. für Brustkrebs (171), das Glioblastom (172), das Lungenkarzinom (173–175) und das cholangiozelluläre Karzinom (176). CDKs und Cycline scheinen mit einer Resistenzentwicklung im Zusammenhang zu stehen (177), die „Antiresistenzwirkung“ von Sulforaphan könnte daher auf einer verstärkten Expression von CDK-Inhibitoren wie p19 und p27 basieren. Tatsächlich kann wohl eine Stabilisierung von p27 dazu führen, Resistenzen zu überwinden, wie anhand von Paclitaxel-resistenten Prostatakarzinomzellen demonstriert wurde (178, 179). Auch für die Strahlentherapie könnte sich Sulforaphan als hilfreich herausstellen: Die (Vor-) Behandlung mit dem pharmakologischen HDAC-Inhibitor Trichostatin A bewirkte laut einer Studie eine Sensibilisierung von strahlungsresistenten Prostatakarzinomzellen (180). Als natürlichem HDAC-Inhibitor könnte Sulforaphan eine ähnliche Bedeutung zukommen.

5 Ausblick

Sulforaphan kann in seiner Eigenschaft als natürlicher HDAC-Inhibitor, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, antitumorale Wirkungen entfalten. Daher ergibt sich die Frage, ob eine gezielt sulforaphanreiche Ernährung gesundheitsfördernd sein kann. Welche Optimaldosis für Sulforaphan gilt, ist jedoch bislang ungeklärt. Zusätzlich fehlen robuste Daten zur unmittelbaren Korrelation zwischen einer bestimmten Menge sulforaphanhaltigen Gemüses, der darin enthaltenen Sulforaphankonzentration und der Sulforaphan-Plasmakonzentration im Menschen. Zusammengenommen sind daher konkrete Empfehlungen hinsichtlich der Menge des Konsums sulforaphanhaltigen Gemüses zurzeit nicht möglich.

Pharmakokinetische Daten können allerdings erste Anhaltspunkte dafür liefern, wie sich die Aufnahme von Sulforaphan im Körper niederschlägt. Zur Erforschung der in vivo-Pharmakokinetik von Sulforaphan wurde Ratten eine Dosis von 50 μMol Sulforaphan oral verabreicht (181): Nach vier Stunden war im Plasma ein Höchstwert von 20 μMol messbar, die Halbwertszeit betrug ca. 2,2 Stunden. Auch am Menschen sind mit einer Einzeldosis von 200 μMol Isothiocyanaten, vornehmlich Sulforaphan, Untersuchungen dieser Art durchgeführt worden. Dabei wurde eine schnelle Absorption von Sulforaphan sowie eine Höchstkonzentration von 0,9-2,3 μMol in Plasma, Serum und Erythrozyten mit einer Halbwertszeit von ca. 1,8 Stunden festgestellt (182). Ähnlich resultierte eine Einzelportion Suppe aus leicht gekochtem, frischem Broccoli beim Menschen in einer Sulforaphan-Plasmakonzentration von ungefähr 0,2 μMol (183). In einem humanen Pankreaskarzinom-Xenograft-Modell an Mäusen war eine Sulforaphankonzentration von 4,4 mg/kg Körpergewicht pro Tag zur Wachstumshemmung nötig (184). Auf den Menschen übertragen würde das einer erforderlichen Sulforaphankonzentration von 0,36 mg/kg Körpergewicht (170, 185) bzw. 25 mg/70 kg Körpergewicht entsprechen (170).

Weitere pharmakokinetische Untersuchungen haben eine gute Verteilung und Anreicherung von Sulforaphan im Gewebe ergeben, insbesondere in der Prostata (118, 186–188). Zudem weisen die eigentlich wirksamen Sulforaphanmetabolite Sulforaphan-Cystein und Sulforaphan-N-acetyl-cystein eine deutlich längere Halbwertszeit auf als

Sulforaphan selbst (95, 105, 135). Damit sind erste positive Bedingungen gegeben, dass über die Nahrung aufgenommenes Sulforaphan eine Wirkung entfalten kann.

Die Konversion von GFN, dem Sulforaphan-Vorläufermolekül, in das bioaktive Sulforaphan sowie die Sulforaphanabsorption im Körper unterliegen dem Einfluss vieler Faktoren. Das beginnt bspw. beim GFN- bzw. Sulforaphangehalt im Gemüse, der je nach Sorte sehr variieren kann, und setzt sich darin fort, ob das Gemüse roh oder gekocht eingenommen wird (189–191). Auch die Intensität des Kauens, wodurch das Enzym Myrosinase, das für die Umwandlung von GFN in Sulforaphan verantwortlich ist, freigesetzt wird, könnte eine Rolle spielen (191, 192, 193). In diesem Zusammenhang ist auch das Vorhandensein von Darmbakterien von Bedeutung, die GFN in Sulforaphan spalten können, sollte das pflanzeigene Enzym Myrosinase, wie beim Kochen, inaktiviert werden (192, 194). Auch die Aktivität der Glutathion-S-Transferase, einer Enzymfamilie zur Entgiftung körperfremder, organischer Substanzen, hat Anteil an der Metabolisierung von Sulforaphan (192, 195). Und schließlich ist auch die Zusammensetzung der gesamten Mahlzeit bzw. der Aufbau der Sulforaphan enthaltenden Nahrungsmittel wichtig: So führt der hohe Faseranteil roher Broccolisprossen möglicherweise zu einer Verlangsamung der Darmpassage und erhöht die Absorptionsrate durch eine längere Kontaktzeit mit der Darmschleimhaut (191, 192, 196).

Insgesamt scheinen rohe Broccolisprossen den höchsten Gehalt an GFN bzw. Sulforaphan zu besitzen und auch die Aufnahme im Darm am effizientesten zu ermöglichen (170, 197). Dazu trägt wohl auch bei, dass das aus Sprossen stammende Sulforaphan über eine längere Halbwertszeit verfügt wegen einer zusätzlichen Interkonversion von ebenfalls in Sprossen enthaltenem Erucin zu Sulforaphan (198). Verschiedene Präparate mit gefriergetrockneten Broccolisprossen, die den 10 – 100-fachen GFN-Gehalt aufweisen, sind verfügbar und stellen somit eine vernünftige Option für eine hohe Sulforaphanaufnahme dar (170, 197).

Die Sequenz der Sulforaphanaufnahme übt ebenfalls einen Einfluss auf die Plasmakonzentration aus: Wird Sulforaphan zweimal am Tag in jeweils halber Dosierung aufgenommen, entwickelt sich eine höhere Konzentration im Vergleich zur einmaligen Aufnahme der Gesamtmenge (192).

Darüber hinaus gibt es Bemühungen, die Wirkeffizienz und Bioverfügbarkeit von Sulforaphan zu verbessern. Züchtungen von sog. „Super-Broccoli“, der eine erhöhte Menge an Sulforaphan gegenüber herkömmlichem Broccoli enthält, sind bereits etabliert (195). Die Steigerung der Bioverfügbarkeit wird nicht zuletzt durch die Entwicklung und Anwendung von Transportsystemen (delivery systems) für Sulforaphan erreicht. Dazu zählen Emulsionen/Nanoemulsionen, aber auch Liposomen oder Mikrogele (51, 199). Für eine langanhaltende, regelmäßige Sulforaphanabgabe ist ein Micellen-System entwickelt worden, das, an Brustkrebszellen getestet, vielversprechende Ergebnisse für eine effektive Therapie lieferte (200). Auch mit Sulforaphan beladene pegylierte Gold-Nanopartikel erwiesen sich in einer ebenfalls an Brustkrebszellen durchgeführten Studie als wirkungsvoller für die Apoptoseinduktion und Migrationshemmung als „unbehandeltes“, freies Sulforaphan (201).

Im Sinne der Komplementärmedizin könnte Sulforaphan mit etablierten Behandlungsverfahren kombiniert werden. Für das Pankreaskarzinom ist ein synergistisches Wirken von Sulforaphan und Sorafenib beschrieben: Sulforaphan führte hier zu einer Verstärkung der durch Sorafenib vermittelten Eigenschaften wie Proliferations- und Angiogenesehemmung sowie Induktion der Apoptose (202). In ähnlicher Weise erwies sich die Kombination aus Taxanen und Sulforaphan in einem Brustkrebsmodell als wirkungsverstärkend gegenüber den jeweiligen Einzelbehandlungen, kam es doch durch die kombinatorische Anwendung zu einer ausgeprägteren Reduktion der Tumorgröße und sekundärer Tumorformationen (203). Ein synergistischer Effekt ist auch bei der gemeinsamen Anwendung von Sulforaphan und Cisplatin gegen Hautkrebszellen (204) sowie von Sulforaphan und Oxaliplatin gegen kolorektale Karzinomzellen festgestellt worden (205). Eine zweifache Erhöhung der durch Cisplatin verursachten zytotoxischen Wirkung und sogar eine zehnfache Erhöhung im Falle von 5-Fluorouracil durch die Kombination mit Sulforaphan ist schließlich für Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomzellen angegeben (206).

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass einige Phytopharmaka zu mittlerweile etablierten, schulmedizinischen Medikamenten weiterentwickelt worden sind, so z. B. Salicylsäure/Acetylsalicylsäure aus der Weidenrinde in Aspirin, Opiate/Morphiumderivate, die vom Opium aus dem Schlafmohn abgeleitet sind oder

die zur Chemotherapie verwendeten Taxane, deren Wirkstoff aus der Eibe stammt. Welches Potential Sulforaphan als Wirkstoff für die Schulmedizin hat, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht einschätzen.

Beim Gebrauch, ob kurz- oder langfristig, stellt sich immer auch die Frage nach der Verträglichkeit von Sulforaphan bzw. der Sulforaphan enthaltenden Lebensmittel. Nach dem Verzehr von Kohlgemüse auftretende typische Beschwerden sind Flatulenz und Schwefelgeruch, was dem Schwefelanteil des Sulforaphans geschuldet ist. Daneben aber scheinen keine schwerwiegenden Beeinträchtigungen und Nebenwirkungen zu entstehen (62), auch nicht bei längerfristiger Sulforaphanzufuhr, wie eine Studie mit sechsmonatiger Sulforaphanapplikation zeigte (94).

Auch eine Wirkabschwächung anderer Medikamente durch die gleichzeitige Einnahme mit Sulforaphan, wie z. B. bei Chemotherapeutika befürchtet, hat sich nicht bestätigt. Vielmehr hat sich ganz im Gegenteil eine Wirkverstärkung eingestellt, wie bereits geschildert. Weitere Studien, auch Langzeitstudien unter in-vivo-Bedingungen, stehen noch aus, um eine bessere Übertragbarkeit der in vitro oder am Tiermodell gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen zu ermöglichen.

Zum Schluss sei noch auf das Potential natürlicher HDAC-Inhibitoren wie Sulforaphan in der Krebsprävention hingewiesen: Obwohl als Ligand schwächer wirksam als pharmakologische HDAC-Inhibitoren, könnte sich die stetige, lebenslange Aufnahme des natürlichen Wirkstoffs über die Ernährung als prophylaktisch sehr effektiv erweisen. Dadurch kann es zu einer Genmodulation noch gesunder Zellen kommen, die es diesen erlaubt, auf potentiell toxische und krebserregende Einflüsse zu reagieren und so eine maligne Entartung gar nicht erst zuzulassen (207). Diesbezüglich sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

6 Zusammenfassung

Sulforaphan ist ein in Kreuzblütengewächsen wie Broccoli oder Kohl vorkommender Naturstoff. Für eine Reihe von Tumorentitäten liegen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer potentiell antikarzinogenen Wirkung von Sulforaphan vor. Die für diese Studie konzipierten Versuche wurden an Prostatakarzinomzellen durchgeführt. Ziel war es, den Einfluss von Sulforaphan auf das Wachstumsverhalten der Prostatakarzinomzellen zu untersuchen.

Konzipiert als in-vitro-Modell, wurden für die Studie die Prostatakarzinomzelllinien DU145 und PC3 verwendet. Die Versuche lassen sich grob in zwei Kategorien unterteilen:

- *Regulierung des Zellwachstums*: Nachdem die wachstumshemmende Wirkung von Sulforaphan bestätigt worden ist (MTT-Test), wurden die Proliferationsrate (BrdU Assay) und die Apoptoserate (Apoptose Assay) der Zellen unter dem Einfluss von Sulforaphan gemessen. Untersuchungen zum klonogenen Wachstum komplettierten diese Versuchsreihe.
- *Regulierung des Zellzyklus*: Nachdem der Einfluss von Sulforaphan auf die Phasen des Zellzyklus ermittelt worden ist (Zellzyklus Assay), wurden die Zellzyklus-relevanten Proteine der Cyclin-CDK-Achse, die CDK-Inhibitoren p19 und p27 sowie die acetylierten Histone aH3 und aH4 analysiert (Western Blot).

Ein zusätzlicher MTT-Test wurde durchgeführt, um eine mögliche Resistenzinduktion durch langfristige Sulforaphanexposition festzustellen. Zudem ist das Expressionsprofil der CD44-Subtypen v4, v5 und v7 unter dem Einfluss von Sulforaphan mittels FACS-Analyse untersucht worden.

Unter dem Einfluss von Sulforaphan zeigte sich konzentrationsabhängig eine deutliche Hemmung der Wachstums- und Proliferationsrate sowie des klonogenen Wachstums der Prostatakarzinomzellen. Eine Induktion der Apoptose ist nicht eingetreten. Die Behandlung mit Sulforaphan führte konzentrationsabhängig zu einem G2/M-Arrest des Zellzyklus. Das Expressionsniveau der Cycline A und B sowie der CDKs 1 und 2 ist durch die Sulforaphanexposition gestiegen. Das Expressionsniveau der pCDKs ist gesunken,

mit Ausnahme eines leichten Anstiegs von pCDK 2 in der DU145-Zellreihe. Die CDK-Inhibitoren p19 und p27 waren erhöht, abgesehen von einer Reduktion von p27 in der PC3-Zelllinie. Das Expressionsniveau der acetylierten Histone aH3 und aH4 ist durch die Sulforaphanbehandlung gestiegen. Hinweise für eine Resistenzinduktion durch langfristige Anwendung von Sulforaphan wurden nicht gefunden. Konzentrations- und zeitabhängig kam es durch die Behandlung mit Sulforaphan zu einem erhöhten Expressionsniveau der CD44-Subtypen v4, v5 und v7.

Die Versuchsergebnisse ordnen sich in die bestehenden Erkenntnisse ein. Die genauen Abläufe und Zusammenhänge der Wirkmechanismen sind noch nicht ausreichend verstanden. Dennoch lässt sich festhalten, dass Sulforaphan auch beim Prostatakarzinom auf molekularer Ebene antikarzinogene Wirkmechanismen in Gang setzen kann. Daher besteht die Möglichkeit, dass Sulforaphan in der klinischen Praxis, sei es prophylaktisch oder therapeutisch, zur Anwendung kommen könnte. Weitere Studien, auch in klinischem Rahmen am Menschen, sind daher notwendig.

7 Summary

Sulforaphane is a natural substance found in cruciferous vegetables such as broccoli or cabbage. There are promising results for a number of tumor entities regarding the potential anti-carcinogenic effects of sulforaphane. The experiments designed for this study were performed on prostate carcinoma cells. The aim was to investigate the influence of sulforaphane on the growth behaviour of prostate cancer cells.

Designed as an in-vitro-model, prostate carcinoma cell lines DU145 and PC3 were used in the study. The experiments can be roughly divided into two categories:

- *Regulation of cell growth:* After the growth inhibitory effect of sulforaphane has been confirmed (MTT test), the proliferation rate (BrdU assay) and apoptosis rate (apoptosis assay) of the cells were measured under the influence of sulforaphane. Studies on clonogenic growth completed this series of experiments.
- *Regulation of the cell cycle:* After determining the impact of sulforaphane on the phases of the cell cycle (cell cycle assay), the cell cycle-relevant proteins of the cyclin-CDK-axis, the CDK inhibitors p19 and p27 as well as the acetylated histones aH3 and aH4 were analysed (Western Blot).

An additional MTT test was performed to determine a possible induction of resistance by long-term sulforaphane exposure. In addition, the expression profile of CD44 subtypes v4, v5 and v7 under the influence of sulforaphane has been investigated by FACS analysis.

The growth and proliferation rate as well as the clonogenic growth of the prostate carcinoma cells were shown to be inhibited under the influence of sulforaphane in a concentration-dependent manner. Induction of apoptosis has not occurred. The treatment with sulforaphane resulted in a concentration-dependent G2/M arrest of the cell cycle. The level of expression of cyclins A and B and of CDKs 1 and 2 has increased due to sulforaphane exposure. The level of expression of pCDKs has decreased except for a slight increase in pCDK 2 in the DU145 cell line. The CDK inhibitors p19 and p27 were elevated, except for a reduction of p27 in the PC3 cell line. The level of expression

of acetylated histones aH3 and aH4 has increased due to sulforaphane treatment. Indications for induction of resistance by long-term use of sulforaphane were not found. Treatment with sulforaphane resulted in an increased expression level of the CD44 subtypes v4, v5 and v7 in a concentration- and time-dependent manner.

The test results fit into the existing findings. The exact processes and relationships of the modes of action are not yet sufficiently understood. Nevertheless, it can be stated that sulforaphane can trigger anticarcinogenic mechanisms at the molecular level also in prostate cancer. Therefore, sulforaphane could eventually be used in clinical practice, whether prophylactically or therapeutically. Further studies, also in clinical settings on humans, are therefore necessary.

Literaturverzeichnis

1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H 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. Abgerufen von: PubMed; PMID 27918777. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688.
2. U.S. Cancer Statistics Working Group. U.S. Cancer Statistics Data Visualizations Tool [Internet]. Atlanta: U.S. Cancer Statistics Working Group; Juni 2018 [Letzter Zugriff: 07.03.2019]. Abgerufen von: <https://gis.cdc.gov/cancer/USCS/DataViz.html>.
3. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe [Internet]. Berlin: Robert Koch Institut; 2017 [Letzter Zugriff: 07.03.2019]. Abgerufen von: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile.
4. Bundesministerium für Gesundheit. Gesundheitsgefahren: Krebs [Internet]. Berlin: Bundesministerium für Gesundheit; Januar 2019 [Letzter Zugriff: 07.03.2019]. Abgerufen von: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/krebs.html>.
5. Robert Koch Institut. Krebs in Deutschland für 2013/2014: 3.19 Prostata. 11. Ausgabe [Internet]. Berlin: Robert Koch Institut; 2017 [Letzter Zugriff: 07.03.2019]. Abgerufen von: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c61_prostata.pdf?__blob=publicationFile.
6. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016; 388(10053):1459–544. Abgerufen von: PubMed; PMID 27733281. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1.
7. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF: Leitlinienprogramm Onkologie: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 5.0 [Internet]. Berlin: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF; April 2018 [Letzter Zugriff: 07.03.2019]. Abgerufen von: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostata_Kurzversion_5.0.pdf.
8. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int* 2003; 91(9):789–94. Abgerufen von: PubMed; PMID 12780833.
9. Zhou, Cindy Ke; Check, David P.; Lortet-Tieulent, Joannie; Laversanne, Mathieu; Jemal, Ahmedin; Ferlay, Jacques et al. (2016): Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group. In: *International journal of cancer* 138 (6), S. 1388–1400. Abgerufen in : PubMed; PMID 26488767. doi:10.1002/ijc.29894.

10. Gann PH. Risk factors for prostate cancer. *Rev Urol* 2002; 4 Suppl 5:S3-S10. Abgerufen in: PubMed; PMID 16986064.
11. Gregg JR, Zheng J, Lopez DS, Reichard C, Browman G, Chapin B et al. Diet quality and Gleason grade progression among localised prostate cancer patients on active surveillance. *Br J Cancer* 2019. Abgerufen in: PubMed; PMID 30679782. doi:10.1038/s41416-019-0380-2.
12. Hautmann R. *Urologie*. 4., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010. (Springer-Lehrbuch). 238-250 pp.
13. Edge SB, editor. AJCC cancer staging manual. 7. ed. [Internet]. New York: Springer; 2010. Abgerufen von: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%207th%20Ed%20Cancer%20Staging%20Manual.pdf> [Letzter Zugriff: 07.03.2019].
14. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 1966; 50(3):125–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 5948714.
15. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71:241–319. Abgerufen von: PubMed; PMID 9111868.
16. Prochazka L, Tesarik R, Turanek J. Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell Signal* 2014; 26(10):2234–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 25025570. doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.011.
17. Xu H, Tian Y, Yuan X, Wu H, Liu Q, Pestell RG et al. The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *Onco Targets Ther* 2015; 8:3783–92. Abgerufen von: PubMed; PMID 26719706. doi:10.2147/OTT.S95470.
18. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39(6):527–79. Abgerufen von: PubMed; PMID 12484499. doi:10.1080/10408360290795574.
19. Plattner H, Hentschel J. *Zellbiologie*. 3., komplett überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2006. 391-409 pp.
20. Müller-Esterl W. *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011. 483 p.
21. Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 2009; 28(33):2925–39. Abgerufen von: PubMed; PMID 19561645. doi:10.1038/onc.2009.170.
22. Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 2004; 116(2):235–46. Abgerufen von: PubMed; PMID 14744434.
23. Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 1995; 82(6):915–25. Abgerufen von: PubMed; PMID 7553852.
24. Macaluso M, Montanari M, Cinti C, Giordano A. Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin Oncol* 2005; 32(5):452–7. Abgerufen von: PubMed; PMID 16210085. doi: 10.1053/j.seminoncol.2005.07.009.

25. National Cancer Institute. Cancer Treatment: Complementary and Alternative Medicine [Internet]. Bethesda, MD (USA): National Cancer Institute; April 2015. [Letzter Zugriff: 07.03.2019]. Abgerufen von: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/cam>.
26. Deutsches Krebsforschungszentrum Krebsinformationsdienst: Alternative und komplementäre Methoden in der Krebstherapie: Ein Überblick [Internet]. Heidelberg: Deutsches Krebsforschungszentrum Krebsinformationsdienst; Juni 2018 [zuletzt überprüft: Januar 2019; Letzter Zugriff: 07.03.2019]. Abgerufen von: <https://www.krebsinformationsdienst.de/behandlung/unkonv-methoden-index.php>.
27. Gschwendtner KM, Klein G, Güthlin C, Holmberg C, Horneber M, Weis J. Bedeutung komplementärmedizinischer Verfahren bei Patienten mit Prostatakarzinom. *Urologe* 2014; 53(11):1600–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 25297489. doi:10.1007/s00120-014-3613-2.
28. Luo Q, Asher GN. Complementary and Alternative Medicine Use at a Comprehensive Cancer Center. *Integr Cancer Ther* 2017; 16(1):104–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 27151586. doi:10.1177/1534735416643384.
29. Mongiovi J, Shi Z, Greenlee H. Complementary and alternative medicine use and absenteeism among individuals with chronic disease. *BMC Complement Altern Med* 2016; 16:248. Abgerufen von: PubMed; PMID 27460643. doi:10.1186/s12906-016-1195-9.
30. Chen L, Michalsen A. Management of chronic pain using complementary and integrative medicine. *BMJ* 2017; 357:j1284. Abgerufen von: PubMed; PMID 28438745. doi:10.1136/bmj.j1284.
31. Horneber M, Bueschel G, Dennert G, Less D, Ritter E, Zwahlen M. How many cancer patients use complementary and alternative medicine: a systematic review and metaanalysis. *Integr Cancer Ther* 2012; 11(3):187–203. Abgerufen von: PubMed; PMID 22019489. doi:10.1177/1534735411423920.
32. Wortmann JK, Bremer A, Eich HT, Wortmann HPK, Schuster A, Fühner J et al. Use of complementary and alternative medicine by patients with cancer: a cross-sectional study at different points of cancer care. *Med Oncol* 2016; 33(7):78. Abgerufen von: PubMed; PMID 27300549. doi:10.1007/s12032-016-0790-4.
33. Hierl M, Pfirstinger J, Andreesen R, Holler E, Mayer S, Wolff D et al. Complementary and Alternative Medicine: A Clinical Study in 1,016 Hematology/Oncology Patients. *Oncology* 2017; 93(3):157–63. Abgerufen von: PubMed; PMID 28641281. doi:10.1159/000464248.
34. McDermott CL, Blough DK, Fedorenko CR, Arora NK, Zeliadt SB, Fairweather ME et al. Complementary and alternative medicine use among newly diagnosed prostate cancer patients. *Support Care Cancer* 2012; 20(1):65–73. Abgerufen von: PubMed; PMID 21120540. doi:10.1007/s00520-010-1055-y.
35. White MA, Verhoef MJ, Davison BJ, Gunn H, Cooke K. Seeking Mind, Body and Spirit Healing-Why Some Men with Prostate Cancer Choose CAM (Complementary and Alternative Medicine) over Conventional Cancer Treatments. *Integr Med Insights* 2008; 3:1–11. Abgerufen von: PubMed; PMID 21614154.

36. Eardley S, Bishop FL, Prescott P, Cardini F, Brinkhaus B, Santos-Rey K et al. A systematic literature review of complementary and alternative medicine prevalence in EU. *Forsch Komplementmed* 2012; 19 Suppl 2:18–28. Abgerufen von: PubMed; PMID 23883941. doi:10.1159/000342708.
37. Evans MA, Shaw ARG, Sharp DJ, Thompson EA, Falk S, Turton P et al. Men with cancer: is their use of complementary and alternative medicine a response to needs unmet by conventional care? *Eur J Cancer Care (Engl)* 2007; 16(6):517–25. Abgerufen von: PubMed; PMID 17944766. doi:10.1111/j.1365-2354.2007.00786.x.
38. Firkins R, Eisfeld H, Keinki C, Buentzel J, Hochhaus A, Schmidt T et al. The use of complementary and alternative medicine by patients in routine care and the risk of interactions. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018; 144(3):551–7. Abgerufen von: PubMed; PMID 29356888. doi:10.1007/s00432-018-2587-7.
39. Kua KP, Lee SWH. Complementary and alternative medicine for the treatment of bronchiolitis in infants: A systematic review. *PLoS ONE* 2017; 12(2):e0172289. Abgerufen von: PubMed; PMID 28212381. doi:10.1371/journal.pone.0172289.
40. Kantor M. The role of rigorous scientific evaluation in the use and practice of complementary and alternative medicine. *J Am Coll Radiol* 2009; 6(4):254–62. Abgerufen von: PubMed; PMID 19327658. doi:10.1016/j.jacr.2008.09.012.
41. Herr I, Lozanovski V, Houben P, Schemmer P, Büchler MW. Sulforaphane and related mustard oils in focus of cancer prevention and therapy. *Wien Med Wochenschr* 2013; 163(3-4):80–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 23224634. doi:10.1007/s10354-012-0163-3.
42. Schmid H, Karrer P. Synthese der racemischen und der optisch aktiven Formen des Sulforaphans. *Helvetica Chimica Acta* 1948; 31(6):1497-1505.
43. Prochazka Z. Isolation of sulforaphane from hoary cress. *Collet Czech Chem Commun* 1959; 24:2429-30.
44. Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(6):2399–403. Abgerufen von: PubMed; PMID 1549603.
45. Fahey JW, Talalay P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol* 1999; 37(9-10):973–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 10541453.
46. Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH, Talalay P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(8):3147–50. Abgerufen von: PubMed; PMID 8159717.
47. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, Rimm EB, Willett WC, Giovannucci EL. Fruit and vegetable intake and incidence of bladder cancer in a male prospective cohort. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(7):605–13. Abgerufen von: PubMed; PMID 10203279.
48. Tang L, Zirpoli GR, Guru K, Moysich KB, Zhang Y, Ambrosone CB et al. Consumption of raw cruciferous vegetables is inversely associated with bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(4):938–44. Abgerufen von: PubMed; PMID 18398034. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-2502.

49. Myzak MC, Dashwood RH. Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1. *Cancer Lett* 2006; 233(2):208–18. Abgerufen von: PubMed; PMID 16520150. doi:10.1016/j.canlet.2005.02.033.
50. Russo M, Spagnuolo C, Russo GL, Skalicka-Woźniak K, Daglia M, Sobarzo-Sánchez E et al. Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2018; 58(8):1391–405. Abgerufen von: PubMed; PMID 28001083. doi:10.1080/10408398.2016.1259983.
51. Juengel E, Erb HHH, Haferkamp A, Rutz J, Chun FK-H, Blaheta RA. Relevance of the natural HDAC inhibitor sulforaphane as a chemopreventive agent in urologic tumors. *Cancer Lett* 2018; 435:121–6. Abgerufen von: PubMed; PMID 30026053. doi:10.1016/j.canlet.2018.07.017.
52. Li Y, Wicha MS, Schwartz SJ, Sun D. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. *J Nutr Biochem* 2011; 22(9):799–806. Abgerufen von: PubMed; PMID 21295962. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.11.001.
53. Myzak MC, Dashwood WM, Orner GA, Ho E, Dashwood RH. Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in Apc-minus mice. *FASEB J* 2006; 20(3):506–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 16407454. doi:10.1096/fj.05-4785fje.
54. Saha K, Fisher ML, Adhikary G, Grun D, Eckert RL. Sulforaphane suppresses PRMT5/MEP50 function in epidermal squamous cell carcinoma leading to reduced tumor formation. *Carcinogenesis* 2017; 38(8):827–36. Abgerufen von: PubMed; PMID 28854561. doi:10.1093/carcin/bgx044.
55. Li Y, Zhang T, Korkaya H, Liu S, Lee H-F, Newman B et al. Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2010; 16(9):2580–90. Abgerufen von: PubMed; PMID 20388854. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2937.
56. Beaver LM, Kuintzle R, Buchanan A, Wiley MW, Glasser ST, Wong CP et al. Long noncoding RNAs and sulforaphane: a target for chemoprevention and suppression of prostate cancer. *J Nutr Biochem* 2017; 42:72–83. Abgerufen von: PubMed; PMID 28131897. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.01.001.
57. Alumkal JJ, Slottke R, Schwartzman J, Cherala G, Munar M, Graff JN et al. A phase II study of sulforaphane-rich broccoli sprout extracts in men with recurrent prostate cancer. *Invest New Drugs* 2015; 33(2):480–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 25431127. doi:10.1007/s10637-014-0189-z.
58. Anand P, Kunnumakkara AB, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* 2008; 25(9):2097–116. Abgerufen von: PubMed; PMID 18626751. doi:10.1007/s11095-008-9661-9.
59. Myzak MC, Tong P, Dashwood W-M, Dashwood RH, Ho E. Sulforaphane retards the growth of human PC-3 xenografts and inhibits HDAC activity in human subjects. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232(2):227–34. Abgerufen von: PubMed; PMID 17259330.

60. Martin SL, Kala R, Tollefsbol TO. Mechanisms for the Inhibition of Colon Cancer Cells by Sulforaphane through Epigenetic Modulation of MicroRNA-21 and Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Down-regulation. *Curr Cancer Drug Targets* 2018; 18(1):97–106. Abgerufen von: PubMed; PMID 28176652. doi:10.2174/1568009617666170206104032.
61. Jiang L-L, Zhou S-J, Zhang X-M, Chen H-Q, Liu W. Sulforaphane suppresses in vitro and in vivo lung tumorigenesis through downregulation of HDAC activity. *Biomed Pharmacother* 2016; 78:74–80. Abgerufen von: PubMed; PMID 26898427. doi:10.1016/j.biopha.2015.11.007.
62. Shapiro TA, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Stephenson KK, Wade KL et al. Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr Cancer* 2006; 55(1):53–62. Abgerufen von: PubMed; PMID 16965241. doi:10.1207/s15327914nc5501_7.
63. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293(5532):1074–80. Abgerufen von: PubMed; PMID 11498575. doi:10.1126/science.1063127.
64. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403(6765):41–5. Abgerufen von: PubMed; PMID 10638745. doi:10.1038/47412.
65. Marks PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res* 2004; 91:137–68. Abgerufen von: PubMed; PMID 15327890. doi:10.1016/S0065-230X(04)91004-4.
66. Olzscha H, Bekheet ME, Sheikh S, La Thangue NB. HDAC Inhibitors. *Methods Mol Biol* 2016; 1436:281–303. Abgerufen von: PubMed; PMID 27246222. doi:10.1007/978-1-4939-3667-0_19.
67. Garcia-Manero G, Issa J-P. Histone deacetylase inhibitors: a review of their clinical status as antineoplastic agents. *Cancer Invest* 2005; 23(7):635–42. Abgerufen von: PubMed; PMID 16305991. doi:10.1080/07357900500283119.
68. Losson H, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Natural Compound Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi): Synergy with Inflammatory Signaling Pathway Modulators and Clinical Applications in Cancer. *Molecules* 2016; 21(11). Abgerufen von: PubMed; PMID 27886118. doi:10.3390/molecules21111608.
69. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci* 2017; 18(7). Abgerufen von: PubMed; PMID 28671573. doi:10.3390/ijms18071414.
70. Secrist JP, Zhou X, Richon VM. HDAC inhibitors for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 2003; 4(12):1422–7. Abgerufen von: PubMed; PMID 14763127.
71. Lakshmaiah KC, Jacob LA, Aparna S, Lokanatha D, Saldanha SC. Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(3):469–78. Abgerufen von: PubMed; PMID 25313724. doi:10.4103/0973-1482.137937.
72. Ozawa A, Tanji N, Kikugawa T, Sasaki T, Yanagihara Y, Miura N et al. Inhibition of bladder tumour growth by histone deacetylase inhibitor. *BJU Int* 2010; 105(8):1181–6. Abgerufen von: PubMed; PMID 19681894. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08795.x.

73. Wilson AJ, Byun D-S, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y et al. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem* 2006; 281(19):13548–58. Abgerufen von: PubMed; PMID 16533812. doi:10.1074/jbc.M510023200.
74. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K et al. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 94(1):11–6. Abgerufen von: PubMed; PMID 16172792. doi:10.1007/s10549-005-6001-1.
75. Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 2004; 59(2):177–89. Abgerufen von: PubMed; PMID 15042618. doi:10.1002/pros.20022.
76. Wang L, Zou X, Berger AD, Twiss C, Peng Y, Li Y et al. Increased expression of histone deacetylases (HDACs) and inhibition of prostate cancer growth and invasion by HDAC inhibitor SAHA. *Am J Transl Res* 2009; 1(1):62–71. Abgerufen von: PubMed; PMID 19966939.
77. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(3):194–202. Abgerufen von: PubMed; PMID 11902574. doi:10.1038/35106079.
78. Sharma NL, Groselj B, Hamdy FC, Kiltie AE. The emerging role of histone deacetylase (HDAC) inhibitors in urological cancers. *BJU Int* 2013; 111(4):537–42. Abgerufen von: PubMed; PMID 23551441. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11647.x.
79. Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. Targeting Histone Deacetylases with Natural and Synthetic Agents: An Emerging Anticancer Strategy. *Nutrients* 2018; 10(6). Abgerufen von: PubMed; PMID 29882797. doi:10.3390/nu10060731.
80. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(4):287–99. Abgerufen von: PubMed; PMID 12120280. doi:10.1038/nrd772.
81. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol* 2009; 27(32):5459–68. Abgerufen von: PubMed; PMID 19826124. doi:10.1200/JCO.2009.22.1291.
82. Clarke JD, Hsu A, Yu Z, Dashwood RH, Ho E. Differential effects of sulforaphane on histone deacetylases, cell cycle arrest and apoptosis in normal prostate cells versus hyperplastic and cancerous prostate cells. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55(7):999–1009. Abgerufen von: PubMed; PMID 21374800. doi:10.1002/mnfr.201000547.
83. Briones-Herrera A, Eugenio-Pérez D, Reyes-Ocampo JG, Rivera-Mancía S, Pedraza-Chaverri J. New highlights on the health-improving effects of sulforaphane. *Food Funct* 2018; 9(5):2589–606. Abgerufen von: PubMed; PMID 29701207. doi:10.1039/c8fo00018b.
84. Kelly WK, Marks PA. Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2(3):150–7. Abgerufen von: PubMed; PMID 16264908. doi:10.1038/ncponc0106.

85. Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* 2008; 269(1):7–17. Abgerufen von: PubMed; PMID 18462867. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.037.
86. Arnold NB, Arkus N, Gunn J, Korc M. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces growth inhibition and enhances gemcitabine-induced cell death in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13(1):18–26. Abgerufen von: PubMed; PMID 17200334. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0914.
87. Sonnemann J, Kumar KS, Heesch S, Müller C, Hartwig C, Maass M et al. Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells. *Int J Oncol* 2006; 28(3):755–66. Abgerufen von: PubMed; PMID 16465382.
88. Pei Y, Wu B, Cao Q, Wu L, Yang G. Hydrogen sulfide mediates the anti-survival effect of sulforaphane on human prostate cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 257(3):420–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 22005276. doi:10.1016/j.taap.2011.09.026.
89. Hsu Y-C, Chang S-J, Wang M-Y, Chen Y-L, Huang T-Y. Growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells through ROS-independent MEK/ERK activation by sulforaphane. *Cell Biochem Biophys* 2013; 66(3):765–74. Abgerufen von: PubMed; PMID 23417518. doi:10.1007/s12013-013-9522-y.
90. Kim BG, Fujita T, Stankovic KM, Welling DB, Moon IS, Choi JY et al. Sulforaphane, a natural component of broccoli, inhibits vestibular schwannoma growth in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2016; 6:36215. Abgerufen von: PubMed; PMID 27805058. doi:10.1038/srep36215.
91. Rizzo VL, Levine CB, Wakshlag JJ. The effects of sulforaphane on canine osteosarcoma proliferation and invasion. *Vet Comp Oncol* 2017; 15(3):718–30. Abgerufen von: Pubmed; PMID 27045198. doi:10.1111/vco.12212.
92. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforaphane: translational research from laboratory bench to clinic. *Nutr Rev* 2013; 71(11):709–26. Abgerufen von: PubMed; PMID 24147970. doi:10.1111/nure.12060.
93. Bergantin E, Quarta C, Nanni C, Fanti S, Pession A, Cantelli-Forti G et al. Sulforaphane induces apoptosis in rhabdomyosarcoma and restores TRAIL-sensitivity in the aggressive alveolar subtype leading to tumor elimination in mice. *Cancer Biol Ther* 2014; 15(9):1219–25. Abgerufen von: PubMed; PMID 24971463. doi:10.4161/cbt.29684.
94. Cipolla BG, Mandron E, Lefort JM, Coadou Y, Della Negra E, Corbel L et al. Effect of Sulforaphane in Men with Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. *Cancer Prev Res (Phila)* 2015; 8(8):712–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 25968598. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0459.
95. Zhou Y, Yang G, Tian H, Hu Y, Wu S, Geng Y et al. Sulforaphane metabolites cause apoptosis via microtubule disruption in cancer. *Endocr Relat Cancer* 2018; 25(3):255–68. Abgerufen von: PubMed; PMID 29431641. doi:10.1530/ERC-17-0483.

96. Chung Y-K, Chi-Hung Or R, Lu C-H, Ouyang W-T, Yang S-Y, Chang C-C. Sulforaphane down-regulates SKP2 to stabilize p27(KIP1) for inducing antiproliferation in human colon adenocarcinoma cells. *J Biosci Bioeng* 2015; 119(1):35–42. Abgerufen von: PubMed; PMID 25070589. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.06.009.
97. Abbaoui B, Riedl KM, Ralston RA, Thomas-Ahner JM, Schwartz SJ, Clinton SK et al. Inhibition of bladder cancer by broccoli isothiocyanates sulforaphane and erucin: characterization, metabolism, and interconversion. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56(11):1675–87. Abgerufen von: PubMed; PMID 23038615. doi:10.1002/mnfr.201200276.
98. Jo GH, Kim G-Y, Kim W-J, Park KY, Choi YH. Sulforaphane induces apoptosis in T24 human urinary bladder cancer cells through a reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway: the involvement of endoplasmic reticulum stress and the Nrf2 signaling pathway. *Int J Oncol* 2014; 45(4):1497–506. Abgerufen von: PubMed; PMID 24993616. doi:10.3892/ijo.2014.2536.
99. Choi S, Lew KL, Xiao H, Herman-Antosiewicz A, Xiao D, Brown CK et al. D,L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibitor of apoptosis family proteins and Apaf-1. *Carcinogenesis* 2007; 28(1):151–62. Abgerufen von: PubMed; PMID 16920735. doi:10.1093/carcin/bgl144.
100. Singh AV, Xiao D, Lew KL, Dhir R, Singh SV. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis* 2004; 25(1):83–90. Abgerufen von: PubMed; PMID 14514658. doi:10.1093/carcin/bgg178.
101. Singh SV, Srivastava SK, Choi S, Lew KL, Antosiewicz J, Xiao D et al. Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2005; 280(20):19911–24. Abgerufen von: PubMed; PMID 15764812. doi:10.1074/jbc.M412443200.
102. Kim M-R, Zhou L, Park B-H, Kim JR. Induction of G₂/M arrest and apoptosis by sulforaphane in human osteosarcoma U2-OS cells. *Mol Med Rep* 2011; 4(5):929–34. Abgerufen von: PubMed; PMID 21720717. doi:10.3892/mmr.2011.520.
103. Arcidiacono P, Ragonese F, Stabile A, Pistilli A, Kuligina E, Rende M et al. Antitumor activity and expression profiles of genes induced by sulforaphane in human melanoma cells. *Eur J Nutr* 2018; 57(7):2547–69. Abgerufen von: PubMed; PMID 28864908. doi:10.1007/s00394-017-1527-7.
104. Choi YH. ROS-mediated activation of AMPK plays a critical role in sulforaphane-induced apoptosis and mitotic arrest in AGS human gastric cancer cells. *Gen Physiol Biophys* 2018; 37(2):129–40. Abgerufen von: PubMed; PMID 29593120. doi:10.4149/gpb_2017026.
105. Lin K, Yang R, Zheng Z, Zhou Y, Geng Y, Hu Y et al. Sulforaphane-cysteine-induced apoptosis via phosphorylated ERK1/2-mediated maspin pathway in human non-small cell lung cancer cells. *Cell Death Discov* 2017; 3:17025. Abgerufen von: PubMed; PMID 28690874. doi:10.1038/cddiscovery.2017.25.

106. Walters DK, Muff R, Langsam B, Born W, Fuchs B. Cytotoxic effects of curcumin on osteosarcoma cell lines. *Invest New Drugs* 2008; 26(4):289–97. Abgerufen von: PubMed; PMID 18071634. doi:10.1007/s10637-007-9099-7.
107. Zanichelli F, Capasso S, Cipollaro M, Pagnotta E, Carteni M, Casale F et al. Dose-dependent effects of R-sulforaphane isothiocyanate on the biology of human mesenchymal stem cells, at dietary amounts, it promotes cell proliferation and reduces senescence and apoptosis, while at anti-cancer drug doses, it has a cytotoxic effect. *Age (Dordr)* 2012; 34(2):281–93. Abgerufen von: PubMed; PMID 21465338. doi:10.1007/s11357-011-9231-7.
108. Herman-Antosiewicz A, Xiao H, Lew KL, Singh SV. Induction of p21 protein protects against sulforaphane-induced mitotic arrest in LNCaP human prostate cancer cell line. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(5):1673–81. Abgerufen von: PubMed; PMID 17513615. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0807.
109. Childs BG, Baker DJ, Kirkland JL, Campisi J, van Deursen JM. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep* 2014; 15(11):1139–53. Abgerufen von: PubMed; PMID 25312810. doi:10.15252/embr.201439245.
110. Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Deregowska A, Wnuk M. Sulforaphane-Induced Cell Cycle Arrest and Senescence are accompanied by DNA Hypomethylation and Changes in microRNA Profile in Breast Cancer Cells. *Theranostics* 2017; 7(14):3461–77. Abgerufen von: PubMed; PMID 28912888. doi:10.7150/thno.20657.
111. Singh SV, Herman-Antosiewicz A, Singh AV, Lew KL, Srivastava SK, Kamath R et al. Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J Biol Chem* 2004; 279(24):25813–22. Abgerufen von: PubMed; PMID 15073169. doi:10.1074/jbc.M313538200.
112. Hoyt MA, Totis L, Roberts BT. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 1991; 66(3):507–17. Abgerufen von: PubMed; PMID 1651171.
113. Hu Y, Zhou Y, Yang G, Wang Y, Zheng Z, Li J et al. Sulforaphane-N-Acetyl-Cysteine inhibited autophagy leading to apoptosis via Hsp70-mediated microtubule disruption. *Cancer Lett* 2018; 431:85–95. Abgerufen von: PubMed; PMID 29807114. doi:10.1016/j.canlet.2018.05.035.
114. Pappa G, Bartsch H, Gerhäuser C. Biphasic modulation of cell proliferation by sulforaphane at physiologically relevant exposure times in a human colon cancer cell line. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51(8):977–84. Abgerufen von: PubMed; PMID 17628879. doi:10.1002/mnfr.200700115.
115. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57–70. Abgerufen von: PubMed; PMID 10647931.
116. Liu K-C, Shih T-Y, Kuo C-L, Ma Y-S, Yang J-L, Wu P-P et al. Sulforaphane Induces Cell Death Through G2/M Phase Arrest and Triggers Apoptosis in HCT 116 Human Colon Cancer Cells. *Am J Chin Med* 2016; 44(6):1289–310. Abgerufen von: PubMed; PMID 27627923. doi:10.1142/S0192415X16500725.

117. Singh RP, Dhanalakshmi S, Agarwal R. Phytochemicals as cell cycle modulators--a less toxic approach in halting human cancers. *Cell Cycle* 2002; 1(3):156–61. Abgerufen von: PubMed; PMID 12429925.
118. Gamet-Payrastre L, Li P, Lumeau S, Cassar G, Dupont MA, Chevolleau S et al. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60(5):1426–33. Abgerufen von: PubMed; PMID 10728709.
119. Pledge-Tracy A, Sobolewski MD, Davidson NE. Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(3):1013–21. Abgerufen von: PubMed; PMID 17339367. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0494.
120. Chien WW, Domenech C, Catallo R, Salles G, Ffrench M. S-phase lengthening induced by p16(INK4a) overexpression in malignant cells with wild-type pRb and p53. *Cell Cycle* 2010; 9(16):3286–96. Abgerufen von: PubMed; PMID 20703084. doi:10.4161/cc.9.16.12600.
121. Møller MB. P27 in cell cycle control and cancer. *Leuk Lymphoma* 2000; 39(1-2):19–27. Abgerufen von: PubMed; PMID 10975380. doi:10.3109/10428190009053535.
122. Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N et al. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(3):542–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 9458103.
123. Cote RJ, Shi Y, Groshen S, Feng AC, Cordon-Cardo C, Skinner D et al. Association of p27Kip1 levels with recurrence and survival in patients with stage C prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(12):916–20. Abgerufen von: PubMed; PMID 9637141.
124. Cordon-Cardo C, Koff A, Drobnjak M, Capodieci P, Osman I, Millard SS et al. Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(17):1284–91. Abgerufen von: PubMed; PMID 9731735.
125. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF et al. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 1997; 3(2):231–4. Abgerufen von: PubMed; PMID 9018245.
126. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C et al. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 1997; 3(2):227–30. Abgerufen von: PubMed; PMID 9018244.
127. Singh SP, Lipman J, Goldman H, Ellis FH, Aizenman L, Cangi MG et al. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(8):1730–5. Abgerufen von: PubMed; PMID 9563491.

128. Catzavelos C, Tsao MS, DeBoer G, Bhattacharya N, Shepherd FA, Slingerland JM. Reduced expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in non-small cell lung carcinoma: a prognostic factor independent of Ras. *Cancer Res* 1999; 59(3):684–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 9973218.
129. Besson A, Hwang HC, Cicero S, Donovan SL, Gurian-West M, Johnson D et al. Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev* 2007; 21(14):1731–46. Abgerufen von: PubMed; PMID 17626791. doi:10.1101/gad.1556607.
130. Abukhdeir AM, Park BH. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 2008; 10:e19. Abgerufen von: PubMed; PMID 18590585. doi:10.1017/S1462399408000744.
131. Kossatz U, Malek NP. p27: tumor suppressor and oncogene ...? *Cell Res* 2007; 17(10):832–3. Abgerufen von: PubMed; PMID 17934492. doi:10.1038/cr.2007.86.
132. Sáez A, Sánchez E, Sánchez-Beato M, Cruz MA, Chacón I, Muñoz E et al. p27KIP1 is abnormally expressed in Diffuse Large B-cell Lymphomas and is associated with an adverse clinical outcome. *Br J Cancer* 1999; 80(9):1427–34. Abgerufen von: PubMed; PMID 10424746. doi:10.1038/sj.bjc.6690539.
133. Vrhovac R, Delmer A, Tang R, Marie JP, Zittoun R, Ajchenbaum-Cymbalista F. Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 91(12):4694–700. Abgerufen von: PubMed; PMID 9616167.
134. Juengel E, Euler S, Maxeiner S, Rutz J, Justin S, Roos F et al. Sulforaphane as an adjunctive to everolimus counteracts everolimus resistance in renal cancer cell lines. *Phytomedicine* 2017; 27:1–7. Abgerufen von: PubMed; PMID 28314474. doi:10.1016/j.phymed.2017.01.016.
135. Myzak MC, Karplus PA, Chung F-L, Dashwood RH. A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibition of histone deacetylase. *Cancer Res* 2004; 64(16):5767–74. Abgerufen von: PubMed; PMID 15313918. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1326.
136. Myzak MC, Hardin K, Wang R, Dashwood RH, Ho E. Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells. *Carcinogenesis* 2006; 27(4):811–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 16280330. doi:10.1093/carcin/bgi265.
137. Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(9):863–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 19168116. doi:10.1016/j.bbagen.2008.12.006.
138. Biterge B, Schneider R. Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res* 2014; 356(3):457–66. Abgerufen von: PubMed; PMID 24781148. doi:10.1007/s00441-014-1862-4.
139. Myzak MC, Dashwood RH. Histone deacetylases as targets for dietary cancer preventive agents: lessons learned with butyrate, diallyl disulfide, and sulforaphane. *Curr Drug Targets* 2006; 7(4):443–52. Abgerufen von: PubMed; PMID 16611031.

140. Abbas A, Hall JA, Patterson WL, Ho E, Hsu A, Al-Mulla F et al. Sulforaphane modulates telomerase activity via epigenetic regulation in prostate cancer cell lines. *Biochem Cell Biol* 2016; 94(1):71–81. Abgerufen von: PubMed; PMID 26458818. doi:10.1139/bcb-2015-0038.
141. Wang C, Chen J, Cao W, Sun L, Sun H, Liu Y. Aurora-B and HDAC synergistically regulate survival and proliferation of lymphoma cell via AKT, mTOR and Notch pathways. *Eur J Pharmacol* 2016; 779:1–7. Abgerufen von: PubMed; PMID 26638998. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.049.
142. Makarević J, Tawanaie N, Juengel E, Reiter M, Mani J, Tsaur I et al. Cross-communication between histone H3 and H4 acetylation and Akt-mTOR signalling in prostate cancer cells. *J Cell Mol Med* 2014; 18(7):1460–6. Abgerufen von: PubMed; PMID 24779401. doi:10.1111/jcmm.12299.
143. Chen C-S, Weng S-C, Tseng P-H, Lin H-P, Chen C-S. Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem* 2005; 280(46):38879–87. Abgerufen von: PubMed; PMID 16186112. doi:10.1074/jbc.M505733200.
144. Ellis L, Ku SY, Ramakrishnan S, Lasorsa E, Azabdaftari G, Godoy A et al. Combinatorial antitumor effect of HDAC and the PI3K-Akt-mTOR pathway inhibition in a Pten deficient model of prostate cancer. *Oncotarget* 2013; 4(12):2225–36. Abgerufen von: PubMed; PMID 24163230. doi:10.18632/oncotarget.1314.
145. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(1):33–45. Abgerufen von: PubMed; PMID 12511867. doi:10.1038/nrm1004.
146. Fang D, Kitamura H. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition in urothelial carcinoma: Possible pathways and potential therapeutic approaches. *Int J Urol* 2018; 25(1):7–17. Abgerufen von: PubMed; PMID 28697535. doi:10.1111/iju.13404.
147. Orian-Rousseau V, Ponta H. Perspectives of CD44 targeting therapies. *Arch Toxicol* 2015; 89(1):3–14. Abgerufen von: PubMed; PMID 25472903. doi:10.1007/s00204-014-1424-2.
148. Li X-D, Ji M, Wu J, Jiang J-T, Wu C-P. Clinical significance of CD44 variants expression in colorectal cancer. *Tumori* 2013; 99(1):88–92. Abgerufen von: PubMed; PMID 23549006. doi:10.1700/1248.13794.
149. Ma L, Dong L, Chang P. CD44v6 engages in colorectal cancer progression. *Cell Death Dis* 2019; 10(1):30. Abgerufen von: PubMed; PMID 30631039. doi:10.1038/s41419-018-1265-7.
150. Döme B, Somlai B, Ladányi A, Fazekas K, Zöller M, Tímár J. Expression of CD44v3 splice variant is associated with the visceral metastatic phenotype of human melanoma. *Virchows Arch* 2001; 439(5):628–35. Abgerufen von: PubMed; PMID 11764382.
151. Li Z, Chen K, Jiang P, Zhang X, Li X, Li Z. CD44v/CD44s expression patterns are associated with the survival of pancreatic carcinoma patients. *Diagn Pathol* 2014; 9:79. Abgerufen von: PubMed; PMID 24708709. doi:10.1186/1746-1596-9-79.

152. Zhao S, He J-L, Qiu Z-X, Chen N-Y, Luo Z, Chen B-J et al. Prognostic value of CD44 variant exon 6 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(16):6761–6. Abgerufen von: PubMed; PMID 25169522.
153. Hu B, Ma Y, Yang Y, Zhang L, Han H, Chen J. CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* 2018; 15(4):5627–33. Abgerufen von: PubMed; PMID 29552200. doi:10.3892/ol.2018.8051.
154. Kanke M, Fujii M, Kameyama K, Kanzaki J, Tokumaru Y, Imanishi Y et al. Clinicopathological significance of expression of CD44 variants in head and neck squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91(4):410–5. Abgerufen von: PubMed; PMID 10804289.
155. Sato S, Miyauchi M, Takekoshi T, Zhao M, Kudo Y, Ogawa I et al. Reduced expression of CD44 variant 9 is related to lymph node metastasis and poor survival in squamous cell carcinoma of tongue. *Oral Oncol* 2000; 36(6):545–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 11036249.
156. Diaz LK, Zhou X, Wright ET, Cristofanilli M, Smith T, Yang Y et al. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9):3309–14. Abgerufen von: PubMed; PMID 15867228. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2184.
157. Hema K, Rao K, Devi HU, Priya N, Smitha T, Sheethal H. Immunohistochemical study of CD44s expression in oral squamous cell carcinoma-its correlation with prognostic parameters. *J Oral Maxillofac Pathol* 2014; 18(2):162–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 25328293. doi:10.4103/0973-029X.140722.
158. Mao M, Zheng X, Jin B, Zhang F, Zhu L, Cui L. Effects of CD44 and E-cadherin overexpression on the proliferation, adhesion and invasion of ovarian cancer cells. *Exp Ther Med* 2017; 14(6):5557–63. Abgerufen von: PubMed; PMID 29285092. doi:10.3892/etm.2017.5259.
159. Sillanpää S, Anttila MA, Voutilainen K, Tammi RH, Tammi MI, Saarikoski SV et al. CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(14):5318–24. Abgerufen von: PubMed; PMID 14614016.
160. Sosulski A, Horn H, Zhang L, Coletti C, Vathipadiekal V, Castro CM et al. CD44 Splice Variant v8-10 as a Marker of Serous Ovarian Cancer Prognosis. *PLoS ONE* 2016; 11(6):e0156595. Abgerufen von: PubMed; PMID 27253518. doi:10.1371/journal.pone.0156595.
161. Ryś J, Kruczak A, Lackowska B, Jaszcz-Gruchała A, Brandys A, Stelmach A et al. The role of CD44v3 expression in female breast carcinomas. *Pol J Pathol* 2003; 54(4):243–7. Abgerufen von: PubMed; PMID 14998292.
162. Olsson E, Honeth G, Bendahl P-O, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringnér M et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer* 2011; 11:418. Abgerufen von: PubMed; PMID 21957977. doi:10.1186/1471-2407-11-418.

163. Mayr L, Pirker C, Lötsch D, van Schoonhoven S, Windhager R, Englinger B et al. CD44 drives aggressiveness and chemoresistance of a metastatic human osteosarcoma xenograft model. *Oncotarget* 2017; 8(69):114095–108. Abgerufen von: PubMed; PMID 29371972. doi:10.18632/oncotarget.23125.
164. Gvozdenovic A, Arlt MJE, Campanile C, Brennecke P, Husmann K, Born W et al. Silencing of CD44 gene expression in human 143-B osteosarcoma cells promotes metastasis of intratibial tumors in SCID mice. *PLoS ONE* 2013; 8(4):e60329. Abgerufen von: PubMed; PMID 23565227. doi:10.1371/journal.pone.0060329.
165. Ni J, Cozzi PJ, Hao JL, Beretov J, Chang L, Duan W et al. CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. *Prostate* 2014; 74(6):602–17. Abgerufen von: Pubmed; PMID 24615685. doi:10.1002/pros.22775.
166. Peng X, Zhou Y, Tian H, Yang G, Li C, Geng Y et al. Sulforaphane inhibits invasion by phosphorylating ERK1/2 to regulate E-cadherin and CD44v6 in human prostate cancer DU145 cells. *Oncol Rep* 2015; 34(3):1565–72. Abgerufen von: PubMed; PMID 26134113. doi:10.3892/or.2015.4098.
167. Chen Y, Song J, Jiang Y, Yu C, Ma Z. Predictive value of CD44 and CD24 for prognosis and chemotherapy response in invasive breast ductal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(9):11287–95. Abgerufen von: PubMed; PMID 26617852.
168. Ahmed MAH, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZA, Benhasouna A, Nolan C et al. A CD44⁻/CD24⁺ phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133(3):979–95. Abgerufen von: PubMed; PMID 22119938. doi:10.1007/s10549-011-1865-8.
169. Börjesson PKE, Postema EJ, Roos JC, Colnot DR, Marres HAM, van Schie MH et al. Phase I therapy study with (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(10 Pt 2):3961S-72S. Abgerufen von: PubMed; PMID 14506195.
170. Fan P, Zhang Y, Liu L, Zhao Z, Yin Y, Xiao X et al. Continuous exposure of pancreatic cancer cells to dietary bioactive agents does not induce drug resistance unlike chemotherapy. *Cell Death Dis* 2016; 7(6):e2246. Abgerufen von: PubMed; PMID 27253410. doi:10.1038/cddis.2016.157.
171. Kaczyńska A, Herman-Antosiewicz A. Combination of lapatinib with isothiocyanates overcomes drug resistance and inhibits migration of HER2 positive breast cancer cells. *Breast Cancer* 2017; 24(2):271–80. Abgerufen von: PubMed; PMID 27154770. doi:10.1007/s12282-016-0700-9.
172. Lan F, Yang Y, Han J, Wu Q, Yu H, Yue X. Sulforaphane reverses chemo-resistance to temozolomide in glioblastoma cells by NF-κB-dependent pathway downregulating MGMT expression. *Int J Oncol* 2016; 48(2):559–68. Abgerufen von: PubMed; PMID 26648123. doi:10.3892/ijco.2015.3271.
173. Wang F, Wang W, Li J, Zhang J, Wang X, Wang M. Sulforaphane reverses gefitinib tolerance in human lung cancer cells via modulation of sonic hedgehog signaling. *Oncol Lett* 2018; 15(1):109–14. Abgerufen von: PubMed; PMID 29285189. doi:10.3892/ol.2017.7293.

174. Li Q-Q, Xie Y-K, Wu Y, Li L-L, Liu Y, Miao X-B et al. Sulforaphane inhibits cancer stem-like cell properties and cisplatin resistance through miR-214-mediated downregulation of c-MYC in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8(7):12067–80. Abgerufen von: PubMed; PMID 28076844. doi:10.18632/oncotarget.14512.
175. Wang Y, Zhou Y, Zheng Z, Li J, Yan Y, Wu W. Sulforaphane metabolites reduce resistance to paclitaxel via microtubule disruption. *Cell Death Dis* 2018; 9(11):1134. Abgerufen von: PubMed; PMID 30429459. doi:10.1038/s41419-018-1174-9.
176. Račkauskas R, Zhou D, Ūselis S, Strupas K, Herr I, Schemmer P. Sulforaphane sensitizes human cholangiocarcinoma to cisplatin via the downregulation of anti-apoptotic proteins. *Oncol Rep* 2017; 37(6):3660–6. Abgerufen von: PubMed; PMID 28498473. doi:10.3892/or.2017.5622.
177. Tsaour I, Makarević J, Hudak L, Juengel E, Kurosch M, Wiesner C et al. The cdk1-cyclin B complex is involved in everolimus triggered resistance in the PC3 prostate cancer cell line. *Cancer Lett* 2011; 313(1):84–90. Abgerufen von: PubMed; PMID 21925791. doi:10.1016/j.canlet.2011.08.026.
178. Yang Y, Lu Y, Wang L, Mizokami A, Keller ET, Zhang J et al. Skp2 is associated with paclitaxel resistance in prostate cancer cells. *Oncol Rep* 2016; 36(1):559–66. Abgerufen von: PubMed; PMID 27175797. doi:10.3892/or.2016.4809.
179. Byun WS, Jin M, Yu J, Kim WK, Song J, Chung H-J et al. A novel selenonucleoside suppresses tumor growth by targeting Skp2 degradation in paclitaxel-resistant prostate cancer. *Biochem Pharmacol* 2018; 158:84–94. Abgerufen von: PubMed; PMID 30292755. doi:10.1016/j.bcp.2018.10.002.
180. Frame FM, Pellacani D, Collins AT, Simms MS, Mann VM, Jones GDD et al. HDAC inhibitor confers radiosensitivity to prostate stem-like cells. *Br J Cancer* 2013; 109(12):3023–33. Abgerufen von: PubMed; PMID 24220693. doi:10.1038/bjc.2013.691.
181. Hu R, Hebbar V, Kim B-R, Chen C, Winnik B, Buckley B et al. In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310(1):263–71. Abgerufen von: PubMed; PMID 14988420. doi:10.1124/jpet.103.064261.
182. Ye L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, Zhang Y, Shapiro TA, Talalay P. Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta* 2002; 316(1-2):43–53. Abgerufen von: PubMed; PMID 11750273.
183. Saha S, Hollands W, Teucher B, Needs PW, Narbad A, Ortori CA et al. Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56(12):1906–16. Abgerufen von: PubMed; PMID 23109475. doi:10.1002/mnfr.201200225.
184. Kallifatidis G, Rausch V, Baumann B, Apel A, Beckermann BM, Groth A et al. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signalling. *Gut* 2009; 58(7):949–63. Abgerufen von: PubMed; PMID 18829980. doi:10.1136/gut.2008.149039.

185. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 22(3):659–61. Abgerufen von: PubMed; PMID 17942826. doi:10.1096/fj.07-9574LSF.
186. Clarke JD, Hsu A, Williams DE, Dashwood RH, Stevens JF, Yamamoto M et al. Metabolism and tissue distribution of sulforaphane in Nrf2 knockout and wild-type mice. *Pharm Res* 2011; 28(12):3171–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 21681606. doi:10.1007/s11095-011-0500-z.
187. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. Human metabolism and excretion of cancer chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(12):1091–100. Abgerufen von: PubMed; PMID 9865427.
188. Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:7857186. Abgerufen von: PubMed; PMID 26881038. doi:10.1155/2016/7857186.
189. Rouzaud G, Young SA, Duncan AJ. Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(1):125–31. Abgerufen von: PubMed; PMID 14744743.
190. Vermeulen M, Klöpping-Ketelaars IWAA, van den Berg R, Vaes WHJ. Bioavailability and kinetics of sulforaphane in humans after consumption of cooked versus raw broccoli. *J Agric Food Chem* 2008; 56(22):10505–9. Abgerufen von: PubMed; PMID 18950181. doi:10.1021/jf801989e.
191. Oliviero T, Verkerk R, Dekker M. Isothiocyanates from Brassica Vegetables-Effects of Processing, Cooking, Mastication, and Digestion. *Mol Nutr Food Res* 2018; 62(18):e1701069. Abgerufen von: PubMed; PMID 29898282. doi:10.1002/mnfr.201701069.
192. Atwell LL, Hsu A, Wong CP, Stevens JF, Bella D, Yu T-W et al. Absorption and chemopreventive targets of sulforaphane in humans following consumption of broccoli sprouts or a myrosinase-treated broccoli sprout extract. *Mol Nutr Food Res* 2015; 59(3):424–33. Abgerufen von: PubMed; PMID 25522265. doi:10.1002/mnfr.201400674.
193. Shapiro TA, Fahey JW, Wade KL, Stephenson KK, Talalay P. Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(5):501–8. Abgerufen von: PubMed; PMID 11352861.
194. Fahey JW, Wehage SL, Holtzclaw WD, Kensler TW, Egner PA, Shapiro TA et al. Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012; 5(4):603–11. Abgerufen von: PubMed; PMID 22318753. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0538.

195. Gasper AV, Al-Janobi A, Smith JA, Bacon JR, Fortun P, Atherton C et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *Am J Clin Nutr* 2005; 82(6):1283–91. Abgerufen von: PubMed; PMID 16332662. doi:10.1093/ajcn/82.6.1283.
196. Oliviero T, Lamers S, Capuano E, Dekker M, Verkerk R. Bioavailability of Isothiocyanates From Broccoli Sprouts in Protein, Lipid, and Fiber Gels. *Mol Nutr Food Res* 2018; 62(18):e1700837. Abgerufen von: PubMed; PMID 29532635. doi:10.1002/mnfr.201700837.
197. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(19):10367–72. Abgerufen von: PubMed; PMID 9294217.
198. Clarke JD, Hsu A, Riedl K, Bella D, Schwartz SJ, Stevens JF et al. Bioavailability and inter-conversion of sulforaphane and erucin in human subjects consuming broccoli sprouts or broccoli supplement in a cross-over study design. *Pharmacol Res* 2011; 64(5):456–63. Abgerufen von: PubMed; PMID 21816223. doi:10.1016/j.phrs.2011.07.005.
199. McClements DJ, Xiao H. Designing food structure and composition to enhance nutraceutical bioactivity to support cancer inhibition. *Semin Cancer Biol* 2017; 46:215–26. Abgerufen von: PubMed; PMID 28596014. doi:10.1016/j.semcancer.2017.06.003.
200. Danafar H, Sharafi A, Kheiri Manjili H, Andalib S. Sulforaphane delivery using mPEG-PCL co-polymer nanoparticles to breast cancer cells. *Pharm Dev Technol* 2017; 22(5):642–51. Abgerufen von: PubMed; PMID 26916923. doi:10.3109/10837450.2016.1146296.
201. Danafar H, Sharafi A, Askarlou S, Manjili HK. Preparation and Characterization of PEGylated Iron Oxide-Gold Nanoparticles for Delivery of Sulforaphane and Curcumin. *Drug Res (Stuttg)* 2017; 67(12):698–704. Abgerufen von: PubMed; PMID 28738425. doi:10.1055/s-0043-115905.
202. Rausch V, Liu L, Kallifatidis G, Baumann B, Mattern J, Gladkich J et al. Synergistic activity of sorafenib and sulforaphane abolishes pancreatic cancer stem cell characteristics. *Cancer Res* 2010; 70(12):5004–13. Abgerufen von: PubMed; PMID 20530687. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0066.
203. Burnett JP, Lim G, Li Y, Shah RB, Lim R, Paholak HJ et al. Sulforaphane enhances the anticancer activity of taxanes against triple negative breast cancer by killing cancer stem cells. *Cancer Lett* 2017; 394:52–64. Abgerufen von: PubMed; PMID 28254410. doi:10.1016/j.canlet.2017.02.023.
204. Kerr C, Adhikary G, Grun D, George N, Eckert RL. Combination cisplatin and sulforaphane treatment reduces proliferation, invasion, and tumor formation in epidermal squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2018; 57(1):3–11. Abgerufen von: PubMed; PMID 28796401. doi:10.1002/mc.22714.

205. Kaminski BM, Weigert A, Brüne B, Schumacher M, Wenzel U, Steinhilber D et al. Sulforaphane potentiates oxaliplatin-induced cell growth inhibition in colorectal cancer cells via induction of different modes of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 67(5):1167–78. Abgerufen von: PubMed; PMID 20689952. doi:10.1007/s00280-010-1413-y.
206. Elkashty OA, Ashry R, Elghanam GA, Pham HM, Su X, Stegen C et al. Broccoli extract improves chemotherapeutic drug efficacy against head-neck squamous cell carcinomas. *Med Oncol* 2018; 35(9):124. Abgerufen von: PubMed; PMID 30078069. doi:10.1007/s12032-018-1186-4.
207. Myzak MC, Ho E, Dashwood RH. Dietary agents as histone deacetylase inhibitors. *Mol Carcinog* 2006; 45(6):443–6. Abgerufen von: PubMed; PMID 16652377. doi: 10.1002/mc.20224.

Danksagung

Arbeiter der Stirn

Ein Mensch sitzt kummervoll und stier | Vor einem weißen Blatt Papier, |
Jedoch vergeblich ist das Sitzen- | Auch wiederholtes Bleistiftspitzen |
Schärft statt des Geistes nur den Stift. | Selbst der Zigarre bittres Gift, |
Kaffee gar, kannenvoll geschlürft, | Den Geist nicht aus den Tiefen schürft, |
Darinnen er, gemein verbockt, | Höchst unzugänglich einsam hockt. |
Dem Menschen kann es nicht gelingen, | Ihn auf das leere Blatt zu bringen. |
Der Mensch erkennt, dass es nichts nützt, | Wenn er den Geist an sich besitzt, |
Weil Geist uns ja erst Freude macht, | Sobald er zu Papier gebracht.

Eugen Roth

Dass es mir nicht so ergangen und diese Arbeit insgesamt zustande gekommen ist, mein Geist den Weg aufs Papier gefunden hat, dazu haben einige Menschen beigetragen, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Zuallererst gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater Prof. Roman Blaheta, der mich in sein Labor aufgenommen und mir diese Arbeit ermöglicht hat. In zahl- und lehrreichen, den Blick fokussierenden Besprechungen hat er mir den Weg durch das wissenschaftliche Dickicht gewiesen, sodass ich sicher durch diese *Tour de Force* durchgekommen bin, Neugierde und Freude daran empfunden habe. Mit Vertrauen und Unterstützung hat er mir nicht nur die Gelegenheit zu dieser Dissertation gegeben, sondern auch die Freiheit zu fachlicher und persönlicher Entfaltung, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Besonderer Dank gilt auch meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. Jochen Rutz sowie Sebastian Maxeiner, die sich beide geduldig die Mühe meiner praktischen Anleitung und Einarbeitung in die labortechnischen Methoden gemacht haben, jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen, „[ihre] Wort und Werke merkt ich und den Brauch, und mit Geistesstärke [tat] ich Wunder auch.“

Mit ihrer Hilfsbereitschaft und Zugewandtheit haben auch Frau Iris Müller und Frau Maryam Tabib einen großen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit. Wie viel trägt nicht ein warmherziges und aufmunterndes Wort des Zuspruchs zur rechten Zeit zum Gelingen bei!

Dank gebührt auch meinem Banknachbarn und Doktorandengenossen Armir Mesic: Mit Zitateraten haben wir uns Wartezeiten verkürzt, unterhaltsam und zugleich ernsthaft waren unsere Gespräche. Aber Armir, ob Sisyphos nun ein glücklicher Mensch war oder nicht, haben wir immer noch nicht geklärt...

Schließlich richtet sich mein Dank auch an Mister Paul Talalay als „spiritus rector“ dieser Arbeit, von dessen jahrzehntelanger, beharrlicher Forschung die wissenschaftliche Reise des Sulforaphans ihren Ausgang nahm und auch den Weg bis zu mir gefunden hat. In der Hoffnung und der Zuversicht, dass diese Arbeit auch in seinem Geiste ist.

Zu guter Letzt geht mein liebevoller Dank an meine Familie, meine Eltern und meine Brüder Emanuel und Jacob. Ich danke meinen Brüdern, dass wir seit immer und für immer eine geschwisterliche Einheit bilden, uns gegenseitig stärken und stärker machen und bedingungslos füreinander da sind und einstehen. Und danken möchte ich meinen Eltern, die beständig und dennoch unaufdringlich, behutsam und zugleich bestimmt von Kindesbeinen an den Boden bereitet, den Samen mit Geist und Geborgenheit gehegt und gepflegt haben, aus dem schlussendlich auch diese Arbeit gewachsen ist. Und auch dafür, dass sie mir die Freude an Büchern und Musik als stete Begleiter des Lebens mit auf den Weg gegeben haben. Während diese Arbeit entstanden ist, war das vor allem die La Traviata-Aufführung aus Salzburg von 2005, unsagbar traurig und beglückend schön, *croce e delizia al cor*. Herzlichen Dank also an Alexandre Dumas den Jüngeren, Giuseppe Verdi, Anna Netrebko und Rolando Villazon für das tiefe Glück, das sie mir damit bereitet haben.

„Ist das Kunst oder kann das weg?“ – Darüber lässt sich ja bekanntlich trefflich streiten. Dass auch Einleitungssätze von Doktorarbeiten zu ähnlich hitzigen Gefechten Anlass geben können, auch dieser Beweis ist im Zuge dieser Dissertation erbracht worden. Diesem ewigen Thema ist also eine weitere Episode hinzugefügt worden, an deren Ende stand, dass besagter Einleitungssatz gewogen und für zu leicht befunden wurde. Statt in dieser Arbeit hat er nun also einen Platz auf dem gut besuchten Friedhof der nur vermeintlich guten Ideen gefunden. Um Herrn Jochen Rutz auch für dieses stilvoll-stilistische Scharmützel meinen Dank zu erbieuten, wäre dieser spezielle erste, nun in der Anonymität begrabene Satz ihm gewidmet.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Bedeutung von Sulforaphan für das Wachstumsverhalten von Prostatakarzinomzellen in vitro

in dem Zentrum der Chirurgie, Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Frankfurt, Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Roman Blaheta mit Unterstützung durch Dr. Jochen Rutz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen