

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

**Einfluss der natürlichen Verbindung Curcumin  
auf die Invasion von Harnblasenkarzinomzellen in vitro**

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

vorgelegt von Jan-Erik Fleger  
aus Wolfsburg  
Frankfurt am Main, 2017

**Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter**  
**Referent: Prof. Dr. Roman Blaheta**  
**Korreferent: Prof. Dr. Roland Kaufmann**  
**Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2019**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	5
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	7
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	8
<b>1. Einleitung</b> .....	10
1.1 Krebs.....	10
1.2 Harnblasenkrebs.....	10
1.2.1 Epidemiologie .....	10
1.2.2 Tumorentität.....	11
1.2.3 TNM-Klassifikation, Tumorstadien und Grading .....	12
1.2.4 Ätiologie und Risikofaktoren .....	14
1.2.5 Diagnostik .....	15
1.2.6 Therapie.....	16
1.3 Alternative Heilmethoden.....	17
1.3.1 Curcumin.....	17
1.4 Ziel der Studie.....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	20
2.1. Zelllinien.....	20
2.2. Material und Instrumente .....	21
2.3. Methoden .....	29
2.3.1. Kultivierung der Zellen .....	29
2.3.1.1. Auftauen der Zelllinien.....	29
2.3.1.2. Splitten der Zellen .....	29
2.3.1.3 Mediumwechsel .....	30
2.3.2. Behandlung mit Curcumin .....	30
2.3.3. Bestrahlen der Zellen .....	30
2.3.4. Zellen einstellen .....	31
2.3.5. Adhäsion an die Extrazelluläre Matrix (EZM) .....	32

2.3.5.1. Auswertung der Adhäsionsstudien .....	33
2.3.6. Adhäsion an Endothelzellen (HUVEC) .....	33
2.3.7. Chemotaxis.....	34
2.3.8. FACScan-Analyse von Integrinen .....	35
2.3.9. Proteinisolierung.....	36
2.3.9.1. Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Comassie-Methode (Bradford)	36
2.3.10. Gel-Elektrophorese und Western Blot.....	37
2.3.11. Blockadestudie.....	39
2.3.11.1 Adhäsion an Kollagen .....	39
2.3.11.2 Chemotaxis.....	39
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1 Zellbehandlung .....	40
3.2 Adhäsion an die EZM .....	41
3.2.1. Adhäsion an Kollagen.....	41
3.2.2. Adhäsion an Fibronectin .....	44
3.3. Adhäsion an Endothelzellen (HUVEC) .....	47
3.5 FACScan-Analyse von Integrinen und Membran Proteinen.....	53
3.5.1. Expression nach Behandlung .....	57
3.6 Gelelektrophorese und Western Blot .....	63
3.7 Integrin-Blockade.....	66
3.7.1 Adhäsion an Kollagen.....	66
3.7.2 Chemotaxis.....	67
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>5. Ausblick.....</b>	<b>80</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>Summary .....</b>	<b>83</b>
<b>Literatur .....</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>98</b>
<b>Schriftliche Erklärung.....</b>	<b>99</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine serum albumin
bspw.	beispielsweise
BTA	Bladder tumour antigen
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
ca.	circa
cm	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
d. h.	das heißt
ECL-Lösung	Enhanced chemiluminescence-Lösung
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAK	fokale Adhäsionskinase
g	Gramm
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
I. E.	Internationale Einheiten
i. d. R.	in der Regel
l	Liter
M	Molare Masse
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minuten
ml	Milliliter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mM	Millimolar
MR-Urografie	Magnetresonanz-Urographie
NAT (1 und 2)	N-Acetyltransferase
n. d.	nicht detektiert
NMP 22	Nukleäres Matrixprotein 22
PBS	Phosphate-buffered saline

pFAK	phosphorylierte fokale Adhäsionskinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sog.	sogenannt
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
TURB	Transurethrale Resektion der Harnblase
U	Enzymeinheit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
UICC	Union internationale contre le cancer
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
v. l.	von links
z. B.	zum Beispiel

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Stadiengruppierung (UICC 2009)	14
Tabelle 2	Klassifikation der Tumorzelllinien mithilfe des TNM-Systems und des histopathologischen Gradings	20
Tabelle 3	Materialien	21-23
Tabelle 4	Trenngel	24
Tabelle 5	Sammelgel	24
Tabelle 6	Puffer-Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgel- Elektrophorese, Western-Hybridisierung, Immunfärbung und Immunstripping	24-25
Tabelle 7	Lysispuffer	25-26
Tabelle 8	Integrin Subtypen. Primäre und isotypische Antikörper, plus Herkunft, Verdünnung und Menge	27-28
Tabelle 9	Blockierende Antikörper: Integrin Subtypen	28

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Altersspezifische Neuerkrankungsraten nach Geschlecht und Altersgruppen, Deutschland 1980, 1990 und 2004	11
Abbildung 2	T-Klassifikation von Harnblasenkarzinomen	12
Abbildung 3	Chemische Struktur von Curcumin	18
Abbildung 4	100-fache Vergrößerung der unbehandelten Zellreihen	20
Abbildung 5	Neubauer Zählkammer	31
Abbildung 6	100-fache Vergrößerung behandelter Blasenkarzinomzellen	40
Abbildung 7–9	Ergebnisse Adhäsion an Kollagen	41–43
Abbildung 10–12	Ergebnisse Adhäsion an Fibronectin	44–46
Abbildung 13–15	Ergebnisse Adhäsion ans Endothel	47–49
Abbildung 16–18	Ergebnisse Chemotaxis	50–52
Abbildung 19–21	Integrinexpressionen vor Behandlung	54–56
Abbildung 22–28	Integrinexpressionen nach Behandlung	57–63
Abbildung 29	Western Blot Analyse	64

Abbildung 30	Blockadeexperiment: Adhäsion an Kollagen	66
Abbildung 31	Blockadeexperiment: Chemotaxis	67

### 1. Einleitung

Das Ziel dieser Studie war es, den Einfluss des natürlichen Farbstoffs Curcumin auf die Invasion von Blasenkarzinomzellen zu untersuchen. Dabei wurde ein Schwerpunkt auf die Adhäsion der Tumorzellen an extrazelluläre Proteine gelegt und insbesondere das Migrationsverhalten der Tumorzellen im Rahmen des Chemotaxisversuchs analysiert. Des Weiteren wurde mithilfe von Western-Blotting und FACScan-Analyse die Expressivität von Integrinen ausgewertet.

#### 1.1 Krebs

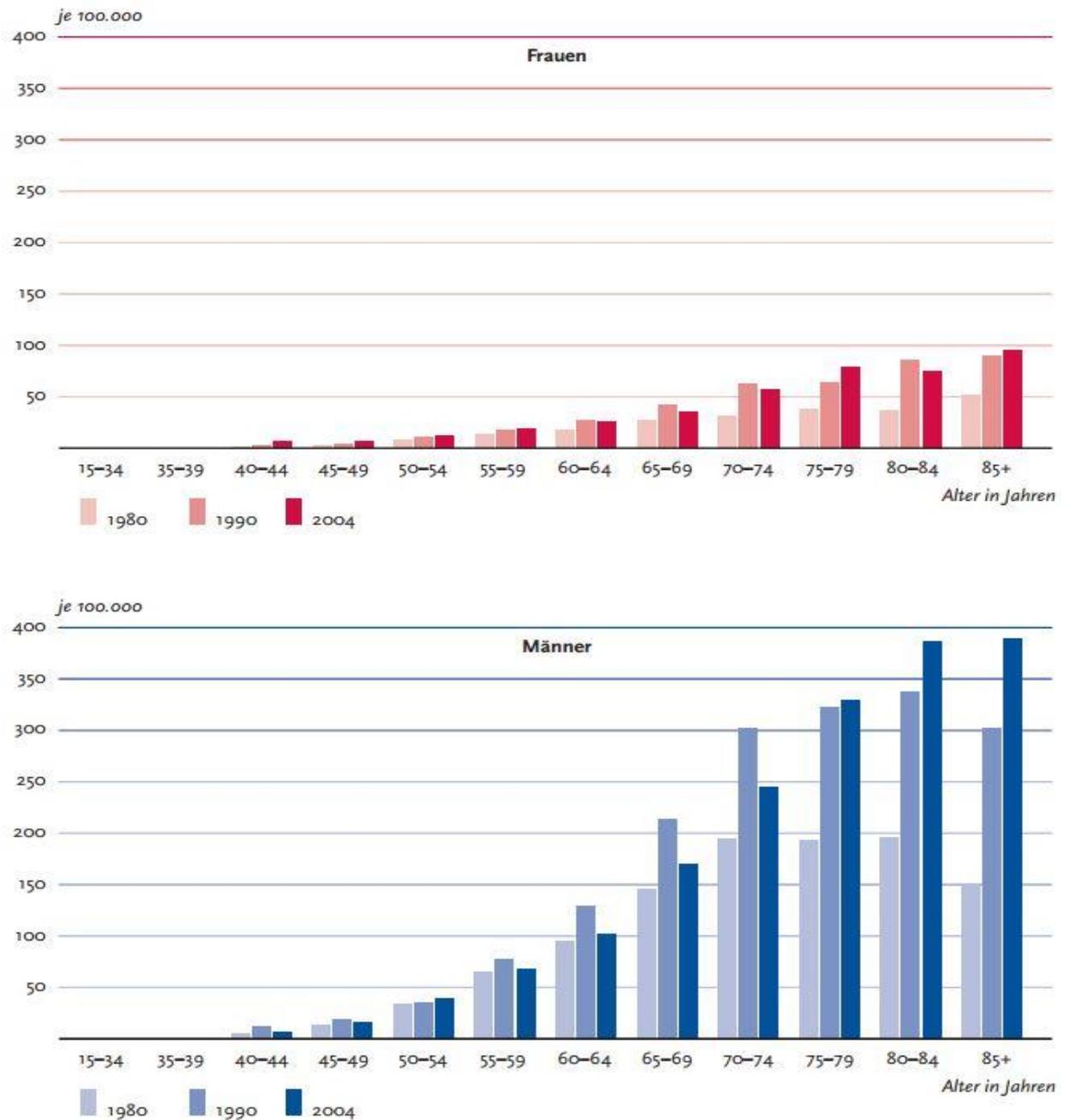
Krebs gehört heutzutage zu den größten Gesundheitsproblemen in den Industrienationen. Von 868.356 Todesfällen in Deutschland im Jahre 2014 starben 230.771 Menschen an bösartigen Neuerkrankungen [1]. Statistisch gesehen, sterben also 26,6 % an einer Krebserkrankung, die damit nach den Krankheiten des Kreislaufsystems (38,9 %) die zweithäufigste Todesursache darstellt. Das entscheidende Merkmal maligner Tumore liegt in der Fähigkeit der Tumorzellen, das normale Gewebe zu infiltrieren (Invasion) und zu zerstören (Destruktion). Darüber hinaus können Tumorzellen absiedeln und an anderen Organen oder Geweben Tochtergeschwülste bilden (Metastasierung) [2]. Metastasen sind häufig ein Zeichen dafür, dass der Krebs sich in einem fortgeschrittenen Stadium befindet.

#### 1.2 Harnblasenkrebs

##### 1.2.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom ist eine Krebsart des fortgeschrittenen Lebensalters, vor dem 40. Lebensjahr kommt die Krankheit nur äußerst selten vor. Insgesamt erkranken ca. 16.000 Menschen in Deutschland jedes Jahr an Blasenkrebs, der in etwa 3,4 % aller bösartigen Tumore ausmacht. Männer sind mehr als dreimal so häufig wie Frauen betroffen [3]. In **Abbildung 1** lässt sich erkennen, dass die Neuerkrankungsraten seit 1980 angestiegen sind, was zum Teil an einer besseren Diagnostik und somit daran liegt, dass mehr Blasentumore gefunden werden. Die Zahl der Sterbefälle hat sich im gleichen Zeitraum jedoch verringert trotz höherer Inzidenzraten. Gründe hierfür sind eine bessere Früherkennung und gute Therapiemöglichkeiten. Die relativen Fünf-Jahres-Überlebensraten liegen bei Männern bei 76 % und bei Frauen bei 70 % [4].

## Einleitung



**Abbildung 1: Altersspezifische Neuerkrankungsraten nach Geschlecht und Altersgruppen, Deutschland 1980, 1990 und 2004, ICD-10 C67, D09.0, D41.4.**

Quelle: Bertz J (ed). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010; Robert-Koch-Institut (2010).

### 1.2.2 Tumorentität

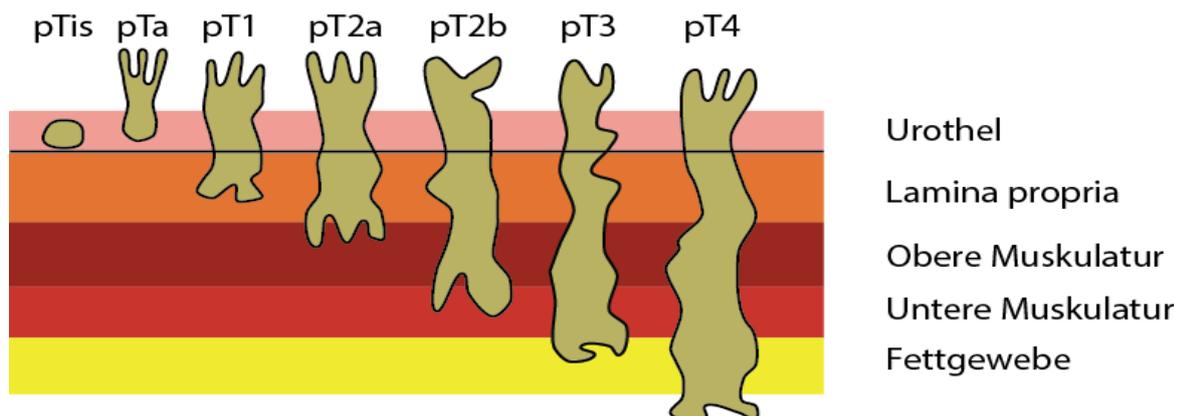
Das Urothel (auch Übergangsepithel) ist ein mehrschichtiges Deckgewebe der Harnblase und der anderen ableitenden Harnwege [5]. 95 % der Blasen Tumore gehen von dieser Zellschicht aus, wobei eine Unterscheidung zwischen einem soliden und einem papillären Tumorwachstum beobachtet werden kann [6,7]. Eine seltenere Tumorentität ist das Adenokarzinom mit

## Einleitung

0,2 bis 2 % aller Blasen Tumore [8]. Sie können sich bspw. aus periurethralen und periprostatischen Drüsen oder aus Resten des Urachus im Bereich des Blasendachs bilden [7]. Das Adenokarzinom ist in der Regel ein solitärer Tumor. Das Urothelkarzinom hingegen stellt eine panurotheliale Erkrankung dar, die charakteristischerweise auch als multiple Läsion imponieren kann. Plattenepithelkarzinome der Harnblase sind in den Industrienationen nur geringfügig häufiger als Adenokarzinome bei 3 bis 6 % der Blasen Tumor entitäten [9–11].

### 1.2.3 TNM-Klassifikation, Tumorstadien und Grading

- Die TNM-Klassifikation dient zur Einteilung bösartiger Tumoren in Stadien. Dabei steht das T für Tumor bzw. die Ausdehnung des Primärtumors (**Abbildung 2**), N für Nodus bzw. das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen, M allgemein für ferne Metastasen [12]. Zusätzlich zur TMN-Klassifikation werden maligne Tumore von der UICC (Union internationale contre le cancer) in eine Stadiengruppierung (**Tabelle 1**) sortiert. Diese Stadieneinteilung gibt der Tumorklassifikation eine Rangordnung [13,14], die bei der Wahl des Therapieansatzes entscheidend ist. Beim Grading geht es um die Differenziertheit der Tumorzellen [15], je mehr sich die Tumorzellen vom Ursprungsgewebe unterscheiden, desto aggressiver wird der Tumor wachsen.



**Abbildung 2: T-Klassifikation von Harnblasenkarzinomen.**

Quelle: vom Dorp et al., 2009. Zusatz p = durch Biopsie vom Pathologen gesichertes Stadium.

**T – Tumorausbreitung:**

- **Tx** Tumor kann nicht beurteilt werden
- **T0** Kein Anhalt für Primärtumor
- **Ta** Nicht invasiver papillärer Tumor
- **Tis** Carcinoma in situ
- **T1** Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
- **T2** Tumor infiltriert die Muskulatur
  - **T2a** Tumor infiltriert oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
  - **T2b** Tumor infiltriert äußere Muskulatur (äußere Hälfte)
- **T3** Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe
  - **T3a** Mikroskopisch
  - **T3b** Makroskopisch (extravesikaler Tumor)
- **T4** Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina oder Becken-/Bauchwand
  - **T4a** Tumor infiltriert Prostata oder Uterus oder Vagina
  - **T4b** Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand

**N – Regionäre Lymphknoten:**

- **NX** Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- **N0** Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
- **N1** Metastase(n) in solitären Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
- **N2** Metastase(n) in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
- **N3** Metastase(n) in Lymphknoten an Aa. Iliacae communes

**M – Fernmetastasen:**

- **MX** Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- **M0** Keine Fernmetastasen
- **M1** Fernmetastasen (v.a. Lunge, Leber und Knochen)

## Einleitung

Stadium 0a	Ta	N0	M0
Stadium 0is	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2a, T2b	N0	M0
Stadium III	T3a, T3b, T4a	N0	M0
Stadium IV	T4b	N0	M0
	Jedes T	N1, N2, N3	M0
	jedes T	jedes N	M1

**Tabelle 1: Stadiengruppierung (UICC 2009) [14].**

Quelle: Wittekind C, Meyer H-J (eds). TNM: Klassifikation maligner Tumoren (2010).

### Grading:

- **GX** Grad der Differenzierung ist nicht zu beurteilen
- **G1** gut differenziertes bösartiges Gewebe, hohe Übereinstimmung mit Ursprungsgewebe (Low grade)
- **G2** mäßig differenziertes bösartiges Gewebe (Intermediate grade)
- **G3** schlecht/niedrig differenziertes bösartiges Gewebe (High grade)
- **G4** nicht differenziertes bösartiges Gewebe (undifferenziert bzw. anaplastisch). Der Tumor kann manchmal nicht mehr oder nur aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen einem bestimmten Ausgangsgewebe zugeordnet werden (High grade)

### 1.2.4 Ätiologie und Risikofaktoren

Das Rauchen stellt, wie bei vielen anderen Krebsarten, einen erheblichen Risikofaktor dar. Die Risikoerhöhung liegt beim Faktor 3 bis 4, etwa die Hälfte aller Urothelkarzinome bei Männern und ein Drittel bei Frauen in Europa lassen sich auf das Rauchen zurückführen. Zudem besteht eine erhöhte Gefahr für ein Tumorrezidiv für Raucher nach erfolgter operativer Therapie [16]. 10 % der Harnblasenkarzinome werden durch Giftstoffe am Arbeitsplatz verursacht. Das Blasenkarzinom ist als Berufserkrankung anerkannt, gefährdende Berufe sind bspw. Lackierer, Zahntechniker und Arbeiter in der Chemieindustrie, Gummiverarbeitung oder Stahlindustrie. Bei den identifizierten Schadstoffen handelt es sich um aromatische Amine, Aminodiphenyl, Benzidin, Naphthylamin und auch Dieselabgase. Auch Medikamente wie das Zytostatikum

## Einleitung

Cyclophosphamid gelten als Verursacher für Harnblasenkarzinome [17]. Zudem spielen chronische, jahrzehntelange Infektionen als Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome eine Rolle. In Gebieten wie Afrika, Asien und Südamerika zählt die Bilharziose zu den häufigsten Ursachen des Blasenkrebses [18]. Genetisch gibt es einige Merkmale, die gehäuft auftreten. So gelten sog. „Langsam-Acetylierer“ als gefährdet, deren N-Acetyltransferasen-Aktivität (NAT1 und NAT2) eingeschränkt ist. Der Verlust des langen Arms von Chromosom 9 ist in allen Stadien des Blasenkarzinoms nachweisbar, außerdem findet sich eine vermehrte Expression von Onkogenen wie ras und p21 [19]. Präventiv soll eine Flüssigkeitsaufnahme von > 2,5 l wirken und zu einer Halbierung des Risikos für ein Blasenkarzinom im Vergleich zu einer Menge < 1,3 l führen [20]. Zudem senkt eine gesunde Ernährung mit viel Gemüse und Früchten (z. B. Mittelmeerdiet) das Risiko für ein Harnblasenkarzinom [21].

### 1.2.5 Diagnostik

Das Leitsymptom ist die schmerzlose Hämaturie beim Harnblasenkrebs, bei der das Ausmaß der Blutbeimengung nicht mit dem Tumorstadium korreliert. Eine Hämaturie fordert die Abklärung des Harntrakts [22]. Zusätzliche fakultative Symptome sind die Dysurie, Algurie oder Pollakisurie. Bei persistierender Symptomatik und fehlendem Infektnachweis muss ein maligner Prozess ausgeschlossen werden [23].

Eine Harnanalyse und Harnkultur dient zum Ausschluss eines Harnwegsinfekts. Das Serumkreatinin wird bestimmt, um die globale Nierenfunktion zu untersuchen. Bei erhärtetem Verdacht auf einen malignen Tumor in der Harnblase wird die Blase zunächst sonographiert. Hierbei lassen sich bei voller Blase bis zu 90 % der Tumore nachweisen. Eine bis jetzt unumgängliche Untersuchung ist die transurethrale Endoskopie der Blase. Sie lokalisiert den Tumor, stellt die Anzahl und den Wachstumstyp fest und kann in 95 % der Fälle zwischen oberflächlichen und muskelinvasiven Tumoren differenzieren [24]. Des Weiteren bietet die endoskopische Untersuchung die Möglichkeit, ein Biopsat oder Resektat zu gewinnen. Diagnostisch und bildtechnisch von höherem Wert als die Sonographie sind CT- und MR-Urographie [25]. 5 % der Urothelkarzinome wachsen im oberen Harntrakt und nicht in der Harnblase, eine Harnstauung in diesem Bereich kann auf einen Tumor des Harnleiters oder auf einen muskelinvasiven Tumor im Bereich der Uretermündung hindeuten [26]. Die positive Fallfindung im Urogramm liegt jedoch bei unter 0,5 % [27]. Auch die Urinzytologie und uringebundene Markersysteme

## Einleitung

erkennen zuverlässig (90 %) ein Carcinoma in situ. Allerdings sind neue Markersysteme wie z. B. der BTA stat Test, der NMP 22 Test oder der Telomerase Test kostenintensiv, sodass diese selten zum Einsatz kommen. Die Zystoskopie in Kombination mit der Urinzytologie stellt ein ausreichend sensitives und spezifisches System dar [28,29].

### 1.2.6 Therapie

Die Therapie erfolgt in Abhängigkeit vom Tumorstatus und unter Berücksichtigung der Lebensumstände des Patienten (Alter, Komorbiditäten). Bei einem Carcinoma in situ kann die Instillation von Bacillus Calmette-Guerin (BCG) zu einer bakteriellen Zystitis mit Granulombildung führen, dabei entsteht eine Entzündungsreaktion, die als „Nebeneffekt“ zu einer Tumorzellzerstörung und zu einer Immunisierung gegen die Tumorzellen führt [30]. Bei Therapiemisserfolg muss auf eine operative Methode umgestiegen werden [31]. Die Therapie des nicht invasiven, oberflächlichen Harnblasenkarzinoms (TaG1 bis T1G2) stellt die fraktionierte transurethrale Resektion (TURB) dar. Diese sichert die Diagnose zusätzlich. Bei einem T1G3-Tumor kann wegen der erhöhten Metastasierungsgefahr bereits eine Blasenentfernung indiziert sein [32]. Etwa 10 bis 15 % aller Harnblasenkarzinome sind bei Erstdiagnose bereits muskelinvasiv und/oder metastasiert (T2–4, Nx, Mx) [33].

Eine radikale Zystektomie ist bei allen muskelinvasiven Tumoren indiziert, hierbei wird nicht nur die Harnblase entnommen, sondern abhängig vom Geschlecht auch Nachbarorgane (Prostata und Samenblasen beim Mann, Uterus und Eileiter bei der Frau). Alternativ zur radikalen Zystektomie kommt eine Strahlentherapie oder Radiochemotherapie nach einer TURB in Betracht. Eine strahlenverstärkende Chemotherapie erreicht gleiche Überlebensraten wie eine Radikaloperation, da Urothelkarzinome sehr strahlenempfindlich sind [34]. Eine reine Strahlentherapie hat bei kurativer Absicht keine Bedeutung mehr. Eine neoadjuvante Chemotherapie verkleinert den Primärtumor und wird daher bei fortgeschrittenen Tumorstadium empfohlen [35]. Hierbei behandelt man den Patienten i. d. R. mit zwei bis drei Zyklen MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin), bevor der Patient zystektomiert wird [36]. Die adjuvante Chemotherapie nach radikaler Zystektomie bei lokal fortgeschrittenem, nicht-metastasiertem Blasenkrebs gibt keine zufriedenstellende Ergebnisse und wird noch debattiert [37,38]. Bei metastasiertem Blasenkrebs zeigt die Chemotherapie im Mittel eine verlängerte Überlebenszeit [39]. Nicht alle Patienten profitieren jedoch von einer Chemotherapie, da sie

## Einleitung

bei vielen Patienten nicht anspricht und die Medikamente zudem große Nebenwirkungsprofile besitzen. Die Chemotherapie kann selbst auch krebserrregend sein [40]. Sie greift neben den Tumorzellen auch gesunde Zellen mit hohen Proliferationsraten an, dadurch ergeben sich z. B. Schleimhautentzündungen und Haarausfall. Die systemische Toxizität führt zudem zu vermehrter Infektanfälligkeit und Blutungen im Körper [41]. Darüber hinaus limitiert die Resistenzbildung die meisten Chemotherapeutika in ihrer Wirkdauer. Die Chemotherapie bietet viele Baustellen und Probleme auf, die es deutlich und nötig machen, weiter nach neuen Möglichkeiten in der perioperativen Therapie zu suchen.

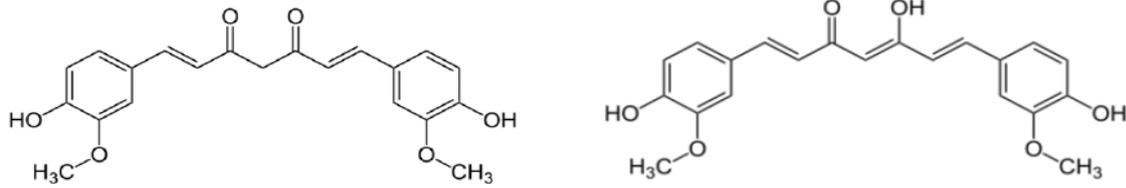
### 1.3 Alternative Heilmethoden

Die Komplementärmedizin spielt insbesondere eine Rolle für Patienten, die über die Schulmedizin hinaus die Möglichkeit haben wollen, ihre Therapie aktiv mitzugestalten. So nutzen bereits 90 % der Mammakarzinompatienten, 50 % der Darmkrebspatienten und 42 % der Lungenkrebspatienten komplementäre Medizin [42]. In vielen Fällen wird die komplementäre Therapie in supportiver Intention zur schulmedizinischen Therapie gegeben. So wurde der günstige Effekt von Ingwer bei Übelkeit und Erbrechen bereits in Studien belegt [43]. Es ist daher wichtig, die Wirksamkeit alternativer Heilmethoden durch mehr Forschung zu belegen und mit dem Patienten gemeinsam realistische Erwartungen an die Tumortherapie zu entwickeln [44].

#### 1.3.1 Curcumin

Kurkuma ist ein Rhizom, dessen botanischer Name „*Curcuma longa*“ lautet. Es wächst natürlicherweise in Südostasien, wird aber stark in Ländern wie Indien, China, Sri Lanka, Indonesien, Peru und Australien kultiviert. Schon seit Generationen wird Kurkuma als Heilmittel gegen bspw. Bauchschmerzen in diesen Ländern verwendet [45]. Um den Farbstoff Curcumin, einer der wichtigsten Inhaltsstoffe der Kurkuma-Pflanze, als therapeutischen Wirkstoff zu verwenden, gewinnt man einen Kurkuma-Extrakt [Curcumin (ca. 75 %), Demethoxycurcumin (ca. 15 %), und Bis-Demethoxycurcumin (ca. 5 %)]. Curcumin kann in verschiedenen Darreichungsformen weltweit frei vertrieben werden, da Kurkuma natürlichen Ursprungs ist und Patente daher abgelehnt werden. **Abbildung 3** zeigt die chemische Formel von Curcumin in seiner Keto- und Enol-Form. Ein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Verbesserung der Bioverfügbarkeit des Curcumins, die in seiner natürlichen Form schlecht ist [46].

## Einleitung



**Abbildung 3: Chemische Struktur von Curcumin Keto- und Enol-Form (Diferuloylmethan) (1,7-bis[4-hydroxy-3-methoxyphenyl]-1,6-heptadien-3,5-dion).**

Quelle: <http://www.orthoknowledge.eu/wp-content/uploads/2014/06/afb1-chemische-struktur-curcumin.png> (aufgerufen am 19.07.2016).

Curcumin verfügt über vielfältige Wirkungen, die aber auf wenige Mechanismen zurückzuführen sind. Es hat Effekte auf zentrale Stoffwechselwege, moduliert darüber hinaus verschiedene Zellsignalproteine, Zellzyklusproteine, Zytokine und Chemokine, Enzyme, Rezeptoren und Zelloberflächen-Adhäsionsmoleküle [47,48]. Curcumin wirkt entzündungshemmend und schmerzlindernd, indem es die Enzyme Cyclooxygenase-2, Lipoxygenase und NO-Synthase hemmt [49,50]. Es ist bereits erforscht, dass Curcumin auch krebshemmend wirkt und insbesondere den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF-kappaB supprimiert [51–54]. Des Weiteren hat Curcumin positive Effekte auf Knochenerhaltung [55], Neurogenese [56–60], Blutfettsenkung [61–63] und Immunstimulation [64]. Aufgrund seiner gesundheitsfördernden Eigenschaften ist Curcumin ein fester Bestandteil heutiger Forschung.

### 1.4 Ziel der Studie

Um das krebsschützende Potenzial von Curcumin ausschöpfen zu können, bedarf es weiterer Forschung. In dieser In-vitro-Studie wurden unter Verwendung drei verschiedener Blasen-tumor-Zelllinien (RT112, TCCSUP und UMUC3) folgende Fragen behandelt:

#### **A. Welche Effekte hat Curcumin auf die invasive Zellmigration von Harnblasenkarzinomzellen?**

Um die invasive Migration bestimmen zu können, wurde die Zellaktivität der Tumorzellen gemessen, indem sie mithilfe eines chemotaktischen Stimulus ein Filtersystem überwinden mussten. Eine weitere Zelleigenschaft, die ein Tumor zum Migrieren braucht, ist die Zelladhäsion an Extrazellulärmatrixproteine und an das Endothel von Gefäßen. So wurde die Adhäsion

## Einleitung

der Tumorzellen an die Matrixproteine Kollagen G und Fibronectin gemessen, indem die Matrixproteine auf Platten beschichtet und mit den Tumorzellen in Kontakt gebracht wurden. Die Anheftung ans Endothel wurde mithilfe von HUVECs untersucht.

### **B. Wie werden invasionsrelevante Zellproteine von Curcumin beeinflusst?**

Um ein detailliertes Bild von der Wirkweise des Curcumins zu erhalten, wurde ein spezieller Blick auf Integrine gelegt, die zu den sog. CAMs (cell adhesion molecules) gehören und essenziell die Tumormigration steuern. Sie vermitteln die Interaktion von Zellen mit der Extrazellulärmatrix, indem sie als Rezeptor fungieren. Des Weiteren können sie intrazellulär als Signalvermittler dienen [65]. Integrine werden von Tumorzellen exprimiert, um als Mediatoren die Tumormetastasierung zu steuern und voranzutreiben [66]. Sie stellen sich als Heterodimere dar, die aus zwei nicht miteinander verbundenen Glykoproteinketten (Alpha- und Beta-Untereinheit) bestehen [67]. In dieser Studie wurde untersucht, wie oder ob sich die Expressivität der Integrine unter Curcuminbehandlung verändert. Die Rezeptor-Analyse beinhaltete auch Signalsysteme, die verantwortlich für die Aktivierung der Integrine sind [FAK (focal adhesion kinase)-Proteine]. Eine mögliche Veränderung der Expressivität wurde mithilfe des Western Blots und der FACS-Analyse dargestellt.

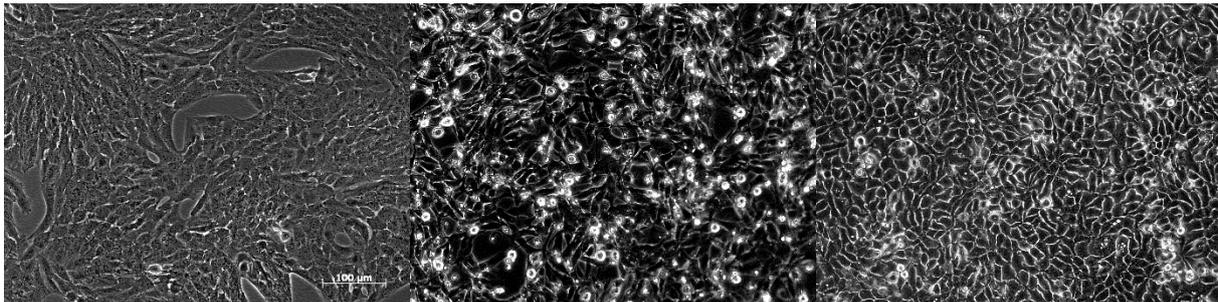
### **C. Hat die additive Lichtbestrahlung der mit Curcumin behandelten Harnblasenkarzinomzellen eine Wirkungsveränderung zur Folge?**

Um eine mögliche Wirkungssteigerung zu erzielen, wurden Tumorzellen ohne und mit Curcuminbehandlung zusätzlich mit Tageslicht bestrahlt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zelllinien

Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden die drei Zelllinien UMUC3, RT112 (ATCC/LGC Promochem GmbH, Wesel, Germany) und TCCSUP (DSMZ, Braunschweig, Germany) (**Abbildung 4**), mit bis zu 0,2 mg/ml Curcumin behandelt und zusätzlich mit einer Tageslichtlampe bestrahlt, um anschließend mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen zu werden.



**Abbildung 4: 100-fache Vergrößerung der unbehandelten Zellreihen.** Von links: TCCSUP Passage 11, UMUC3 Passage 12 und RT112 Passage 11. Passage 11 = Zellen wurden zuvor elfmal gesplittet.

Alle drei Zelllinien sind adhärent, die RT112- und UMUC3-Zelllinien haben zusätzlich epitheliale Eigenschaften [68–71]. Die Zelllinien entstammen verschiedenen Tumorstadien, die bei der Harnblase nach dem TNM-System eingeteilt werden, zudem spielt das sogenannte Grading eine Rolle (**s. Kapitel 1.2.3 und Tabelle 2**).

Zelllinie	TNM	Grading	Beschreibung
UMUC3	T3b	G3	makroskopische perivesikale Infiltration, schlecht differenziert
TCCSUP	T4	G4	Infiltration von Nachbarorganen, undifferenziert
RT112	T2	G1	Infiltration der Harnblasenmuskulatur, gut differenziert

**Tabelle 2: Klassifikation mithilfe des TNM-Systems und des histopathologischen Gradings [5].**

Quelle: Lazzeri M.: The physiological function of the urothelium – more than a simple barrier (2006).

## Material und Methoden

### 2.2. Material und Instrumente

**Tabelle 3** verschafft einen Überblick über alle Materialien, die für die Versuche verwendet und gebraucht wurden.

Material	Hersteller
RPMI 1640 (500 ml)	Fa. Sigma-Aldrich, R8758
HEPES Puffer 1M (100 ml)	Fa. Sigma-Aldrich, H0887
GlutaMAX 100x (100 ml)	Fa. Invitrogen, REF: 35050-038
Fetal Bovine Serum (100 ml) (FBS)	Fa. Invitrogen, REF 10500-056
Penicillin (5.000 U/ml) – Streptomycin (5.000 µg/ml) (100 ml) (P/S)	Fa. Sigma-Aldrich, P4458
Accutase (100 ml)	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cat.No.: L11-007
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (500 ml)	Fa. Sigma-Aldrich, D8537
Humanserum	Blutspendedienst, Frankfurt am Main
ECGS (2 ml)	Fa. Promo Cell, Cat.No.: C-30160
Gentamicin Sulfat (10 ml, 50 mg Gentamicin per ml)	Fa. Bio Whittaker, Cat.No.: 17-518Z
Heparin-Natrium-5000-ratiopharm, 5 Fläschchen jeweils 5.000 I.E./0,2 ml	Fa. Ratiopharm, PZN-3029820
Glutaraldehyd 25 % (1 l)	Fa. Merck, 8206031000
Zentrifuge	Fa. Hettich, Rotina 380 R
Zentrifuge	Fa. Eppendorf, Centrifuge 5402
Pipette	Fa. Hirschmann Laborgeräte, Pipetus
Pipettenspitze	Fa. Costar, 5 ml stripette: Cat.No.: 4487, 10 ml stripette: Cat.No.: 4488

<b>Pipettenspitze</b>	Fa. StarLab, Bevelled Filter Tip (1.000 µl Cat.No.: S1126-7810, 200 µl Cat.No.: S1120-880, 100 µl Cat.No.: S1120-1840, 20 µl Cat.No.: S1120-1810, 10 µl Cat.No.: S1121-3810)
<b>Falcon/Cellstar Röhrchen, 15 ml</b>	Fa. Greiner bio-one, Cat.No.: 188271
<b>1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen</b>	Eppendorf
<b>C-Chip Einweg-Zählkammer</b>	Fa. Digital Bio, DHC-N01
<b>Trypanblau 0,4 % (100 ml)</b>	Fa. Invitrogen, 15250
<b>Fibronektin (100 µg/ml)</b>	FC010 EMD MILLIPORE, P02751
<b>FACS Röhrchen</b>	Fa. BD Falcon, REF No.: 352235
<b>Mikroskop</b>	Zeiss, ID 03
<b>Mikroskop/Foto</b>	Zeiss, Observer Z1/AxioCam MRm
<b>Mikroskop Programm</b>	Axio vision
<b>ELISA</b>	Tecan, infinite M200
<b>ELISA Programm</b>	Magellan Version 6.5
<b>Schwenktisch</b>	Stuart, see-saw rocker SSL4
<b>Thermalblock</b>	Biometra, TB1
<b>Magnetrührer mit Heizplattenfunktion</b>	Yellow line, yellow line Mag HS7
<b>Elektrophorese und Blotting Station</b>	Bio Rad, Power Pac HC
<b>Werkbank</b>	Antair BSK
<b>Inkubator</b>	Heracell 240i Thermo Scientific
<b>Wasserbad</b>	GRW 720-04 Fritz Gössner
<b>Entwicklungskammer</b>	Fusion FX7 Peqlab
<b>Entwicklungssoftware</b>	Fusion
<b>FACS</b>	Becton Dickinson (Heidelberg) FACSCalibur
<b>FACS</b>	Becton Dickinson (Heidelberg) FACScan
<b>Evaluation Programm</b>	Systat Software SigmaPlot 11.0
<b>Insulinspritze (1 ml)</b>	Fa. Becton, Dickinson, USA. REF: 324827
<b>Membranfilter (6-well 8,0 µm Porengröße)</b>	Becton Dickinson (Heidelberg) REF:353093

<b>Kollagen G</b> <b>(0,4%-ige Kollagenlösung in HCl,</b> <b>Typ I, 4 mg/ml)</b>	Fa. Biochrom, L7213
<b>Medium 199</b>	Fa. Sigma-Aldrich, M4530

**Tabelle 3: Materialien.**

**Nährmedium:**

500 ml Nährmedium bestehen aus:

- 430 ml RPMI 1640
- 50 ml FBS (= 10 %)
- 10 ml HEPES (= 2 %)
- 5 ml P/S (= 1 %)
- 5 ml GlutaMAX (= 1 %)

**HUVEC-Medium:**

500 ml Grundmedium bestehend aus:

- 483,8 ml M199 Medium
- 5 ml GlutaMAX (= 1 %)
- 10 ml HEPES Puffer (= 2 %)
- 0,2 ml Heparin-sodium (= 5.000 IE)
- 1 ml Gentamycin sulfat (= 50 mg)

Weitere Herstellung:

1. 396 ml des Grundmediums filtrieren
2. 50 ml humanes Serum und 50 ml FBS hinzufügen
3. Mischung steril filtrieren
4. 4 ml EGCS (endothelial cell growth supplement) hinzufügen

## Material und Methoden

Lösung	7 %	8 %	10 %	12 %
Aqua dest.	3,9 ml	3,5 ml	2,6 ml	1,75 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid A	2,3 ml	2,6 ml	3,2 ml	3,9 ml
Bisacryl B	1,1 ml	1,6 ml	1,6 ml	1,8 ml
10 % APDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 4: Trenngel.

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

Tabelle 5: Sammelgel.

Lösung	Inhalt	Mengenverhältnis
Antikörperpuffer	Blotpuffer	90 ml
	BSA	5 g in 100 ml Blotpuffer
Blotpuffer	10 x Towbinpuffer	100 ml
	Tween 20	5 ml
	Aqua dest.	895 ml
Blockierlösung	1 x Towbinpuffer	100 ml
	Magermilchpulver	10 g
10 x Elphopuffer (pH 8.3)	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g

## Material und Methoden

	SDS	10 g
	Aqua dest.	1 l
<b>1 x Elphopuffer</b>	10 x Elphopuffer	100 ml
	Aqua dest.	900 ml
<b>10 x Transferpuffer</b>	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	Aqua dest.	1 l
<b>1 x Transferpuffer</b>	10 x Transferpuffer	100 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua dest.	700 ml
<b>10 x Towbinpuffer</b>	Tris	12,1 g
	NaCl	90 g
	Aqua dest.	1 l
<b>1 x Towbinpuffer</b>	10 x Towbinpuffer	100 ml
	Aqua dest.	900 ml

Tabelle 6: Puffer-Lösungen für die SDS-polyacrylamidgel Elektrophorese, Western-Hybridisierung, Immunfärbung und Immunstripping.

Chemikalien	Konzentrationen	Lösungsmittel	Lagerung	Hersteller
<b>EDTA</b>	0,1 M (29,22 g/l), pH 7,4	H <sub>2</sub> O		Fa. Sigma, Kat#ED455
<b>NaCl</b>				Fa. Merck
<b>Na-deoxycholat</b>	10 % (g/v)	H <sub>2</sub> O		Fa. Sigma, Kat#D6750
<b>NaF</b>	0,2 M (8.398 g/l)	H <sub>2</sub> O	RT	Fa. Sigma, Kat#1504
<b>Tergitol NP40</b>	10 % (v/v)	H <sub>2</sub> O	RT	Fa. Sigma, Kat#127087- 87-0
<b>Tris-base</b>				Fa. USB

<b>Phosphatase Inhibitoren</b>	<b>Konzentrationen</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Lagerung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Na-orthovanadat</b>	0,2 M (36,78 g/l)	H <sub>2</sub> O	-20 °C	Fa. Sigma, Kat#S6508
<b>Protease Inhibitoren</b>	<b>Konzentrationen</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Lagerung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Leupeptin</b>	1 mg/ml	H <sub>2</sub> O	-20 °C	Fa. Sigma, Kat#2023
<b>Pepstatin A</b>	1 mg/ml	Methanol	-20 °C	Fa. Sigma, Kat#P5318
<b>Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)</b>	0,2 M (34,84 g/l)	Isopropanol	RT	Fa. Sigma, Kat#P7626
<b>Apropitin</b>	1 mg/ml	H <sub>2</sub> O	-20 °C	Fa. Sigma, Kat#A1153

**Tabelle 7: Lysispuffer.**

### **Vorbereitung des Lysispuffers:**

Für den maximalen Effekt muss Na-orthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) aktiviert werden:

1. 0,2 Mol Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Mischung in H<sub>2</sub>O (36.78 g/l) lösen
2. pH-Wert auf pH 10 (gelblich) einstellen
3. Mit Bunsenbrenner erhitzen, bis die Mischung farblos ist (10 min)
4. Auf Raumtemperatur herunterkühlen lassen
5. Den pH-Wert überprüfen (pH 10)
6. Schritte 3 bis 5 so oft wiederholen, bis der pH-Wert stabil bei pH 10 liegt
7. Die Aliquots bei -20 °C lagern

Tergitol NP40 muss 2 bis 3 Tage bei 70 °C inkubiert werden, bis es flüssig ist. 2 ml Tergitol werden zu 18 ml H<sub>2</sub>O gegeben und gut vermischt.

100 ml Puffer werden wie folgt zusammengestellt:

1. 790 mg Tris-Base werden in 75 ml H<sub>2</sub>O gelöst (Endkonzentration (EK): 50 mM) unter der Zugabe von 900 mg NaCl (EK 180 mM)
2. 10 ml 10 % Tergitol Lösung (EK 1 %) wird hinzugegeben

## Material und Methoden

3. 2,5 ml 10 % Na-deoxycholat Lösung (EK 0,25 %) wird hinzugegeben, umrühren bis die Lösung klar ist
4. 1 ml EDTA [0,1] (EK 1 mM) hinzugeben
5. Auf 98,2 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen
6. Zugabe von:
  - 100 µl Apropitin (EK 1 µg/ml)
  - 100 µl Leupeptin (EK 1 µg/ml)
  - 100 µl Pepstatin (EK 1 µg/ml)
  - 500 µl NaF (EK 1 mM)
  - 500 µl Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (EK 1 mM)
  - 500 µl PMSF (EK 1 mM)

Mischen und Aliquotierung von 500 µl bei -20 °C lagern.

Primärer Antikörper	Klon	Herkunft	Verdünnung	Menge
<b>CD49a-PE (Integrin alpha1, Mouse IgG1)</b>	SR84	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>CD49b-PE (Integrin alpha2, Mouse IgG2a)</b>	12F1-H6	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>CD49c-PE (Integrin alpha3, Mouse IgG1)</b>	C3 II.1	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>CD49d-PE (Integrin alpha4, Mouse IgG1)</b>	9F10	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>CD49e-PE (Integrin alpha5, Mouse IgG1)</b>	IIA1	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>CD49f-PE (Integrin alpha6, rat IgG2a)</b>	GoH3	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>CD29 R-PE (Integrin beta1, Mouse IgG1)</b>	MAR4	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl

## Material und Methoden

<b>CD61 R-PE (Integrin beta3, Mouse IgG1)</b>	VI-PL2	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>CD104 R-PE (Integrin beta4, rat IgG2b)</b>	439-9B	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Menge</b>
<b>Mouse IgG1 R-PE</b>	MOPC-21	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>Mouse IgG2a R-PE</b>	G155-178	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
<b>Rat IgG2b R-PE</b>	R35-38	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl

Tabelle 8: Integrin-Subtypen. Primäre und isotypische Antikörper, plus Herkunft, Verdünnung und Menge.

Antikörper	Bestellnummer	Herkunft	Verdünnung	Menge
<b>Ms X Hu Integrin alpha3</b>	MAB1952Z	Millipore	1:100	100 µl
<b>Ms X Hu Integrin alpha5</b>	MAB 1956Z	Millipore	1:100	100 µl
<b>Ms X Hu Integrin beta1</b>	MAB2253Z	Millipore	1:100	100 µl

Tabelle 9: Blockierende Antikörper: Integrin-Subtypen.

## Material und Methoden

### 2.3. Methoden

#### 2.3.1. Kultivierung der Zellen

##### 2.3.1.1. Auftauen der Zelllinien

Die Zelllinien, TCCSUP, RT112 und UMUC3, werden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  gelagert. Um die Zellen aufzutauen, legt man sie für ca. 1 Minute in ein  $37\text{ °C}$  warmes Wasserbad. Nun füllt man den gesamten Inhalt des Kryoröhrchens in ein 15 ml Falcon Röhrchen und füllt zusätzlich 9 ml RPMI 1640 Nährmedium hinzu. Anschließend zentrifugiert man die Falcon Röhrchen für 5 Minuten bei 1.050 Umdrehungen pro Minute und  $4\text{ °C}$ , um das Gefriermedium (Dimethylsulfoxid) von den Zellen zu trennen. Nach dem Zentrifugieren verwirft man den flüssigen Überstand und resuspendiert das Zellpellet in 7 ml Nährmedium. Abschließend füllt man die Zellsuspension in eine  $25\text{ cm}^2$  kleine Kulturflasche und lagert sie in einem  $37\text{ °C}$  warmen Inkubator ( $5\text{ % CO}_2$ ).

##### 2.3.1.2. Splitten der Zellen

Sobald die Zellen komplett am Boden der Kulturflasche konfluieren, i. d. R. nach 2 bis 3 Tagen Kultivierung, werden die Zellen gesplittet. Dafür verwirft man das alte Medium und wäscht die Zellen mit PBS (ohne Magnesium/Calcium). Man nimmt 1 ml PBS bei kleinen ( $25\text{ cm}^2$ ) Kulturflaschen und 3 ml PBS bei großen ( $75\text{ cm}^2$ ) Kulturflaschen. Nachdem man das PBS zu den Zellen hinzugegeben hat, wird die Flüssigkeit darin mehrfach kurzzeitig vorsichtig geschwenkt, um die Zellen zu waschen.

Danach entnimmt man das PBS wieder und fügt den Zellen Accutase im gleichen Verhältnis wie PBS (1 ml für kleine Flasche, 3 ml bei großer Flasche) hinzu, um sie vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Hierfür platziert man die Kulturflasche in den Inkubator bei  $37\text{ °C}$  für 1 bis 3 Minuten oder belässt die Flasche unter der Werkbank bei Raumtemperatur für 5 bis 6 Minuten. Um gänzlich alle Zellen abzulösen, kann man nach abgelaufener Zeit die Kulturflasche leicht schütteln oder vorsichtig von unten beklopfen und zusätzlich mithilfe von 3 bis 5 ml Nährmedium die noch festsitzenden Zellen abspülen, indem man mehrmals das Medium entlang des Flaschenbodens spült. Je nachdem, in welchem Verhältnis man die Zellen splitten möchte, entnimmt man nun die ganze oder einen Teil der Zellsuspension und füllt sie in eine große ( $75\text{ cm}^2$ ) Kulturflasche, in die man vorher eine ergänzende Menge Nährmedium gefüllt hat. In eine große Flasche füllt man entweder 10 oder 12 ml, sodass man z. B. für eine Splitting

## Material und Methoden

Ratio von 1 zu 4 (1 : 4) 3 ml Zellsuspension der kleinen Flasche entnimmt und 9 ml Nährmedium in der großen Flasche hinzufügt. Die drei Zellreihen haben eine individuelle Wachstumsgeschwindigkeit und müssen daher unterschiedlich hoch gesplittet werden. Möchte man z. B. eine volle Kulturflasche innerhalb von 48 Stunden erreichen, um einen Versuch durchführen zu können, muss man eine niedrige Splitting Ratio wählen (z. B. 1 : 3).

### 2.3.1.3 Mediumwechsel

Das Medium auf den Zellen sollte alle 2 bis 3 Tage gewechselt werden, wenn man die Zellen nicht splitten möchte. Hierfür verwirft man das alte Medium, wäscht die Zellen (s. o.) mit PBS (ohne Magnesium/Calcium) und gibt anschließend 12 ml neues Nährmedium in die Kulturflasche (bei der kleinen Flasche 6 ml Nährmedium).

### 2.3.2. Behandlung mit Curcumin

Zunächst verwirft man das alte Medium. Man wäscht die Zellen, die man für ein Experiment benutzen möchte, mit PBS (ohne Magnesium/Calcium). Die Zellen wurden mit Curcumin in folgenden Konzentrationen behandelt: 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,2 µg/ml. Die Molare Masse von Curcumin beträgt 368, 838 g/mol. 0,27 µM Curcumin ergeben 0,1 µg Curcumin pro Milliliter. Für die gewünschten Konzentrationen wurde zunächst ein Zwischenstock angelegt, indem man 1 µl Curcumin (100 mM) in ein mit 999 µl Medium gefülltes 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen hinzugibt. So hat man eine 1:1000-Verdünnung des Curcumins. Gibt man nun 27 µl des Zwischenstocks in 10 ml Medium, hat man eine Curcuminkonzentration von 0,1 µg/ml in der Lösung, die man auf die Zellen gibt. Für eine Konzentration von 0,2 µg/ml wurden dementsprechend 54 µl des Zwischenstocks entnommen. Die Zellen wurden anschließend eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

### 2.3.3. Bestrahlen der Zellen

Nachdem die Zellen eine Stunde im Inkubator waren, verwirft man bei jeder Probe das Medium und fügt den Zellen PBS (mit Magnesium/Calcium) mit der gleichen Curcuminkonzentration wie zuvor hinzu. Nun wurden die Proben bestrahlt, indem man sie unter einer Tageslichtlampe für 5 Minuten belässt. Das Tageslicht befindet sich im Bereich des visuellen Lichtspektrums mit einer Wellenlänge von 400 bis 550 nm. Abschließend werden alle Proben wieder mit normalem Nährmedium (10–12 ml) versorgt und 24 Stunden im Inkubator (37 °C)

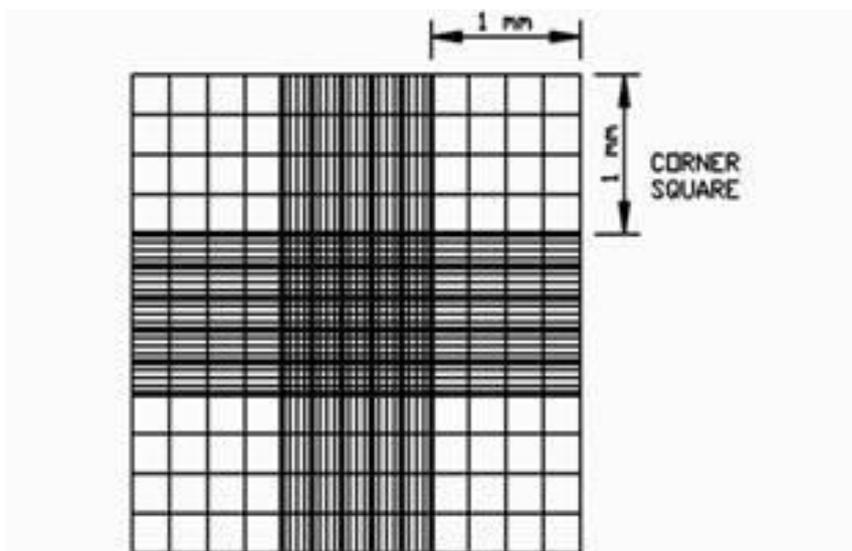
gelagert. Die Behandlung mit Curcumin und zusätzlich Lichtbestrahlung wird im Weiteren als Curumin<sup>Licht</sup>(-Therapie) oder Kombinationsbehandlung bezeichnet.

### 2.3.4. Zellen einstellen

Um die Zellzahl einer Suspension zu bestimmen, entnimmt man dieser 10 µl und fügt dies in ein kleineres Gefäß (z. B. 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen), wo man es mit 90 µl Trypanblau vermengt. Trypanblau markiert alle Zellen blau, die keine intakte Zellmembran mehr besitzen – da es sich hierbei um nicht vitale Zellen handelt, werden diese nicht mitgezählt. Als nächstes entnimmt man dieser 100-µl-Suspension 10 µl und fügt diese in eine Neubauer Zählkammer (**Abbildung 5**), die mithilfe von Kapillarkräften gefüllt wird. Die Zellen mit intakter Zellmembran erscheinen unter dem Mikroskop hell und sind vom Blau des Trypanblaus umgeben, so dass man sie gut zählen kann. Nun zählt man alle hellen Zellen in den vier großen Quadranten (jeder enthält 16 kleinere Quadranten) am besten in einer systematischen Reihenfolge. Die Zellen sollten über die gesamte Zählkammer verstreut sein. Wie viel Zellen in einem Quadranten landen, ist also zufällig.

Die Fläche eines großen Quadranten beträgt 1 mm<sup>2</sup> und hat eine Tiefe von 0,1 mm, daraus erschließt sich ein Volumen von 10<sup>4</sup> ml. Um auf die gesamte Zellzahl zu kommen, benutzt man folgende Rechnung:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl aller 4 großen Quadranten} / 4 \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4$$



**Abbildung 5: Neubauer-Zählkammer.**

Quelle: [http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/images/63560\\_a.jpg](http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/images/63560_a.jpg) (aufgerufen am 25.07.2016).

### 2.3.5. Adhäsion an die Extrazelluläre Matrix (EZM)

Der Adhäsionsversuch untersucht die Eigenschaften der Tumorzellen, sich an eine Oberfläche zu heften. Für die Versuchsreihen wurde mit Kollagen G (400 µg/ml) und Fibronectin (100 µg/ml) gearbeitet, die als Matrixproteine für die Anheftung der Tumorzellen dienten. Der Versuch bestand aus einem dreitägigen Aufbau. Am ersten Tag wurde eine 24-well Platte mit Kollagen G/Fibronectin beschichtet. Dafür wurden zunächst Kollagen und Fibronectin 1:10 in PBS (ohne Magnesium/Calcium) verdünnt. Von der Verdünnung kamen jeweils 500 µl in die vorgesehenen Wells. Die Platte kam über Nacht in den Kühlschrank bei 4 °C. Zudem wurden am ersten Tag die Versuchszellen einer Zellreihe in zwei 6-well Platten umgesetzt. Dafür wurde zuerst das alte Medium verworfen, die volle Kulturflasche mit PBS (ohne Magnesium/Calcium) gewaschen und die Zellen mit 3 ml Accutase zum Ablösen gebracht. Anschließend wurden die Zellen in die Wells in einer 1:4-Verdünnung gegeben (1 ml Zellsuspension + 3 ml Nährmedium) und über Nacht im Inkubator bei 37 °C gelagert.

Am zweiten Tag wurden die Zellen mit Curcumin in drei verschiedenen Konzentrationen (0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,2 µg/ml) behandelt, zudem wurde eine Kontrolle belassen. Zunächst wurde das alte Medium auf den Platten entfernt, dann wurden die Zellen mit PBS (ohne Magnesium/Calcium) gewaschen, anschließend das Curcumin daraufgegeben, die Kontrolle bekam 4 ml normales Medium, und die Platten eine Stunde im Inkubator belassen. Danach wurde das Medium mit Curcumin verworfen und überall PBS (mit Magnesium/Calcium) mit den gleichen Curcuminkonzentrationen hinzugegeben. Die Kontrollprobe bekam 4ml PBS ohne Curcumin. Nun wurde eine der beiden 6-well Platten 5 Minuten unter der Tageslichtlampe bestrahlt. Abschließend wurde das PBS aus allen Wells verworfen und in alle Wells 4 ml normales Medium gegeben. Die Platten blieben über Nacht im Inkubator bei 37 °C. Das eigentliche Experiment fand am dritten Tag statt. Als Erstes wurden die Wells der 24-well Platte vorsichtig dreimal mit PBS (ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen. Um die Matrixproteine nicht aus Versehen abzuspülen, wurde das PBS über den Rand in das Well gegeben. Nach dem Waschen kommt 1 ml Blockierpuffer (1 % BSA in PBS) in die Wells, den man bei Raumtemperatur für 1 Stunde einwirken lässt, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1 ml Accutase pro Well abgelöst, in 4 ml Nährmedium resuspendiert und in 15 ml Falcons überführt.

## Material und Methoden

Nun wurde die Suspension für 5 Minuten bei 1050 rpm zentrifugiert. Der Überstand über dem Zellpellet wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Medium suspendiert. Optional wurde an dieser Stelle 1 µl Calcein den Proben hinzugefügt (s. u.). Als nächstes wurde die Zellzahl in jeder Probe gemäß **Kapitel 2.3.4.** bestimmt und die Proben wurden auf 200.000 Zellen/ml eingestellt, in dem man die Zellsuspensionen entsprechend verdünnt hat. Ist dies geschehen, kommen jeweils 500 µl in die vorgesehenen Wells der 24-well Platte, bei der man zuvor den Blockierpuffer entfernt hat und die Wells nochmal dreifach mit PBS gewaschen hat. Die Zellen wurden jetzt eine Stunde lang im Inkubator gelagert und dann dreimal mit PBS (mit  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen, das als Bindepuffer dient. Um die Zellen, die an der Matrixoberfläche haften, zu fixieren, wurde nun in jedes Well 500 µl 2-%-iges Glutaraldehyd (mit Alufolie bedeckt, da sehr lichtempfindlich) gegeben und die 24-well Platte für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hinterher wurden die Zellen noch einmal mit PBS (mit  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen und abschließend kam in jedes Well 1 ml PBS (mit  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ). Die Platte lässt sich nun im Kühlschrank lagern, die Auswertung kann jedoch auch direkt im Anschluss erfolgen.

### 2.3.5.1. Auswertung der Adhäsionsstudien

Die Auswertung der Versuchsplatten erfolgte auf zwei verschiedene Arten. Bei der ersten Methode wurde die Platte unter dem Mikroskop platziert und die Zellen bei zweihundertfacher Vergrößerung mithilfe eines Rasterokulars gezählt. Dafür suchte man sich fünf verschiedene Zählfelder im Well aus und bildete anschließend den Mittelwert aus den fünf Zellanzahlen. Die zweite Methode erfolgte mithilfe eines Multimode Microplate Readers, der in der Lage ist, Fluoreszenz zu messen. Als Fluoreszenzfarbstoff diente hierbei Calcein, das den Zellen bereits im Versuch zugeführt wurde (**s. Kapitel 2.3.5.**). Der Microplate Reader misst die spontanen Lichtemissionen, die durch das Komplexieren des Calceins mit Calciumionen entstehen. Dies kann nur in lebenden Zellen geschehen, d.h. je mehr intakte Zellen in der Probe, desto höher die gemessene Emissionsrate.

### 2.3.6. Adhäsion an Endothelzellen (HUVEC)

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, um herauszufinden, wie sich das Bindungsverhalten der Tumorzellen an Endothelzellen, wie sie in der Gefäßwand im menschlichen Körper vorkommen, darstellt. Dafür wurden 6-well Platten am Vortag mit HUVECs beschichtet (3 ml). Die HUVECs wurden zuvor aus einer menschlichen Nabelschnur isoliert und mithilfe eines eigens

## Material und Methoden

verwendeten Mediums kultiviert (s. o.). Es ist wichtig, dass die Zellen subkonfluent vorliegen für das Experiment. Am Versuchstag wurde 1 ml des HUVEC-Mediums verworfen und durch 1 ml der Tumorzellproben ersetzt, die zuvor auf 500.000 Zellen/ml eingestellt wurden (**s. Kapitel 2.3.4.**). Die Proben bestanden aus einer Kontrolle, einer mit 0,2 µg/ml Curcumin behandelten Probe, einer mit Tageslicht bestrahlten Kontrolle und einer Kombination aus Curcuminbehandlung (0,2 µg/ml) und Bestrahlung (Kombinationsbehandlung, Curcumin<sup>Licht</sup>). Die Platte wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1-%igem Glutaraldehyd (lichtsensibel) und zweifach mit PBS (mit Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) gewaschen. Um die Zellen an Ort und Stelle zu fixieren, wurden sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 1-%igem Glutaraldehyd inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen nochmals mit PBS (mit Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und zuletzt in jedes Well 2 ml PBS (mit Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) gegeben. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop mit zweihundertfacher Vergrößerung mit Rasterokular, in dem die Zellzahl in jeweils fünf Feldern gezählt wurde.

### 2.3.7. Chemotaxis

Beim Chemotaxisversuch wurde untersucht, wie das Migrationsverhalten der Tumorzelllinien durch einen Filter sich abhängig von der Curcuminbehandlung verändert. Als Erstes wurde begonnen, die Zellen mit PBS zu waschen, sie mit Accutase zu lösen und in 15-ml-Falcon-Röhrchen zu überführen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml serumfreies Medium resuspendiert. Nun wurden die Zellproben (Kontrolle, Curcuminbehandlung (0,2 µg/ml), bestrahlte Kontrolle, bestrahlte Curcuminbehandlung) auf 250.000 Zellen/ml eingestellt. Hierbei wurden 6-well Platten verwendet und die dazugehörigen Filter (6-well, 8 µm Porengröße). In die Wells kamen zunächst 2 ml Nährmedium, dann wurden die Filter eingesetzt und in jeden Filter kamen 2 ml einer Probe. Die Platten wurden 24 Stunden im Inkubator belassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen fixiert. Hierfür wurde zunächst Hämatoxylin gefiltert. Nun wurde der Inhalt der Filter von oben geleert und zweimal mit PBS (mit Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) gewaschen. Anschließend wurden neue 6-well Platten beschriftet, mit 2 ml 2-%igem Glutaraldehyd befüllt und die Filter umgelagert und eingehängt. Die Filter wurden für 10 Minuten bei RT inkubiert und währenddessen für eine spätere Zuordnung an den Ecken beschriftet. Die „alten“ Platten werden aufbewahrt, um evtl. vorhandene Zellen im unteren Kompartiment zu zählen. Nach der Fixierung wurden die Filter auf der Seite in VE-Was-

## Material und Methoden

ser gewaschen und anschließend 10 Minuten in Hämatoxylin gefärbt. Nach dem Färben werden die Filter auf dem Kopf mit fließendem Leitungswasser gebläut und nach ca. 2 Minuten geschwenkt, um die Farbe komplett auszuwaschen. Danach wurden die Filter in eine Schale mit VE-Wasser gelegt und mit Wattestäbchen die Zellen im Filter entfernt. Abschließend wurden die Filter noch einmal mit VE-Wasser gewaschen und in eine neue 6-well Platte gelagert, bei der zuvor jeweils 2 ml PBS (mit  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) in die Wells gegeben wurden. Zum Ende wurden in jeden Filter 2 ml PBS (mit  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) pipettiert. Die Platten wurden unter dem Mikroskop mithilfe des Rasterokulars ausgezählt.

### 2.3.8. FACScan-Analyse von Integrinen

Die Expression von Integrinen auf Zellmembranen kann mithilfe des FACS gemessen werden. Dieses Verfahren funktioniert durch Durchflusszytometrie, dabei fließen Zellen einzeln in einem hohen Tempo an einer elektrischen Spannung oder an einem Lichtstrahl vorbei, wobei sie nach Größe und Granularität sortiert werden.

Am ersten Versuchstag wurden die Zellen mit Curcumin behandelt und ausgewählte Proben zusätzlich bestrahlt (s. o.). Mit Beginn des zweiten Versuchstages wurden die Zellen gewaschen, abgelöst, in 15-ml-Falcons überführt und zentrifugiert. Die nächsten Schritte wurden allesamt auf Eis durchgeführt, um die Proteine möglichst schonend zu behandeln. Zunächst wurde das Zellpellet in 2 ml FACS-Puffer (PBS ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  + 0,5 % BSA) resuspendiert und erneut bei 4 °C für 5 Minuten bei 1050 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 12 ml FACS-Puffer aufgenommen, da 12 verschiedene Antikörper (**s. Tabelle 8**) verwendet werden. Also wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in FACS-Röhrchen verteilt und zentrifugiert. Nun wurde der Überstand verworfen und jeweils 20 µl der Antikörperlösungen auf die entsprechenden Zellpellets gegeben und in Suspension gebracht. Die Antikörper wurden für eine Stunde auf Eis im (dunklen) Kühlschrank inkubiert. Nach abgelaufener Zeit wurden die Röhrchen zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen zweifach mit 1 bis 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Zum Abschluss wurde das Pellet, abhängig von der Größe, in 200 bis 400 µl FACS-Puffer resuspendiert, und die Proben wurden am Durchflusszytometer gemessen.

## Material und Methoden

### 2.3.9. Proteinisolierung

Man isoliert die Proteine der Zellen, um sie später für das Western Blotting zu verwenden. Hierfür ist es nicht notwendig, die Zellen zu zählen. Zunächst ist es wichtig, den eingefrorenen Lysispuffer (**s. Tabelle 7**) langsam auf Eis auftauen zu lassen, bevor man mit dem Versuch starten kann. Wie in allen durchgeführten Versuchen wurden die Zellen am ersten Tag mit Curcumin behandelt und ausgewählte Proben bestrahlt, sodass sich folgende Proben ergaben: Kontrolle, Curcuminbehandlung (0,2 µg/ml), bestrahlte Kontrolle, bestrahlte Curcuminbehandlung (s. o.). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS (ohne Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) gewaschen, mit Accutase abgelöst und in 5 ml PBS oder Nährmedium resuspendiert. Nach der Überführung der Zellsuspensionen in 15-ml-Falcon-Röhrchen wurden die Proben für 5 Minuten bei 4 °C und 1050 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde zu jeweils 1,5 ml Lysispuffer 7,5 µl PMSF pipettiert.

Nun wurde der Überstand abdekantiert und die Restflüssigkeit über dem Pellet abgesaugt. Je nach Pelletgröße wurden die Zellen nun in 100 bis 300 µl Lysispuffer resuspendiert und in 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Proben wurden 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mithilfe einer Insulinspritze die Zellsuspension siebenmal gut durchgemischt, bis das Lysat schaumig wurde. Das Lysat kam anschließend für 10 Minuten bei 4 °C und 10.000 rpm in die Eppendorf-Zentrifuge. Im Überstand befinden sich die freigesetzten Proteine, sodass die Flüssigkeit über dem Pellet abgesaugt und in zuvor beschriftete Kryoröhrchen überführt wurde und, sofern die Proteine nicht sofort weiterverarbeitet wurden, bei -80 °C verstaut und gelagert wurden. Das Zellpellet wurde verworfen. Bevor die Proteinlösung in den Gefrierschrank bei -80 °C kam, wurden 3 µl Proteinlösung zur späteren Konzentrationsbestimmung entnommen und in 0,2-ml-PCR-Röhrchen pipettiert.

#### 2.3.9.1. Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Coomassie-Methode (Bradford)

Nachdem bei der Proteinisolierung 3 µl der Proteinlösung in 0,2-ml-PCR-Röhrchen pipettiert wurden (s. o.), wurde die Lösung mit 57 µl destilliertem Wasser (1:20) verdünnt. Aus jeder Lösung wurden 3 Proben in Form von 10 µl entnommen und in entsprechende Wells einer 96-well Platte pipettiert. Anschließend wurde jedem Well 300 µl Coomassie Blau hinzugefügt und die Proben für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, während sie auf dem

## Material und Methoden

Schwenktisch geschwenkt wurden. Hinterher wurde die optische Dichte/Extinktion der Proteinlösungen im Tecan bei 595 nm Licht-Wellenlänge gemessen. Um für die Messung einen Vergleichswert zu bekommen, wurde ein sog. „blank“ verwendet, dessen 3 Proben aus destilliertem Wasser (plus Coomasie Blau) bestanden. Durch eine Kalibrierungskurve von verschiedenen Albuminkonzentrationen konnte der Computer den entsprechenden Proteingehalt messen.

### 2.3.10. Gel-Elektrophorese und Western Blot

Die Gel-Elektrophorese wird für Trennung von DNA, RNA und, wie in diesem Falle, von Proteinen verwendet. Hierbei werden die Proteine nach ihrer Ladung und Größe aufgeteilt. Die Trennung erfolgt durch Glycingele mit 4 % Sammelgel und 7 bis 15 % Trenngel (Laemmli). Die Zusammensetzung der Gele kann den **Tabellen 4** und **5** entnommen werden. Die Proteine wurden so gewonnen, wie in den **Kapiteln 2.3.8.** und **2.3.8.1.** beschrieben. Während der Gel-Elektrophorese und Western-Blot-Analyse wurden verschiedene Puffer verwendet, deren Zusammensetzungen in **Tabelle 6** zu finden sind.

Für die Trennung wurden jeweils 7,2 ml Trenngel in die Gelkammern pipettiert und 50 µl Isobutanol draufgegeben, um Bläschen zu vermeiden. Nach 15 bis 20 Minuten Polymerisation wurde das Isobutanol mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Filterpapier getrocknet. Der übrig gebliebene Platz wurde mit Sammelgel gefüllt und direkt danach wurden die Kämme platziert, um Taschen zu formen. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x Elphopuffer gefüllt und die Taschen mit 5 µl Proteinmarker (peqGOLD IV) und den Proteinlösungen beladen. Bevor jede Tasche mit 50 µg Protein gefüllt wurde, wurden die Proben im 1:1-Verhältnis verdünnt mit einer Mixtur bestehend aus Laemmli-Puffer (4 %) und Mercaptoethanol. Dann wurden die Proteine denaturiert, indem sie bei 95 °C für 5 Minuten im Thermo-Block belassen wurden. Die Elektrophorese wurde unter einer Spannung von 80 V durchgeführt, und nachdem die Proben das Sammelgel passiert hatten, wurde die Spannung auf bis zu 120 V erhöht. Nach etwa einer Stunde waren die Proteine getrennt und konnten nun für das Western Blotting verwendet werden.

## Material und Methoden

Der Western Blot dient zum Nachweis von Proteinen. Die durch die Gel-Elektrophorese getrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Zu Beginn wurden die Nitrozellulose Membran, das Schwammtuch und auch das Blotting Papier für 15 Minuten in 1 x Transferpuffer eingeweicht. Ein „Sandwich“ mit Materialien in folgender Reihenfolge wurde zusammengestellt: Schwammtuch, 2 Blotting Papiere, Gel, Membran, 2 Blotting Papiere, zweites Schwammtuch. Um Bläschen zu vermeiden, wurde die Luft aus dem Aufbau gepresst, indem man eine Pipettenspitze mit leichtem Druck über das zweite Blotting Papier Paar rollte. Danach wurde die Kammerhalterung aufgebaut, 1 x Transferpuffer hinzugegeben und mit einem Eisblock versucht, eine spätere Überhitzung zu vermeiden. Nun wurde die Kammer auf einen Magnetrührer gestellt, ein Magnetfischchen hineingelegt und der Blot-Vorgang für eine Stunde bei 100 V laufen gelassen. Nach abgelaufener Zeit waren die getrennten Proteine auf eine Membran transferiert, die zur Immunfärbung mit bestimmten Antikörpern benutzt werden konnte.

Die Nitrozellulose Membran wurde mit 1 x Towbinpuffer gewaschen und, um unspezifische Bindungen zu umgehen, mit Blockierlösung blockiert. Nach einer Stunde wurde die Blockierlösung verworfen und die Membran wurde mit 1 x Blotpuffer gewaschen; die entsprechenden primären Antikörper wurden auf die Membran gegeben. Die Inkubation konnte entweder über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank oder für eine Stunde bei Raumtemperatur geschehen. Die primären Antikörper wurden nach der Verwendung in 15-ml-Falcons überführt und bis zu zweimal wiederverwendet. Die Membran wurde nun dreimal mit 1 x Blotpuffer für jeweils 15 Minuten gewaschen und anschließend mit dem passenden, zweiten Antikörper inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Membran erneut dreimal für 15 Minuten mit 1 x Blotpuffer und 5 Minuten lang mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran für eine Minute mit 1 ml einer 1:1-Mischung, bestehend aus Detektionsreagenz 1 und 2 (ECL-Lösung), inkubiert. Danach wurde die Membran in eine Plastikhülle gelegt und vom Fusion FX7 vermessen. Als Kontrolle zur gleichmäßigen Proteinladung diente  $\beta$ -Aktin.

### 2.3.11. Blockadestudie

#### 2.3.11.1 Adhäsion an Kollagen

Am Vortag wurde eine 24-well Platte mit Kollagen G beschichtet wie in **Kapitel 2.3.5.** beschrieben. Am Versuchstag wurde die Platte dreimal mit PBS (ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen und mit 1 ml Blockierpuffer pro Well eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 1 ml Nährmedium resuspendiert. Nun wurden in die entsprechenden Proben 10  $\mu$ l der blockierenden Antikörper  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ , und  $\beta 1$  (**s. Tabelle 9**) gegeben. Anschließend wurden die Zellen gezählt und auf 200.000/ml eingestellt. Nach einer Stunde wurde der Blockierpuffer auf der 24-well Platte entfernt und die Platte erneut dreimal mit PBS (ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen. Jetzt wurden in jedes mit Kollagen beschichtete Well 500  $\mu$ l der Proben gegeben und die Platte bei 37 °C eine Stunde im Inkubator belassen. Danach wurde die Platte dreimal mit PBS (mit  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen. Um die Zellen nun zu fixieren, wurden in die entsprechenden Wells 500  $\mu$ l 2%-iges Glutaraldehyd gegeben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Platte wieder dreimal mit PBS (mit  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) gewaschen und in jedem entsprechenden Well 1 ml PBS (mit  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$ ) belassen.

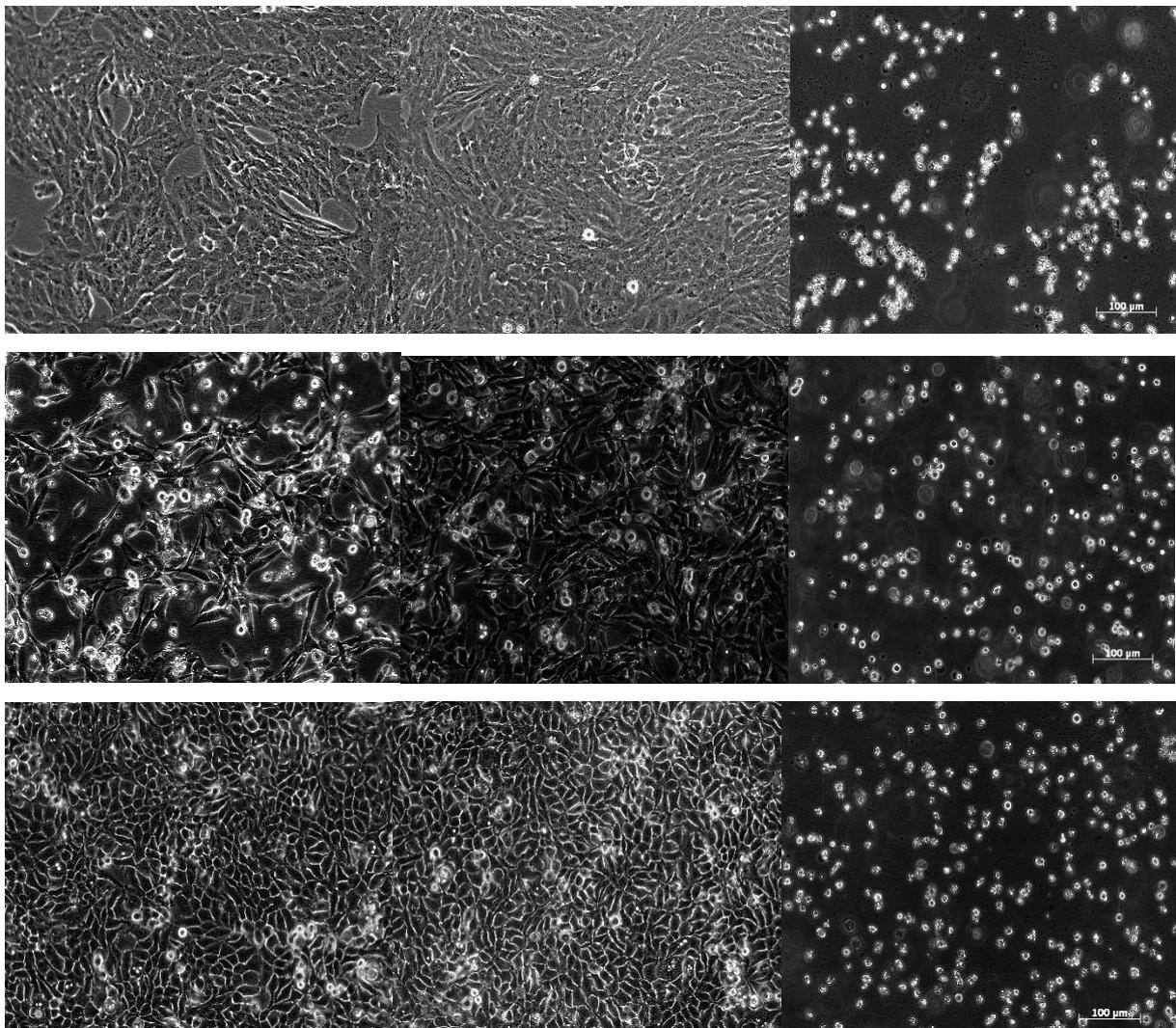
#### 2.3.11.2 Chemotaxis

Am Versuchstag wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert. Der Abstand wurde verworfen und mit 1 ml Medium ohne Zusätze resuspendiert. Nun wurden in die entsprechenden Proben 10  $\mu$ l der blockierenden Antikörper ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ) gegeben. Anschließend wurden die Zellen gezählt und auf 250.000/ml eingestellt. Danach wurden in eine 6-well Platte jeweils 2 ml Nährmedium in die entsprechenden Wells gegeben und ein Filter (6-well, 8 $\mu$ m Porengröße) eingehängt. In den Filter wurden jeweils 2 ml der Proben gegeben; die Platte wurde über Nacht im Inkubator bei 37 °C belassen. Ausgewertet wurde der Versuch wie in **Kapitel 2.3.7.** beschrieben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Zellbehandlung

**Abbildung 6** zeigt den Zustand der drei Tumorzellreihen 24 Stunden nach verschiedenen Behandlungsmethoden. Die Behandlungen bestanden aus einer reinen Curcuminbehandlung (0,2 µg/ml), einer reinen Bestrahlung mit Tageslicht und einer Kombinationsbehandlung aus beidem (Curcumin<sup>Licht</sup>). Bei jeder Zellreihe lässt sich gut erkennen, dass nur die Kombinationsbehandlung deutliche morphologische Alterationen induzierte. Die Tumorzellen rundeten sich ab, verloren Zell-Zell-Kontakte und verringerten sich in Anzahl und Größe.



**Abbildung 6: Hundertfache Vergrößerung behandelter Blasenkarzinomzellen.** Von oben nach unten: TCCSUP (Passage 11), UMUC3 (Passage 12) und RT112 (Passage 11) (von links nach rechts: Curcuminbehandlung (0,2 µg/ml), Bestrahlung mit visuellem Licht, kombinierte Behandlung mit Curcumin<sup>Licht</sup>. Kontrollzellen sind in **Abbildung 4** gezeigt.

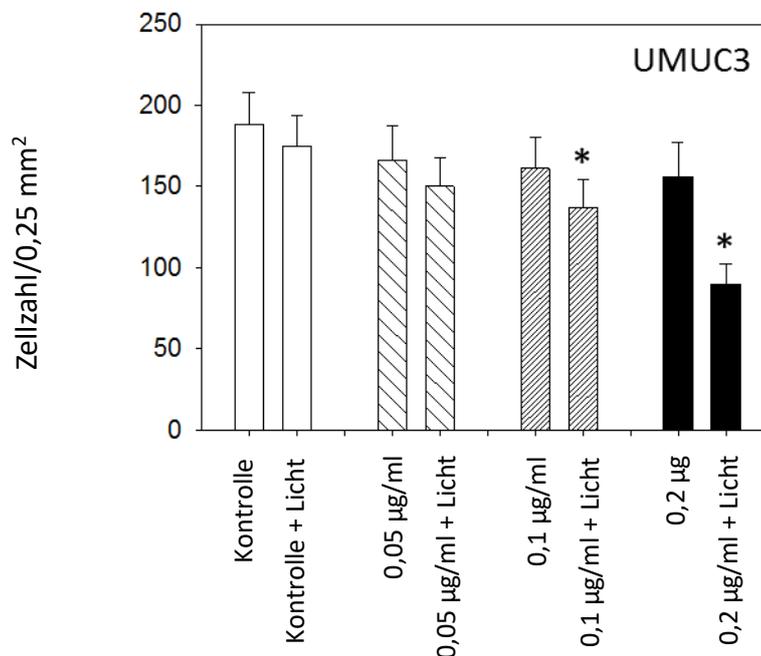
## Ergebnisse

### 3.2 Adhäsion an die EZM

Die Adhäsion an Kollagen, wie auch die Adhäsion an Fibronectin, wurde durchgeführt, um das Bindungsverhalten der Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix (EZM) zu untersuchen. Die Resultate basieren auf der Zellzahl der adhärenen Tumorzellen, die mithilfe eines Mikroskops bestimmt wurde. Die **Abbildungen 7 bis 12** zeigen die Ergebnisse dieser Testreihe, die mit acht verschiedenen Proben durchgeführt wurde. Neben der Kontrolle und der bestrahlten Kontrolle, wurden drei verschiedene Curcuminkonzentrationen (0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml) für die Zellbehandlung verwendet (bestrahlt versus nicht bestrahlt).

#### 3.2.1. Adhäsion an Kollagen

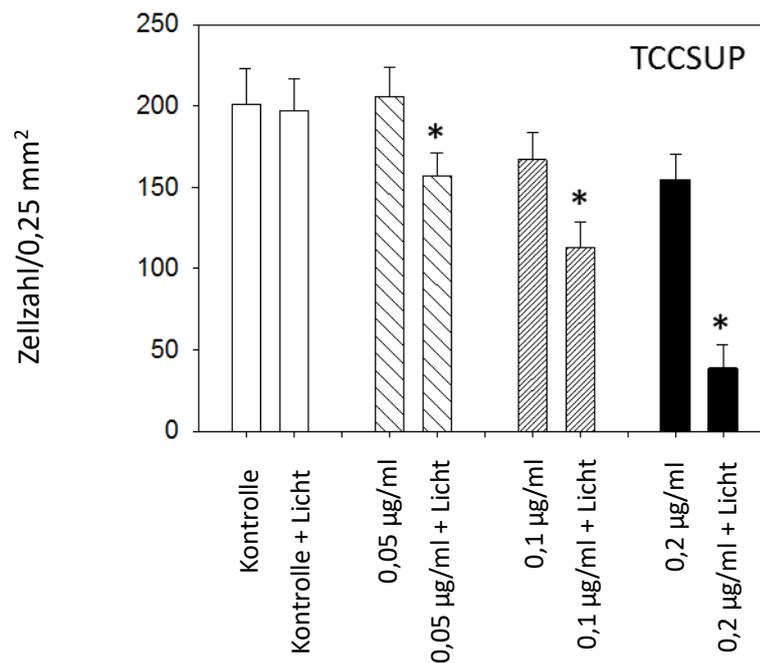
**Abbildung 7** veranschaulicht, dass die UMUC3-Zellen ein geringeres Bindungsverhalten zeigen, wenn sie zuvor eine Kombinationsbehandlung bekamen. Die reine Behandlung mit Curcumin hatte einen schwächeren Effekt. Je höher die Curcuminkonzentration, desto stärker der Effekt, wobei erst ab einer Konzentration von 0,2 µg/ml eine signifikante Reduzierung der adhärenen Zellen zu beobachten war.



**Abbildung 7:** Anzahl der UMUC3-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit an der Kollagenoberfläche adhären. Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

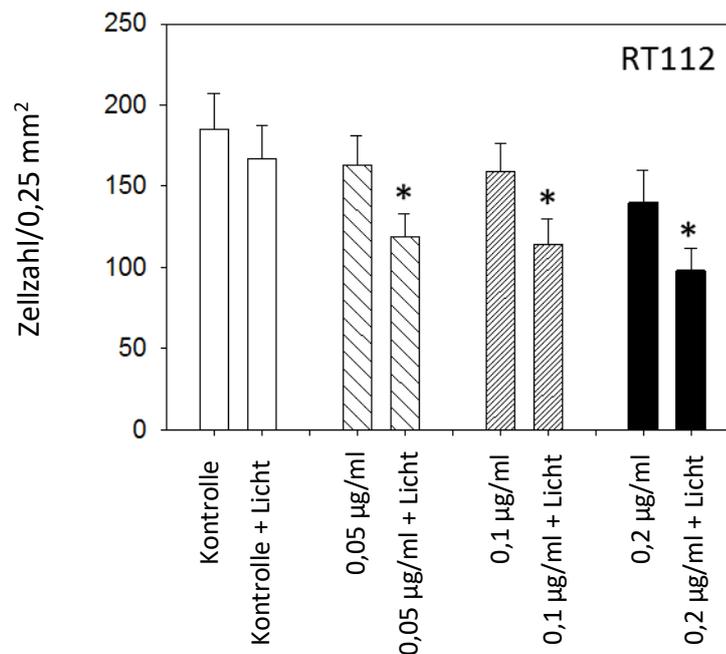
**Abbildung 8** veranschaulicht die Resultate der Kollagenadhäsion von TCCSUP-Zellen. Die Tumorzellen reagierten beinahe ausschließlich auf die Curcumin<sup>Licht</sup>-Therapie. Während der Effekt bei der Kombinationsbehandlung mit 0,05 µg/ml Curcumin noch gering ausfiel, war er bei einer Behandlung mit 0,1 µg/ml schon deutlicher erkennbar. Das Bindungsverhalten wurde bei einer Kombinationsbehandlung mit 0,2 µg/ml stark beeinflusst. Die Tumorzellen zeigten nur noch geringes Potenzial, sich an das Kollagen zu heften.



**Abbildung 8:** Anzahl der TCCSUP-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit an der Kollagenoberfläche adhärirten. Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

In **Abbildung 9** lässt sich erkennen, wie sich die RT112-Zellen in ihrem Bindungsverhalten veränderten. Diese Zellreihe reagierte auf die reine Curcuminbehandlung, vor allem in Gegenwart von 0,2 µg/ml Curcumin, mit einem reduzierten Bindungsverhalten. Es gab einen stärkeren Effekt bei den Kombinationsbehandlungen.

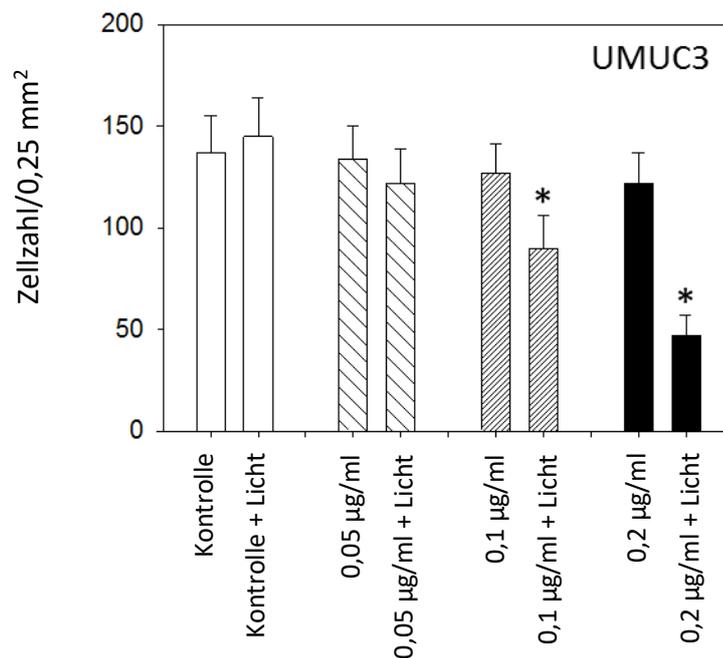


**Abbildung 9:** Anzahl der RT112-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit an der Kollagenoberfläche adhären. Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

### 3.2.2. Adhäsion an Fibronectin

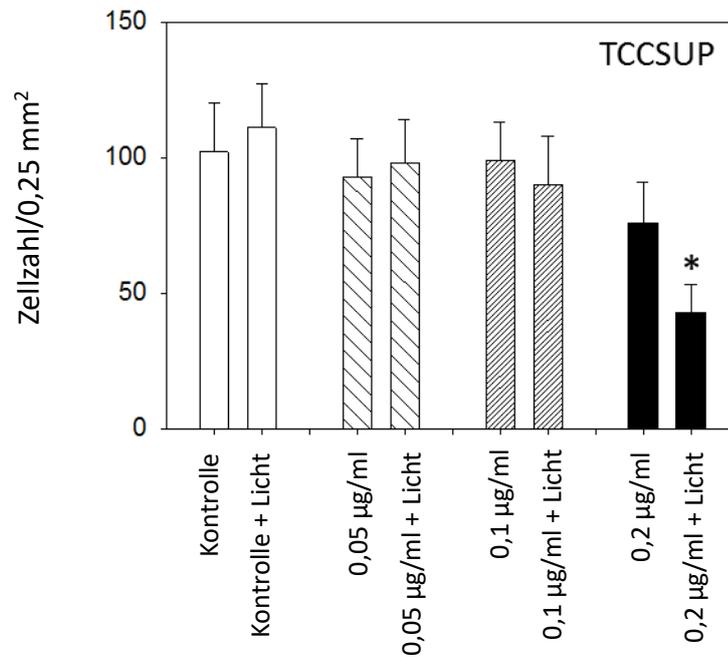
**Abbildung 10** verdeutlicht, dass die UMUC3-Zellen ein geringeres Bindungsverhalten hatten, wenn sie zuvor eine Behandlung mit Curcumin<sup>Licht</sup> bekamen. Die reine Bestrahlung sowie die ausschließliche Behandlung mit Curcumin induzierte keine signifikante Reaktion. Je höher die Curcuminkonzentration der Kombinationsbehandlung gewesen ist, desto stärker wurde der Effekt, wobei erst ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml eine signifikante Reduzierung der adhären Zellen zu beobachten war.



**Abbildung 10: Anzahl der UMUC3-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit an der Fibronectinoberfläche adhärten.** Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

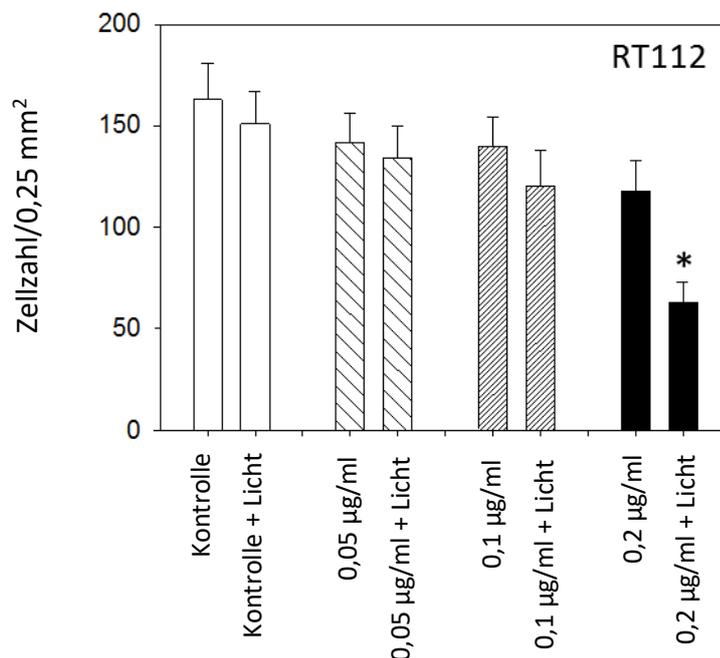
In **Abbildung 11** lässt sich erfassen, wie sich das Bindungsverhalten der TCCSUP-Zellen veränderte. In diesen Experimenten reagierten die Zellen mit einem reduzierten Bindungsverhalten auf die reine Curcuminbehandlung, dies bei einer verwendeten Konzentration von 0,2 µg/ml. Signifikant stärkere Effekte zeigten sich unter der Curcumin<sup>Licht</sup>-Behandlung.



**Abbildung 11: Anzahl der TCCSUP-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit an der Kollagenoberfläche adhären.** Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

**Abbildung 12** stellt die Resultate des Adhäsionstests mit RT112-Zellen dar. Die Tumorzellen wurden durch sämtliche Curcuminbehandlungen beeinflusst und reagierten mit einem reduzierten Bindungsverhalten. Während sich der Wirkeffekt bei der Curcumin<sup>Licht</sup>-Therapie mit 0,05 und 0,1 µg/ml im Vergleich zur ausschließlichen Curcuminbehandlung nicht wesentlich unterschied, wurde das Adhäsionsverhalten bei einer Behandlung mit 0,2 µg/ml Curcumin<sup>Licht</sup> stärker beeinflusst. Die Tumorzellen zeigten hier ein geringeres Potenzial, sich an die Fibronektinoberfläche zu heften.



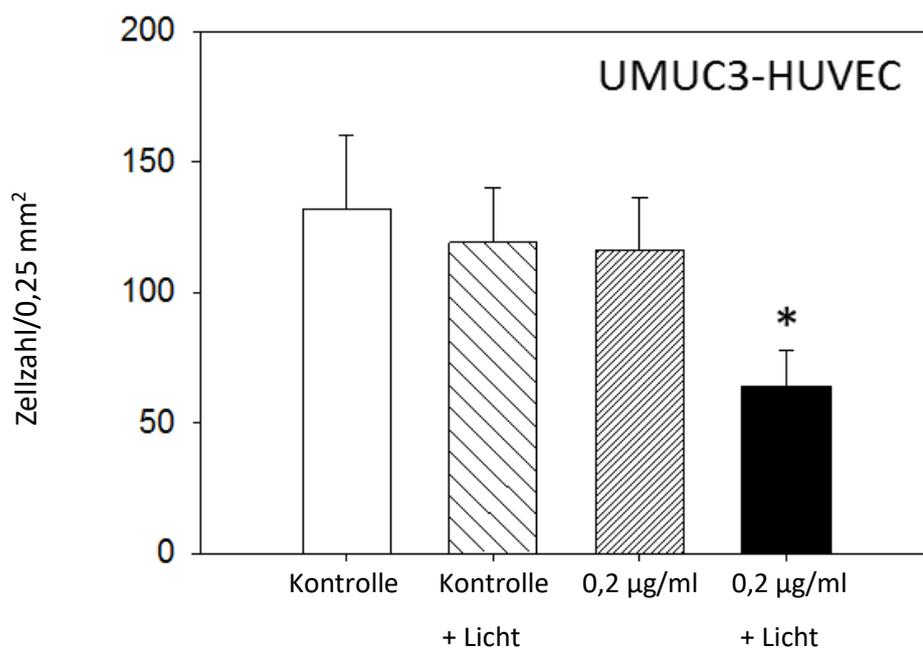
**Abbildung 12: Anzahl der RT112-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit an der Kollagenoberfläche adhärierten.** Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

### 3.3. Adhäsion an Endothelzellen (HUVEC)

Im Rahmen des Endothel-Tumorzell-Interaktionsassay wurden die Tumorzellen in Verbindung mit HUVECs gebracht und das Bindungsverhalten untersucht. Die Ergebnisse basieren auf der Zellzahl der adhärennten Tumorzellen, die mithilfe eines Mikroskops bestimmt wurde.

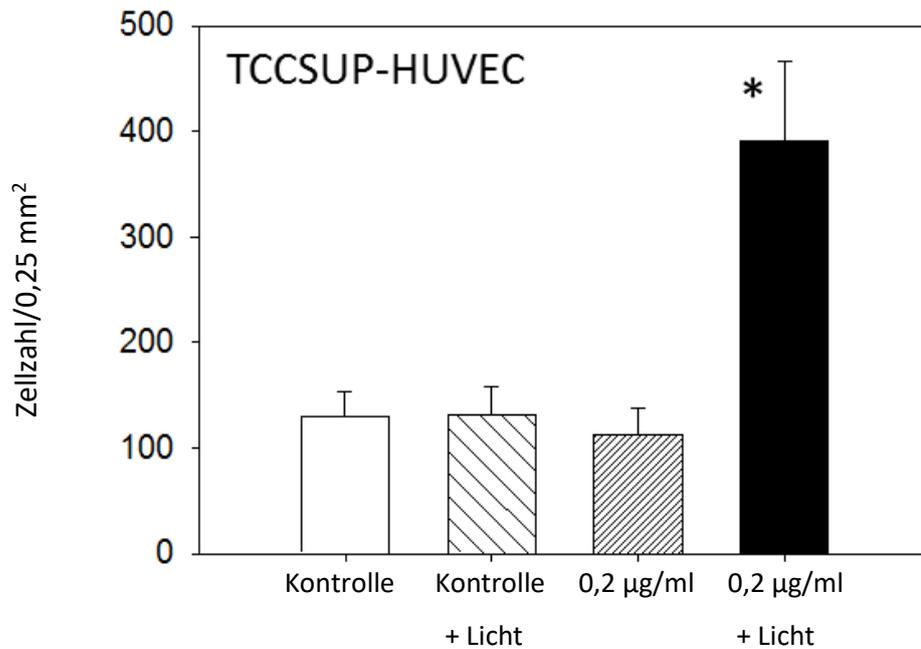
**Abbildung 13** veranschaulicht die Adhäsion der UMUC3-Zellen an die umbilikalen Endothelzellen, ermittelt nach einer Stunde Inkubationszeit. Der Kontrollansatz, die mit Licht bestrahlte Kontrolle sowie die mit 0,2 µg/ml Curcumin behandelte Probe sind in ihren Resultaten vergleichbar. Ein um mehr als die Hälfte verringertes Adhäsionsverhalten hingegen zeigten die Zellen unter der Curcumin<sup>Licht</sup>-Therapie.



**Abbildung 13: Anzahl der UMUC3-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit am Endothel anhefteten.** Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

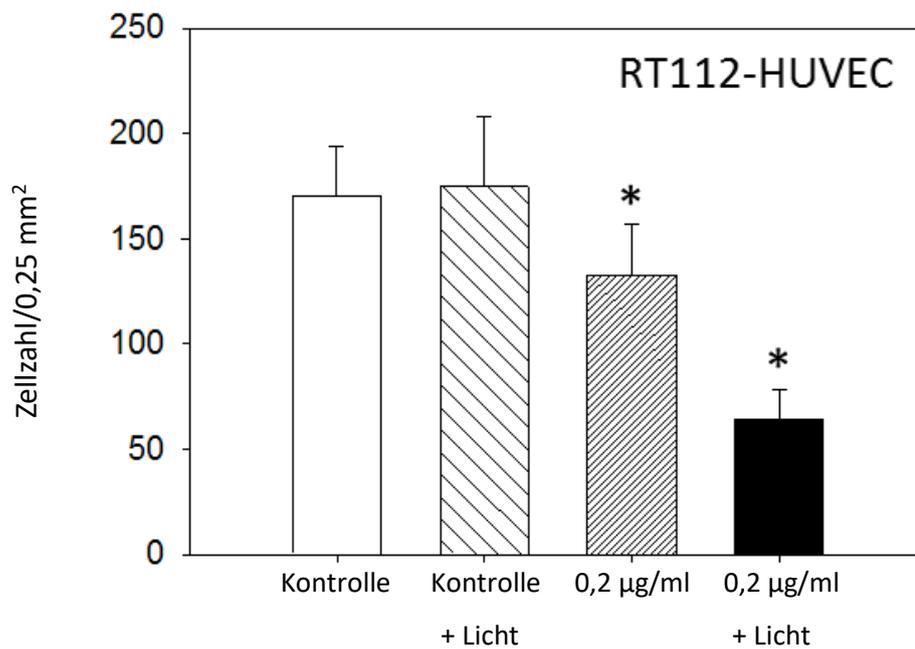
**Abbildung 14** illustriert das Adhäsionsverhalten der TCCSUP-Zellen an die Endothelzellen. Während die Tumorzellen der Kontrolle, der mit Licht bestrahlten Kontrolle und der mit 0,2 µg/ml Curcumin behandelten Probe allesamt ein sehr vergleichbares Adhäsionsverhalten zeigten, stieg die Bindungskapazität bei der Kombinationsbehandlung auf das Dreifache an.



**Abbildung 14:** Anzahl der TCCSUP-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit am Endothel anhefteten. Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

In **Abbildung 15** wird die Adhäsion von RT112-Zellen an Endothelzellen verdeutlicht. Hierbei zeigte sich ein annähernd gleiches Bindungsverhalten der Kontrollzellen und der mit Licht bestrahlten Kontrollzellen. Die mit 0,2 µg/ml Curcumin behandelten Tumorzellen zeichneten sich durch ein moderat reduziertes Adhäsionsverhalten gegenüber der Kontrolle aus. Die Zellen der Kombinationsbehandlung besaßen ein stärker eingeschränktes Potenzial, sich an die umbilikalen Endothelzellen zu binden.



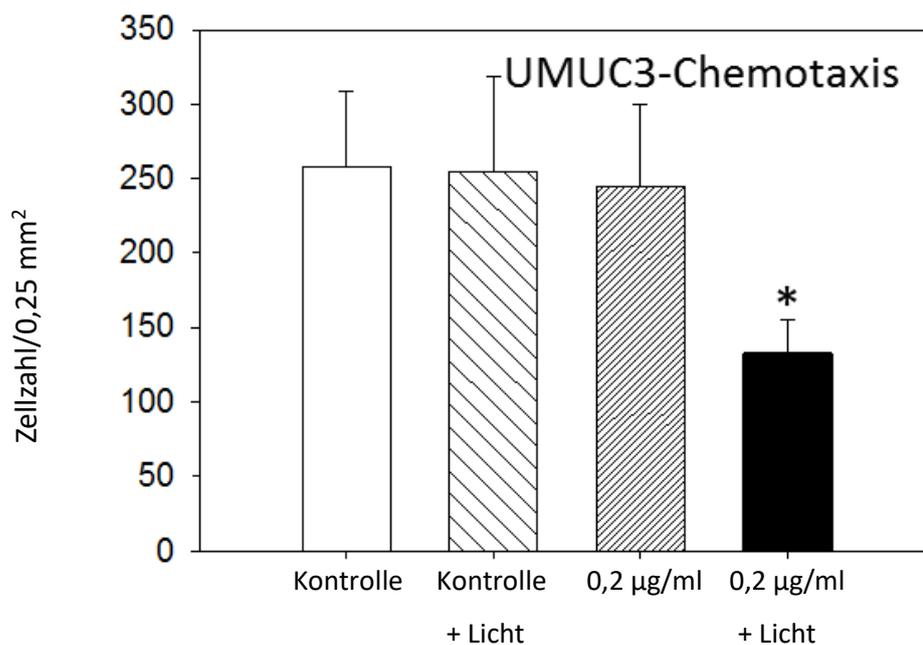
**Abbildung 15:** Anzahl der RT112-Zellen, die nach einer Stunde Inkubationszeit am Endothel anhefteten. Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

### 3.4 Chemotaxis

Die Chemotaxis wurde durchgeführt, um das Migrationsverhalten durch einen Filter zu untersuchen. Die Ergebnisse basieren auf der Zellzahl der migrierten Zellen, die mithilfe eines Mikroskops bestimmt wurde. Die **Abbildungen 16 bis 18** veranschaulichen die Ergebnisse. Bei der Auswertung wurden die Zellen erfasst, die durch den Filter wanderten und an der Unterseite hängen blieben.

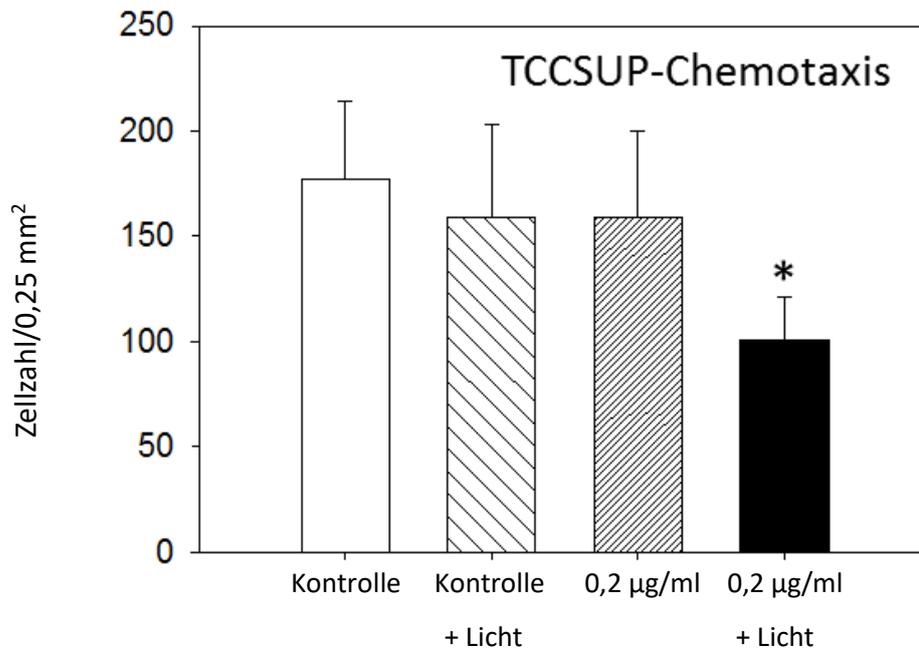
In **Abbildung 16** zeigen die mit Licht bestrahlte Kontrolle und die mit 0,2 µg/ml Curcumin behandelte Probe kaum abweichende Effekte bezüglich der Migration, verglichen mit der Kontrolle. Eine erhebliche Reduktion der Zellzahl ergab sich bei der Behandlung mit Curcumin<sup>Licht</sup>. Hierbei wurde eine beinahe um die Hälfte reduzierte Zellzahl, verglichen zur Kontrolle, ermittelt.



**Abbildung 16: Anzahl der UMUC3-Zellen, die durch den Filter gewandert und am Boden hängen geblieben sind.** Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

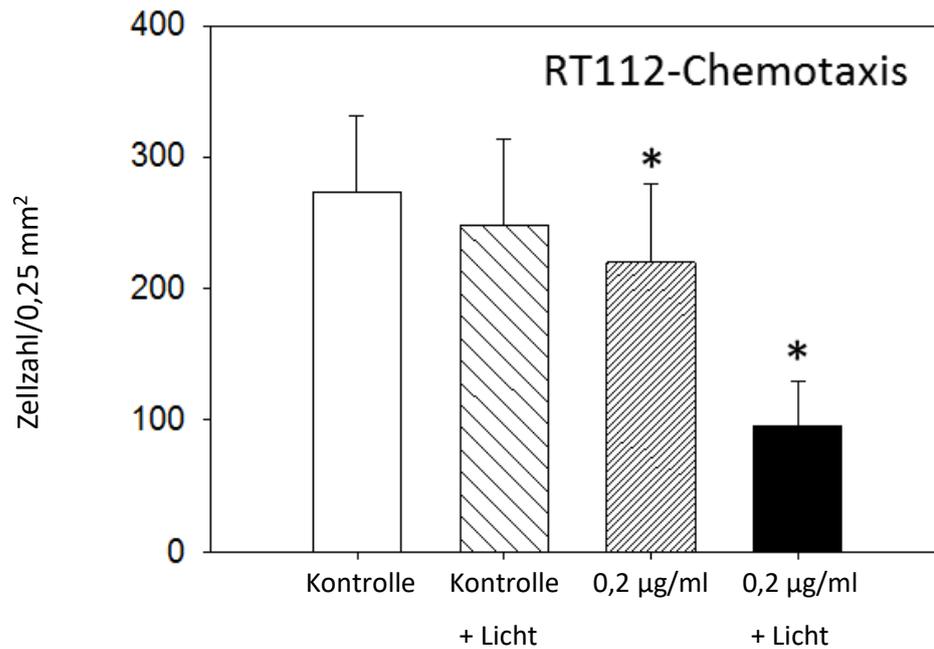
In **Abbildung 17** lassen die mit Licht bestrahlte Kontrolle und die mit 0,2 µg/ml Curcumin behandelte Probe eine geringe, nicht signifikante Reduktion der Zellwanderung erkennen. Der stärkste Effekt, verglichen mit der Kontrolle, trat bei der Therapie mit Curcumin<sup>Licht</sup> auf.



**Abbildung 17: Anzahl der TCCSUP-Zellen, die durch den Filter gewandert und am Boden hängen geblieben sind.** Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

## Ergebnisse

**Abbildung 18** lässt die geringe Differenz zwischen der Kontrolle und der mit Licht bestrahlten Kontrolle erkennen. Die mit 0,2 µg/ml Curcumin behandelte Probe unterschied sich in einer leichten Migrationsreduktion von der Kontrolle (81 %), die jedoch nicht signifikant war. Die Behandlung mit Curcumin<sup>Licht</sup> zeigte eine signifikante Verminderung (35 %) der Migration und damit der Zellzahl unter dem Filter.



**Abbildung 18:** Anzahl der RT112-Zellen, die durch den Filter gewandert und am Boden hängen geblieben sind. Die x-Achse beschreibt den Versuchsansatz, die y-Achse zeigt die Zellzahl pro 0,25 mm<sup>2</sup> an.

### 3.5 FACScan-Analyse von Integrinen und Membran Proteinen

**Abbildungen 19 bis 21** verweisen auf die Integrin-Expressionsmuster der unbehandelten Tumorzelllinien, inklusive der entsprechenden Isotypen. Die x-Koordinate spiegelt die Fluoreszenzintensität wider, die y-Koordinate die Anzahl fluoreszenzpositiver Zellen in Korrelation zur Intensität.

Vergleicht man die Expressionen in den **Abbildungen 19 bis 21** von  $\alpha 1$  und  $\alpha 4$  aller drei Zelllinien, so lässt sich feststellen, dass diese Integrine nur sehr schwach oder gar nicht auf der Zellmembran exprimiert wurden. Umgekehrt ließen sich die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  und  $\beta 1$  auf jeder Zelllinie detektieren. Eine zellspezifische Expression ergab sich wie folgt: Während Integrin  $\beta 3$  nicht auf RT112-Zellen, sondern nur auf UMUC3- und TCCSUP-Zellen nachzuweisen war (**Abbildungen 19–20**), wurde  $\beta 4$ -Integrin nur auf TCCSUP- (**Abbildung 20**) und RT112-Zellen (**Abbildung 21**) detektiert. Da die Integrine  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  auf jeder Zelle stark exprimiert waren, wurden diese Integrine für die später zu beschreibende Blockadeanalyse verwendet (**s. Kapitel 3.7.**).

## UMUC3

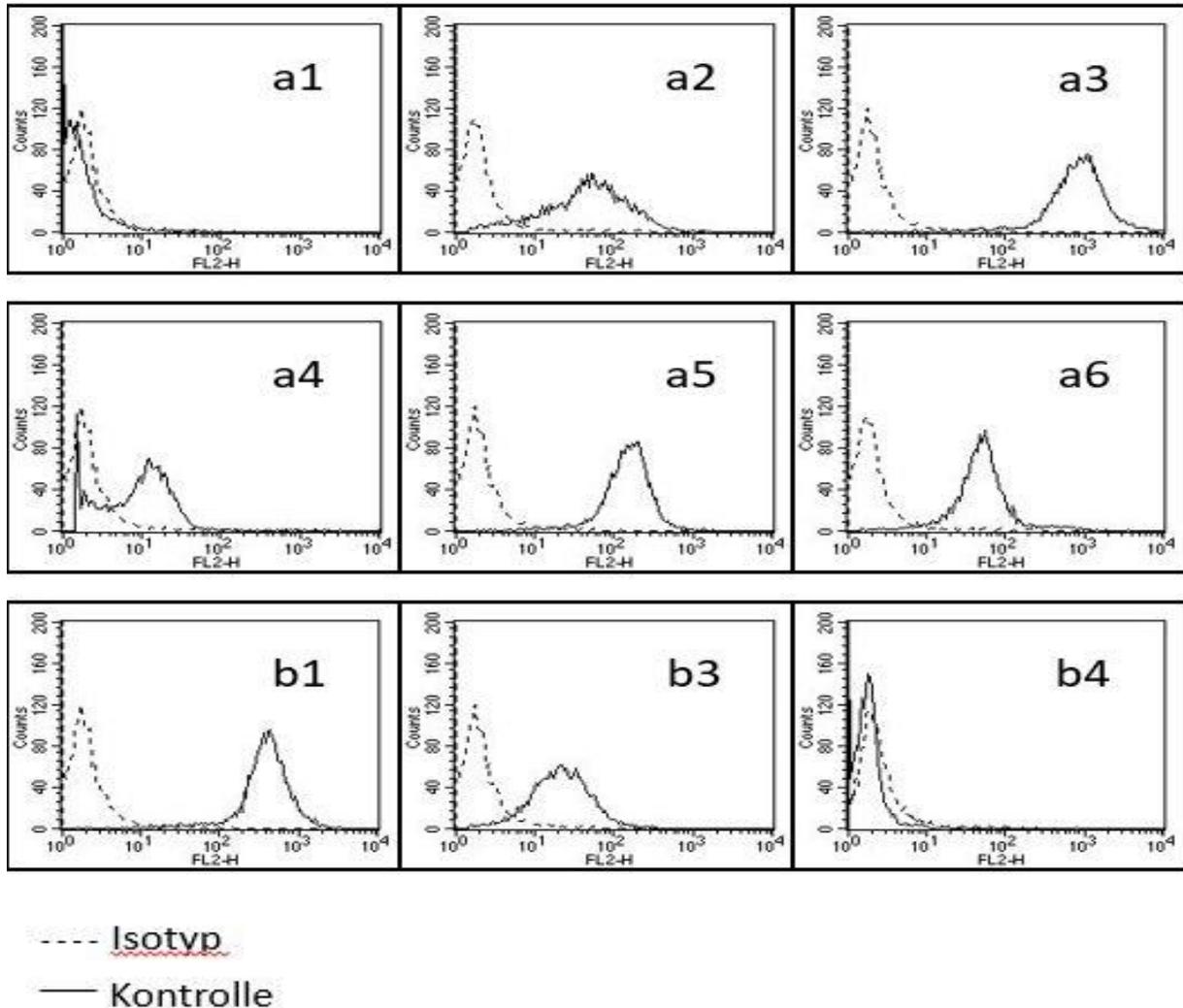
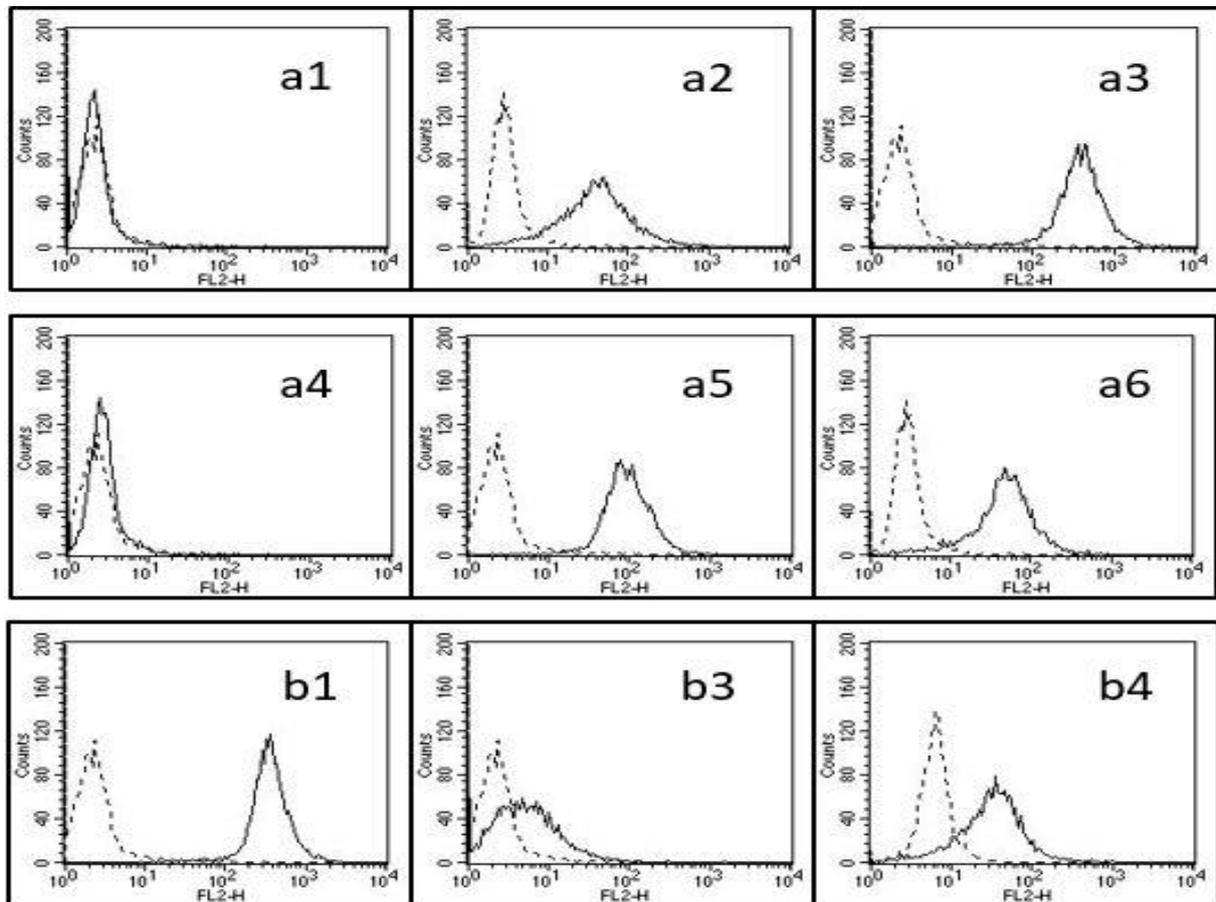


Abbildung 19: Darstellung des Integrin-Expressionsmusters (durchgehende Linie) inklusive des entsprechenden Isotyps (gestrichelte Linie) der UMUC3-Zelllinie. Die x-Achse beschreibt die Fluoreszenzintensität und damit die Expressionsstärke des Integrins. Die y-Koordinate zeigt die gezählten Zellen.

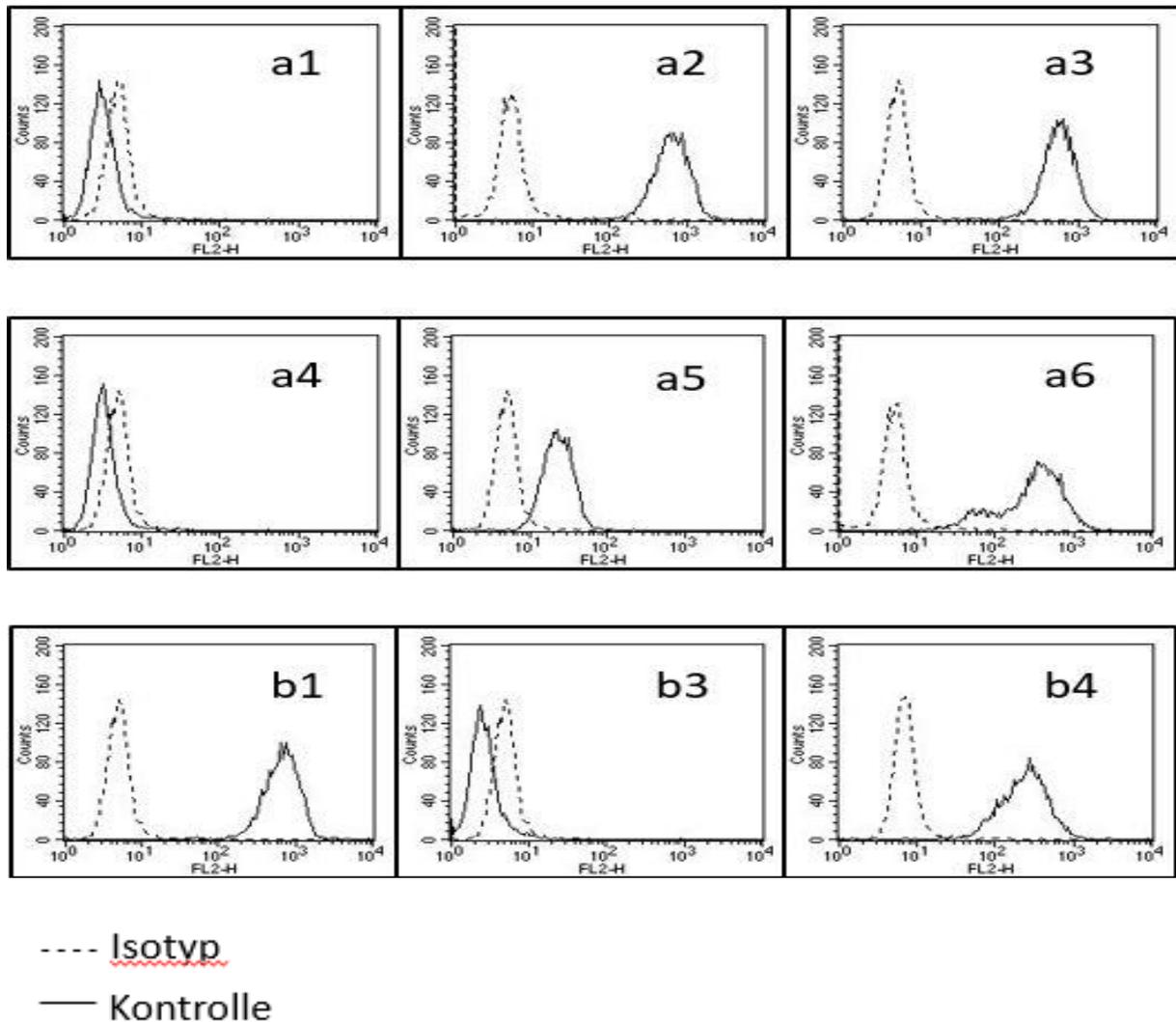
TCCSUP



---- Isotyp  
 — Kontrolle

Abbildung 20: Darstellung des Integrin-Expressionsmusters (durchgehende Linie) inklusive des entsprechenden Isotyps (gestrichelte Linie) der TCCSUP-Zelllinie. Die x-Achse beschreibt die Fluoreszenzintensität und damit die Expressionsstärke des Integrins. Die y-Koordinate zeigt die gezählten Zellen.

**RT112**

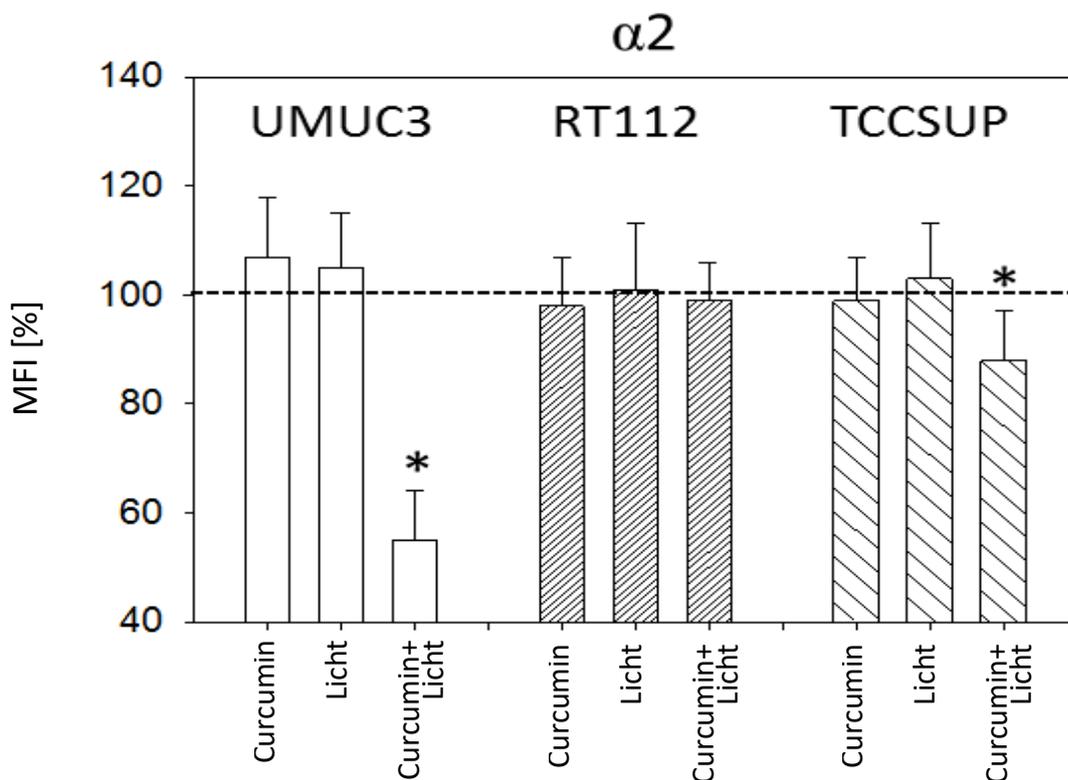


**Abbildung 21:** Darstellung des Integrin-Expressionsmusters (durchgehende Linie) inklusive des entsprechenden Isotyps (gestrichelte Linie) der RT112-Zelllinie. Die x-Achse beschreibt die Fluoreszenzintensität und damit die Expressionsstärke des Integrins. Die y-Koordinate zeigt die gezählten Zellen.

## Ergebnisse

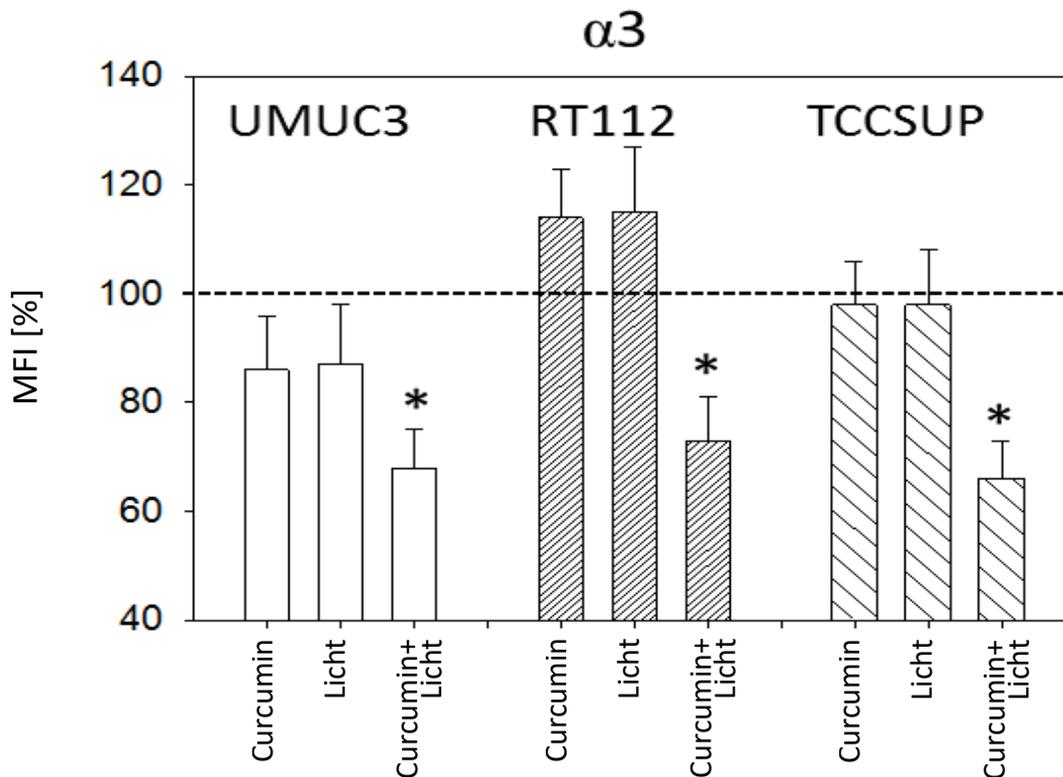
### 3.5.1. Expression nach Behandlung

Die durch Curcumin hervorgerufenen Veränderungen der Integrin-Expression sind in den **Abbildungen 22 bis 28** wiedergegeben. Dargestellt sind jeweils die Integrin-Expressionen nach Behandlung der Tumorzellen mit 0,2 µg/ml Curcumin (versus Bestrahlung alleine versus Curcumin<sup>Licht</sup>). Die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist im prozentualen Verhältnis zur Kontrolle (gesetzt als 100 %) angegeben.



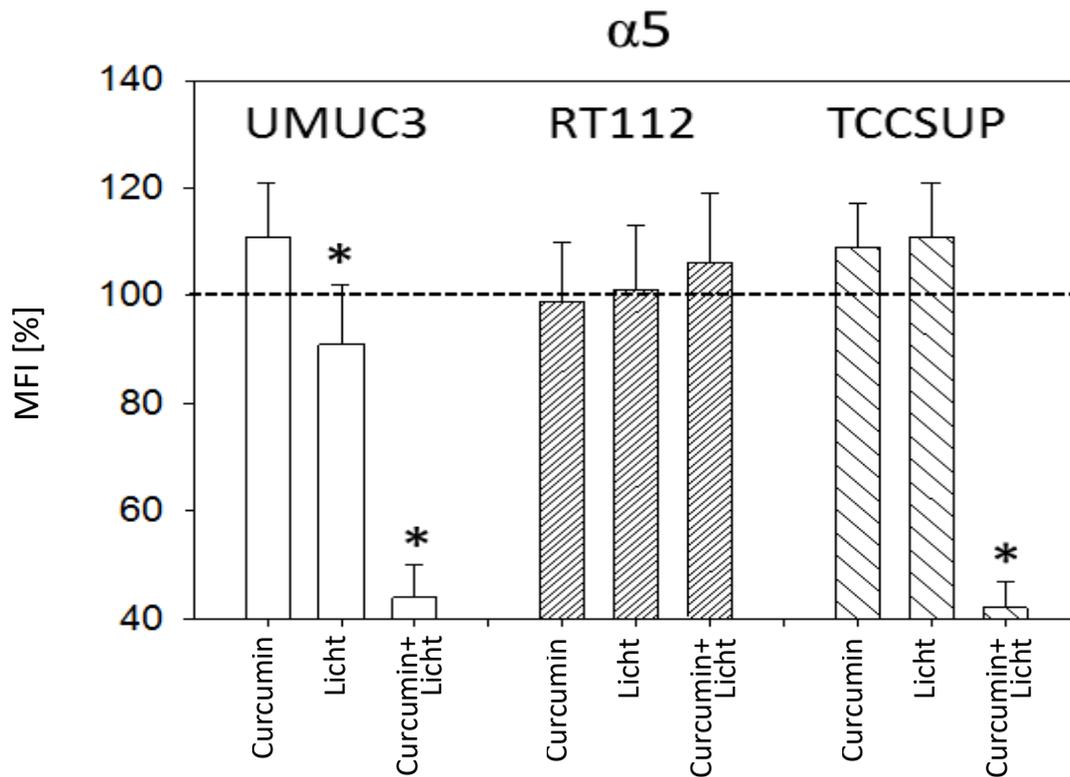
**Abbildung 22: Expression des Integrins  $\alpha 2$  nach Behandlung mit Curcumin.** Die x-Koordinate bezieht sich auf den jeweiligen Versuchsansatz, auf der y-Achse ist die mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) eingetragen. Die MFI beschreibt den Anteil positiver Partikel gegenüber der Gesamtzahl der Kontrolle (100 %).

UMUC3-Zellen reagierten mit einer starken Abnahme der  $\alpha 2$ -spezifischen Fluoreszenzintensität nach der Behandlung mit 0,2 µg/ml Curcumin<sup>Licht</sup> (**s. Abbildung 22**). Bei RT112-Zellen bewirkte keiner der Versuchsansätze eine Veränderung der  $\alpha 2$ -Expression. Bezüglich TCCSUP-Zellen induzierte ausschließlich die Curcumin<sup>Licht</sup>-Anwendung eine signifikante  $\alpha 2$ -Reduktion.



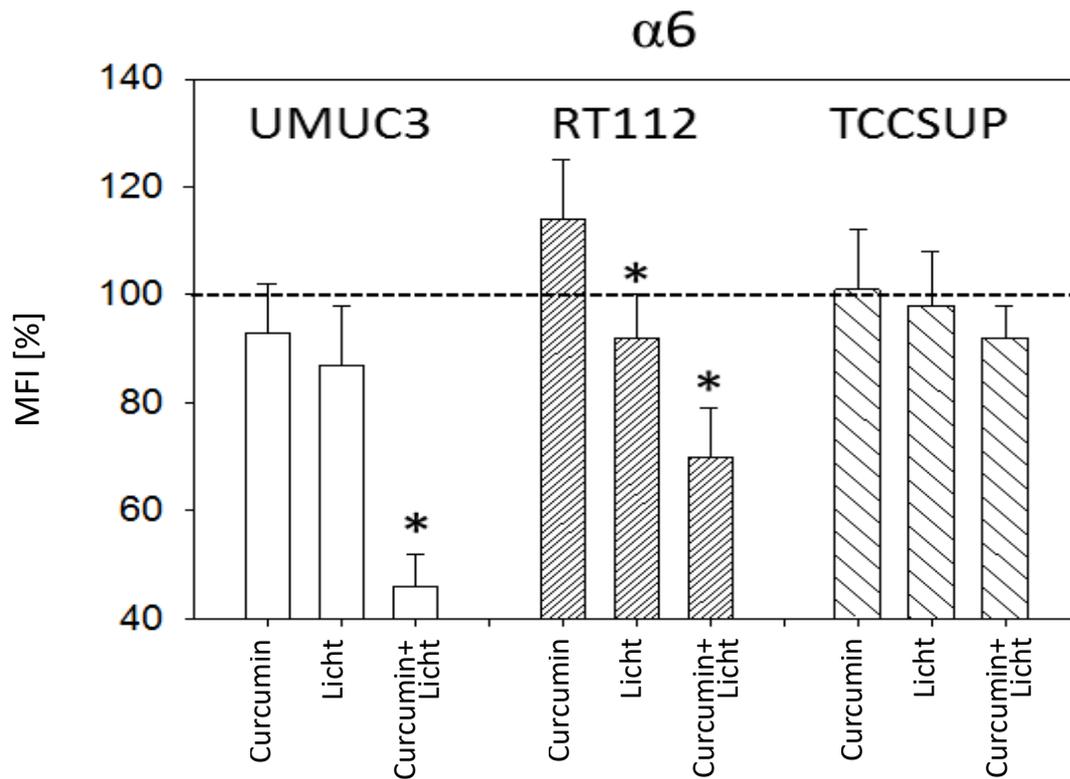
**Abbildung 23: Expression des Integrins  $\alpha 3$  nach Behandlung mit Curcumin (v.l. UMUC3, RT112, TCCSUP).** Die x-Koordinate bezieht sich auf den jeweiligen Versuchsansatz, auf der y-Achse ist die mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) eingetragen.

Der  $\alpha 3$ -Expressionsspiegel sank in sämtlichen getesteten Zelllinien unter der Kombinationsbehandlung (**s. Abbildung 23**). Unter isolierter Zugabe von Curcumin sowie bei alleiniger Lichtexposition verringerte sich die  $\alpha 3$ -Expression bei UMUC3 schwach, bei RT112 wurden leicht erhöhte Werte gemessen. Keinen Einfluss hatte die reine Curcumin- bzw. Lichttherapie auf die TCCSUP-Zellen.



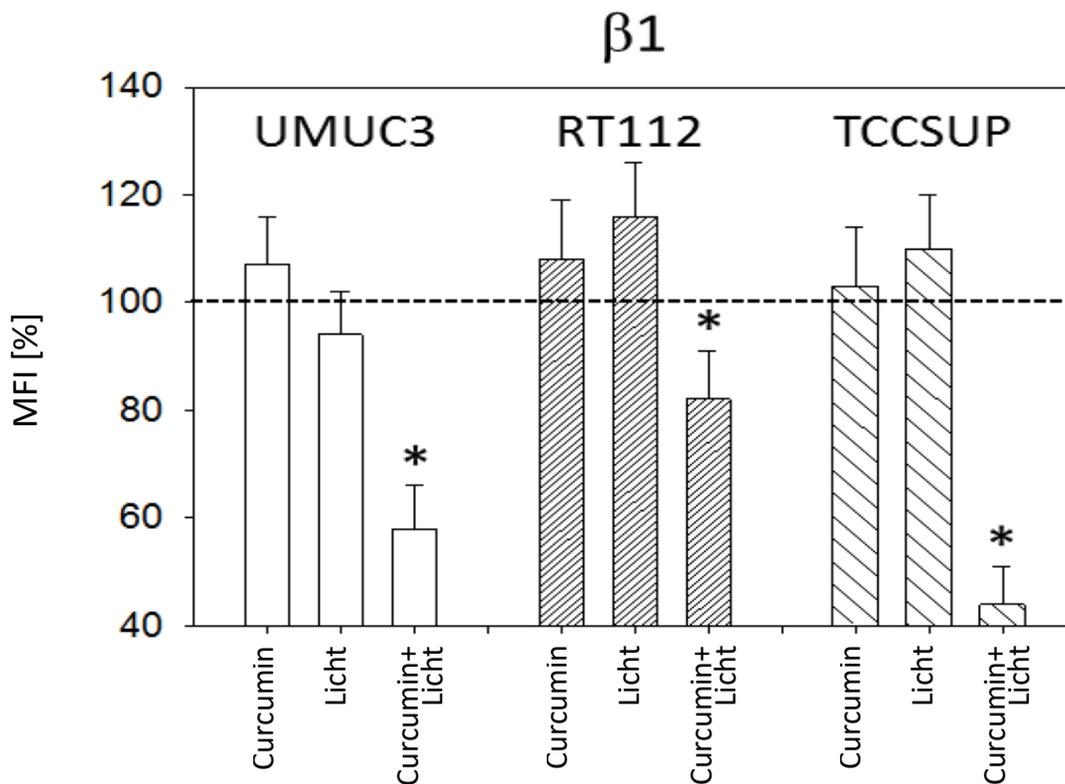
**Abbildung 24: Expression des Integrins  $\alpha 5$  nach Behandlung mit Curcumin (v.l. UMUC3, RT112, TCCSUP).** Die x-Koordinate bezieht sich auf den jeweiligen Versuchsansatz, auf der y-Achse ist die mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) eingetragen.

Im Verhältnis zur Kontrolle ergab sich eine deutliche Suppression des  $\alpha 5$ -Integrins auf UMUC3- und TCCSUP-Zellen nach der Kombinationsbehandlung (**s. Abbildung 24**). Hingegen stieg die  $\alpha 5$ -Expression auf der RT112-Zellmembran unter Curcumin in Verbindung mit Licht signifikant an. Die alleinige Behandlung mit entweder Licht oder Curcumin evozierte keine Alterationen.



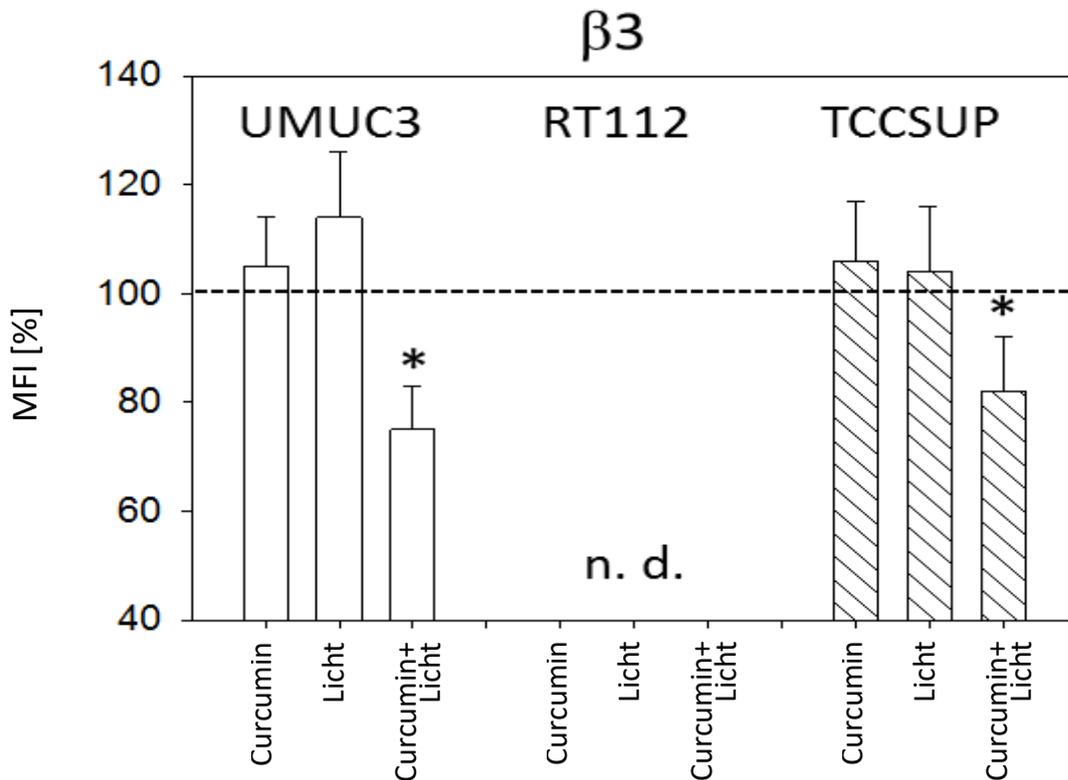
**Abbildung 25: Expression des Integrins α6 nach Behandlung mit Curcumin (v.l. UMUC3, RT112, TCCSUP).** Die x-Koordinate bezieht sich auf den jeweiligen Versuchsansatz, auf der y-Achse ist die mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) eingetragen.

Die α6-Spiegel sanken nach der Doppelbehandlung mit Curcumin und Licht bei sowohl RT112- als auch UMUC3-Tumorzellen signifikant ab (UMUC3 > RT112) (**s. Abbildung 25**). TCCSUP-Zellen reagierten nicht auf die Behandlung im Sinne einer Modulation dieses Integrin-Subtyps.



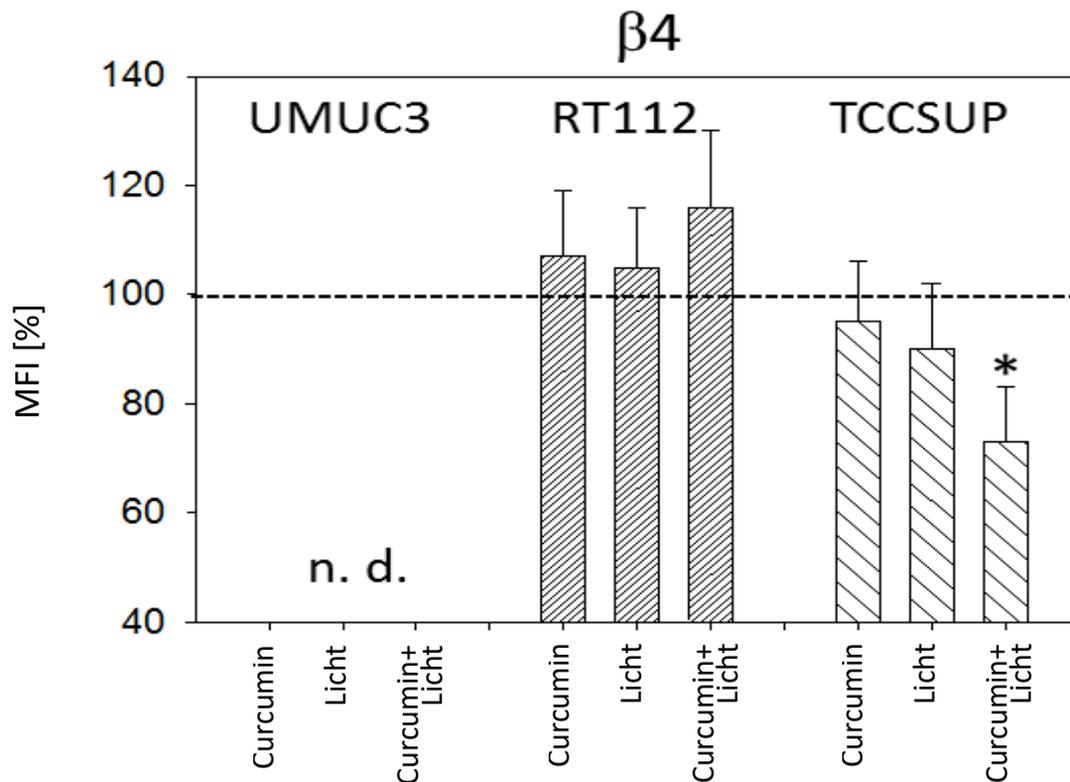
**Abbildung 26: Expression des Integrins  $\beta 1$  nach Behandlung mit Curcumin (v.l. UMUC3, RT112, TCCSUP).** Die x-Koordinate bezieht sich auf den jeweiligen Versuchsansatz, auf der y-Achse ist die mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) eingetragen.

Die  $\beta 1$ -Integrin-Expression verringerte sich unter Curcumin<sup>Licht</sup>-Exposition (nicht jedoch unter alleiniger Licht- oder Curcuminbehandlung) signifikant auf UMUC3- und TCCSUP-Tumorzellen, im Vergleich zur Kontrolle (**s. Abbildung 26**). Keine Auswirkungen hatten die Therapien auf die RT112-Zellen.



**Abbildung 27: Expression des Integrins  $\beta 3$  nach Behandlung mit Curcumin (v.l. UMUC3, RT112, TCCSUP).** Die x-Koordinate bezieht sich auf den jeweiligen Versuchsansatz, auf der y-Achse ist die mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) eingetragen. n.d.: nicht detektierbar.

Eine 20- bis 30-%-ige Reduktion der membranständigen  $\beta 3$ -Expression ergab sich nach der Curcumin<sup>Licht</sup>-Therapie bei UMUC3- und TCCSUP-Zellen (**s. Abbildung 27**). Auf RT112-Zellen wurde  $\beta 3$  nicht nachgewiesen (**s. Abbildung 21**).

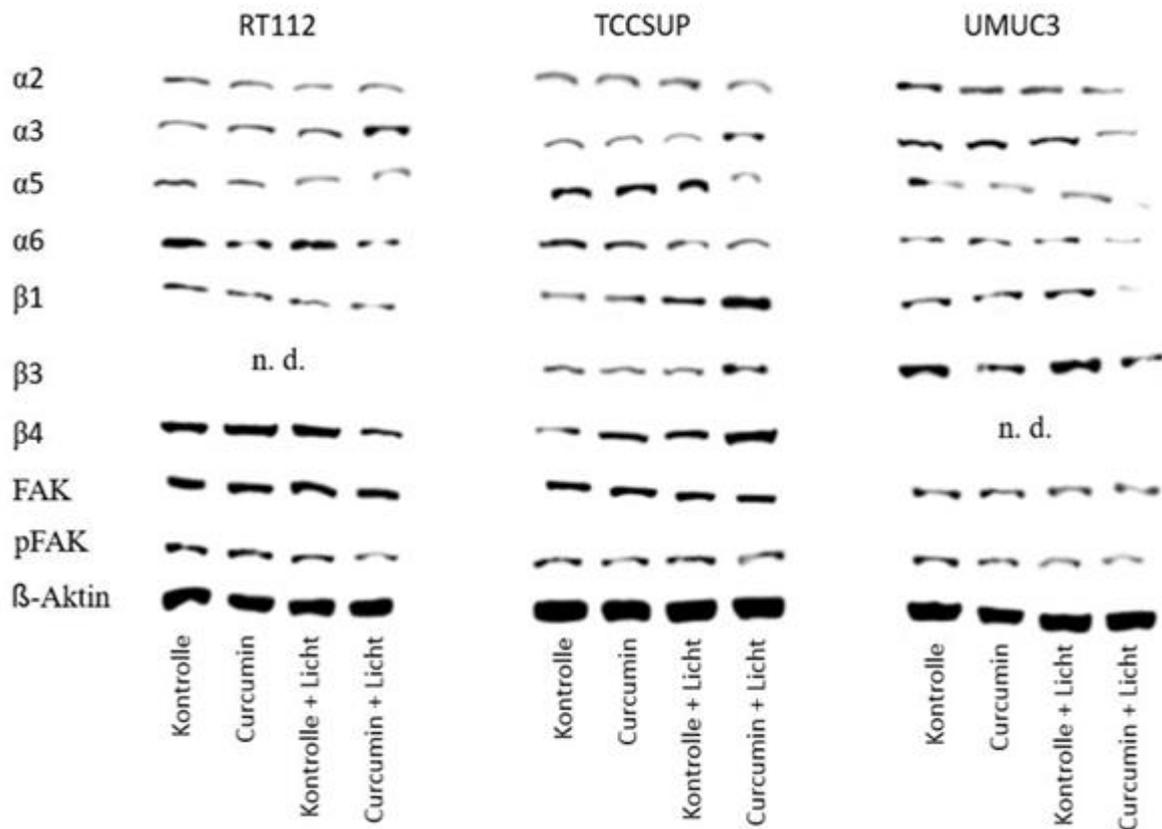


**Abbildung 28: Expression des Integrins  $\beta 4$  nach Behandlung mit Curcumin (v.l. UMUC3, RT112, TCCSUP).** Die x-Koordinate bezieht sich auf den jeweiligen Versuchsansatz, auf der y-Achse ist die mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) eingetragen. n. d.: nicht detektierbar.

Die  $\beta 4$ -Oberflächenexpression verringerte sich bei TCCSUP-Zellen nach Kombinationsbehandlung (**s. Abbildung 28**). Eine 25-%-ige Vermehrung der  $\beta 4$ -Expression wurde bei den RT112-Zellen nach Kombinationsbehandlung gemessen. Auf UMUC3-Tumorzellen wurde  $\beta 4$  nicht detektiert (**s. Abbildung 19**). Die separate Anwendung von entweder Licht oder Curcumin führte in keiner der Zelllinien zu einer Expressionsveränderung im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.6 Gelelektrophorese und Western Blot

## Ergebnisse



**Abbildung 29: Western Blot Analyse der Integrinlevel in den drei Tumorzellreihen.** Die Effekte der Behandlung mit 0,2  $\mu$ g/ml Curcumin, der Kontrollbestrahlung und der Curcumin<sup>Licht</sup>-Behandlung auf die Integrinspiegel in den menschlichen Harnblasenkarzinomzelllinien RT112, TCCSUP und UMUC3.

**Abbildung 29** zeigt die Effekte der Behandlung mit Curcumin (0,2  $\mu$ g/ml) und Licht auf die Integrin-Proteinexpression, dargestellt für die Zelllinien RT112, TCCSUP und UMUC3. Die  $\beta$ -Aktin-Expressionsspiegel dienten zum Mengenabgleich und demonstrieren eine gleiche Beladung der Gele. Gemessen wurde die gesamte Proteinmenge, d. h. der sowohl intra- als auch extrazellulär gelegenen Proteine.

## Ergebnisse

Distinkte Veränderungen waren primär in Gegenwart von Curcumin plus Lichtexposition wie folgt zu verzeichnen (**s. Abbildung 29**):

- Integrin  $\alpha 2$ : Reduktion bei TCCSUP und UMUC3-Zellen. Keine Veränderung in RT112-Zellen.
- Integrin  $\alpha 3$ : Expressionsverstärkung in RT112 und TCCSUP, Reduktion in UMUC3-Zellen.
- Integrin  $\alpha 5$ : Deutliche Suppression in TCCSUP- und UMUC3-Zellen. Keine Veränderung in RT112, verglichen zur isolierten Anwendung von Licht.
- Integrin  $\alpha 6$ : Deutliche Reduktion in RT112- und UMUC3-Zellen. Dezent Reduktion in TCCSUP-Zellen.
- Integrin  $\beta 1$ : Massive Erhöhung in TCCSUP, massive Reduktion in UMUC3-Zellen. Keine distinkten Veränderungen in RT112-Zellen.
- Integrin  $\beta 3$ : Massive Erhöhung in TCCSUP, deutliche Reduktion in UMUC3-Zellen. Protein nicht nachweisbar in RT112-Zellen.
- Integrin  $\beta 4$ : Massive Erhöhung in TCCSUP, deutliche Reduktion in RT112-Zellen. Protein nicht nachweisbar in UMUC3-Zellen.

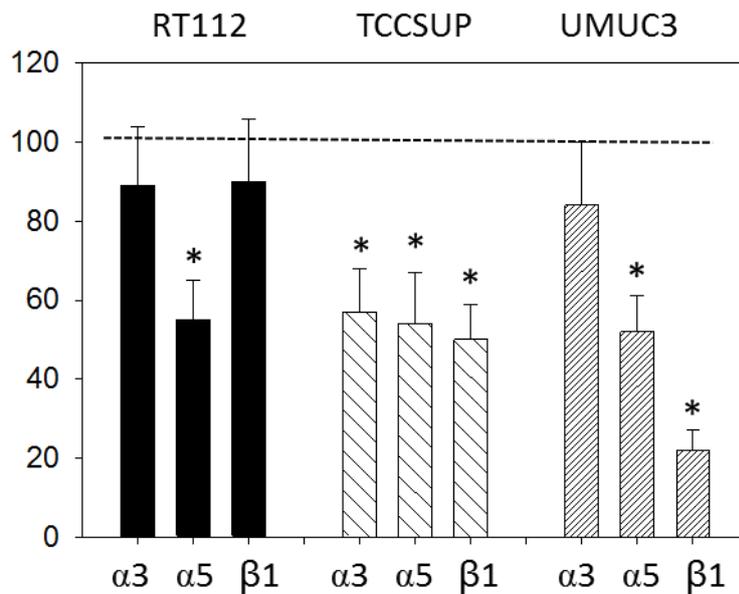
Unter alleiniger Verwendung von Curcumin ergaben sich nur in wenigen Fällen Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diese beschränkten sich auf TCCSUP-Zellen im Sinne einer Erhöhung des Integrins  $\beta 1$  (dezent) und  $\beta 4$  (deutlich) sowie einer Reduktion des  $\alpha 6$ -Subtyps (dezent). Bezüglich UMUC3 ergaben sich Suppressionen der Integrin-Subtypen  $\alpha 5$  (dezent) und  $\beta 3$  (deutlich).

Eine distinkte Wirkung auf das FAK-Protein ließ sich in keinem der Versuchsansätze erzielen. Jedoch verringerte sich die FAK-Aktivität (pFAK) deutlich unter Curcumin<sup>Licht</sup>-Anwendung in RT112- und UMUC3-Zellen.

### 3.7 Integrin-Blockade

Im Rahmen von Blockadetests wurden die Integrine  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\beta 1$  mit blockierenden Antikörpern geblockt, um zu evaluieren, wie sich anschließend die Adhäsion an Kollagen und die Chemotaxis nach Deaktivierung des einzelnen entsprechenden Integrins veränderte.

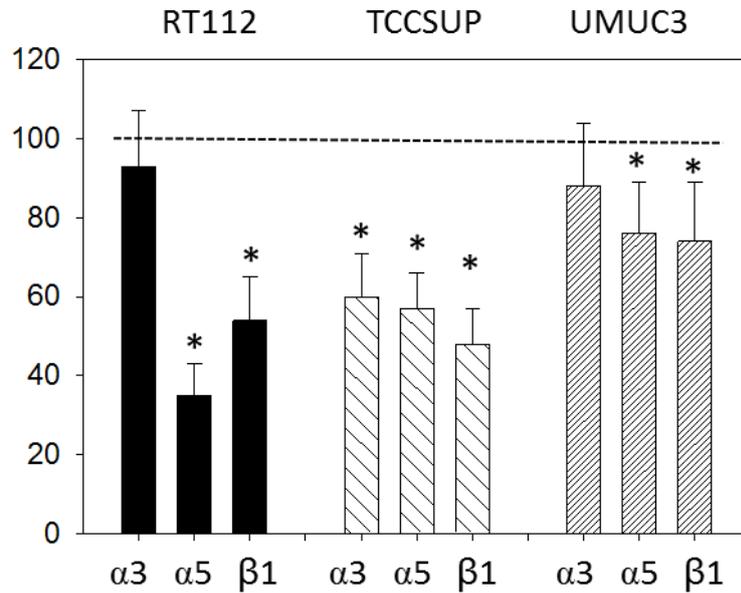
#### 3.7.1 Adhäsion an Kollagen



**Abbildung 30: Blockadeexperiment: Adhäsion an das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen.** Auf der x-Achse sind die jeweils geblockten Integrin-Subtypen gelistet. Die y-Koordinate beschreibt die Zellzahl der adhärenen Zellen nach Antikörperbehandlung im Verhältnis zur Kontrolle (gesetzt zu 100 %).

**Abbildung 30** verdeutlicht ein verändertes Adhäsionsverhalten unter Integrinblockade, in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie und vom Integrin-Subtyp. Die Zell-Kollagen-Adhäsion nach Blockade des  $\alpha 3$ -Integrins verringerte sich ausschließlich bei Versuchen mit TCCSUP-Zellen. Die Adhäsion der RT112- und UMUC3-Zellen wurde durch den  $\alpha 3$ -Block nicht beeinflusst. Die Blockade von  $\alpha 5$  resultierte bei sämtlichen Zelllinien gleichermaßen in einer verminderten Adhäsion. Das Bindungsverhalten nach  $\beta 1$ -Blockade hingegen änderte sich bei UMUC3- (-75 %) und TCCSUP-Zellen (-50 %), nicht jedoch bei RT112-Zellen.

3.7.2 Chemotaxis



**Abbildung 31: Blockadeexperiment: Chemotaxis.** Auf der x-Achse sind die jeweils geblockten Integrin-Subtypen gelistet. Die y-Koordinate beschreibt die Zellzahl der migrierten Zellen an der Unterseite des Filters nach Antikörperbehandlung im Verhältnis zur Kontrolle (gesetzt zu 100 %).

**Abbildung 31** demonstriert teilweise unterschiedliche Effekte der Integrinblockade auf das chemotaktische Verhalten im Vergleich zur Adhäsion. Analog zum Adhäsionsversuch induzierte die Blockade des Integrins  $\alpha 3$  eine Abnahme der Chemotaxis lediglich bei TCCSUP-Zellen. Unter  $\alpha 5$ -Blockade reduzierte sich die chemotaktische Aktivität der eingesetzten Zelllinien jedoch in unterschiedlichem Maße in der Reihenfolge RT112 > TCCSUP > UMUC3. Der  $\beta 1$ -Subtyp war bei jedem Zelltyp in die Regulation der Chemotaxis eingebunden, die chemotaktische Aktivität verringerte sich in unterschiedlichem Maße in der Reihenfolge TCCSUP > RT112 > UMUC3.

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Effekte Curcumin auf die Metastasierung des Harnblasenkarzinoms ausübt. Dafür wurde ein spezieller Fokus auf die Adhäsion und Migration gelegt. Im folgenden Teil werden die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsreihen interpretiert und diskutiert. Um strukturiert vorzugehen, werden die Fragen **A–C (s. Seite 20 und 21)** aus der Einleitung aufgegriffen.

**Abbildung 6** verdeutlicht, dass sich die Behandlung der Tumorzellen mit einer Kombinationsbehandlung aus Curcumin (0,2 µg/ml) und Tageslichtbestrahlung hemmend auf das Tumorzellwachstum auswirkt. Der wachstumshemmende Effekt von Curcumin wird unter anderem mit einem Zellzyklusarrest und induzierter Apoptose erklärt [72–76]. Wachstumsprozesse wurden zwar im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht analysiert, im Einklang mit Literaturdaten stellt sich allerdings Curcumin als ein Naturstoff dar, der sowohl antiproliferatives als auch antimetastatisches Potenzial besitzt.

### **C. Hat die additive Lichtbestrahlung der mit Curcumin behandelten Harnblasenkarzinomzellen eine Wirkungsveränderung zur Folge?**

Die Plasmaspiegel von Curcumin in physiologischem Medium sinken unter Tageslichtbedingungen viel rapider als bei Verdunklung, eine Stabilisierung lässt sich durch eine höhere Serumkonzentration erreichen [77]. Die Versuchsreihen, bei denen sowohl eine reine Curcuminbehandlung als auch eine Kombinationsbehandlung mit Tageslicht verwendet wurden, zeigen, dass der Effekt durch die zusätzliche Lichtbestrahlung erheblich sein kann. Daraus lässt sich ableiten, dass Curcumin eine Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber äußeren Einflüssen, in dem Fall Tageslicht, bewirkt. Dhandapani et al. und Shehzad et al. haben in ihren Studien gezeigt, dass Curcumin eine gesteigerte Radiosensitivität in Zellen induziert [78,79].

Eine Erklärung liefert hierfür Brach et al., dessen Studie die verstärkte Expression von NF-kappaB in Tumorzellen nach Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen feststellt [80]. NF-kappaB hat beschützende Effekte auf die Tumorzellen, indem es eine Apoptose nach der Strahleneinwirkung blocken kann [81,82]. Laut Sandur et al. kann Curcumin die Aktivierung von NF-kappaB

hemmend beeinflussen, sodass mehr Tumorzellen nach Radiation in Apoptose gehen [83]. Somit wäre der Einfluss von Curcumin am größten, wenn es vor einer additiven Lichttherapie appliziert und lokal (z. B. im Tumorgewebe) angereichert wird und das Curcumin-aufnehmende Gewebe gut für Tageslichtstrahlen erreichbar ist. Eine erhöhte Wirksamkeit hat zudem den Vorteil, dass man geringere Konzentrationen an Curcumin benötigt, um den gewünschten antitumoralen Effekt zu erzielen.

### **A. Welche Effekte hat Curcumin auf die invasive Zellmigration von Blasenkarzinomzellen?**

Das Harnblasenkarzinom besitzt, wie die meisten Karzinome, die Eigenschaft, unkontrolliert zu wachsen. Dabei wächst es invasiv, infiltriert zuerst Nachbarstrukturen und anschließend andere Organe. Ein metastasiertes Harnblasenkarzinom senkt die Überlebenschancen des Patienten und lässt eine kurativ angelegte Therapie nicht mehr zu [84]. In diesem Zusammenhang ist die Zelladhäsion der Tumorzellen eine wichtige Komponente der Metastasierung. Die Fähigkeit der Tumorzelle, sich an Endothelzellen und extrazelluläre Matrixproteine binden zu können, bildet den ersten Schritt der Invasion in ein anderes Gewebe.

Um das Bindungsverhalten der Tumorzellreihen an extrazelluläre Matrixproteine zu untersuchen, wurden Adhäsionsstudien mit immobilisiertem Kollagen und Fibronectin durchgeführt (**Abbildungen 7–12**). Anhand der Daten lässt sich ableiten, dass Curcumin in Verbindung mit Licht die Tumorzell-Matrix-Interaktion zu unterbinden vermag [85]. Um auszuschließen, dass die verringerte Adhäsion möglicherweise aus einer reduzierten Proliferation heraus entstanden ist, wurden die Proben mit den Matrixproteinen nur für eine Stunde inkubiert, da in einem solchen Zeitabschnitt keine Mitosen ablaufen. Zwar zeigte auch die alleinige Curcuminbehandlung Auswirkung auf das Bindungsverhalten, diese waren jedoch nur moderat ausgeprägt. Ganz offensichtlich lässt sich die Wirkung von Curcumin auf invasive Prozesse durch Lichtexposition wesentlich steigern.

Die additive Bestrahlung hatte ihre größte Wirkeffizienz bei einer vorherigen Curcuminbehandlung mit 0,2 µg/ml. Eine höhere Curcuminkonzentration als 0,2 µg/ml führte in Pilotexperimenten bei zusätzlicher Bestrahlung zu einer toxischen Schädigung der Zellen. Die Schwelle zur Zelltoxizität wurde hier empirisch festgelegt, ist aber prinzipiell abhängig von der

## Diskussion

Curcuminkonzentration, der Dauer der Tageslichtbestrahlung und vom zu behandelnden Gewebe [86].

Bezüglich der Adhäsionskapazität aller drei Harnblasenkarzinomzellreihen erlauben die Resultate den Schluss, dass Curcumin in Verbindung mit Tageslicht eine wesentliche Wirkungssteigerung erfährt, sodass auch unter Verwendung niedriger Curcuminkonzentrationen therapeutisch in den Prozess der Tumordissemination eingegriffen werden kann. Die Schlussfolgerung basiert allerdings auf In-vitro-Daten. Zur Verifizierung bedarf es weiterer Studien am Tiermodell. Interessant sind Aussagen von Herman et al., der anhand eines In-vitro-Prostatatumor-Modells Differenzen in der Wirksamkeit von Curcumin gegenüber der Tumorzellbindung an Fibronectin versus Kollagen beobachtete. Demnach hatte die alleinige Behandlung mit Curcumin nur Auswirkungen auf die Adhäsion an Fibronectin, nicht aber auf eine Anheftung an Kollagen [87].

Eine weitere Phase der hämatogenen Dissemination der Tumorzellen beinhaltet die Anheftung an Endothelzellen. Die Adhäsionsstudie wurde repräsentativ für die Gefäßauskleidung mit HUVECs durchgeführt (**Abbildungen 13–15**).

Analog zur Matrix-Tumor-Interaktion reduzierte sich auch die Anzahl adhärenter RT112- und UMUC3-Zellen nach einer Curcumin<sup>Licht</sup>-Therapie deutlich gegenüber der Kontrolle. Da die vasculäre Invasion einen entscheidenden Schritt in der metastatischen Kaskade beinhaltet [88], lässt sich folgern, dass über eine verminderte Anheftung zirkulierender Tumorzellen auch die Anzahl der Zellen abnimmt, die in das umliegende Gewebe eindringen können. Allerdings sei auch auf **Abbildung 14** verwiesen, die eine gesteigerte Adhäsion von TCCSUP-Zellen unter Curcumin und Licht dokumentiert. Offensichtlich unterliegen TCCSUP-Zellen anderen Kontrollmechanismen als RT112 und UMUC3. Interessant sind in diesem Zusammenhang von Makarevic et al. vorgelegte Daten, bei denen der Naturstoff Amygdalin das chemotaktische Verhalten der Zelllinien RT112 und UMUC3 verminderte, dasjenige der TCCSUP-Zellen hingegen drastisch erhöhte [89]. In ihrer Argumentation hierfür liefern die Autoren Gründe, die beschreiben könnten, warum es in einer bestimmten Subtypzellreihe, wie TCCSUP, zu diesen Ergebnissen kommen konnte. So wurde die Expression von Integrin-Subtyp  $\alpha 2$  und  $\beta 3$ , die unter anderem für das verstärkte Migrationsverhalten ursächlich zu sein scheinen, in den TCCSUP-Zellen nach

## Diskussion

zweiwöchiger Behandlung mit Amygdalin extrem hochreguliert. In TCCSUP-Zellen mit 24-stündiger Amygdalin-Behandlung fand jedoch noch keine erhöhte Expression dieser beiden Integrin-Subtypen statt. Hieraus lässt sich ableiten, dass sich kurzfristige von mittelfristigen Wirkungen unterscheiden lassen. Die TCCSUP-Zellen in dieser Studie wurden eine Stunde lang mit Curcumin und anschließend mit Tageslicht behandelt, was *in vitro* zu einer verstärkten Adhäsion an die Endothelzellen (HUVECs) führte. Die gegensätzlichen Adhäsionsdaten zwischen U-MUC3/RT112 und TCCSUP sind klinisch bedeutsam und sollten weiter analysiert werden, in dem man bspw. alle drei Subtyp-Zellreihen länger als eine Stunde mit Curcumin behandeln lässt. Möglicherweise wird nicht jeder Tumorpatient mit Harnblasenkarzinom gleichermaßen von einer Therapie mit Curcumin profitieren. TCCSUP sind Tumorzellen mit der Klassifikation T4 und dem Grading G4 (**s. Tabelle 2**).

Das bedeutet, dass diese Zellen ein sehr fortgeschrittenes Stadium erreicht und hinsichtlich ihres Differenzierungsgrads und Aggressionspotenzials äußerst maligne sind. Man könnte vermuten, dass diese Zellen relativ schlecht therapeutisch zu kontrollieren sind. Das hohe Aggressionspotenzial der TCCSUP-Zellen könnte in Verbindung mit der Curcumin-Licht-Therapie auch zu einer sehr starken Adhäsion an das Endothel führen und durch die damit einhergehende verminderte Motilität eine Migration eher behindern. Erst *In-vivo*-Studien könnten einen negativen oder positiven Effekt verifizieren.

Die Chemotaxis von Tumorzellen ist von zentraler Bedeutung für die Migration bzw. für das Bestreben der Tumorzellen, ihren primären Tumorzellverband zu verlassen und durch andere Strukturen, z. B. Endothel, zu wandern [90]. Die **Abbildungen 16 bis 18** verweisen auf deutliche migrationshemmende Eigenschaften von Curcumin nach Lichtexposition. Nach reiner Curcuminbehandlung mit 0,2 µg/ml wurden nur sehr schwache Effekte registriert. Demnach bewirkt die Bestrahlung mit Licht eine deutliche Wirkungsverstärkung der Natursubstanz. Die Resultate sind brisant. Ein reduziertes chemotaktisches Verhalten würde die Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung verringern und könnte dazu führen, den Krebs therapeutisch in den Griff zu bekommen. Eine Therapie mit Curcumin hätte somit in allen Krebsstadien Vorteile. Vor allem bei Tumoren, die noch nicht gestreut haben, kann eine perioperative Behandlung mit Curcumin einen großen Nutzen haben, indem man die Wahrscheinlichkeit einer Fernabsiedlung minimiert.

## **B. Wie werden invasionsrelevante Zellproteine von Curcumin beeinflusst?**

Integrine spielen als Rezeptorproteine eine führende Rolle bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Als entscheidender Bestandteil des Metastasierungsprozesses ermöglichen sie den Tumorzellen, sich an extrazelluläre Proteine und andere Zellen zu heften [91].

Mittels Flow Zytometrie wurde die Oberflächenexpression adhäsions- und invasionsrelevanter Integrine vom  $\alpha$ - und  $\beta$ -Subtyp untersucht (**Abbildungen 19–21**). Beim Western Blotting wurden zusätzlich zum Integrin-Proteinprofil FAK und pFAK analysiert (**Abbildung 29**). Jede Zellreihe charakterisierte sich über ihr eigenes, zellspezifisches Integrin-Expressionsmuster, wobei neben Unterschieden auch Gemeinsamkeiten bestanden (**Abbildungen 19–21**). So wurden bei allen drei Zelllinien  $\alpha 1$  und  $\alpha 4$  kaum bzw. gar nicht nachgewiesen,  $\beta 3$  wiederum wurde nicht auf RT112,  $\beta 4$  nicht auf UMUC3 detektiert. Tatsächlich führte die Anwendung von Curcumin inklusive Lichtbestrahlung zu unterschiedlichen, Zelllinien-spezifischen Alterationen im Integrin-Oberflächenprofil (**Abbildungen 22–28**). Im Verlauf der Curcumin<sup>Licht</sup>-Therapie wurde bspw. eine klare Reduktion der  $\alpha 2$ -Expression nur in UMUC3-Zellen gemessen, während  $\alpha 3$  in allen drei Tumorzellreihen weniger exprimiert wurde. Juengel et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Modulation der Integrine durch Curcumin abhängig vom initialen Integrinprofil ist [92].

Die Integrine  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$ , also die Paarungen von  $\beta 1$  mit  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ , repräsentieren Kollagenrezeptoren [93]. Wie in den **Abbildungen 7 bis 9** verdeutlicht, wird das Bindungspotenzial aller drei Tumorzellreihen an Kollagen nach Curcumin<sup>Licht</sup>-Behandlung herabgesetzt. Das Integrin  $\alpha 1$  wurde nicht auf den Harnblasenkrebszellen detektiert. Das Integrin  $\alpha 2$  wurde im UMUC3- sowie im TCCSUP-Oberflächenprofil nach Behandlung herabgesetzt (**Abbildung 22**). Beim Blick auf **Abbildung 26** fällt auf, dass auch die oberflächliche  $\beta 1$ -Expression nach der Curcumin<sup>Licht</sup>-Therapie bei den UMUC3- und TCCSUP-Zellen stark sank. Man könnte spekulieren, dass die Reduzierung der Adhäsion an Kollagen in diesen beiden Tumorzelllinien deshalb stärker ausfiel als bei RT112 (**s. Abbildungen 7–9**).

Es lässt sich außerdem vermuten, dass die Integrinsupprimierung von Subtyp  $\alpha 2\beta 1$  eine wichtige Rolle bei der verringerten Adhäsion von TCCSUP und UMUC3-Zellen an Kollagen spielte. Da auch die RT112-Zellen eine verringerte Adhäsion an Kollagen zeigten, scheint es aber noch

weitere Angriffspunkte zu geben, die Curcumin in Bezug auf die Adhäsion beeinflusst. Ein weiterer Beleg dafür, dass  $\beta 1$  bei der Adhäsion an die EZM eine größere Rolle bei UMUC3 und TCCSUP als bei RT112 spielt, sind die Ergebnisse der Blockadetestreihe (**s. Abbildung 30**). Blockiert man  $\beta 1$  mit blockierenden Antikörpern, so sinkt die Adhäsion an Kollagen bei UMUC3 und TCCSUP deutlich, bei den RT112-Zellen verändert sich das Bindungsverhalten so gut wie nicht.

Die Bedeutung von Integrin  $\alpha 3$ , das einen Komplex mit  $\beta 1$  bildet, im Harnblasenkarzinom ist nicht abschließend geklärt. Die Curcumin<sup>Licht</sup>-Behandlung hat die  $\alpha 3$ -Spiegel an der Zelloberfläche in allen drei Tumorzelllinien reduziert (**s. Abbildung 23**). Das Integrin  $\alpha 3$  scheint aber abhängig vom Tumorsubtyp bzw. vom Tumorstadium eine Adhäsion und Migration zu bewirken, wie ein Blick auf **Abbildungen 30** und **31** verrät. Passend hierzu haben Sakaguchi et al. und Kurozumi et al. in ihren Studien eine Korrelanz zwischen der Zellmigration, -invasion und Regulierung von  $\alpha 3\beta 1$  festgestellt [94,95]. Eine Runterregulierung vom Subtyp  $\alpha 3\beta 1$  hatte eine signifikante Verringerung der Migration zur Folge, was letztendlich zu einem besseren Outcome für die Patienten führen würde. Integrin  $\alpha 3$  spielt in anderen Tumorentitäten eine mitentscheidende Rolle. In Glioblastom-Stammzellen wird  $\alpha 3$  überexprimiert und korreliert mit einer verstärkten Invasion [96]. So lässt sich die Hypothese formulieren, dass eine durch Curcumin gesenkte  $\alpha 3$ -Oberflächenexpression einen blockierenden Effekt auf die Invasivität der schlecht oder wenig differenzierten Tumorzellen (TCCSUP; **s. Tabelle 2**) ausübt.

Ebenso wie die Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  verbindet sich  $\alpha 4$  mit  $\beta 1$  zu einem Heterodimer. Das Integrin  $\alpha 4\beta 1$  dient als Fibronektin-Rezeptor [97]. Das Integrin  $\alpha 4$  wurde nicht auf den Harnblasenkrebszellen detektiert. Dem Integrin  $\alpha 4$  wird eine Rolle bei der Metastasierung von Dickdarmkrebs und bei der Lymphangiogenese im Zuge des Tumorwachstums zugeschrieben [98]. Die geringe Expression in den Harnblasenkrebszellen führt dazu, dass  $\alpha 4$  nicht als therapeutischer Ansatz in Betracht gezogen werden kann.

Die Rolle von  $\alpha 5$  im Metastasierungsprozess ist durch seine Expression und seine Wirkung auf die Zelladhäsion eine mitentscheidende. Das belegt ein Blick auf die FACScan-Ergebnisse und Blockadetestreihe (**s. Abbildungen 19–21, 30**). Bei allen drei Zellreihen bewirkte  $\alpha 5$  eine Reduzierung der Adhäsion an Kollagen nach Blockierung des Integrins (**s. Abbildung 30**). Auch

## Diskussion

$\alpha 5$  bildet mit  $\beta 1$  ein Heterodimer. Laut Mierke et al. erleichtert Integrin  $\alpha 5\beta 1$  die Tumorzellinvasion, indem es für eine Stärkung kontraktile Kräfte sorgt [99]. Analog dazu verdeutlicht **Abbildung 31** die Abnahme der Tumorzellinvasion nach  $\alpha 5$ -Blockade.

Saito et al. und Adachi et al. haben in ihren Studien über die Rolle von  $\alpha 5$  in Blasen Tumoren und NSCLCs (non-small cell lung cancers) herausgefunden, dass die Expression von  $\alpha 5$  in den Tumorzellen mit ihrer Malignität korreliert, und somit formuliert, dass Integrin  $\alpha 5$  als prognostischer Faktor für die Situation der Krebspatienten in Betracht zu ziehen sei, wobei eine besonders hohe  $\alpha 5$ -Expression einen prognostisch ungünstigen Faktor darstellt [100,101]. Xu et al. und Yin et al. haben das Integrin  $\alpha 5$  als therapeutischen Angriffspunkt ausfindig gemacht, um das Überleben der Patienten mit Blasen Tumoren oder NSCLCs [102,103] zu verbessern. In Ovarialkarzinomen führt das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin zum initialen Tumoraladhäsionsprozess und korreliert somit ebenfalls mit einem schlechten Outcome. Gong et al. zeigen in ihrer Studie, dass die Suppression des  $\alpha 5\beta 1$ -Subtyps das Ovarialkarzinom behinderte, Peritonealmetastasen zu bilden [104].

Die Expression von  $\alpha 6$  und dem Integrin  $\alpha 6\beta 4$  auf Harnblasenkrebszellen haben Liebert et al. in ihrer Studie beschrieben [105]. Ihre Ergebnisse stimmen mit den FACScan-Analysen dieser Studie überein. Integrin  $\alpha 6$  wird in allen drei Zellreihen exprimiert. Die Ergebnisse in der FACScan-Analyse nach Behandlung (**Abbildung 25**) und im Western Blot (**Abbildung 29**) zeigen deutlich, dass die  $\alpha 6$ -Spiegel durch Curcumin gesenkt werden. Integrin  $\alpha 6\beta 4$  ist laut Mercurio et al. verantwortlich für Zellmotilität und Zellmigration [106]. Der Einfluss von Curcumin auf  $\alpha 6$  ist somit in engem Zusammenhang mit der beobachteten Hemmung der Tumorzellmigration zu sehen.

Integrin  $\beta 3$  ist Teil des Heterodimers  $\alpha v\beta 3$ , der bereits als therapeutisches Target diskutiert wurde, da  $\alpha v\beta 3$  in die Abläufe der Angiogenese im Zuge der Tumorerkrankung verwickelt ist [107]. Im Harnblasenkrebs wurde  $\beta 3$  nur auf UMUC3- und TCCSUP-Zellen exprimiert. Die Curcumin-Licht-Behandlung bewirkte an beiden Zellreihen eine Reduktion der Oberflächenexpression von  $\beta 3$  (**s. Abbildung 27**). Shang et al. zeigen in ihrer Studie, dass die Rolle von  $\beta 3$  nicht ganz klar ist, denn in T24-Blasentumorzellen führte eine Reduktion des  $\beta 3$ -Integrins zu einer erhöhten Invasion [108]. Bei Kolonkarzinomen wurde entdeckt, dass die verschiedenen

Integrine abhängig vom Tumorstadium ihre Effekte ausüben können, so wurde bspw. das Integrin  $\beta 3$  im Stadium 2 der Darmkrebszellen vermehrt detektiert und korrelierte mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs [109]. Beim Lungenkrebs gibt es Hinweise darauf, dass der  $\beta 3$ -Subtyp mitverantwortlich für Tumorwachstum, Metastasierung und Invasion ist [110,111]. Es scheint also auch in Wachstumsprozesse einzugreifen. Mit Blick auf die bisherigen Studienergebnisse zum  $\beta 3$ -Integrin lässt sich folgendes festhalten: Eine Hochregulierung und vermehrte  $\beta 3$ -Expression in Tumorzellen führt stadiumabhängig eher zu einem vermehrten Tumorwachstum, einer stärkeren Tumormigration und damit zu einem aggressiveren Verhalten. Die Runterregulierung des  $\beta 3$ -Subtyps bedeutet jedoch nicht immer gleichzeitig eine Inhibition des Metastasierungsprozesses, da erstens noch viele weitere Proteine hierfür eine Rolle spielen und zweitens  $\beta 3$  wahrscheinlich in einem komplexen System funktioniert, das auch mit wenig  $\beta 3$ -Expression abläuft, jedoch durch erhöhte  $\beta 3$ -Spiegel stark angetrieben werden kann.

Wie bereits erwähnt, ist das Integrin  $\beta 4$  im Heterokomplex mit  $\alpha 6$  auf den Krebszellen vorzufinden. Allerdings wurde  $\beta 4$  nicht auf UMUC3 exprimiert. Das Integrin  $\alpha 6\beta 4$  spielt eine Rolle bei der Zellmigration (s. o.) [112]. Unter Curcumin-Licht-Therapie sank die oberflächliche  $\beta 4$ -Expression bei den TCCSUP-Zellen (**s. Abbildung 28**). Behnsawy et al. identifizierten die Expressionslevel der Integrine  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  und  $\beta 4$  als wichtige Vorhersagewerte zur Bestimmung von Rezidiven beim Harnblasenkrebs [113].

Beim Western Blot wurden sowohl extra- als auch intrazelluläre Integrinproteine in ihrer Quantität detektiert. Die **Abbildung 29** zeigt, dass wie bei der FACScan-Analyse die Integrinlevel unterschiedlich auf die Curcumin<sup>Licht</sup>-Behandlung reagierten. So stieg der  $\beta 1$ -Gehalt, gegensätzlich zum FACScan-Ergebnis (**Abbildung 26**), in den TCCSUP-Zellen nach Behandlung an, während er in den RT112- und UMUC3-Zellen sank. Manche Ergebnisse beider Versuchsreihen stimmen jedoch überein. Festhalten lässt sich bereits, dass die Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Western Blot und FACScan darauf hindeuten, dass die Kombinationsbehandlung mit Curcumin und Tageslicht zu Veränderungen der Proteinspiegel führt, diese aber nicht zwangsläufig sichtbar in der Oberflächenexpression werden.

Möchte man ergründen, warum die TCCSUP-Zellen trotz einer vermehrten intrazellulären Expression von  $\beta 1$  (**s. Abbildung 29**) eine verringerte Adhäsion an Kollagen nach Curcumin<sup>Licht</sup>-Therapie zeigten, kommt man zu der Hypothese, dass nur oberflächliche Integrine eine mechanische Funktion zur Adhäsion ausführen können, sodass bei TCCSUP ein blockierter Transport der neu gebildeten Integrine zur Zelloberfläche vorgelegen haben könnte. Bei der vermehrten  $\beta 1$ -Expression wurde z. B. auch beim Prostatakarzinom eine verringerte Tumoradhäsion nachgewiesen [114,115] Juengel et al. haben in ihrer Studie darüber hinaus beschrieben, dass eine Hochregulierung des gleichen Integrin-Subtyps sowohl zu einer verstärkten Adhäsion, als auch zu einer reduzierten Adhäsion führen kann [92]. Hierzu passend wurde in dieser Studie eine erhöhte Adhäsion der TCCSUP-Zellen an Endothelzellen gemessen, was dafürsprechen könnte, dass die Hochregulierung des  $\beta 1$  intrazellulär Einfluss auf die Anheftung am Endothel gehabt haben könnte. Heyder et al. haben in ihrer Studie nachgewiesen, dass das Integrin  $\beta 1$  nicht nur bei der Adhäsion, sondern auch bei der Migration von Harnblasenkrebszellen beteiligt ist [116]. Übereinstimmend hierzu wurde im Chemotaxisversuch eine Reduzierung des invasiven Verhaltens aller drei Tumorzellreihen nach  $\beta 1$ -Blockade festgestellt (**s. Abbildung 31**).

Das Integrin  $\alpha 3$  wurde nach Curcumin<sup>Licht</sup>-Behandlung in RT112 und TCCSUP insgesamt mehr exprimiert, nur in UMUC3 weniger (**s. Abbildung 29**). Das Vorkommen des  $\alpha 3$ -Subtyps auf der Oberfläche der Zellen sank jedoch einheitlich nach Behandlung (s.o.). Mit Blick auf die Blockadestreifen (**s. Abbildungen 30, 31**) lässt sich erkennen, dass die Blockade von  $\alpha 3$  nur einen signifikanten Einfluss auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten der TCCSUP-Zellen hat. Es zeigt sich also einmal mehr, dass der Einfluss des Curcumins abhängig vom Zelltyp bzw. Zellstadium ist. In diesem Fall scheint, wie beim  $\beta 1$ -Integrin, Curcumin in Verbindung mit Tageslicht eine Blockierung des  $\alpha 3$ -Transport innerhalb der TCCSUP-Zellen zu bewirken, sodass kein oder weniger  $\alpha 3$  an der Oberfläche exprimiert werden kann. So lässt sich die Hypothese formulieren, dass Curcumin bei weit fortgeschrittenem Tumorstadium einen hemmenden Einfluss auf intrazelluläre Integrin-Transportwege nimmt. Ein weiterer Beleg dafür scheint der  $\beta 4$ -Transport zu sein (höhere Synthese, weniger Oberflächenexpression).

## Diskussion

Ein kongruentes Bild ergibt sich bei den  $\alpha 5$ -Daten aus den **Abbildungen 24** und **29**. Hier ergibt eine verminderte intrazelluläre Synthese des Integrins, auch eine verminderte oberflächliche Expression.

Somit hat die Curcumin-Licht-Behandlung zwei erfolgreiche Wege, die Invasion über Integrine zu hemmen. Einerseits hemmt die Behandlung die Synthese zahlreicher Integrine, andererseits werden Transportmechanismen gestört, wodurch trotz erhöhter Zellplasmaspiegel der suppressierende Effekt überwiegt.

Integrine sind also wesentlicher Bestandteil der Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten und somit eminent wichtig für das Tumorgewebe im Zuge der Metastasierung. Sie dienen nicht nur als oberflächliche Rezeptoren zur mechanischen Bindung, sondern vermitteln darüber hinaus ein intrazelluläres Signal, das Auswirkungen auf das Überleben der Zelle hat. Einer der wichtigsten intrazellulären Signalwege der Integrine führt über die Fokale Adhäsionskinase (FAK) [117]. Wenn Integrine an Proteine der Extrazellulärmatrix (EZM) docken, aktivieren sie FAK, indem FAK phosphoryliert (pFAK) wird und einen Komplex mit einer Kinase der Src-Familie bildet. Der FAK/Src-Komplex ist wiederum in der Lage, andere Proteine zu phosphorylieren und damit die Signalkaskade anzustoßen [118]. Studien haben gezeigt, dass FAK in malignen Tumoren überexprimiert wird [119,120]. FAK reguliert die Adhäsion, Migration und Proliferation von Zellen und trägt somit in Krebszellen zum Progress der Metastasierung bei [121]. Entsprechend wird FAK auch beim Harnblasenkrebs eine entscheidende Komponente zugeschrieben. Kong et al. verweisen diesbezüglich auf die inverse Assoziation zwischen FAK/pFAK und induzierter Apoptose [122]. Den Resultaten des Western Blots zufolge inhibiert Curcumin in Verbindung mit Licht nicht die totale FAK-Menge, sondern führt zu einer deutlichen Deaktivierung dieses Proteins insbesondere in RT112- und UMUC3-Zellen (**Abbildung 29**). Offensichtlich liegt der Wirkmechanismus von Curcumin in einer verminderten Bildung von pFAK. Die These wird durch die Studie von Chen et al. gestützt, die eine Inhibition der Phosphorylierung der FAK durch Curcumin festgestellt haben [123]. Inwieweit die Suppression von pFAK Auswirkungen auf die Expression spezifischer Integrin-Subtypen hat, konnte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht geklärt werden.

## Diskussion

Auch andere Effekte von Curcumin spielen wichtige Rollen bei der Tumorausbreitung. So kann Curcumin durch eine Depolymerisation von Mikrotubuli, die mit den Integrinen ein Netzwerk bilden, die Proliferation und die Metastasierung von Tumorzellen hemmen [124–126]. Es greift somit in mehrere Schritte der Signalvermittlung ein, sowohl in die extra- und intrazelluläre Expression von Integrinen, in die Deaktivierung von wichtigen zytoplasmatischen Tyrosinkinase (FAK) als auch in die Transportwege der Zelle über ihr Zytoskelett. Bedeutende Proteine, die über diesen Transport gerichtet nach extrazellulär geleitet werden, sind die Matrix-Metalloproteasen (MMP) [127].

MMPs sind zink-abhängige Endopeptidasen, die wichtig für den Abbau extrazellulärer Proteine und dem Remodeling des Gewebes sind. Sie stellen sich als bedeutende Mediatoren der Tumordinvasion und Metastasierung dar, indem sie intaktes Gewebe zerstören [128]. Durch die Regulierung der Expression und Sekretion der MMPs wirkt Curcumin hemmend auf die MMP-Aktivität und kann auch auf diesem Wege positive Effekte im Sinne einer Blockade des Metastasierungsprozesses auslösen [129–131].

Obwohl sich insgesamt bei der Expression der Integrine kein einheitliches Bild abgezeichnet hat, wurden gleichartige biologische Effekte (Zell-Matrix-Adhäsion und Chemotaxis) unter Curcumin beobachtet. Spekulativ löst Curcumin möglicherweise über unterschiedliche Integrine unterschiedliche Signale in der Tumorzelle aus, die aber im gleichen Resultat einer verminderten Adhäsions- und Invasionskapazität münden. In Betracht sollten hier auch Diskrepanzen zwischen der Curcumin bedingten Regulation eines spezifischen Integrin-Subtyps an der Membranoberfläche und der intrazellulären Expression gezogen werden. Vergleicht man die Versuchsergebnisse von FACScan- Analyse und Western Blot (**Abbildungen 22–29**), stellt man fest, dass TCCSUP Zellen auf die Behandlung mit Curcumin und Tageslicht teilweise mit einer intrazellulären Steigerung der Expression reagierten, sich jedoch die Integrinspiegel an der Zelloberfläche einheitlich verringerten. Dies könnte auf eine Verschiebung einzelner Integrine von außen nach innen hinweisen. Tatsächlich sind auch Translokalisationsprozesse wesentlich an der Steuerung des Tumors beteiligt [132].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Curcumin-Licht-Therapie auf alle drei Blasenkarzinom-Zelllinien – UMUC3, RT112 und TCCSUP – einen Effekt ausübte. Die Krebszellen

## Diskussion

gingen vermehrt in Apoptose nach Behandlung und zeigten ein geringeres Bindungs- und Migrationsverhalten, was im Sinne einer geringeren Tendenz zur Bildung einer Metastase zu interpretieren ist. Der Wirkungsgrad der Behandlung hing von der Curcuminosis (0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,2 µg/ml), der Bestrahlungsdauer mit Tageslicht und der behandelten Zelllinie ab. Nachfolgende Studien am Tiermodell sind nun essenziell, um die In-vitro-Daten zu verifizieren. Darüber hinaus sind Möglichkeiten der klinischen Anwendung zu erarbeiten.

## 5. Ausblick

Die vorliegenden Daten verweisen auf distinkte antiproliferative und antimetastatische Eigenschaften der Natursubstanz Curcumin. Durch seine zusätzlichen antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften [133] könnte sich Curcumin als wertvolles Additivum im Rahmen der konventionellen Tumorthherapie erweisen. Es ist jedoch nötig, die Wirkmechanismen dieser Substanz insbesondere am Tiermodell vertiefend zu evaluieren. Zudem ist das Problem der geringen systemischen Bioverfügbarkeit von Curcumin zu berücksichtigen. Es wird wichtig sein, die Form seiner klinischen Applikation weiter zu verbessern [134]. Eine neuere Möglichkeit bietet die Nanotechnologie bzw. Nanomedizin [135]. Yallapu et al. beschreiben in ihrer Studie Vorteile und Verbesserung der Bioverfügbarkeit des Curcumins mithilfe der Nanotechnologie [136]. Die vorliegende Arbeit greift die Bedeutung der Bestrahlung mit Tageslicht auf. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass das zu behandelnde Zielgewebe nach Curcuminapplikation für eine zusätzliche Lichttherapie gut erreichbar sein muss. Die anatomischen Voraussetzungen für den Einsatz dieser Technik sind bei der Harnblase gegeben. Andere Krebsarten wie Pankreaskarzinome oder Glioblastome sind jedoch für eine Tageslichttherapie weniger geeignet. Hier gilt es, die Effektivität des Curcumins anderweitig zu steigern. Dies kann über Abwandlungen in der Darreichungsform geschehen. Möglicherweise lassen sich aber auch Therapiekonzepte entwickeln, die eine vorteilbringende, additive Lichttherapie mit einschließen.

## Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom macht 3,4 % aller bösartigen Tumore aus. In Deutschland erkranken jedes Jahr 16.000 Menschen mit stetig steigenden Inzidenzraten. Betroffen sind vor allem ältere Menschen.

Die Therapie erfolgt in Abhängigkeit vom Tumorstadium. Im fortgeschrittenen Stadium wird der Patient i. d. R. mit zwei bis drei Zyklen MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin) behandelt. Unter Chemotherapie lässt sich die Überlebenszeit des Patienten verlängern, dennoch schränken rasch aufkommende Resistenzen den Wirkungsgrad erheblich ein. Curcumin kann den Bedarf von Patienten, die Krankheit zusätzlich aktiv bekämpfen zu können, decken. Die natürliche Substanz hat das Potenzial, sich als eine zusätzliche Therapieoption beim fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom zu etablieren. Ziel der Studie war es, die Wirksamkeit von Curcumin durch Lichtexposition zu erhöhen und die Bedeutung dieses Ansatzes für die Hemmung der Tumordinvasion anhand von Harnblasenkarzinomzellen zu evaluieren.

Zellkulturen der Harnblasenkarzinomzelllinien UMUC3, RT112 und TCCSUP wurden angelegt. Die Tumorzellen wurden vor den Versuchen mit Curcumin in verschiedenen Konzentrationen (0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,2 µg/ml) und/oder mit Tageslicht behandelt und in entsprechende Proben eingeteilt. Mittels Adhäsionsversuchen wurde das Bindungsverhalten der Krebszellen an extrazelluläre Matrixproteine (Kollagen, Fibronectin) und humane Endothelzellen (HUVEC) untersucht. Die Migrationstendenz wurde mithilfe eines Chemotaxisexperiments ermittelt. Um die Wirkung von Curcumin auf die für den Metastasierungsprozess relevanten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrin-Subtypen zu untersuchen, wurde eine FACScan-Analyse durchgeführt. Der Western Blot diente zur Quantifizierung der Integrinproteine vor und nach Behandlung. Zusätzlich wurde durch Blockadeanalysen dargestellt, in welchem Rahmen die Tumorzellen in ihrem Bindungs- und Migrationsverhalten von selektiven Integrinen abhängig sind.

Eine Bestrahlung von Curcumin mit Tageslicht (Curcumin<sup>Licht</sup>) hatte eine signifikante Wirkungssteigerung der Substanz gegenüber unbestrahltem Curcumin zur Folge. Einheitlich verringerte Curcumin<sup>Licht</sup> die Adhäsion sämtlicher Tumorzelllinien an immobilisiertes Kollagen und Fib-

ronektin. Die Interaktion von UMUC3 und RT112 mit HUVEC wurde gehemmt, hingegen erhöhte sich die Bindungsrate von TCCSUP signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Tumorzellmotilität (Chemotaxis) wurde in Gegenwart von Curcumin<sup>Licht</sup> deutlich geblockt. Die FACScan-Analyse und Western Blotting verwiesen auf distinkte Modulationen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrin-Subtypen. Diese waren in Abhängigkeit vom Tumorzelltyp unterschiedlich ausgeprägt. Mittels Blockadestudien konnte demonstriert werden, dass die Integrin-Subtypen  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5 und  $\beta$ 1 wesentlich in Adhäsions- und Migrationsereignisse eingebunden sind.

Die Ergebnisse verweisen auf die Bedeutung der Lichtexposition für die Wirkeffektivität der Natursubstanz Curcumin. Curcumin<sup>Licht</sup> vermag, invasive Prozesse im Rahmen der Tumordissemination zu unterbinden, und könnte sich somit als wertvolles Additivum im Rahmen der konventionellen Tumorbehandlung erweisen. In nachfolgenden Studien sollten die erarbeiteten Daten am Tiermodell verifiziert werden.

## Summary

The bladder carcinoma constitutes 3.4 % of all malignant tumours. In Germany, 16,000 people per year fall ill with a continuous rising incidence rate. Bladder cancer is a disease that concerns especially the elderly generation.

The therapy depends on the tumour stadium. In an advanced stadium the patient will be treated with two to three cycles of MVAC (Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin und Cisplatin). With chemotherapy it is possible to prolong survival time, but fast-rising resistances restrict the efficiency. In addition to chemotherapy curcumin can cover the need of patients to fight their disease actively. The natural compound has the potential to become a further therapy option for advanced bladder cancer disease. It is a molecule that has been explored much, and its antiproliferative and antiinvasive effects are described for several cancer diseases. The aim of this study was to investigate the invasive and migrating behaviour of bladder cancer cells before and after curcumin treatment as well as to increase the efficiency by light exposure.

UMUC3, RT112 and TCCSUP cell cultures were set up. The cancer cells were treated with curcumin in different concentrations (0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,2 µg/ml) and/or with daylight before starting the experiments. In order to investigate the binding behaviour of the cancer cells on extracellular matrix proteins (collagen, fibronectin) and endothelial cells (HUVECs), adhesion tests were carried out. The migration tendency was tested by chemotaxis experiments. To investigate the effects of curcumin on superficially integrin expression, a FACScan-analysis was undertaken. The quantity of integrins before and after treatment was measured by Western Blotting. Additionally, a blockade analysis detected whether the binding and migrating behaviour of bladder cancer cells is depended on certain integrins.

Light exposure increased the efficiency of curcumin treatment significantly. The therapy with curcumin plus daylight caused a reduction of the adhesion on extracellular proteins of all three cell lines uniformly. The interaction of UMUC3 and RT112 with HUVEC was inhibited however the retention rate of TCCSUP increased significantly. The curcumin<sup>light</sup> treatment was also suc-

cessfully involved in lower migration behaviour. The FACScan-analysis and Western Blot results showed that there were different modifications of  $\alpha$  and  $\beta$  integrin subtype expressions after treatment. The changes were depended on the cell type and the integrin type. The blockade experiments demonstrate how deeply involved  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  and  $\beta 1$  integrin subtypes are in adhesion and migration process.

The additive daylight exposure potentiated the effectiveness of curcumin treatment. The results in total proved that curcumin has a positive, inhibiting effect on invasive tumour dissemination. This makes curcumin a potential additive to the conventional tumour therapy. The collected data should however be further verified by animal testing.

## Literatur

1. Statistisches Bundesamt. Gesundheit: Todesursachen in Deutschland; 2014.  
[https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400147004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400147004.pdf?__blob=publicationFile).
2. Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A, Böcker-Denk-Heitz-Moch (eds). Pathologie: Mit über 200 Tabellen ; [mit dem Plus im Web ; Zugangscode im Buch; [www.studentconsult.de](http://www.studentconsult.de)]. 4<sup>th</sup> ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2008 S.169.
3. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin: Robert Koch-Inst; 2008-.
4. Bertz J (ed). Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin: Robert-Koch-Inst; 2010.
5. Lazzeri M. The physiological function of the urothelium – more than a simple barrier. *Urologia internationalis* 2006;76:289–295.
6. Raghavan D, Huben R. Management of bladder cancer. *Current problems in cancer* 1995;19:1–64.
7. Riede U-N, Schaefer H-E (eds). Allgemeine und spezielle Pathologie. 4<sup>th</sup> ed. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 1999.
8. Anderstrom C, Johansson SL, Schultz L von. Primary adenocarcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic and prognostic study. *Cancer* 1983;52:1273–1280.
9. Johnson DE, Schoenwald MB, Ayala AG, Miller LS. Squamous cell carcinoma of the bladder. *The Journal of urology* 1976;115:542–544.
10. Patterson JM, Ray EH, JR, Mendiondo OA, Medina WD, Gee WF. A new treatment for invasive squamous cell bladder cancer: the Nigro regimen: preoperative chemotherapy and radiation therapy. *The Journal of urology* 1988;140:379–380.

11. Quilty PM, Duncan W. Primary radical radiotherapy for T3 transitional cell cancer of the bladder: an analysis of survival and control. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1986;12:853–860.
12. Percy C, Fritz A, Jack A. *International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O)*. 3<sup>rd</sup> ed. Geneva: World Health Organization; 2000.
13. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C (eds). *TNM Classification of Malignant Tumours*. 7<sup>th</sup> ed. Somerset: Wiley; 2011.
14. Wittekind C, Meyer H-J (eds). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 7<sup>th</sup> ed. Weinheim: Wiley-Blackwell; 2010.
15. Edge SB (ed). *AJCC cancer staging manual*. 7<sup>th</sup> ed. New York: Springer; 2010.
16. Lammers RJM, Witjes WPJ, Hendricksen K, Caris CTM, Janzing-Pastors MHC, Witjes JA. Smoking status is a risk factor for recurrence after transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer. *European urology* 2011;60:713–720.
17. Kalble T. Etiopathology, risk factors, environmental influences and epidemiology of bladder cancer. *Der Urologe. Ausg. A* 2001;40:447–450.
18. Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K. *Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006.
19. Plna K, Hemminki K. Familial bladder cancer in the National Swedish Family Cancer Database. *The Journal of urology* 2001;166:2129–2133.
20. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, Rimm EB, Curhan GC, Willett WC, et al. Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. *The New England journal of medicine* 1999;340:1390–1397.
21. Leppert JT, Shvarts O, Kawaoka K, Lieberman R, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Prevention of bladder cancer: a review. *European urology* 2006;49:226–234.
22. Sultana SR, Goodman CM, Byrne DJ, Baxby K. Microscopic haematuria: urological investigation using a standard protocol. *British journal of urology* 1996;78:691-6; discussion 697-8.
23. Cummings KB, Barone JG, Ward WS. Diagnosis and staging of bladder cancer. *The Urologic clinics of North America* 1992;19:455–465.
24. Oosterlinck W, Kurth KH, Schroder F, Bultinck J, Hammond B, Sylvester R. A prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Group ran-

- domized trial comparing transurethral resection followed by a single intravesical instillation of epirubicin or water in single stage Ta, T1 papillary carcinoma of the bladder. *The Journal of urology* 1993;149:749–752.
25. Gnant M (ed). *Chirurgische Onkologie: Strategien und Standards für die Praxis*. Wien, New York, NY: Springer; 2008.
  26. See WA, Fuller JR. Staging of advanced bladder cancer. Current concepts and pitfalls. *The Urologic clinics of North America* 1992;19:663–683.
  27. Holmang S, Hedelin H, Anderstrom C, Holmberg E, Johansson SL. Long-term followup of a bladder carcinoma cohort: routine followup urography is not necessary. *The Journal of urology* 1998;160:45–48.
  28. Glas AS, Roos D, Deutekom M, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Kurth KH. Tumor markers in the diagnosis of primary bladder cancer. A systematic review. *The Journal of urology* 2003;169:1975–1982.
  29. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, Kahn P, Chao R, Yore L, et al. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *The Journal of urology* 2002;168:1950–1954.
  30. Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *The Journal of urology* 2003;170:964–969.
  31. Zlotta AR, Fleshner NE, Jewett MA. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada* 2009;3:S199-205.
  32. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn, Bas W G, Comperat E, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *European urology* 2013;64:639–653.
  33. Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *The Journal of urology* 2005;174:14–20.
  34. Mak RH, Hunt D, Shipley WU, Efstathiou JA, Tester WJ, Hagan MP, et al. Long-term outcomes in patients with muscle-invasive bladder cancer after selective bladder-preserving combined-modality therapy: a pooled analysis of Radiation Therapy Oncology Group protocols 8802, 8903, 9506, 9706, 9906, and 0233. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2014;32:3801–3809.

35. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, et al. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *The New England journal of medicine* 2003;349:859–866.
36. Scher HI, Yagoda A, Herr HW, Sternberg CN, Bosl G, Morse MJ, et al. Neoadjuvant M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) effect on the primary bladder lesion. *The Journal of urology* 1988;139:470–474.
37. Cohen SM, Goel A, Phillips J, Ennis RD, Grossbard ML. The role of perioperative chemotherapy in the treatment of urothelial cancer. *The oncologist* 2006;11:630–640.
38. Sylvester R, Sternberg C. The role of adjuvant combination chemotherapy after cystectomy in locally advanced bladder cancer: what we do not know and why. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2000;11:851–856.
39. Sternberg CN, Vogelzang NJ. Gemcitabine, paclitaxel, pemetrexed and other newer agents in urothelial and kidney cancers. *Critical reviews in oncology/hematology* 2003;46 Suppl:S105-15.
40. Boffetta P, Kaldor JM. Secondary malignancies following cancer chemotherapy. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 1994;33:591–598.
41. Morton LM, Dores GM, Tucker MA, Kim CJ, Onel K, Gilbert ES, et al. Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood* 2013;121:2996–3004.
42. Schonekaes K, Micke O, Mucke R, Buntzel J, Glatzel M, Bruns F, et al. Use of complementary/alternative therapy methods by patients with breast cancer. *Forschende Komplementarmedizin und klassische Naturheilkunde = Research in complementary and natural classical medicine* 2003;10:304–308.
43. Ryan JL, Heckler CE, Roscoe JA, Dakhil SR, Kirshner J, Flynn PJ, et al. Ginger (Zingiber officinale) reduces acute chemotherapy-induced nausea: a URCC CCOP study of 576 patients. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 2012;20:1479–1489.
44. Huebner J, Micke O, Muecke R, Buentzel J, Prott FJ, Kleeberg U, et al. User rate of complementary and alternative medicine (CAM) of patients visiting a counseling facility for CAM of a German comprehensive cancer center. *Anticancer research* 2014;34:943–948.

45. Sun W, Wang S, Zhao W, Wu C, Guo S, Hongwei G, et al. Chemical Constituents and Biological Research on Plants in the Genus *Curcuma*. *Critical reviews in food science and nutrition* 2016;0.
46. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 2014;46:2–18.
47. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Critical reviews in food science and nutrition* 2004;44:97–111.
48. Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1056:206–217.
49. Menon VP, Sudheer AR. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology* 2007;595:105–125.
50. Madhu K, Chanda K, Saji MJ. Safety and efficacy of *Curcuma longa* extract in the treatment of painful knee osteoarthritis: a randomized placebo-controlled trial. *Inflammopharmacology* 2013;21:129–136.
51. Naik SR, Thakare VN, Patil SR. Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: evidence of its antioxidant property. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 2011;63:419–431.
52. Killian PH, Kronski E, Michalik KM, Barbieri O, Astigliano S, Sommerhoff CP, et al. Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Carcinogenesis* 2012;33:2507–2519.
53. Bachmeier B, Nerlich AG, Iancu CM, Cilli M, Schleicher E, Vene R, et al. The chemopreventive polyphenol Curcumin prevents hematogenous breast cancer metastases in immunodeficient mice. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2007;19:137–152.
54. Cruz-Correa M, Shoskes DA, Sanchez P, Zhao R, Hyland LM, Wexner SD, et al. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2006;4:1035–1038.

55. Oh S, Kyung TW, Choi HS. Curcumin inhibits osteoclastogenesis by decreasing receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in bone marrow stromal cells. *Molecules and cells* 2008;26:486–489.
56. Ataie A, Sabetkasaei M, Haghparast A, Moghaddam AH, Kazeminejad B. Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, Curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 2010;96:378–385.
57. Kim KT, Kim MJ, Cho DC, Park SH, Hwang JH, Sung JK, et al. The neuroprotective effect of treatment with curcumin in acute spinal cord injury: Laboratory investigation. *Neurologia medico-chirurgica* 2014;54:387–394.
58. Lee W-H, Loo C-Y, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Current neuropharmacology* 2013;11:338–378.
59. Kulkarni SK, Dhir A. An overview of curcumin in neurological disorders. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 2010;72:149–154.
60. Belviranlı M, Okudan N, Atalık KE, Öz M. Curcumin improves spatial memory and decreases oxidative damage in aged female rats. *Biogerontology* 2013;14:187–196.
61. Hasan ST, Zingg J-M, Kwan P, Noble T, Smith D, Meydani M. Curcumin modulation of high fat diet-induced atherosclerosis and steatohepatosis in LDL receptor deficient mice. *Atherosclerosis* 2014;232:40–51.
62. Oner-Iyidogan Y, Kocak H, Seyidhanoglu M, Gurdol F, Gulcubuk A, Yildirim F, et al. Curcumin prevents liver fat accumulation and serum fetuin-A increase in rats fed a high-fat diet. *Journal of physiology and biochemistry* 2013;69:677–686.
63. Bradford PG. Curcumin and obesity. *BioFactors (Oxford, England)* 2013 Jan-Feb;39:78–87.
64. Jagetia GC, Aggarwal BB. "Spicing up" of the immune system by curcumin. *Journal of clinical immunology* 2007;27:19–35.
65. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 4<sup>th</sup> ed. New York, NY: Garland Science; 2002.
66. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: Biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Cancer* 2010;10:9–22.
67. Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011;3.

68. Nayak SK, O'Toole C, Price ZH. A cell line from an anaplastic transitional cell carcinoma of human urinary bladder, Vol 35.
69. Makarevic J, Rutz J, Juengel E, Kaulfuss S, Reiter M, Tsauro I, et al. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth in vitro by diminishing cyclin A and cdk2. *PloS one* 2014;9:e105590.
70. Grossman HB, Wedemeyer G, Ren L, Wilson GN, Cox B. Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures, Vol 136.
71. Bellet D, Lazar V, Bieche I, Paradis V, Giovangrandi Y, Paterlini P, et al. Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells, Vol 57.
72. Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: Cycle of life and death. *Cell division* 2008;3:14.
73. Lee DS, Lee MK, Kim JH. Curcumin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells. *Anticancer research* 2009;29:5039–5044.
74. Liu D, Chen Z. The effect of curcumin on breast cancer cells. *Journal of breast cancer* 2013;16:133–137.
75. Tian B, Wang Z, Zhao Y, Wang D, Li Y, Ma L, et al. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. *Cancer letters* 2008;264:299–308.
76. Shankar S, Chen Q, Sarva K, Siddiqui I, Srivastava RK. Curcumin enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in prostate cancer cells: Molecular mechanisms of apoptosis, migration and angiogenesis. *Journal of molecular signaling* 2007;2:10.
77. Blasius R, Duvoix A, Morceau F, Schnekenburger M, Delhalle S, Henry E, et al. Curcumin stability and its effect on glutathione S-transferase P1-1 mRNA expression in K562 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004;1030:442–448.
78. Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *Journal of neurochemistry* 2007;102:522–538.
79. Shehzad A, Park J-W, Lee J, Lee YS. Curcumin induces radiosensitivity of in vitro and in vivo cancer models by modulating pre-mRNA processing factor 4 (Prp4). *Chemico-biological interactions* 2013;206:394–402.

80. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *The Journal of clinical investigation* 1991;88:691–695.
81. Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6910–6924.
82. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, JR. NF-kappaB antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science (New York, N.Y.)* 1998;281:1680–1683.
83. Sandur SK, Deorukhkar A, Pandey MK, Pabon AM, Shentu S, Guha S, et al. Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF-kappaB activity. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2009;75:534–542.
84. Sternberg CN. Muscle invasive and metastatic bladder cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2006;17 Suppl 10:x23-30.
85. Song J, Choi B, Jin E-J, Yoon Y, Choi K-H. Curcumin suppresses *Streptococcus mutans* adherence to human tooth surfaces and extracellular matrix proteins. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2012;31:1347–1352.
86. Bruzell EM, Morisbak E, Tonnesen HH. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous preparations. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2005;4:523–530.
87. Herman JG, Stadelman HL, Roselli CE. Curcumin blocks CCL2-induced adhesion, motility and invasion, in part, through down-regulation of CCL2 expression and proteolytic activity. *International journal of oncology* 2009;34:1319–1327.
88. Safuan S, Storr SJ, Patel PM, Martin SG. A comparative study of adhesion of melanoma and breast cancer cells to blood and lymphatic endothelium. *Lymphatic research and biology* 2012;10:173–181.
89. Makarevic J, Rutz J, Juengel E, Kaulfuss S, Tsaour I, Nelson K, et al. Amygdalin influences bladder cancer cell adhesion and invasion in vitro. *PloS one* 2014;9:e110244.
90. Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. Chemotaxis in cancer. *Nature reviews. Cancer* 2011;11:573–587.

91. Ganguly KK, Pal S, Moulik S, Chatterjee A. Integrins and metastasis. *Cell adhesion & migration* 2013 May-Jun;7:251–261.
92. Juengel E, Meyer dos Santos S, Schneider T, Makarevic J, Hudak L, Bartsch G, et al. HDAC inhibition suppresses bladder cancer cell adhesion to collagen under flow conditions. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 2013;238:1297–1304.
93. Lowell CA, Mayadas TN. Overview: Studying integrins in vivo. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2012;757:369–397.
94. Sakaguchi T, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Sugita S, Matsushita R, et al. Regulation of ITGA3 by the dual-stranded microRNA-199 family as a potential prognostic marker in bladder cancer. *British journal of cancer* 2017;116:1077–1087.
95. Kurozumi A, Goto Y, Matsushita R, Fukumoto I, Kato M, Nishikawa R, et al. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer. *Cancer science* 2016;107:84–94.
96. Nakada M, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, et al. Integrin alpha3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. *British journal of cancer* 2013;108:2516–2524.
97. Madame Curie Bioscience Database (ed). *Integrins in Cancer Cell Invasion*. Landes Bioscience, Austin (TX); 2000-2013.
98. Lv XH, Liu BQ, Li XM, Wang XC, Li XL, Ahmed N, et al. Integrin alpha4 Induces Lymphangiogenesis and Metastasis via Upregulation of VEGF-C in Human Colon Cancer. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 2016;299:741–747.
99. Mierke CT, Frey B, Fellner M, Herrmann M, Fabry B. Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *Journal of cell science* 2011;124:369–383.
100. Adachi M, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Inufusa H, Miyake M. Significance of integrin alpha5 gene expression as a prognostic factor in node-negative non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2000;6:96–101.
101. Saito T, Kimura M, Kawasaki T, Sato S, Tomita Y. Correlation between integrin alpha 5 expression and the malignant phenotype of transitional cell carcinoma. *British journal of cancer* 1996;73:327–331.

102. Yin H, Wang Y, Chen W, Zhong S, Liu Z, Zhao J. Drug-resistant CXCR4-positive cells have the molecular characteristics of EMT in NSCLC. *Gene* 2016;594:23–29.
103. Xu T, Qin L, Zhu Z, Wang X, Liu Y, Fan Y, et al. MicroRNA-31 functions as a tumor suppressor and increases sensitivity to mitomycin-C in urothelial bladder cancer by targeting integrin alpha5. *Oncotarget* 2016;7:27445–27457.
104. Gong C, Yang Z, Wu F, Han L, Liu Y, Gong W. miR-17 inhibits ovarian cancer cell peritoneal metastasis by targeting ITGA5 and ITGB1. *Oncology reports* 2016;36:2177–2183.
105. Liebert M, Wedemeyer G, Stein JA, Washington RW, JR, van Waes C, Carey TE, et al. The monoclonal antibody BQ16 identifies the alpha 6 beta 4 integrin on bladder cancer. *Hybridoma* 1993;12:67–80.
106. Mercurio AM, Rabinovitz I, Shaw LM. The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Current opinion in cell biology* 2001;13:541–545.
107. Liu Z, Wang F, Chen X. Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Cancer Therapy. *Drug development research* 2008;69:329–339.
108. Shang C, Zhang H, Guo Y, Hong Y, Liu Y, Xue Y. MiR-320a down-regulation mediates bladder carcinoma invasion by targeting ITGB3. *Molecular biology reports* 2014;41:2521–2527.
109. Bohanes P, Yang D, Loupakis F, LaBonte MJ, Gerger A, Ning Y, et al. Integrin genetic variants and stage-specific tumor recurrence in patients with stage II and III colon cancer. *The pharmacogenomics journal* 2015;15:226–234.
110. Ni R, Huang Y, Wang J. miR-98 targets ITGB3 to inhibit proliferation, migration, and invasion of non-small-cell lung cancer. *OncoTargets and therapy* 2015;8:2689–2697.
111. Chen X, Wei L, Zhao S. miR-338 inhibits the metastasis of lung cancer by targeting integrin beta3. *Oncology reports* 2016;36:1467–1474.
112. Stewart RL, O'Connor KL. Clinical significance of the integrin alpha6beta4 in human malignancies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2015;95:976–986.
113. Behnsawy HM, Miyake H, Abdalla MA, Sayed MA, Ahmed AE-FI, Fujisawa M. Expression of integrin proteins in non-muscle-invasive bladder cancer: significance of intravesical recurrence after transurethral resection. *BJU international* 2011;107:240–246.

114. Engl T, Makarevic J, Relja B, Natsheh I, Muller I, Beecken W-D, et al. Mycophenolate mofetil modulates adhesion receptors of the beta1 integrin family on tumor cells: impact on tumor recurrence and malignancy. *BMC cancer* 2005;5:4.
115. Hudak L, Tezeeh P, Wedel S, Makarevic J, Juengel E, Tsaur I, et al. Low dosed interferon alpha augments the anti-tumor potential of histone deacetylase inhibition on prostate cancer cell growth and invasion. *The Prostate* 2012;72:1719–1735.
116. Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Niggemann B, Zanker KS, Dittmar T. Role of the beta1-integrin subunit in the adhesion, extravasation and migration of T24 human bladder carcinoma cells. *Clinical & experimental metastasis* 2005;22:99–106.
117. Zhao J, Guan J-L. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer metastasis reviews* 2009;28:35–49.
118. Zhao X, Guan J-L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced drug delivery reviews* 2011;63:610–615.
119. Lark AL, Livasy CA, Calvo B, Caskey L, Moore DT, Yang X, et al. Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003;9:215–222.
120. Lightfoot HM, JR, Lark A, Livasy CA, Moore DT, Cowan D, Dressler L, et al. Upregulation of focal adhesion kinase (FAK) expression in ductal carcinoma in situ (DCIS) is an early event in breast tumorigenesis. *Breast cancer research and treatment* 2004;88:109–116.
121. Yoon H, Dehart JP, Murphy JM, Lim S-TS. Understanding the roles of FAK in cancer: inhibitors, genetic models, and new insights. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2015;63:114–128.
122. Kong D, Chen F, Sima NI. Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in bladder cancer cells via Src and the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Experimental and therapeutic medicine* 2015;10:1725–1731.
123. Chen CC, Sureshabul M, Chen HW, Lin YS, Lee JY, Hong QS, et al. Curcumin Suppresses Metastasis via Sp-1, FAK Inhibition, and E-Cadherin Upregulation in Colorectal Cancer. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2013;2013:541695.

124. Zhang Y, Luo Y, Lyu R, Chen J, Liu R, Li D, et al. Proto-Oncogenic Src Phosphorylates EB1 to Regulate the Microtubule- Focal Adhesion Crosstalk and Stimulate Cell Migration. *Theranostics* 2016;6:2129–2140.
125. Akhtar N, Streuli CH. An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nature cell biology* 2013;15:17–27.
126. Gupta KK, Bharne SS, Rathinasamy K, Naik NR, Panda D. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. *The FEBS journal* 2006;273:5320–5332.
127. Stehbens S, Wittmann T. Targeting and transport: How microtubules control focal adhesion dynamics. *The Journal of cell biology* 2012;198:481–489.
128. Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers* 2014;6:1298–1327.
129. Kumar D, Kumar M, Saravanan C, Singh SK. Curcumin: A potential candidate for matrix metalloproteinase inhibitors. *Expert opinion on therapeutic targets* 2012;16:959–972.
130. Lin S-S, Lai K-C, Hsu S-C, Yang J-S, Kuo C-L, Lin J-P, et al. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *Cancer letters* 2009;285:127–133.
131. Tsang RK-Y, Tang WW-Y, Gao W, Ho W-K, Chan JY-W, Wei WI, et al. Curcumin inhibits tongue carcinoma cells migration and invasion through downregulation of matrix metalloproteinase 10. *Cancer investigation* 2012;30:503–512.
132. Liu SY, Di Ge, Chen LN, Zhao J, Le Su, Zhang SL, et al. A small molecule induces integrin beta4 nuclear translocation and apoptosis selectively in cancer cells with high expression of integrin beta4. *Oncotarget* 2016;7:16282–16296.
133. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: Lessons learned from clinical trials. *The AAPS journal* 2013;15:195–218.
134. Fan X, Zhang C, Liu DB, Yan J, Liang HP. The clinical applications of curcumin: Current state and the future. *Current pharmaceutical design* 2013;19:2011–2031.
135. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2013;9:1–14.

136. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanomedicine: A road to cancer therapeutics. *Current pharmaceutical design* 2013;19:1994–2010.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Prof. Dr. phil. nat. Roman Blaheta und PD Dr. phil. nat. Eva Jüngel, die meine Arbeit betreut haben. Für das Anlernen der Laborarbeit, die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bedanke ich mich herzlich.

Ebenfalls bedanke ich mich beim ganzen Team des Forschungslabors der Klinik für Urologie und Kinderurologie. Ich habe mich bei Ihnen sehr wohl gefühlt – jeder war stets bereit mir zu helfen, wenn ich ein Problem hatte. Besonders bedanke ich mich bei Jochen Rutz, der immer ansprechbar und hilfsbereit war und mich enorm unterstützt hat.

Meinem Freund Jonathan danke ich ebenfalls herzlich für seine Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Hanna, die immer für mich da ist, wenn ich jemanden zum Reden brauche. Vielen Dank für deine Liebe und Unterstützung, die du mir jeden Tag entgegenbringst.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern Nicol und Klaus-Peter, die mir mein Studium ermöglicht haben und immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten. Über die Dauer meines gesamten Studiums konnte ich mich auf euch verlassen. Ich danke euch.

Jan-Erik Fleger,  
Wolfsburg, 23.07.2017

## 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

Einfluss der natürlichen Verbindung Curcumin  
auf die Invasion von Harnblasenkarzinomzellen in vitro

in der Klinik für Urologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Roman Blaheta mit Unterstützung durch Dr. Eva Juengel 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.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift