

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

Schwerpunkt:

Gastroenterologie, Hepatologie, Infektionskrankheiten

**Die Rolle der AMPK
beim cholangiozellulären Karzinom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Foth, Felix Marius

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. R. R. Plentz
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Seizer
Tag der Disputation: 24.09.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung.....	9
1.1 Das Cholangiokarzinom (CC)	9
1.2 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)	12
1.2.1 AMPK in Tumoren.....	14
1.2.2 AMPK beim CC.....	17
1.3 EMT-Marker	18
1.3.1 E-Cadherin.....	18
1.3.2 N-Cadherin	18
1.4 Interleukin-6 (IL-6).....	18
1.5 Signal Transducer und Aktivator der Transkription-3 (STAT-3).....	18
1.6 Nuklearer Faktor kb (nfb)	19
1.7 Ziel des Projekts.....	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Material	21
2.1.1 TFK1-Zelllinie.....	21
2.1.2 siRNA.....	21
2.1.3 Verbrauchsgegenstände.....	21
2.1.4 Geräte.....	22
2.1.5 Chemikalien	23
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	26
2.1.6.1 Puffer und Lösungen für Proteinextraktion und Western Blot.....	26
2.1.6.2 Lösungen für die Immunhistochemie	28
2.1.7 Antikörper	28

2.1.7.1 Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie.....	28
2.1.7.2 Primer und PCR Programm.....	29
2.1.8 Software.....	30
2.2 Methoden	30
2.2.2 Arbeiten mit der Zellkultur	30
2.2.2.1 Zelllinie und Medium.....	30
2.2.2.2 Zell-Splitting.....	30
2.2.2.3 siRNA	31
2.2.3 Western Blot	32
2.2.3.1 Zellkultur	32
2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.2.3.3 Blotting.....	33
2.2.3.4 Proteintransfer auf eine PVDF Membran.....	33
2.2.3.5 Antikörper und Entwicklung	34
2.2.3.6 Auswertung mit ImageJ	34
2.2.4 Proliferations-Assay (wst-1 (wasserlösliches Tetrazolium) –Assay) .	34
2.2.5 Migrations-Assay	35
2.2.6 Invasions-Assay.....	35
2.2.7 qtRT-PCR	36
2.2.8 Immunhistochemie.....	38
3. Ergebnisse	41
3.1 Immunhistochemischer Nachweis der AMPK im CC.....	41
3.2 Proliferations-Assay	41
3.3 Migrations-Assay.....	42
3.4 Invasions-Assay	42
3.5 Western Blot.....	46

3.5.1 AMPK und phospho-AMPK-Expression.....	46
3.5.2 Marker der epithelialen-mesenchymalen Transition.....	48
3.5.3 Auswirkungen auf den Signal Transducer und Aktivator der Transkription-3 (STAT-3)	48
3.5.4 Auswirkungen auf den Nuklearen Faktor kb (nfkb)	50
3.6 qtRT-PCR	51
3.6.1 AMPK α 1 und AMPK α 2	51
3.6.2 Auswirkungen auf Interleukin-6.....	53
4. Diskussion	54
5. Zusammenfassung	64
6. Literaturverzeichnis	66
7. Erklärung zum Eigenanteil.....	74
8. Danksagung	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
AICAR	5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonukleosid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	Cholangiokarzinom
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ct-Wert	Cycle threshold
D	Deutschland
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Diphosphat-gepufferte Salzlösung
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
FCS	Fetales Kälberserum
h	Stunden
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IL6	Interleukin-6
I κ B α	Nuklearer Faktor der kappa light polypeptide gene enhancer in B-Zellen Inhibitor α
LKB1	Leber-Kinase-B1
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
n κ b	Nuklearer Faktor kappa-b
p-AMPK	Phosphorylierte AMPK
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis

p-STAT-3	Phosphorylierter Signal Transducer und Aktivator der Transkription-3
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
qtRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
siRNA	Small interfering RNA
STAT-3	Signal Transducer und Aktivator der Transkription-3
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TFK1	Name der CC-Zelllinie
TWIST1	Twist-related protein 1
UK	Vereinigtes Königreich
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
Wst-1	Wasserlösliches Tetrazolium-1

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Die anatomische Lage und die Ursprungszellen des CC	9
Abb. 2	Regulationsmechanismen der AMPK	12
Abb. 3	AMPK Signalwege	14
Abb. 4	Metformingesteuerte Antitumorwirkung	19
Abb. 5	Immunhistochemische Färbung der AMPK in murinem CC Gewebe	40
Abb. 6	Proliferation nach 48h	42
Abb. 7	Proliferation nach 96h	43
Abb. 8	Invasionsindex	43
Abb. 9	Migration	44
Abb. 10	Invasion: Lichtmikroskopische Bilder	45
Abb. 11	Western Blot: AMPK und p-AMPK	46
Abb. 12	Western Blot: EMT-Marker (E-Cadherin und N-Cadherin)	48
Abb. 13	Western Blot: STAT-3 und p-STAT-3	49
Abb. 14	Western Blot: nfkb	50
Abb. 15	qtRT-PCR: AMPK α 1 und AMPK α 2	51
Abb. 16	qtRT-PCR: IL-6	52

1. Einleitung

1.1 Das Cholangiokarzinom (CC)

Das CC ist ein maligner Tumor, der von epithelialen Zellen ausgeht, und dessen Zellen Anzeichen einer cholangiozellulären Differenzierung zeigen. Es kann an verschiedenen Orten auftreten und wird auch nach der anatomischen Auftretsstelle eingeteilt. Es gibt intrahepatische CC, diese liegen hinsichtlich des Gallenabflusses proximal der zweitgradigen Gallengänge, perihiliäre CC (auch Klatskin-Tumore genannt), diese liegen zwischen den zweitgradigen Gallengängen und der Einmündung des Ductus cysticus in den Ductus choledochus, und extrahepatische CC, die zwischen der Einmündung des Ductus cysticus in den Ductus choledochus und der Papilla Vateri liegen. Die meisten CC zeigen sich histologisch als unterschiedlich stark differenzierte Adenokarzinome (Razumilava und Gores 2014; Rajamohan et al. 2016).

Auch die Ursprungszellen unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Untergruppen des CC. Das intrahepatische CC weist eine histologische Vielfältigkeit auf und entwickelt sich aus Epithelzellen der Gallenwege oder hepatischen Vorläuferzellen. Auch eine Entstehung aus Hepatozyten durch verschiedene Umdifferenzierungen wird diskutiert. Die perihiliären und extrahepatischen CC entstammen aus Epithelzellen der Gallenwege oder periduktalen Drüsen (Rizvi und Gores 2013; Rajamohan et al. 2016).

Das CC ist der häufigste maligne Tumor, der von Gallengangsgewebe ausgeht, und nach dem hepatozellulären Karzinom der zweithäufigste primäre Tumor in der Leber. Das CC ist für 3% aller Tumoren des Gastrointestinaltrakts verantwortlich (Rizvi und Gores 2013). Die intrahepatischen CC machen dabei weniger als 10%, die perihiliären ca. 50 % und die extrahepatischen ca. 40% aller CC aus. Auch kombinierte cholangiozelluläre-hepatozelluläre Karzinome sind beschrieben, diese machen als verwandte Unterart des CC ca. 1% aus (Razumilava und Gores 2014).

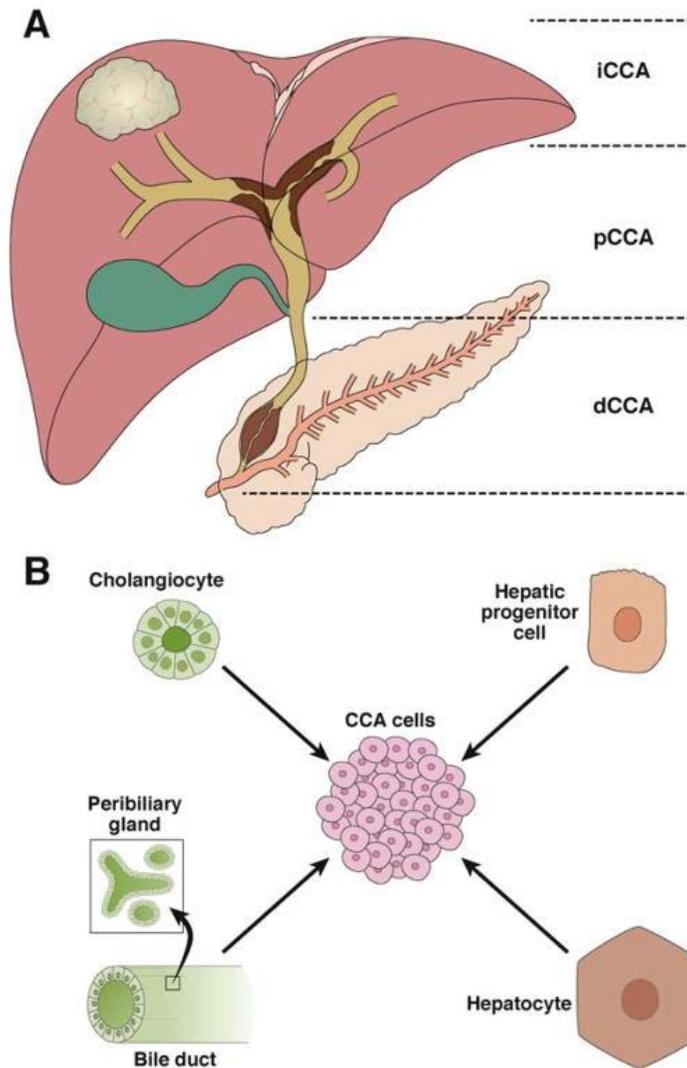


Abb.1: Die anatomische Lage und die Ursprungszellen des CC; **A**: Die Unterscheidung der drei verschiedenen Typen des CC anhand ihrer anatomischen Lage; **B**: Mögliche Ursprungszellen des CC; CCA=CC; dCCA=distales CC, iCCA=intrahepatisches CC, pCCA=perihiläres CC (Klatskin-Tumor) (aus: Rizvi und Gores 2013).

Die Inzidenz des CC hat in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen, wobei dies vor allem das intrahepatische CC betrifft; die Inzidenz der anderen beiden Typen ist weitestgehend stabil. Dies kann auf der einen Seite durch eine Abnahme an sogenannten cancer of unknown primary (CUP) im gleichen Zeitraum, hauptsächlich bedingt durch eine Verbesserung der diagnostischen Verfahren, auf der anderen Seite durch eine Alterung der westlichen Bevölkerung erklärt werden. Die Daten aus Nachbarländern verhalten sich hier-

bei jedoch nicht immer kongruent zueinander, was durch die erschwerte Einteilung, besonders von fortgeschrittenen Stadien, bedingt sein könnte. Die Gesamtinzidenz des CC beträgt weniger als 2/100.000, wodurch der Tumor noch als selten gilt (Kirstein und Vogel 2016; Shaib und El-Serag 2004). Männer sind ein wenig häufiger betroffen als Frauen (1,5 zu 1 pro 100.000). Das CC tritt normalerweise nicht bei Kindern auf. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt im siebten Lebensjahrzent (Razumilava und Gores 2014).

Hepatobiliäre Tumore sind für 13% der Mortalität an allen Tumorentitäten verantwortlich. Das CC ist der Grund für ca. ein Fünftel der Todesfälle an hepatobiliären Karzinomen. Außerdem ist das CC einer der Tumore mit der höchsten Sterblichkeitsrate weltweit, bei einem 5-Jahresüberleben von lediglich 10%. Die einzige bisher bekannte Therapie, die zu einer Heilung führen kann, ist die chirurgische Resektion, doch die tatsächliche kurative Resektion kann nur in weniger als der Hälfte der Fälle durchgeführt werden (Kirstein und Vogel 2016). Bei inoperablem CC ist die Standard-Chemotherapie eine Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin, wodurch das durchschnittliche Überleben auf fast 12 Monate gestiegen ist (Vogel et al. 2014; Valle et al. 2010). Aufgrund eines Mangels an frühen Symptomen wird das CC meist erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, in welchen eine sehr schlechte Prognose mit einer mittleren Überlebensdauer von 12-15 Monaten besteht (Kirstein und Vogel 2016).

Obwohl der Großteil der CC idiopathisch auftritt, konnten inzwischen einige Risikofaktoren entdeckt werden. Die Auftrittshäufigkeit ist weltweit am höchsten in Südostasien, was eng mit dem Vorkommen von Leberegel, am häufigsten *Opisthorchis viverini* oder *Clonorchis sinensis*, vergesellschaftet ist (Watanapa und Watanapa 2002). In der westlichen Hemisphäre ist die Vergesellschaftung mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) am häufigsten (Kirstein und Vogel 2016). Zwischen 5 und 10% der an PSC erkrankten Personen erkranken in der Folge an einem CC (Vogel et al. 2014). Wiederum 50% der CC bei PSC-Patienten werden binnen des ersten Jahres nach Diagnose der PSC entdeckt. Als weitere Risikofaktoren werden speziell für das intrahepatische CC eine Infektion mit dem Hepatitis B-Virus, eine Infektion mit dem Hepatitis C-Virus und

eine Leberzirrhose diskutiert, auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen stehen zur Debatte (Rizvi und Gores 2013; Cardinale et al. 2010). Des Weiteren scheint ein Einfluss von Diabetes mellitus, Alkohol- und Tabakkonsum sowie möglicherweise auch Adipositas wahrscheinlich. Außerdem gibt es auch seltene angeborene Malformationen, wie das Caroli-Syndrom, das mit angeborenen Zysten der Gallengänge einhergeht, welche mit einer höheren CC Erkrankungsrate assoziiert werden (Kirstein und Vogel 2016; Blechacz und Gores 2008; Rizvi und Gores 2013; Ben-Menachem 2007; Plentz und Malek 2015; Chaiteerakij et al. 2013).

1.2 Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)

Die AMPK ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, welche aus einem heterotrimerischen Komplex mit einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen, β - und γ -, Untereinheiten besteht (Li et al. 2015b). Jede dieser Untereinheiten besteht beim Menschen aus verschiedenen Isoformen, so gibt es für die katalytische Untereinheit eine α -1 und eine α -2 Isoform, für die regulatorischen eine β -1 und β -2 und eine γ -1, γ -2 und γ -3 Isoform. Jede dieser Isoformen wird wiederum von bestimmten Genen gebildet, sodass insgesamt 12 verschiedene heterotrimerische Kombination gebildet werden können (Hardie 2015). AMPK ist in jeder Zelle vorhanden, jedoch gibt es eine gewebsspezifische Häufung verschiedener Isoformen. Die α 1-, β 1- und γ 1-Untereinheiten sind mäßig bis stark exprimiert in vielen Geweben, unter anderem der Lunge, den Knochen und der Leber, die Untereinheiten α 2 und β 2 sind besonders in Skelettmuskeln stark vorhanden (Sinnott und Brenman 2014).

AMPK ist ein Sensor für die in der Zelle vorhandene Energie und ihren Ernährungszustand. Dazu überwacht sie sehr genau das Verhältnis von AMP zu ATP in der Zelle. Wird dabei ein Mangel an bereitstehender Energie festgestellt, aktiviert die AMPK katabolische Prozesse und deaktiviert nicht obligatorisch notwendige energieverbrauchende Reaktionen, um das energetische Gleichgewicht wiederherzustellen (Hardie 2014; Cantó und Auwerx 2010; Carling et al. 2011). Dazu unterbindet die aktivierte AMPK verschiedene zelluläre Prozesse, die ATP verbrauchen, wie die Cholesterin-, die Fettsäure-, und die Proteinbio-

synthese, durch Phosphorylierung von unter anderem der Acetyl-Coenzym A-Carboxylase und der HMG-CoA-Reduktase. Zusätzlich werden ATP-produzierende Reaktionen aktiviert, wie die Aufnahme und Verstoffwechslung von Glukose und Fettsäuren. Außer der Phosphorylierung von Schlüsselenzymen scheint auch ein direkter Einfluss auf die Genexpression jener durch die AMPK zu erfolgen, da AMPK sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommt (Motoshima et al. 2006; Faubert et al. 2013).

AMPK selbst wird durch eine Phosphorylierung am Threonin 172 der α -Untereinheit aktiviert. Durch Binden an die γ -Untereinheit fördert AMP sowohl die Phosphorylierung des T172 als auch die Aktivität der phosphorylierten AMPK (p-AMPK) und schützt darüber hinaus auch die p-AMPK vor der Dephosphorylierung. Zusätzlich kann auch eine Bindung von ADP an die γ -Untereinheit zu einer Verhinderung der Dephosphorylierung der p-AMPK führen (Sinnett und Brenman 2014; Shaw et al. 2004; Mihaylova und Shaw 2011). Diese verschiedenen Mechanismen zur Aktivierung der AMPK führen dazu, dass das ganze System sehr sensitiv auf Änderungen der Energiehomöostase der Zelle reagieren kann und schon eine kleine Erhöhung der AMP-Konzentration eine frühzeitige und große Gegenreaktion auslöst (Hardie 2004).

Regulation of AMPK activity		AMPK Heterotrimer
Magnitude	<ul style="list-style-type: none"> • AMPK kinases phosphorylate T172 • AMP binds Site 1 (increases p-AMPK activity) 	
Duration	<ul style="list-style-type: none"> • Phosphatases dephosphorylate T172 • AMP and ADP bind Site 3 and inhibit dephosphorylation 	
Sub-cellular distribution	<ul style="list-style-type: none"> • AMPK-β subunit modifications: phosphorylation, myristoylation 	

Abb.2: Regulationsmechanismen der AMPK. Das vereinfachte Cartoon zeigt lediglich 2 Bindungsstellen an der γ -Untereinheit. Die zwei anderen Bindungsstellen wurden zur Übersichtlichkeit weggelassen (Stelle 2 und 4) (aus: Sinnett und Brenman 2014).

Die Serin/Threonin-Kinase LKB1 (Leber-Kinase-B1) induziert direkt die Aktivierung der AMPK durch Phosphorylierung an T172 der α -Untereinheit. LKB1 ist als Tumorsuppressor beim Menschen bekannt, da es beim erblichen, mit zahlreichen Tumoren assoziierten, Peutz-Jeghers-Syndrom mutiert ist. LKB1 aktiviert 12 mit der AMPK verwandte Kinasen, wovon jedoch lediglich AMPK- α 1 und AMPK- α 2 mit einem verminderten ATP-Status der Zelle assoziiert sind. Es ist allerdings bisher nicht bekannt, ob eine dieser von LKB1 aktivierten Kinasen dafür verantwortlich ist, dass eine mutierte LKB1 zu einer vermehrten Tumorbildung führt (Shaw 2009; Boudeau et al. 2003).

Da die AMPK eine zentrale Rolle bei der Zellvermehrung und bei der Erhaltung der Energielevel der Zelle einnimmt, wurden bereits synthetische Mittel zur Aktivierung hergestellt. Diese können in erster Linie in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Zuerst indirekte Aktivatoren, die durch eine Verschiebung des ATP- zu ADP/AMP-Verhältnisses zu einer Aktivierung der AMPK führen, zweitens Prodrugs, die in der Zelle in AMP-Analoga verwandelt werden und drittens direkte AMPK-Aktivatoren, die die Carbohydrat-Bindung der β -Untereinheit nutzen. Die meisten der indirekten Aktivatoren hemmen die Atmungskette oder die mitochondriale ATP-Synthase (Hardie 2014). Zu diesen indirekten Aktivatoren gehört auch das weit verbreitete Antidiabetikum Metformin, das auch in vielen Experimenten mit Bezug zur AMPK benutzt wird (Morales und Morris 2015). Die zweite Gruppe wird hauptsächlich vom 5-Aminoimidazol-4-Carboxamid Ribonukleosid (AICAR) repräsentiert. AICAR wird nach Aufnahme in die Zelle zu ZMP (Phosphoryliertes AICARibosid) phosphoryliert, welches ein AMP-Analogen ist, das die gleichen Effekte auf die AMPK hat wie AMP. Zu der dritten Gruppe gehört das Thienopyridon A769662, welches die Effekte von AMP imitiert, so führt es zu einer Aktivierung und zu einem Schutz vor Dephosphorylierung des T172 der AMPK. Hierbei ist es unabhängig von AMP (Hardie 2014).

1.2.1 AMPK in Tumoren

AMPK führt zur Aktivierung einer Reihe von Effektorproteinen, die einen Einfluss auf Tumorgenese und –entwicklung haben (Abb.3). So hemmt die AMPK mTOR (mammalian target of Rapamycin), eine Serin-Threonin-Kinase, die

Zellwachstum, Zellvermehrung, Überlebensdauer der Zelle, Beweglichkeit der Zelle, Transkription von Genen und die Proteinsynthese reguliert. Auch die COX-2 (Cyclooxygenase-2) wird von der AMPK gehemmt. COX-2 wirkt proinflammatorisch, ist in vielen Tumoren erhöht, führt zur Entstehung von Tumoren und fördert deren Wachstum. Außerdem hemmt AMPK auch die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), die für die Fettsäurebiosynthese und die Aufnahme von Fettsäuren eine entscheidende Rolle spielt. In verschiedenen Tumoren führt eine Inhibition der ACC zu einer Apoptose der Zellen (Li et al. 2015b; Sanli et al. 2014).

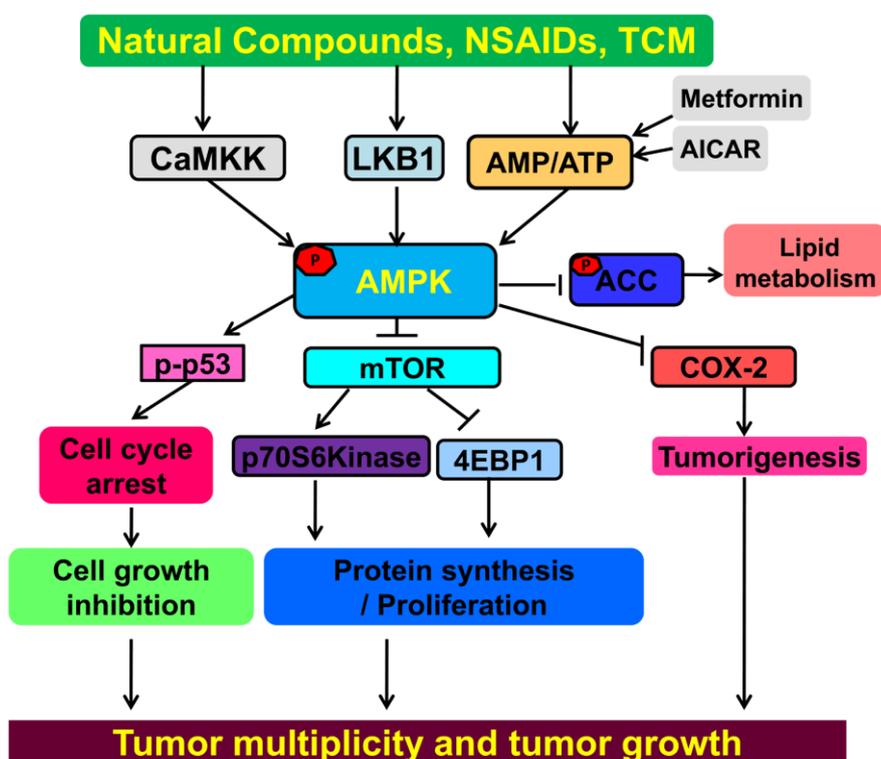


Abb.3: AMPK Signalwege: Die AMPK wirkt hinsichtlich Tumorbehandlung und Tumorprävention als Tumorsuppressor. Eine Aktivierung erfolgt zum Beispiel durch Bestandteile natürlicher Produkte, nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs), traditionelle chinesische Medizin (TCM) oder Metformin. AMPK hemmt den mTOR-Signalweg, was zu einer Verringerung des Tumorzellwachstums führt. Aktivierte AMPK inhibiert außerdem die COX-2, welche durch ihre entzündungsfördernde Aktivität eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt. Auch ein Stillstand des Zellzyklus durch eine Phosphorylierung des Tumorsuppressors p53 wird durch AMPK bedingt. Des Weiteren induziert eine Aktivierung der AMPK eine Phosphorylierung der ACC, wodurch der Fettsäurestoffwechsel beeinflusst wird. Eine Aktivierung der Zielproteine ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, eine Inhibition mit einem Balken (aus: Li et al. 2015b).

Hingegen phosphoryliert AMPK p53 und stabilisiert es dadurch. P53 wirkt als Tumorsuppressor, indem es die Zelle stressanfällig macht, was zu einem Zellzyklusarrest führt. Über p53 bewirkt die AMPK eine Regulation des Zellwachstums und der Vermehrung bei Energiemangelzuständen (Jones et al. 2005). Bei ungefähr der Hälfte der menschlichen Tumoren besteht eine p53-Inaktivierung (Li et al. 2015b).

Es ist bekannt, dass AMPK die Entstehung, das Wachstum und die Vermehrung von Tumorzellen einschränkt, jedoch wird trotzdem auch ein tumorfördernder Einfluss der AMPK diskutiert. So scheint mindestens eine kleine Restfunktion der AMPK nötig zu sein, um bestimmte Stresssituationen, wie Hypoxie oder eine mangelnde Verfügbarkeit von Energie, die im Laufe einer Tumorentwicklung vorkommen, zu überstehen (Hardie 2015; Chuang et al. 2014).

Beim nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinom liegt zu 30-50% eine Mutation der LKB1 vor, was dazu führt, dass die Zelle unfähig ist AMPK zu aktivieren. Eine aktive AMPK ist bei dieser Tumorart mit einer besseren Prognose und einem höheren Langzeitüberleben assoziiert (Li et al. 2015b; Carretero et al. 2007).

Beim kolorektalen Karzinom wird angenommen, dass eine unspezifische Aktivierung der AMPK mit Berberin, sowohl über die AMPK-abhängige Inhibition des mTOR als auch über eine AMPK-unabhängige Hemmung des nfkb, zu einer verminderten Tumorgenese und Proliferation führt (Li et al. 2015a).

Beim Prostatakarzinom führt eine Aktivierung der LKB1 und AMPK zu einem Wachstumsstopp. Eine Deaktivierung der AMPK führt wiederum zu einer verstärkten Malignität der Zellen (Zhou et al. 2009).

Im hepatozellulären Karzinom (HCC) wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung eine Korrelation zwischen einer geringen p-AMPK-Konzentration und einer schlechten Prognose sowie einem klinisch aggressiven Verlauf festgestellt. Eine Aktivierung der AMPK mit Metformin führte zu einer Verringerung des Tumorwachstums (Zheng et al. 2013). Der Differenzierungsgrad und die Tumorgröße korrelieren negativ mit der AMPK-Aktivität. Außerdem

ist die Aktivität im HCC umgebenden Lebergewebe signifikant höher als im HCC selbst (Cheng et al. 2014).

1.2.2 AMPK beim CC

Für das CC im Speziellen wurde der Einfluss der AMPK durch Aktivierung mit Metformin untersucht. Metformin gehört zur Gruppe der Biguanide und wird als Erstlinientherapie des Diabetes mellitus Typ 2 empfohlen. Hierbei entwickelt es seine Wirkung durch eine Erhöhung der Insulinsensitivität der Zellen. Es wird als weitestgehend sicher und effizient angesehen, auch wenn genauere Wirkmechanismen derzeit noch unbekannt sind (Pawlyk et al. 2014; Florez 2017). Bei der Aktivierung der AMPK durch Metformin konnte in vitro, an Zellen von durch Leberegel verursachtem CC, festgestellt werden, dass Metformin zu einer Reduktion der Proliferation von CC-Zellen, unabhängig vom Glukosespiegel, führt. In geringen Dosen verringerte Metformin auch die Invasions- und Migrationsrate der Zellen. Jedoch wurde außer einer Aktivierung der AMPK auch eine leicht erhöhte Expression des nfkb, bei gleich bleibendem Vorhandensein des STAT-3, festgestellt. Auffällig war ein vermehrter Shift des nfkb und STAT-3 aus dem Zellkern in das Zytoplasma, was einen Anhalt auf eine verringerte Transkription dieser gibt (Saengboonmee et al. 2017). Auch bei einer anderen Zelllinie eines intrahepatischen CC konnte unter Behandlung mit Metformin eine Verringerung der Proliferation sowie vermehrte Apoptose der Zellen festgestellt werden (Ling et al. 2014). Die Rolle von Metformin als präventiver Faktor des CC ist in manchen Studien beschrieben, eine Verbindung zu einer erhöhten Überlebensrate ist bislang nicht zu erkennen (Kaewpitoon et al. 2015). Für die Nahrungsbestandteile Capsaicin, Bromelain und Papain, welche unter anderem über eine unspezifische Aktivierung der AMPK wirken, ist bekannt, dass sie zu einer Verringerung von Proliferation, Migration und Invasion beim CC führen (Lee et al. 2014; Müller et al. 2016).

1.3 EMT-Marker

Die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet die Verwandlung von Zellen des Epithels in Zellen, welche Charakteristika des Mesenchyms zeigen. Es wird angenommen, dass sie bei der Metastasierung von Tumoren eine entscheidende Rolle spielt (Li und Li 2015).

1.3.1 E-Cadherin

E-Cadherin ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches in Tumoren häufig weniger vorhanden ist und deshalb in Verdacht steht, eine wichtige Rolle zur Metastasierungsfähigkeit von Tumoren beizutragen. Es gilt als epithelialer EMT-Marker. Beim CC wurde eine Beziehung zwischen geringer E-Cadherin-Expression und vorhandener Metastasierung beobachtet (Techasen et al. 2014).

1.3.2 N-Cadherin

N-Cadherin ist ein mesenchymaler EMT-Marker. Die Menge an N-Cadherin korrelierte negativ zur Menge an E-Cadherin in kolorektalen Karzinomen. Eine erhöhte N-Cadherin-Konzentration konnte in Verbindung mit einer erhöhten Metastasierungsrate und geringerem Langzeitüberleben gebracht werden (Yan et al. 2015; Wheelock et al. 2008).

1.4 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein Entzündungsmediator und sowohl bei Entzündungen als auch bei vielen Tumoren, unter anderem beim CC, in erhöhter Konzentration vorhanden. IL-6 aktiviert in der Zelle Mechanismen, die zu einer höheren Widerstandsfähigkeit und damit einem besseren Überleben der Zellen führen, was zu einer Förderung des Wachstums des CC führt (Braconi et al. 2010). IL-6 ist ein vorgeschalteter Aktivator des STAT-3, was eine wichtige Rolle bei Tumorentstehung und Tumorwachstum zur Folge hat (Zheng et al. 2014).

1.5 Signal Transducer und Aktivator der Transkription-3 (STAT-3)

Physiologisch hat der STAT-3 viele Funktionen, unter anderem nimmt es an der Entzündungsreaktion, der aeroben Glykolyse und an der Modulation des Immunsystems teil. Es ist jedoch auch bekannt, dass STAT-3 in vielen verschiedenen Tumoren aktiviert ist und die Tumorentstehung durch das Regulieren der

Expression verschiedener tumorfördernder Gene, wie antiapoptotischer Gene, fördert. Aktiviert wird der STAT-3 hauptsächlich von IL-6 und Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase, zum Beispiel den Janus-Kinasen, durch Phosphorylierung zur aktiven Form, dem p-STAT-3 (Wake und Watson 2015).

STAT-3 spielt beim CC die wichtigste Rolle der STAT-Proteine und ist wichtig bei der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum (Dokduang et al. 2014).

1.6 Nuklearer Faktor κ B (nfb)

Nfb ist ein Transkriptionsfaktor, der physiologisch an vielen verschiedenen Prozessen, wie Immunantwort, Zellwachstum, Zelltod und Entzündungsreaktionen, beteiligt ist. Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass der nfb in vielen Tumoren bei der Entstehung eine Rolle spielt. Nfb kann dabei verschiedene Charakteristika eines Tumors beeinflussen, nämlich die Unabhängigkeit der Zellvermehrung von Wachstumsfaktoren, fehlende Reaktion auf wachstumsbeschränkende Signale, Vermeiden von Apoptose, Aneignen der Fähigkeit uneingeschränkter Vermehrung, Gefäßneubildung, Invasion und Metastasenbildung (Baud und Karin 2009).

Beim HCC wurde beobachtet, dass eine, durch Metformin induzierte, Aktivierung der AMPK zu einer Inhibition des nfb führt. Dies wird durch eine erhöhte Aktivierung des I κ B α , einem wichtigen Inhibitor des nfb, vermittelt. Auch das IL-6, eine der wichtigsten vom nfb abhängigen Kinasen, und folglich auch der STAT-3 waren dementsprechend weniger aktiviert. Auch die Aktivierung der AMPK mit AICAR führte zu dieser Inhibition des nfb. Bei einer Herunterregulierung der AMPK mit siRNA zeigte sich sowohl ohne als auch mit Metformin ein erniedrigter I κ B α und ein demzufolge erhöhter nfb (Zheng et al. 2013).

Des Weiteren ist bekannt, dass eine Hochregulierung von N-Cadherin zu vermehrter Aktivität des nfb führt. Da Metformin über TWIST1 auch direkt N-Cadherin hemmt, scheint der nfb ebenfalls AMPK-unabhängig von Metformin gehemmt zu werden (Ge et al. 2015).

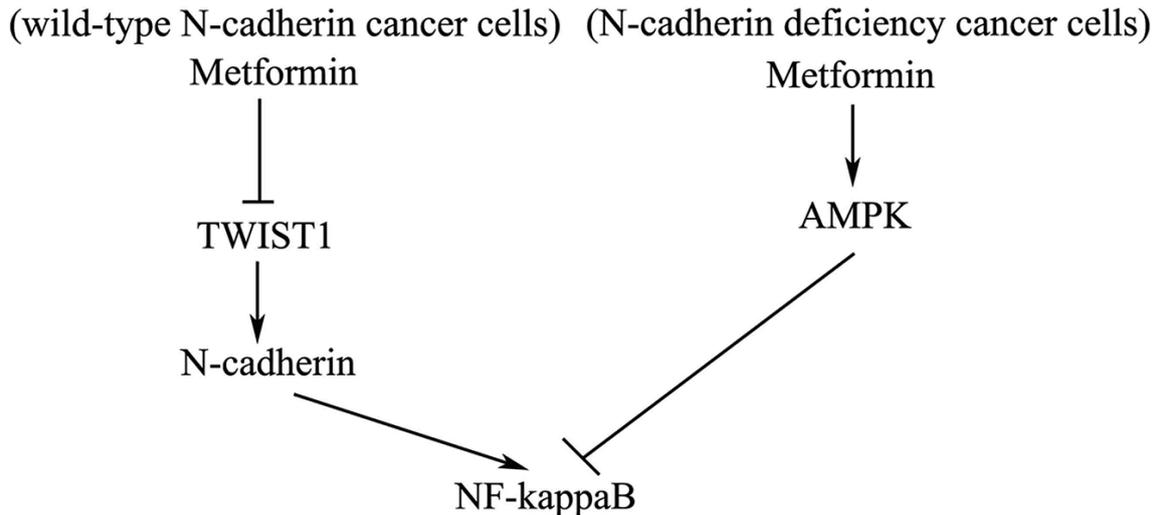


Abb.4: Schematische Darstellung des molekularen Mechanismus von Metformin-gesteuerter Antitumorwirkung auf N-Cadherin exprimierende Tumorzellen gegenüber Tumorzellen ohne N-Cadherin. In den N-Cadherin exprimierenden Tumorzellen führt Metformin durch eine Hemmung von TWIST1 zu einer geringeren Aktivierung von N-Cadherin und damit auch zu einer geringeren Aktivität des nfkb. In den Tumorzellen ohne N-Cadherin führt eine direkte Aktivierung der AMPK durch Metformin zu einer geringeren Aktivität des nfkb (aus: Ge et al. 2015).

1.7 Ziel des Projekts

Das CC ist ein maligner Tumor des hepatobiliären Systems, dessen Ursprung die Gallengangszellen sind. Die Inzidenz des CC nimmt weltweit zu. AMPK ist ein Enzym, welches eine wichtige Rolle für den Energiestoffwechsel der Zelle spielt. Es ist bekannt, dass die AMPK das Wachstum von Tumorzellen bei Krebsarten verringert. Auch das CC zeigt bei einer unspezifischen Aktivierung der AMPK mit Metformin ein verringertes Tumorstadium. Ziel dieses Projekts ist es, herauszufinden, welche Rolle eine verminderte Aktivierung der AMPK beim CC hinsichtlich der Tumorstadium spielt. Des Weiteren sollen Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung der katalytischen Untereinheiten der AMPK gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 TFK1-Zelllinie

Die TFK1-Zelllinie entstammt menschlichen Zellen eines extrahepatischen Gallengangkarzinoms. Die Zellen stammen von einem 63-jährigen Japaner, histologisch als teilweise papilläres Adenokarzinom und teilweise differenziertes tubuläres Adenokarzinom klassifiziert. Die mittlere Verdopplungszeit der Population beträgt 37h (Saijyo et al. 1995).

Benutzt wurden käuflich erworbene TFK1-Zellen, vertrieben vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D, Nr. ACC 344.

2.1.2 siRNA

AMPK α 1: Hs_PRKAA1_6	Qiagen, Hilden, USA
AMPK α 2: Hs_PRKAA2_6	Qiagen, Hilden, USA
Control siRNA-A:sc-37007	Santa Cruz, Dallas, USA
siLentFect™ Lipid Reagent for RNAi	Bio-RAD, München, D

2.1.3 Verbrauchsgegenstände

10cm Platte	Sarstedt, Nürnberg, D
15ml Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
50ml Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
6cm Platte	Greiner Bio.One, Frickenhausen, D
6-well BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber	BD Biosciences, Bedford, UK
6-Well-Platte	Sarstedt, Nürnberg, D
96-Well-Platte	Sarstedt, Nürnberg, D
BD Falcon TC Companion Plate	BD Biosciences, Bedford, UK
Deckel	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Eppendorf Gefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D

Hyperfilm™ ECL	Amersham Bioscience, Braunschweig, D
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Pipettenspitzen mit Filter 10µl	Sarstedt, Nürnberg, D
Pipettenspitzen mit Filter 1000µl	Greiner, Solingen, D
Pipettenspitzen mit Filter 20µl	Sarstedt, Nürnberg, D
Pipettenspitzen mit Filter 200µl	Sarstedt, Nürnberg, D
Qiagen RNeasy protect Mini Kit	Qiagen, Hilden, USA
QuantiFast SYBR Green	Qiagen, Hilden, USA
RevertAid™ H Minus cDNA Synthesis Kit	LifeTechnologies, Carlsbad, USA
Röhrchen zum Einfrieren	Sarstedt, Nürnberg, D
Stericup®	Merck, Darmstadt, D
Transfer Membran	Perkin Elmer, Rodgau, D
Whatman Papier	Omilab, Bremen, D

2.1.4 Geräte

ABI PRISM™ 7000	Thermo Fisher, Freiburg, D
Agarose Gelelektrophorese System	Bio-RAD, München, D
Clean Bench	Hera Safe, Kendro, Osterode, D
Fluoreszenzmikroskop	Bio-RAD, München, D
Gelkammern für Western Blot	Bio-RAD, München, D
Heizgerät	Heraeus, Instruments GmbH, Osterode, D
Inkubator	Heidolph, Kelheim, D
Leica DMI 6000 B Mikroskop	Leica, Wetzlar, D
Magnet-Rührer	Bio-RAD, München, D
Megafuge 1.0	Hettich, Tuttlingen, D
Micro-plate Reader Multiskan Plus	Titertek-Berthold, Pforzheim, D
Mikrotiterplatte Luminometer	Bauknecht, Stuttgart, D
Mikrowelle	Bio-RAD, München, D
Mirco Pulser™	Tecan Deutschland GmbH, Crails-

Mixer 5432	heim, D
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg, D
Nanodrop 3300	InoLab, Weilheim, D
pH-Meter	Thermo Fisher, Waltham, USA
Photometer	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetman	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	Bio-RAD, München, D
Sonifiziergerät UP 200H	Hirschmann, Eberstadt, D
Stromversorgung	Bio-RAD, München, D
ThermosStat plus	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Vortex-Genie	Eppendorf, Hamburg, D
Wasserbad	Janke&Kunkel, Staufen, D
Zentrifuge "L8-55M"	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge "Rotina 38R"	Beckman GmbH, Düsseldorf, D
Zentrifuge 5415 D	Roth, Karlsruhe, D
Zentrifuge Mikro 220 R cooled	Heraeus, Osterode, D

2.1.5 Chemikalien

ABC Peroxidase Kits	Vector, Eching, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Acrylamid-Lösung (30%) Mi 37,5:1	AppliChem, Darmstadt, D
Agar	Bioline, Luckenwalde, D
Agarose	Bioline, Luckenwalde, D
Ammoniumacetat	AppliChem, Darmstadt, D
Ammoniumsulfat	AppliChem, Darmstadt, D
Antigen Demaskierungslösung	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Borax 1%	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, D
Bovines Serum Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Bromophenol blau	AppliChem, Darmstadt, D
Cäsiumchlorid 99%	AppliChem, Darmstadt, D

cOmplete™	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
DAB Substrat Kit	Vector, Eching, D
Deoxycholat	AppliChem, Darmstadt, D
DEPC	AppliChem, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, D
dNTP	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher, Freiburg, D
EDTA	AppliChem, Darmstadt, D
EGTA	AppliChem, Darmstadt, D
Essigsäure	Baker, Griesheim, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, D
FCS	Biochrom, Berlin, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, D
Fettfreies getrocknetes Milchpulver	AppliChem, Darmstadt, D
Formaldehydlösung min 37% säurefrei	Merck, Darmstadt, D
Gelatine	Sigma-Aldrich, Darmstadt, D
Glukose	AppliChem, Darmstadt, D
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, D
Glycin	AppliChem, Darmstadt, D
Guanid-thiocyanat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
H ₂ O ₂ 30%	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Hot start DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden, USA
Imidazol	AppliChem, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, D
Kalziumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D

Kanamycinsulfat	AppliChem, Darmstadt, D
Laurosylarcosin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Luminol min 97%, HPLC	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D
Methanol	AppliChem, Darmstadt, D
Mounting Medium	Vector, Eching, D
MTT-assay WST-1	Roche, Mannheim, D
Natrium	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumfluorid	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumkarbonat	AppliChem, Darmstadt, D
Natriumpyrophosphat	AppliChem, Darmstadt, D
Nonidet P-40	AppliChem, Darmstadt, D
p-Cumarinsäure	Merck, Darmstadt, D
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, D
PfuTurbo DNA-Polymerase	Thermo Fisher, Freiburg, D
Phenol	AppliChem, Darmstadt, D
PhoSTOP™	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Ponceau S Lösung	Roth, Karlsruhe, D
Propidiumiodid	Invitrogen, Karlsruhe, D
Protein Leiter	Fermentas, Waltham, USA
Proteinase K	Fluka, Steinheim, D
Restriktionsenzyme	AppliChem, Darmstadt, D
RPMI 1640+Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, D
SDS	NEB, Fermentas, Waltham, USA
TEMED	Becton-Dickinson, Heidelberg, D
Thermo Pol Buffer	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Thymidin 99-100%	AppliChem, Darmstadt, D
Toluidinblau 1%	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris	Biolabs, Frankfurt, D

Triton X 100	AppliChem, Darmstadt, D
Trypsin/EDTA-Lösung	AppliChem, Darmstadt, D
Trypton	Biochrom, Berlin, D
Tunicamycin	AppliChem, Darmstadt, D
Tween-20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, D
Urea	AppliChem, Darmstadt, D
Vectastain Elite	AppliChem, Darmstadt, D
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt, D
β-Glycerophosphat	AppliChem, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, D

2.1.6 Puffer und Lösungen

2.1.6.1 Puffer und Lösungen für Proteinextraktion und Western Blot

RIPA-Buffer:

Tris pH 8,0	50mM
NaCl	80mM
NaF	50mM
NA ₄ P ₂ O ₇	20mM
EDTA	1mM
EGTA	1mM
NP-40	1%
DOC	1%
SDS	0,1%

Lysis Buffer: 10 ml RIPA Buffer+ 1 Tablette PhoStopTM+ 1 Tablette cOmpleteTM

Seperating Gel:

%Acrylamid	10%
Acrylamid	4,1ml
Tris pH 8,0	2,5ml

ddH ₂ O	4,1
10% SDS	100µl
TEMED	10µl
10% APS	105µl

Stacking Gel:

Acrylamid	1,13ml
Tris pH 6,8	1,75ml
ddH ₂ O	3,2ml
10% SDS	70µl
TEMED	7µl
10% APS	70µl

SDS running buffer (10x):

Tris pH 8,3	250mM
SDS	1%
Glycin	1,92M

Western Transfer buffer (10x):

Tris	250mM
Glycin	1,92M

TBST Western Blot Washing Buffer (10x):

Für 1l

Tris	24g
NaCl	88g
ddH ₂ O	900ml
HCl bis pH7,6	

Tween-20 0,1%

Blocking-Lösung (5%BSA/TBST): 4mg Albumin Fraktion V + 80ml 1xTBST

ECL-Lösungen:

Lösung 1:

Luminol 250mM

p-Cumarinsäure 0,4mM

Tris pH 8,5 0,1M

Lösung 2:

Tris pH 8,5 0,1M

30% H₂O₂ 0,061%

2.1.6.2 Lösungen für die Immunhistochemie

Blocking Lösung: in PBS 5% Pferdeserum und 0,3% Trinton X-100

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Antikörper für Western Blot und Immunhistochemie

Erste Antikörper:

AMPK α (D5A2) Rabbit mAb #5831 Cell Signaling, Cambridge, USA

Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) Rabbit mAb #2535 Cell Signaling, Cambridge, USA

Phospho STAT3 (Tyr 705) Rabbit mAb #9131 Cell Signaling, Cambridge, USA

STAT3 #9132 Cell Signaling, Cambridge, USA

E-Cadherin (24E10) Rabbit mAb #3195 Cell Signaling, Cambridge, USA

Anti-N-cadherin Antibody, CT clone Merck Millipore, Darmstadt, D

EPR1792Y rabbit monoclonal #04-1126

Anti-NF-kB p65 antibody #ab16502 Abcam, Cambridge, UK

Anti beta-actin antibody loading control #ab8229 Abcam, Cambridge, UK

Zweite Antikörper:

Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey) GE Healthcare Lifesciences, Freiburg, D

Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab (from sheep) GE Healthcare Lifesciences, Freiburg, D

Für den Western Blot wurden die Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000, für die Immunhistochemie mit einer Verdünnung von 1:100 verwendet.

2.1.7.2 Primer und PCR Programm

Hu-AMPKa1-F	CGGCAAAGTGAAGGTTGGCAA	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Hu-AMPKa1-R	CAAATAGCTCTCCTCCTGAGAC	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
Hu-AMPKa2-F	ATGGGAGGGTGCCACAAAGAAG	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
Hu-AMPKa2-R	ACGGGTTGAAGAGATGGAAGCCAG	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
IL-6-F	GTAGCCGCCCCACACAGA	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
IL-6-R	CATGTCTCCTTTCTCAGGGCTG	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
18s RNA-F	AAACGGCTACCACATCCAAG	Sigma-Aldrich St.Louis, USA
18s RNA-R	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	Sigma-Aldrich St.Louis, USA

PCR-Programm:

50°C → 2 Minuten

95°C → 10 Minuten

95°C → 15 Sekunden (40mal)

60°C→1 Minute

4°C→Lagerung

2.1.8 Software

Microsoft Excel 2007	Microsoft Inc, Redmond, USA
Microsoft Word 2013	Microsoft Inc, Redmond, USA
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Adobe Photoshop CS2	Adobe System, San José, USA
ImageJ 1.51f	Wayne Rasband, NIH, Bethesda, USA
Citavi 5	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.2 Arbeiten mit der Zellkultur

2.2.2.1 Zelllinie und Medium

TFK1-Zellen (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D, Nr. ACC 344) wurden mit RPMI-Medium 1640+Glutamax versetzt und mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt und die Zellen bei Bedarf in eine neue Platte überführt. Alle Arbeiten fanden unter einer Abzugshaube mit laminarem Luftfluss und bei reinen Bedingungen statt. Die Werkbank wurde vor und nach Gebrauch mit 70% Ethanol gesäubert. Alle verwendeten Pipetten und Platten waren bis zum Gebrauch steril verpackt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ verwahrt, das Medium vor Gebrauch im Wasserbad auf ca. 37°C erwärmt.

2.2.2.2 Zell-Splitting

Die Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf Menge und Aussehen bzw. eventuelle Kontamination untersucht. Bedeckten die Zellen mehr als 75% der Oberfläche des Bodens, wurden sie auf eine neue Platte überführt. Hierzu wurde nach Entfernung des Mediums mit DPBS gewaschen und dann 1ml Trypsin zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 2 Minuten

bei 37°C lösten sich die Zellen vom Boden. Dieser Milliliter wurde nun mit 9ml Medium in einem Röhrchen gemischt und anschließend für 5 Minuten zentrifugiert. Das Trypsin-Medium-Gemisch wurde entfernt und 10ml Medium hinzugegeben. Nun wurden die Zellen gut gemischt und ca. 10 μ l auf eine Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden nun 4 große Quadrate gezählt, anschließend durch 4 dividiert und mit 10⁴ multipliziert um die Anzahl der Zellen pro Milliliter Medium im Röhrchen zu bestimmen. Jetzt wurden ca. 1x10⁶ Zellen in 10ml Medium auf eine neue 10cm² Platte überführt. Das Zählen der Zellen und das Überführen in eine 6-Well- oder 96-Well-Platte wurden immer nach diesem Schema durchgeführt.

Um die Zelllinie für längere Zeit aufzubewahren, wurde sie bei min. -80°C eingefroren. Hierzu wurde FCS mit 10% DMSO benutzt. Das DMSO ist kälteprotektiv für die Zellen, verhindert deren Zerstörung, senkt den Gefrierpunkt und sorgt für ein langsames Einfrieren. Nach der Trypsingabe und 5 Minuten bei ca. 800 Umdrehungen/Minute wurden 1x10⁶ Zellen/1ml FCS/DMSO-Gemisch in speziell zum Einfrieren von Zellen hergestellte Röhrchen gegeben.

Vor der Wiederverwendung mussten die Zellen aufgetaut werden. Hierzu wurde ein Röhrchen aus dem -80°C kalten Gefrierschrank direkt in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Nachdem die Zellen aufgetaut waren, wurden sie in eine 10 cm² Platte, gemeinsam mit 9ml vorgewärmtem Medium, gegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium ausgetauscht um das DMSO zu entfernen.

2.2.2.3 siRNA

Die Technik der siRNA (small interfering RNA) beruht auf einer Verringerung der Reproduktion des spezifischen Proteins. Hierzu wurden die siRNA AMPK α 1: Hs_PRKAA1_6 und AMPK α 2: Hs_PRKAA2_6 von Qiagen, Hilden, USA verwendet. Es wurden je 200 000 Zellen in 2ml 10%FCS-haltigem RPMI-Medium in jedes Well einer 6-Well-Platte gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1,25ml Medium versetzt. Zum selben Zeitpunkt wurde in 4 Röhrchen die siRNA mit der Konzentration von 80nMol vorbereitet. Hierzu wurde Medium frei von FCS und Antibiotika verwendet. Des Weiteren wurde die siRNA mit dem LipidReagent versetzt. Es wurden 20 μ l Lipid

Reagent mit 500µl reinem Medium versetzt und gemischt. 6µl der jeweiligen siRNA wurden mit 125µl reinem Medium gemischt. Anschließend wurden 125µl des LipidReagent-Medium-Gemisches in jedes der 4 anderen Röhren gegeben. Die hierbei entstandenen 4 verschiedenen Gruppen sind die Kontrollgruppe C ohne siRNA, die Gruppe a1 mit siRNA gegen AMPK α 1, die Gruppe a2 mit siRNA gegen AMPK α 2 und die Gruppe a1+2 mit siRNA sowohl gegen AMPK α 1 als auch gegen AMPK α 2. Nach gutem Vermischen und einer Wartezeit von 20 Minuten wurde je ein Well mit je einer verschiedenen siRNA versetzt, sodass sich nun 1,5ml Flüssigkeit in jedem Well befanden. Nach 24 h wurde das Medium mit der siRNA entfernt und jedes Well mit 2ml 10% FCS-haltigem Medium befüllt. Je nach Versuch wurden nun die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt nach diesem Zeitpunkt 0 ausgewertet.

2.2.3 Western Blot

Mittels Western Blot können bestimmte Proteine aus einer Zellyse heraus bestimmt werden. Die Proteine werden zuerst mit einer Gelelektrophorese, abhängig von ihrem Molekulargewicht, auf eine Membran übertragen. Durch das Verwenden spezifischer Antikörper kann das jeweilige Protein auf der Membran dargestellt werden. Durch Verwendung eines zweiten Antikörpers wird Luminol umgesetzt, wodurch dessen Lumineszenz auf einem Film abgebildet werden kann. Je nach Menge des Proteins erscheint die Stärke der Bande relativ zu den danebenliegenden Banden größer.

2.2.3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit der siRNA behandelt. 48h nach Zeitpunkt 0 wurde die Extraktion der Proteine durchgeführt. Hierzu wurde der flüssige Überstand entfernt, die Zellen zweimal mit eiskaltem DPBS gewaschen, anschließend mit 200µl Lysis Buffer versetzt, mittels Zell-Kratzer vom Boden gelöst und in ein Eppendorf Gefäß gegeben. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten bei Lagerung auf Eis wurde die Lyse für je 10 Sekunden bei 40 Watt sonifiziert, um die Zellwände zu zerstören. Anschließend wurde die Lyse für 30 Minuten bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun konnte der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß gefüllt werden.

2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde gemäß der Herstellerinformation von Bio Rad durchgeführt. Um die Standardkurve anzupassen wurde eine Verdünnung der Lyse mit Lysis Buffer von 1:1 durchgeführt. Die Methode basiert auf einer Farbänderung je nach Menge der vorhandenen Proteine, welche mit dem Micro-plate Reader photometrisch bei einer Referenz-Wellenlänge von 650nm gemessen wird. Die drei gemessenen Werte wurden gemittelt, dieser Wert wurde für die Angleichung der Proteinkonzentration in den verschiedenen Proben verwendet. Die Menge des zu verwendenden Proteinlysats wird anhand einer Standardkurve wie folgt berechnet: $=2 \cdot (6,1813 \cdot \text{Mittelwert} - 1,0202)$. Dieser berechnete Proteinlysateanteil wurde mit Lysis Buffer auf 150µl aufgefüllt und mit 50µl Loading dye versetzt. Dieses Gemisch wurde zum Beladen des Gels benutzt.

2.2.3.3 Blotting

Das Separating Gel wurde zwischen zwei Glasscheiben gegossen und mit 100% Ethanol abgedeckt. Nach ca. 30 Minuten wurde das Ethanol entfernt und das Stacking Gel auf das Separating Gel gegossen. Nach erneuten ca. 30 Minuten konnte mit dem Beladen des Gels begonnen werden. Hierfür wurden die Proben zuerst 5 Minuten bei 95°C erhitzt, anschließend zentrifugiert und dann in das Gel pipettiert. Eine Proteinleiter wurde zur Bestimmung der Größe der später abgebildeten Proteine in ein zusätzliches Well dazugegeben. Die Gele wurden in eine mit 1xSDS Running Buffer befüllte Kammer zur Elektrophorese gestellt. Die Elektrophorese wurde bei 80V bis zum Ende des Stacking Gels und anschließend bei 120V durchgeführt.

2.2.3.4 Proteintransfer auf eine PVDF Membran

Die PVDF Membran wurde für wenige Sekunden mit 100% Methanol benetzt. Anschließend wurde sie in 1x Transfer Buffer gegeben. Folgende Konstruktion wurde zum Transfer eingesetzt: Plastikhalter, mit 1x Transfer Buffer vollgesogener Schwamm, Whatman Filterpapier, Gel, PVDF Membran, Whatman Filterpapier, Schwamm, Plastikhalter. Bei 4°C, 90V, 0,35A und 30W für 1 Stunde wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen. Die Transfer

Box war hierbei mit 1x Transfer Buffer gefüllt. Anschließend wurde die Membran für 3x 10 Minuten mit 1xTBST gewaschen und für 1 Stunde in 5% BSA/TBST Blocking-Lösung gegeben. Anschließend wurde die Membran erneut mit 1xTBST für 3x 10 Minuten gewaschen.

2.2.3.5 Antikörper und Entwicklung

Die spezifischen Antikörper wurden über Nacht bei 4°C zur Inkubation auf die Membran gegeben. Hierbei wurde 1µl des jeweiligen Antikörpers mit 10ml 1xTBST verdünnt. Am folgenden Tag wurde die Membran erneut 3x 10 Minuten mit 1xTBST gewaschen, dann mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur versetzt und anschließend erneut gewaschen. Zur Kontrolle der Proteinmenge wurde β-Actin eingesetzt. Die Membran wurde nun Amersham Hyperfilm ECL ausgesetzt, die ECL Membran im Dunkeln mit einem Film belegt und der Film nach einer Expositionszeit von 3-15 Minuten entwickelt.

2.2.3.6 Auswertung mit ImageJ

Die entwickelten Filme wurden am PC gescannt. Mithilfe von ImageJ wurde die Farbintensität der jeweiligen Bande gemessen und die Farbintensität des Hintergrunds herausgerechnet. Dies wurde an drei verschiedenen Filmen durchgeführt. Die Farbintensität der jeweiligen Kontrollgruppe C entspricht 100%. Die β-Actin-Intensität sollte in allen vier Gruppen identisch sein, da die gleiche Menge an Protein verwendet wurde. Um etwaige Schwankungen auszugleichen, wurde die Intensität der zu untersuchenden Bande durch die Intensität der korrespondierenden β-Actin-Bande geteilt. So entstand die korrigierte, vergleichsfähige Expression der jeweilig getesteten Proteine.

$$\text{Intensität} = \frac{\left(\frac{(\text{Farbintensität des Hintergrunds} - \text{Farbintensität der Bande der Gruppe } x)}{(\text{Farbintensität des Hintergrunds} - \text{Farbintensität der Bande der Kontrollgruppe C})} \right)}{\left(\frac{(\text{Farbintensität des Hintergrunds} - \text{Farbintensität der Bande der Kontrollgruppe C}) * 100}{\text{Ergebnis der jeweiligen } \beta\text{-Actin Bande}} \right)}$$

2.2.4 Proliferations-Assay (wst-1 (wasserlösliches Tetrazolium) –Assay)

Die Anzahl der lebenden Zellen kann mit Hilfe des wst-1 Assays per Photometer bestimmt werden, da lebende Zellen mit intakter mitochondrialer Dehydrogenase das rote wst-1 enzymatisch in orangenes Formazan spalten.

In eine 96-Well-Platte wurden 1000 Zellen pro 200µl pro Well gegeben. Nach der oben beschriebenen Behandlung mit 80nM siRNA (hier wurden die zugefügten Mengen auf die verringerte Menge an Medium in der 96-Well-Platte angepasst) wurde die Platte für 48 bzw. 96 Stunden in den Inkubator gestellt. Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden in jedes Well 90µl Medium gemischt mit 10µl wst-1 gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Proben mit einem Micro-Plate Reader, bei einer Wellenlänge von 492nm und einer Referenzwellenlänge von 650nm, analysiert. Außerdem wurde die Vermehrung der Zellen täglich lichtmikroskopisch überwacht. Zur Auswertung der Proliferation der verschiedenen Testgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde das Wachstum der Kontrollgruppe gleich 100% gesetzt.

$$\text{Proliferationsindex} = \frac{\text{Absorbtion der Gruppe x zum Zeitpunkt y}}{\text{durchschnittliche Absorbtion der Kontrollgruppe C zum Zeitpunkt y}} \times 100$$

2.2.5 Migrations-Assay

Die Migration wurde mit dem Wundheilungstest untersucht. Hierbei wurden in eine 6-Well-Platte je 200 000 Zellen pro Well gefüllt. Nach der oben beschriebenen Behandlung mit 80nM siRNA wurde zum Zeitpunkt 0 mit einer 200µl Pipetten Spitze ein Wundkrater durch die Zellen gezogen. Mit einem Lichtmikroskop wurde die Wunde an 3 verschiedenen markierten Stellen fotografiert. Nach 24h und 48h wurden erneut mit dem Lichtmikroskop die gleichen Stellen fotografiert. Mit Hilfe von Image J wurde die Fläche zwischen den beiden Wundrändern zur Auswertung gemessen. Um den Migrationsindex zu bestimmen, wurde die Migrationsrate der Probe ins Verhältnis zur Größe der Ursprungswunde an dieser Stelle gesetzt. Die Fläche der Wunde zum Zeitpunkt 0h am jeweiligen Ort beschreibt die Referenzgröße und ist somit gleich 0%.

$$\text{Migrationsindex} = \frac{(\text{Wundfläche zum Zeitpunkt 0h} - \text{Wundfläche zum Zeitpunkt x})}{\text{Wundfläche zum Zeitpunkt 0h}} \times 100.$$

2.2.6 Invasions-Assay

Die Invasion wurde mit der BD Matrigel Invasion Chamber BioCoat (BD Biosciences, Bedford, UK) durchgeführt. Die Membran der Kammer hat 8µm große Poren, die mit einer dünnen Matrix bedeckt sind. Im Inneren der Kammer befand sich 2% FCS-haltiges Medium, außerhalb, also unter der Matrix, 20%

FCS-haltiges Medium. Dadurch können nur invasionsfähige Zellen, die durch das nährstoffreichere Medium angezogen werden, in die Membran eindringen.

Die Kammern wurden aus tiefgefrorenem Zustand bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend, mit FCS-freiem Medium befüllt, für 2 Stunden in den Inkubator gestellt. 500 000 Zellen in 1,25ml 2% FCS-haltigem Medium, mit 80nM siRNA versetzt, wurden in die Kammer gefüllt. Unter die Membran wurden 2,5ml 20%FCS-haltige Lösung gegeben. Nach 24h wurde sowohl das Medium oberhalb als auch unterhalb der Membran vorsichtig ausgetauscht, um schädliche Effekte der siRNA zu vermeiden. In die Kammer wurden nun 2ml 2% FCS-haltiges Medium, unter die Kammer 2,5ml 20% FCS-haltiges Medium gegeben. Nach 48h wurde das Medium entfernt und die oberflächlichen Zellen vorsichtig mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Zellen, die Invasion in die Membran begangen hatten, wurden mit 100% Methanol fixiert und anschließend mit 1% Toluidinblau gefärbt. Nach sorgfältigem Waschen mit autoklaviertem Wasser und Trocknenlassen der Membran wurde diese auf einem Objektträger befestigt. Unter dem Mikroskop wurden nun die invadierten Zellen gezählt. Der Invasionsindex bezieht sich auf die Kontrollgruppe, deren durchschnittliche Anzahl an invadierten Zellen 100% entspricht.

$$\text{Invasionsindex} = \frac{\text{Anzahl der invadierten Zellen}}{\text{durchschnittliche Anzahl der invadierten Zellen der Kontrollgruppe C}} \times 100.$$

2.2.7 qtRT-PCR

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit siRNA behandelt. Nach 48h wurden die Zellen mit kaltem DPBS gewaschen und anschließend für 2 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die übrig gebliebenen Zellen auf Eis gelagert.

Zuerst wurde die RNA extrahiert, dazu wurde das Qiagen RNeasy protect Mini Kit benutzt. Hierzu wurden nun 350µl RLT-Buffer, welcher zuvor mit 3,5µl Mercaptoethanol vermischt wurde, zu jeder Zellyse hinzugegeben und für zwei Minuten bei 7900U/min zentrifugiert. Das homogenisierte Lysat wurde nun vermischt mit 350µl 70% Ethanol in eine, sich in einem 2ml Eppendorf Gefäß befindliche, RNeasy spin column, welche sich unter dem eingeschalteten Abzug

befand, gegeben. Nach erneuter Zentrifugation für eine Minute bei 7900U/min wurde das Filtrat verworfen und zu jeder RNeasy spin column 700µl RW1-Buffer gegeben und erneut für eine Minute bei 7900U/min zentrifugiert. Anschließend wurde dieselbe Prozedur zweimal mit 500µl RPE-Buffer durchgeführt. Als nächstes wurden die RNeasy spin columns in ein neues 1,5ml Eppendorf Gefäß gestellt. Hier wurden nun 50µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran gegeben. Die Gefäße wurden erneut für eine Minute bei 7900U/min zentrifugiert. Im 1,5ml Eppendorf Gefäß hatte sich nun die RNA gesammelt, deren Konzentration im Folgenden bestimmt wurde.

Die Konzentrationsbestimmung der gesammelten RNA wurde mit einem Nanodrop Spektrometer durchgeführt, hierzu wurde 1µl der gesammelten, filtrierten RNA mit 99µl autoklaviertem Wasser verdünnt und die Extinktion in µg/ml bestimmt.

Als nächstes folgte die cDNA-Synthese, welche mit dem RevertAid™ H Minus cDNA Synthesis Kit (lifeTechnologies, Carlsbad, USA) durchgeführt wurde. Hierzu wurden je Probe 1µg RNA mit autoklaviertem Wasser auf 12µl verdünnt. Nach 5-minütigem Erhitzen bei 70°C wurden auf Eis 4µl 5x Reaction Buffer, 1µl Ribolock Ribonuklease Inhibitor und 2µl des 10mM dNTP Mixes hinzugegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde noch 1µl RevertAid™ Reverse Transkriptase hinzugegeben. Das Gemisch wurde nun für eine Stunde auf 42°C erwärmt und dann die Reaktion durch eine 10-minütige Erhitzung auf 70°C gestoppt. Anschließend wurden die Proben wieder auf Eis gelagert.

Die DNA-Amplifikation wurde mit QuantiFast SYBR Green durchgeführt. Hierzu wurden für jede Probe 2µl cDNA mit 10µl SYBR Green, 3µl des spezifischen sense-Primers, 3µl des entsprechenden antisense-Primers und 2µl autoklaviertes Wasser in ein Well, einer 96-Well PCR-Platte pipettiert. Eine Negativkontrolle wurde mittels cDNA-freien Wells, eine interne Kontrolle mittels 18S Ribosomen RNA durchgeführt. An der qRT-PCR Maschine ABI PRISM™ 7000 (Thermo Fisher, Freiburg, D) wurde folgendes Programm eingestellt:

50°C→2 Minuten

95°C→10 Minuten

95°C→15 Sekunden (40mal)

60°C→1 Minute

4°C→Lagerung

Die festgestellten Ergebnisse wurden anschließend mit einer Gelelektrophorese validiert. Für das 2% Agarosegel wurden 10g Agarose unter Erhitzen in 500ml 1xTBE aufgelöst. 15µl Ehtidiumbromid wurden nach Erkalten hinzugegeben und das entstandene Gel in die Elektrophorese-Kammer gegossen. Die Proben wurden mit 6µl Agarosebuffer versetzt. Eine DNA-Leiter wurde als Marker genutzt. Die Elektrophorese wurde mit 120V durchgeführt, die Banden dann unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Zur Auswertung wurden die jeweiligen Ct-Werte erhoben und eine relative Quantifizierung mit Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode durchgeführt. Der Ct-Wert des zu bestimmenden Gens wurde dazu zuerst vom Ct-Wert der internen Kontrolle, der 18S-RNA, abgezogen. Anschließend wurde der Ct-Wert der Kontrollgruppe (C) vom Ct-Wert der jeweiligem Gruppe (a1, a2 oder a1+2) abgezogen. Das daraus erhaltene $\Delta\Delta\text{Ct}$ wurde in die Gleichung $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt und somit konnte die Expression des Gens in der untersuchten Gruppe im Verhältnis zur Expression in der jeweiligen Kontrollgruppe berechnet werden.

2.2.8 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie können bestimmte Antigene in Gewebe sichtbar gemacht werden. Bei der indirekten Methode bindet der spezifische erste Antikörper an das gezielte Antigen, dadurch kann ein zweiter Antikörper an den ersten binden. Sichtbar werden die gebundenen Antikörper durch die Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Hierbei verbindet Avidin Biotin mit den gepaarten zweiten Antikörpern, sodass das farblose 3'3'Diaminobenzidin durch das Binden an den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex aktiviert wird und das Antigen als braun gefärbt erscheint.

Die zu untersuchenden Gewebeproben wurden in 4% Formalin über Nacht fixiert, in PBS gelagert und in Paraffin eingebettet. Vor Beginn des Experiments wurden die Gewebe eine Nacht bei 55°C hybridisiert. Zurückbleibendes Paraffin konnte mit der Inkubation von Xylen beseitigt werden. Danach wurden die Gewebe rehydriert, indem Alkohol in abgestuften Konzentrationen (100%, 95%, 5%, 40% Ethanol) verwendet wurde und dreimal für je 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Durch die Fixierung der Gewebe mit Formalin bilden manche Proteine Verbindungen, durch welche sie nicht auffindbar sind. Um dies zu verhindern, wurden die Gewebe in einen Dampfkochtopf, gefüllt mit Antigen-Demaskierungs-Lösung und autoklaviertem Wasser im Verhältnis 1:100, zum Kochen gebracht. Nach Abkühlen und erneutem dreimaligen Waschen wurden die Proben für 10 Minuten in 1% Hydrogenperoxid-haltiges Wasser gelegt. Nun wurden die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln in 100µl Blocking-Lösung gelegt und mit Paraffin abgedeckt. Danach wurde der erste Antikörper, 100µl AMPK, in 10ml Blocking-Lösung gegeben und die Proben darin über Nacht im Kühlraum bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgte auf dreimaliges Waschen die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, 100µl Rabbit-Antikörper, in Blocking-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut dreimal gewaschen und 100µl Avidin-Biotin-Komplex-Reagenz in Blocking-Lösung für eine Stunde hinzugegeben. Anschließend erfolgte erneutes Waschen und Zugabe von 300µl vorbereitetem Vektor DAB Substrat zu den Proben. Es wurde nun ca. 3 Minuten gewartet, bis eine Braunfärbung sichtbar wurde, und die Proben dann sofort mit destilliertem Wasser gereinigt, um die Reaktion zu stoppen. Zuletzt wurden die Proben wieder dehydriert, indem ansteigende Konzentrationen von Alkohol hinzugegeben wurden, und für 5 Minuten in Xylen eingetaucht.

Im vorliegenden Versuch wurde die immunhistochemische Färbung an fünf murinen Gewebeproben durchgeführt. Diese Gewebeproben stammen von im Labor vermehrten Mäusen, welche durch eine Aktivierung des *Kras*^{G12D}, eine Mutation von Albumin-Cre und eine Deletion des p53 Gens ein intrahepatisches CC entwickeln. Dies ist auch eine sehr häufige Mutation beim CC des Menschen (O'Dell et al. 2012). Die genmutierten Mäuse wurden bei JAX, Bar Har-

bor, Maine, USA erworben. Das etablierte Mausmodell heißt AlbCre/LSL KRAS^{G12D}/p53^{L/L} Model. Die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte anhand von histologischer Beurteilung des abgebildeten Gewebes und entsprechender Entscheidung, ob im tumorverdächtigen oder im tumorumgebenden Gewebe der Anteil der positiven AMPK-Färbung erhöht war.

Der Ethikantrag mit der Nummer M15/14 wurde genehmigt.

.

3. Ergebnisse

3.1 Immunhistochemischer Nachweis der AMPK im CC

Mittels Immunhistochemie wurde AMPK in murinem CC Gewebe bei n=5 Mäusen angefärbt. Hierfür wurden Tumorproben des etablierten Mausmodells (AlbCre/LSL KRAS^{G12D}/p53^{L/L} Model von JAX, Bar Harbor, Maine, USA) eingesetzt. In den lichtmikroskopischen Bildern ist sowohl intrahepatisches CC Gewebe als auch benachbartes gesundes Lebergewebe zu sehen.

Bei der AMPK Färbung zeigte sich eine geringere Expression in den Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe (Abb. 5).

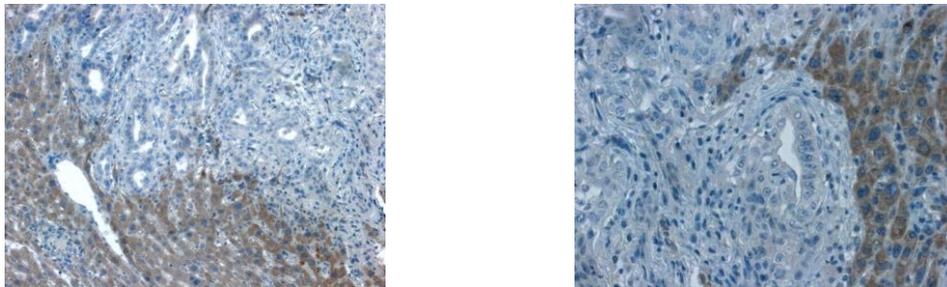


Abb. 5: Immunhistochemische Färbung der AMPK in murinem CC Gewebe; links in 20x, rechts in 40x Vergrößerung.

3.2 Proliferations-Assay

Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurden die gemessenen Werte der jeweils angewandten siRNA ins Verhältnis zum Wachstum der nicht mit siRNA behandelten Kontrollgruppe C gesetzt (siehe Material und Methoden).

Nach 48h zeigte sich für die mit siRNA gegen AMPK α 1 versetzten Zellen eine leichte Wachstumshemmung auf 88%, für AMPK α 2 eine leichte Wachstumsreduktion um fast 4% und für die mit beiden siRNA behandelte Gruppe ein signifikant stärkeres Wachstum auf 125% mit $p < 0,05$. Am zweiten Messzeitpunkt nach 96h zeigte sich ein anderes Bild. Die AMPK α 1-Gruppe war im Wachstum auf 91% leicht gehemmt, die AMPK α 2-Gruppe mit 98% nahezu unverändert und die kombinierte Gruppe mit 101% der Kontrolle quasi identisch. Diese Veränderungen nach 96h waren statistisch nicht signifikant. Somit konnte die nach

48h gezeigte statistisch signifikante Proliferationszunahme durch Blockade beider AMPK α -Untereinheiten nach 96h nicht mehr nachgewiesen werden. Mithilfe von lichtmikroskopischen Bildern, die zu den jeweiligen Messzeitpunkten aufgenommen worden sind, wurde eine grobe zweite Kontrolle der Untersuchungsergebnisse durchgeführt. Auch hier zeigten sich keine größeren Unterschiede (Abb. 6 und 7).

3.3 Migrations-Assay

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den mit den jeweiligen siRNAs behandelten Gruppen wurde zum Zeitpunkt 0h eine Wunde gesetzt. Die Fläche der Wunde zum Zeitpunkt 0h am jeweiligen Ort beschreibt die Referenzgröße und entspricht somit 0% Migration. Ein vollständiger Verschluss der Wunde entspricht 100% (siehe Material und Methoden).

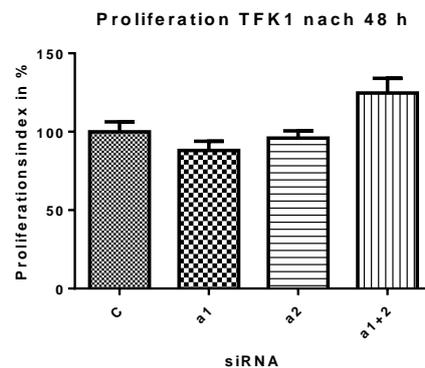
Der Migrationsindex beschreibt nun, um wieviel Prozent die Wundfläche im Messzeitraum von 24h oder 48h verringert wurde. Hierbei zeigt sich für alle siRNA-Gruppen eine erhöhte Migration nach 48h, besonders bei den mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2 versetzten Zellen: hier verringerte sich die Wundfläche um 7% mehr als bei der Kontrollgruppe. Nach 24h zeigt sich eine Reduktion der Migration für mit siRNA gegen AMPK α 2 behandelte Zellen um 4%, nach 48h ist die Migration für diese Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch um 2% erhöht. Für die Gruppen a1 und a1+2 zeigte sich schon nach 24h eine vergleichsweise vermehrte Reduktion der Wundfläche. Die Unterschiede sind aber statistisch nicht signifikant (Abb. 9). In den zur Auswertung angefertigten und in Abb. 9 C aufgeführten lichtmikroskopischen Bildern ist auch die zunehmende Migration der Zellen im Laufe der Zeit erkennbar.

3.4 Invasions-Assay

Es wurden die nach 48h in die Membran der BD Matrigel Invasion Chamber BioCoat (BD Biosciences, Bedford, UK) invadierten Zellen, welche zuvor mit den verschiedenen siRNAs behandelt wurden, gemessen (siehe Material und Methoden).

Während zwischen der Kontrollgruppe C und den nur mit einzelner siRNA behandelten Gruppen kein Unterschied bestand, war der Invasionsindex in der kombinierten Gruppe a1+2 im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht auf 324%. Die verstärkte Invasion Gruppe a1+2 ist statistisch signifikant mit einem $p < 0,0001$ (Abb. 8). Auch in den angefertigten lichtmikroskopischen Bildern ist das deutlich erkennbar (Abb. 10).

A



B

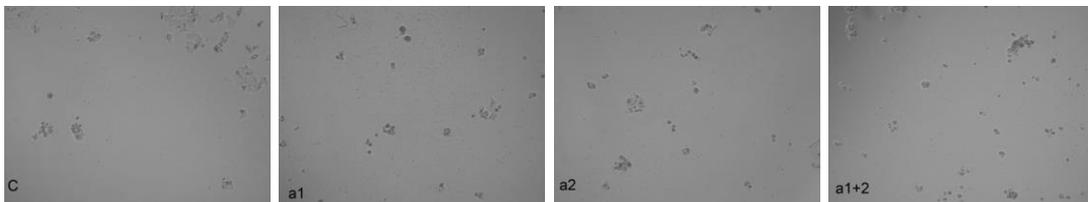
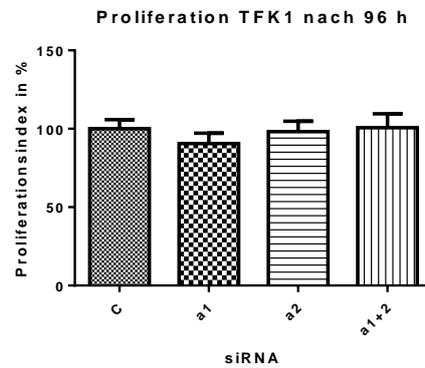


Abb. 6: **A**: Proliferationsindex von mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2 behandelten TFK1-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 48h; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; Signifikanztest: One-way-Anova **B**: Zugehörige, lichtmikroskopische Bilder, 10x vergrößert, nach 48h aufgenommen. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

A



B

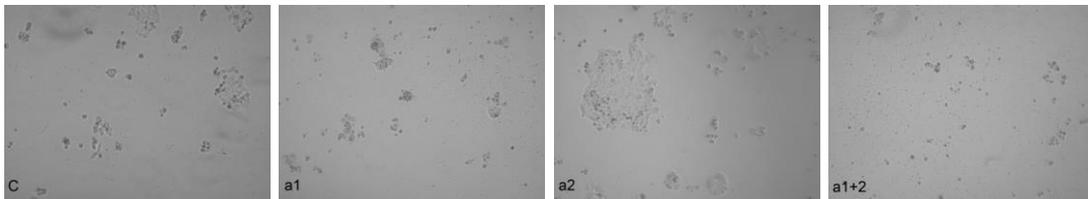


Abb. 7: **A**: Proliferationsindex von mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2 behandelten TFK1 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 96h; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; Signifikanztest: One-way-Anova. **B**: Zugehörige, lichtmikroskopische Bilder, 10x vergrößert, nach 96h aufgenommen. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

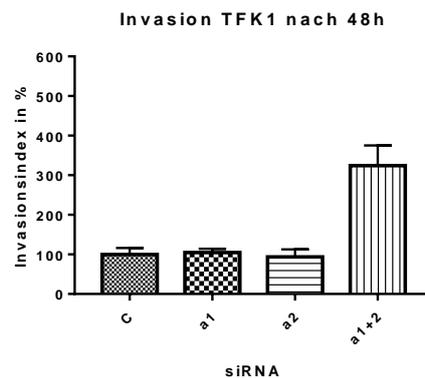


Abb. 8: Invasionsindex von mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2 behandelten TFK1 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 48h; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; Signifikanztest: One-way-Anova. Die Gruppe a1+2 hat eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle mit einem

$p < 0,0001$. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

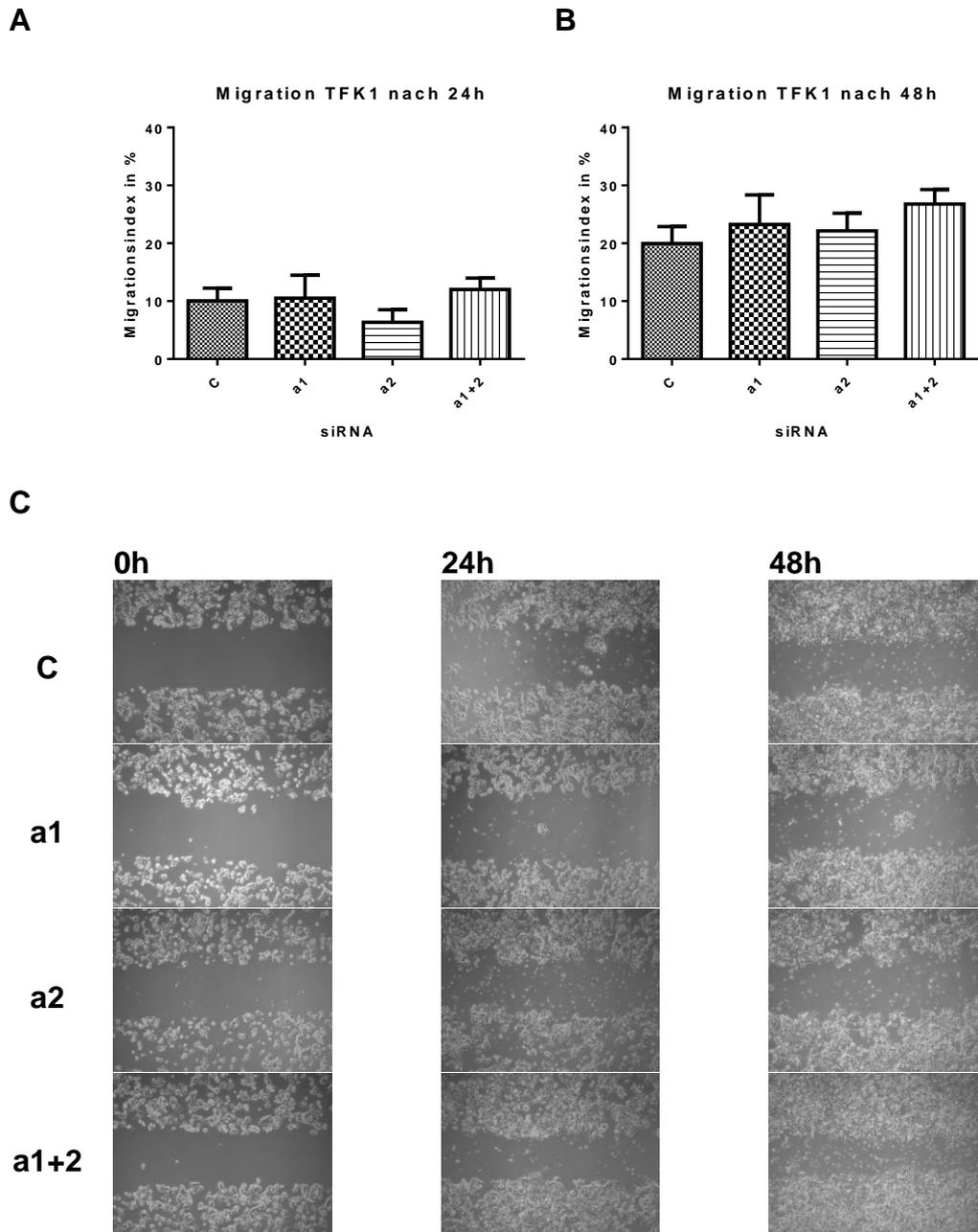


Abb. 9: Ermittelte Migration mit dem Wundheilungsassay. Migrationsindex von mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2 behandelten TFK1 Zellen; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler; Signifikanztest: One-way-Anova. **A**: nach 24h, **B**: nach 48h. **C**: Lichtmikroskopische Bilder, 10x vergrößert, der Wunde zum Zeitpunkt 0h, nach 24h und nach 48h. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

Lichtmikroskopische Bilder zur Invasionsbestimmung

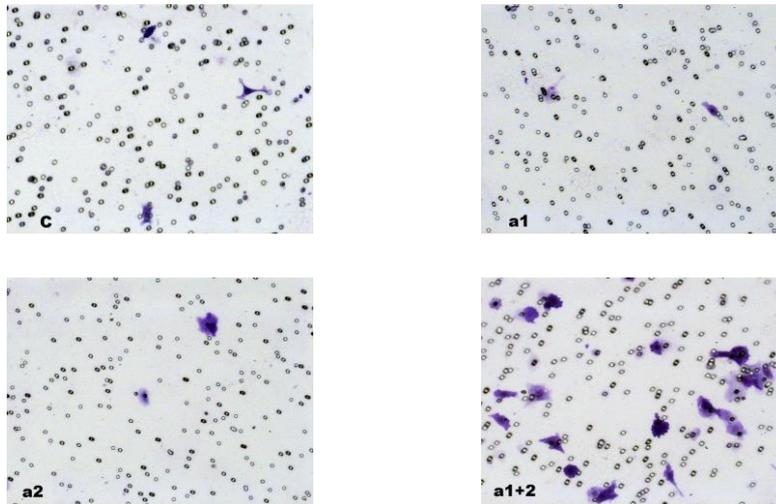


Abb. 10: Invasion: Lichtmikroskopische Bilder bei 40x Vergrößerung. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

3.5 Western Blot

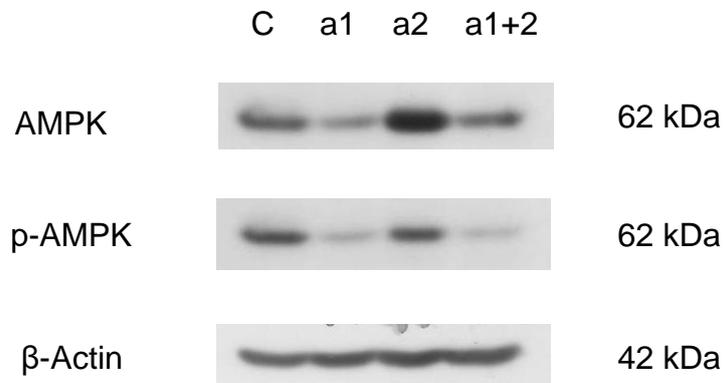
3.5.1 AMPK und phospho-AMPK-Expression

Mittels Western Blot wurde die Expression der AMPK und p-AMPK nach Behandlung mit der spezifisch gegen AMPK α 1 bzw. AMPK α 2 wirksamen siRNA überprüft. Die Intensität in der jeweiligen Kontrollgruppe C entspricht 100% (siehe Material und Methoden).

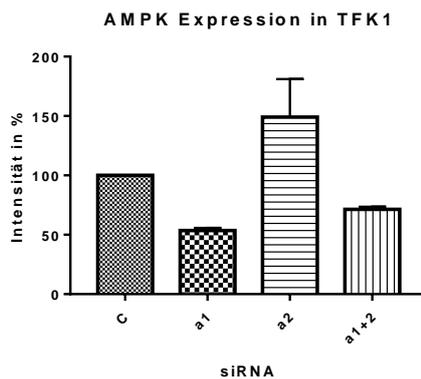
Die Gesamt-AMPK sank in der nur mit siRNA gegen AMPK α 1 behandelten Gruppe auf 54% ab. In der mit siRNA gegen AMPK α 2 versetzten Gruppe zeigte sich hingegen ein deutlicher Anstieg der Gesamt-AMPK auf 149%. Die mit beiden siRNAs versetzte Gruppe zeigte eine Reduktion der Gesamt-AMPK-Expression auf 71%. Außerdem wurde noch die aktivierte Form der AMPK, die p-AMPK, untersucht. Hier zeigte sich in der AMPK α 1-Gruppe eine deutliche Reduktion auf 35% im Vergleich zur Kontrolle. Die AMPK α 2-Gruppe wies eine schwächere Reduktion auf 67%, die kombinierte Gruppe eine starke Verringerung der Expression auf 26% auf. Insgesamt ergab sich, dass die Behandlung mit siRNA zu der gewünschten Verringerung der AMPK-Expression führte, le-

diglich die leichte Erhöhung der Gesamt-AMPK-Expression nach Behandlung mit siRNA gegen AMPK α 2 überraschte (Abb. 11).

A



B



C

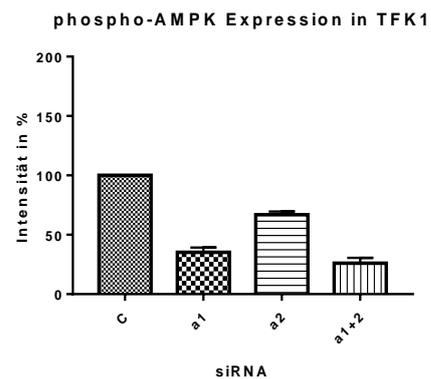


Abb. 11: Western Blot; Verringerung der AMPK- bzw. p-AMPK Expression von TFK1 Zellen nach Behandlung mit spezifischer siRNA. **A**: Western Blots für AMPK, p-AMPK, β -Actin nach verschiedener Therapie / Exposition; **B**: Expression der AMPK nach rechnerischem Angleichen der jeweiligen Expression der β -Actin Kontrolle, dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler. **C**: Expression der p-AMPK nach rechnerischem Angleichen der jeweiligen Expression der β -Actin Kontrolle, dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

3.5.2 Marker der epithelialen-mesenchymalen Transition

Zur Bestimmung des Effekts der siRNA-Behandlung auf die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) wurden die beiden Marker E-Cadherin, als epithelialer Marker, und N-Cadherin, als mesenchymaler Marker, untersucht. Die Expression von E-Cadherin stieg in allen untersuchten Gruppen deutlich an. Der auf 260% größte Anstieg wurde durch die Behandlung mit siRNA gegen AMPK α 2 ausgelöst (Abb. 12 A+B).

Auch beim N-Cadherin war ein Anstieg der Expression unter siRNA-Behandlung zu erkennen, bei der AMPK α 1-Gruppe auf 122%, bei der α 2-Gruppe auf 150% und bei der Kombination beider siRNAs auf 197% (Abb. 12 A+C).

Interessanterweise nahmen also sowohl die epithelialen Marker als auch die mesenchymalen Marker zu.

3.5.3 Auswirkungen auf den Signal Transducer und Aktivator der Transkription-3 (STAT-3)

Zur Bestimmung der Auswirkungen der siRNA-Behandlung gegen AMPK α 1 und AMPK α 2 auf STAT-3 wurde die Expression des STAT-3 und dessen aktivierter Form, p-STAT-3, nach der Behandlung bestimmt.

Die Expression des p-STAT-3 nahm in der AMPK α 1-supprimierten Gruppe auf 157%, in der AMPK α 2-supprimierten Gruppe auf 135% zu. In der kombinierten Gruppe war hingegen eine leichte Abnahme auf 93% festzustellen. Auch beim STAT-3 zeigte sich ein ähnlicher Trend. Eine leichte Zunahme auf 120% bei AMPK α 1, ein der Kontrollgruppe nahezu identisches Level bei AMPK α 2 und eine deutliche Abnahme bei der Kombination beider siRNAs auf lediglich 43%, konnte hinsichtlich der STAT-3-Expression festgestellt werden (Abb. 13).

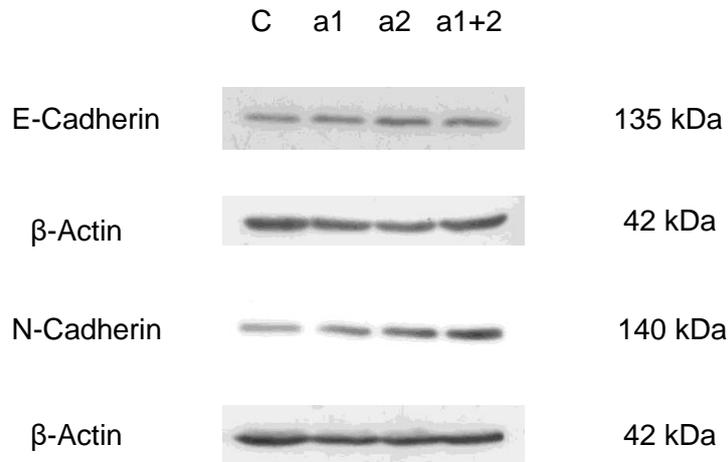
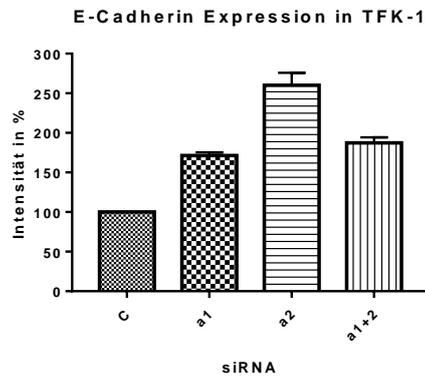
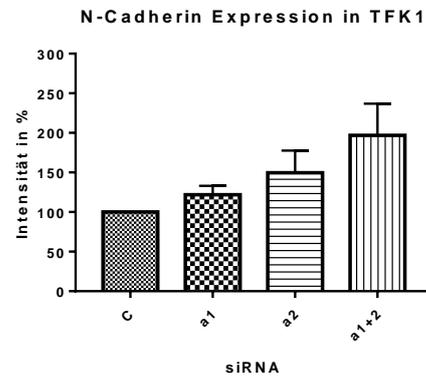
A**B****C**

Abb. 12: Western Blot der EMT-Marker E-Cadherin und N-Cadherin. **A:** Western Blots für E-Cadherin, N-Cadherin, β -Actin nach verschiedener Therapie / Exposition. **B:** Expression von E-Cadherin nach rechnerischem Angleichen der jeweiligen Expression der β -Actin Kontrolle, dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler. **C:** Expression von N-Cadherin nach rechnerischem Angleichen der jeweiligen Expression der β -Actin Kontrolle, dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

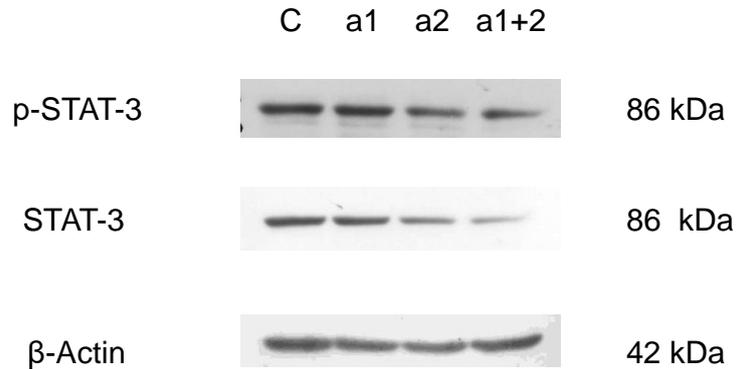
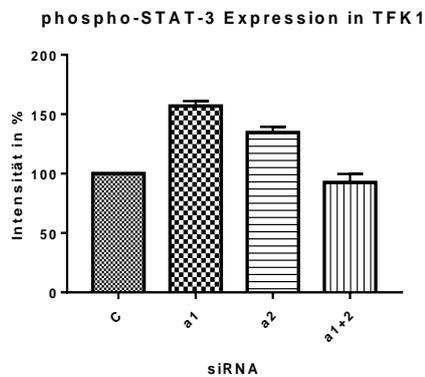
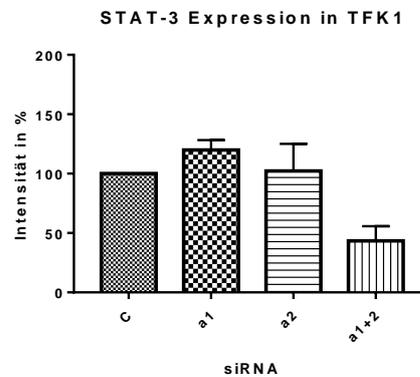
A**B****C**

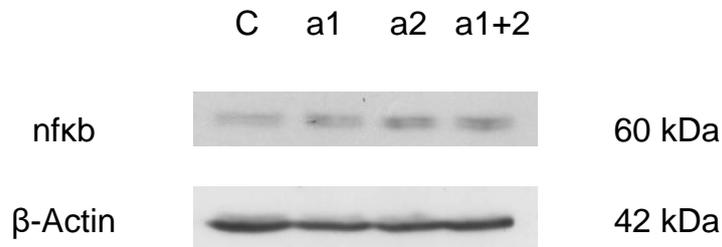
Abb. 13: Western Blot des p-STAT3 und STAT-3. **A:** Western Blots für p-STAT-3, STAT-3, β-Actin nach verschiedener Therapie / Exposition. **B:** Expression des phospho-STAT-3 nach rechnerischem Angleichen der jeweiligen Expression der β-Actin Kontrolle, dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler. **C:** Expression des STAT-3 nach rechnerischem Angleichen der jeweiligen Expression der β-Actin Kontrolle, dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPKα1, a2: mit siRNA gegen AMPKα2, a1+2: mit siRNA gegen AMPKα1 und AMPKα2.

3.5.4 Auswirkungen auf den Nuklearen Faktor kb (nfbk)

Um etwaige Auswirkungen der siRNA-Behandlung auf den nfbk zu zeigen, wurde auch hier ein Western Blot durchgeführt. Nfbk kann eine Vielzahl tumorfördernder Funktionen innehaben. In allen Gruppen war, nach Behandlung mit der jeweiligen siRNA, ein Anstieg der nfbk-Expression zu beobachten: In der AMPKα1-Gruppe auf 134%, in der AMPKα2-Gruppe auf 161% und in der kom-

binieren Gruppe auf 163%. Insofern konnte gezeigt werden, dass das Supprimieren der AMPK zu einem Anstieg des nfkb führt (Abb. 14).

A



B

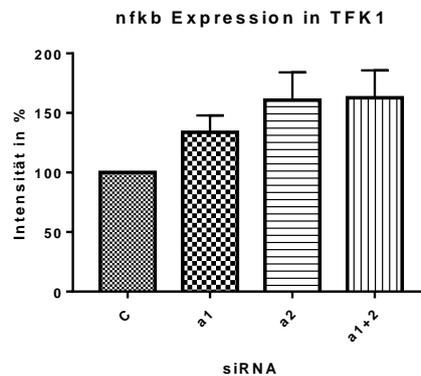


Abb. 14: Western Blot des nfkb. **A**: Western Blots für nfkb und β -Actin nach verschiedener Therapie / Exposition **B**: Expression des nfkb nach rechnerischem Angleichen der jeweiligen Expression der β -Actin Kontrolle, dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

3.6 qtRT-PCR

3.6.1 AMPK α 1 und AMPK α 2

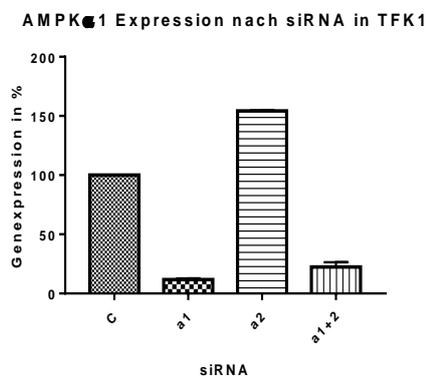
Die Überprüfung der Auswirkungen der siRNA-Behandlung auf die beiden AMPK-Untereinheiten wurde mit einer qtRT-PCR, zusätzlich zum Western Blot, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode.

Hierbei zeigte sich eine sehr starke Reduktion der AMPK α 1-Expression auf 12% bei den mit siRNA gegen AMPK α 1 behandelten TFK1-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch bei der kombinierten Gruppe zeigte sich eine starke Reduktion der AMPK α 1-Expression auf 22%. Die siRNA-Behandlung gegen AMPK α 2 führte hingegen zu einer Zunahme der AMPK α 1-Expression auf 154%. Durch die starke Suppression der α 1-Untereinheit scheint eine reaktive Überexpression der α 2-Untereinheit vorzuherrschen. Die Veränderungen sind alle statistisch signifikant mit einem $p < 0,0001$ (Abb. 15 A).

Für die Expression der AMPK α 2 war eine derart deutliche Abnahme in der mit siRNA gegen AMPK α 2 versetzten Gruppe nicht zu erkennen, hier erfolgte lediglich eine Reduktion auf 75%. Diese Abnahme war somit nahezu identisch mit dem Effekt der siRNA gegen AMPK α 1 auf die AMPK α 2-Expression, da auch hier eine Reduktion der Expression auf 76% gemessen werden konnte. Bei der Kombination beider siRNAs erfolgte eine etwas deutlichere Suppression der α 2-Untereinheit auf 66%. Lediglich die von der Gruppe α 1+2 im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkten Veränderungen der AMPK α 2-Expression sind statistisch signifikant mit einem $p < 0,05$ (Abb. 15 B).

Die siRNA gegen AMPK α 1 war folglich bedeutend stärker wirksam als die siRNA gegen AMPK α 2.

A



B

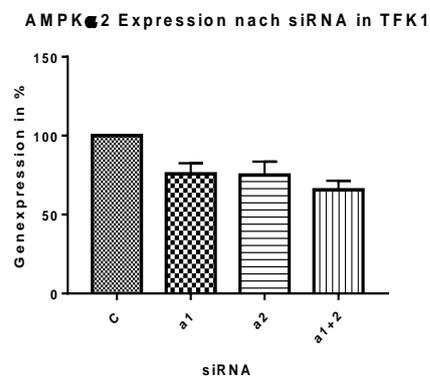


Abb. 15: qRT-PCR Ergebnisse. **A**: Genexpression der AMPK α 1 nach jeweiliger siRNA Behandlung. Signifikanztest: One-Way-Anova. Die Ergebnisse sind alle

statistisch signifikant mit einem $p < 0,0001$. **B**: Genexpression der AMPK α 2 nach jeweiliger siRNA-Behandlung. Signifikanztest: One-Way-Anova. Das Ergebnis für die Gruppe a1+2 ist statistisch signifikant mit $p < 0,05$. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler; Berechnung der Werte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Verwendung von 18S-RNA als interne Kontrolle. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

3.6.2 Auswirkungen auf Interleukin-6

Die Veränderung der Expression von IL-6 wurde mithilfe einer qtRT-PCR untersucht. Dabei reduzierte die Behandlung mit siRNA gegen AMPK α 1 die Expression auf 72% im Vergleich zur Kontrollgruppe, hingegen verstärkte die siRNA gegen AMPK α 2 die IL-6-Expression auf 177%. Diese beiden Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant. Ein sehr starker, statistisch signifikanter Anstieg auf 553% war bei der Kombination beider siRNAs zu beobachten (Abb. 16).

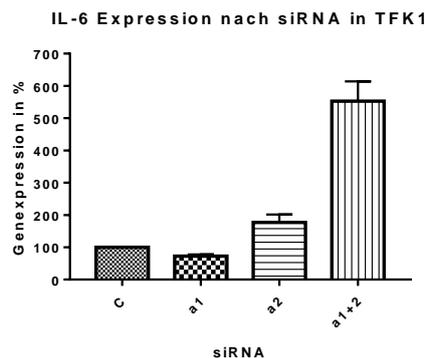


Abb. 16: qtRT-PCR Ergebnisse. Genexpression von IL-6 nach jeweiliger siRNA Behandlung. Signifikanztest: One-Way-Anova. Die Gruppe a1+2 zeigt eine signifikante Veränderung mit $p < 0,05$. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler; Berechnung der Werte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Verwendung von 18S-RNA als interne Kontrolle. C: die Kontrollgruppe ohne siRNA, a1: mit siRNA gegen AMPK α 1, a2: mit siRNA gegen AMPK α 2, a1+2: mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2.

4. Diskussion

Das CC hat in seiner Inzidenz in den letzten Jahren deutlich zugenommen, auch wenn es noch als seltener Tumor gilt. Außerdem fehlen, vor allem bei später Erkennung des Tumorbefalls, Therapieoptionen, um die hohe Mortalität zu verringern. Neben einer früheren Diagnostik zur Tumorerkennung ist deshalb das Entdecken neuer Therapien ein Hauptanliegen der CC-Forschung (Kennedy et al. 2017).

AMPK spielt eine wichtige Rolle beim Energiehaushalt der Zelle, der Regulierung der Proteinsynthese und der Fettsäuresynthese. Beim CC wurde bereits festgestellt, dass eine Aktivierung der AMPK durch Metformin eine antitumoröse Wirkung hat. Genauere Mechanismen blieben bisher jedoch teilweise unklar (Kaewpitoon et al. 2015; Saengboonmee et al. 2017; Pawlyk et al. 2014). Die AMPK α 1-Untereinheit kommt vor allem in Leber, Lunge und Knochen, die AMPK α 2-Untereinheit vor allem in der Muskulatur vor (Sinnott und Brennan 2014).

Da sowohl eine Herunterregulierung der AMPK im CC und die damit einhergehenden Auswirkungen auf verschiedene Tumorcharakteristika und Signalproteine als auch die Unterschiede in der Bedeutung der AMPK α -Untereinheiten unbekannt sind, wurde versucht, dies zu erforschen.

Hierzu wurde AMPK α 1 bzw. AMPK α 2 mithilfe einer spezifischen siRNA (AMPK α 1: Hs_PRKAA1_6 und AMPK α 2: Hs_PRKAA2_6 von Qiagen, Hilden, USA) inhibiert. Der Nachweis der Funktion dieser siRNA wurde per Western Blot und qRT-PCR erbracht. Hierbei war im Western Blot auffällig, dass die Expression der AMPK nach Behandlung mit siRNA gegen AMPK α 2 insgesamt zunahm. In der qRT-PCR zeigte sich dann, dass dieser Anstieg auf einer Erhöhung der AMPK α 1 beruhte. Jing und Ismail-Beigi konnten nach siRNA-Behandlung gegen AMPK α 2 auch keine signifikante Reduktion der Gesamt-AMPK per Western Blot feststellen, allerdings trat bei ihnen kein Anstieg der AMPK auf. Ein weiterer Unterschied zu ihrem Projekt ist, dass sie den Versuch an Clone-9-Zellen, Leberzellen der Ratte, durchführten (Jing und Ismail-Beigi 2007). Trotz der nicht abfallenden Gesamt-AMPK für die AMPK α 2-siRNA wur-

den für die Zellkulturversuche Veränderungen beobachtet, die den für einen AMPK-Abfall erwarteten entsprechen. Viollet et al. zeigten bei Knockout-Mäusen in Leberzellen, dass AMPK α 1 nicht in der Lage ist, für die komplette Funktion der AMPK α 2 bei deren Ausfall aufzukommen (Viollet et al. 2009). Eine den Ausfall der AMPK α 2 ersetzende erhöhte Expression der AMPK α 1 ist folglich genauso möglich, wie eine nicht ausreichende Genauigkeit der siRNA gegen AMPK α 2. Hierfür spricht auch eine deutlich kleinere Reduktion der AMPK α 2 durch die spezifische siRNA gegenüber der Reduktion der AMPK α 1 durch die zugehörige siRNA. Auch die in der qtRT-PCR nachgewiesene, quasi gleich große Reduktion der AMPK α 2 durch siRNA gegen AMPK α 1 und durch siRNA gegen AMPK α 2 spricht für eine bessere Wirksamkeit der α 1-siRNA. Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang auch, dass nur für die mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2 behandelten Zellen eine signifikante Reduktion der AMPK α 2-Expression in der qtRT-PCR gezeigt werden konnte. Insgesamt zeigte sich im Western Blot, dass die Suppression der AMPK α 1 sowohl auf die Gesamt-AMPK als auch auf die p-AMPK ungefähr das gleiche Resultat wie die Suppression beider α -Untereinheiten hat. Durch die Überprüfung des Ergebnisses durch zwei verschiedene Methoden (Western Blot und qtRT-PCR) ist die Wahrscheinlichkeit für methodische oder technische Fehler relativ gering.

Die aktivierte Form der AMPK, die p-AMPK, zeigte sich im Western Blot für jede siRNA reduziert. Hiermit lassen sich die Veränderungen bei der Proliferation, Migration und Invasion der Zellen erklären, da sich lediglich die p-AMPK auf das Zellenergielevel und die durch AMPK gesteuerten Regulationsmechanismen auswirkt (Li et al. 2015b). Die siRNA führte somit auch zu einer geringeren Aktivierung der AMPK zu p-AMPK; dies war besonders ersichtlich für die Gruppe α 2, da hier trotz erhöhter Gesamt-AMPK-Konzentration die p-AMPK-Expression abnahm. Da im physiologischen Ruhezustand p-AMPK mit der α 1-Untereinheit eine höhere Aktivität als p-AMPK mit der α 2-Untereinheit zeigt, könnte sich hieraus die stärker verminderte Gesamt-p-AMPK-Expression für mit siRNA gegen AMPK α 1 behandelte Zellen erklären (Rajamohan et al. 2016).

Die Proliferation der TFK1-Zellen wurde mit dem Wst-1-Assay ermittelt. Hierbei zeigten sich nach 96h keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Einer leichten Reduktion der Proliferation der mit siRNA gegen AMPK α 1 behandelten Zellen steht ein nahezu gleicher Proliferationsindex der anderen beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe gegenüber. Eine vermehrte Aktivierung der AMPK, beispielsweise durch Metformin, ist dafür bekannt, zu einer Verringerung der Proliferation von Zellen eines intrahepatischen CC zu führen (Ling et al. 2014; Saengboonmee et al. 2017; Ling et al. 2017; Fujimori et al. 2015). Im durchgeführten Experiment konnte allerdings lediglich für die Gruppe a1+2 nach 48h ein signifikanter gegenteiliger Effekt, also Zunahme der Proliferation, festgestellt werden. Bei Zellen des Prostatakarzinoms, bei welchen durch gentechnische Verfahren die AMPK α 1 komplett ausgeschaltet wurde, konnte hingegen eine deutliche Verstärkung des Zellwachstums demonstriert werden (Zhou et al. 2009). Auffällig ist jedoch, dass die signifikante Proliferationszunahme für die Gruppe a1+2 nach 48h im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 96h nicht mehr erkennbar war. Womöglich wurde die Proliferation im Verlauf also durch andere Faktoren, zum Beispiel Energiemangel, eingeschränkt. Eine mögliche zu hohe Zelldichte konnte in den lichtmikroskopischen Aufnahmen aber nicht festgestellt werden. Es wird diskutiert, ob eine Aktivierung der AMPK unter bestimmten Umständen, wie Hypoxie oder Energiemangel, einen tumorfördernden Einfluss hat. Dies ist möglicherweise auch ein potenzieller Ansatz, um die vorliegenden Ergebnisse erklären zu können (Viollet et al. 2010; Hardie 2015). Der Proliferations-Assay wurde dreimal wiederholt und per wst-1 Test und mit dem Lichtmikroskop beurteilt, sodass ein technisches Problem bei der Ausführung unwahrscheinlich ist.

Das Erwerben der Fähigkeit zur Migration und Invasion ist bei Tumorzellen Voraussetzung für eine Metastasierung (van Zijl et al. 2011). Die Migration wurde mit dem Wundheilungstest untersucht. Hierbei zeigte sich nach 48h eine leicht verstärkte, nicht signifikante Zunahme der Migration für die mit siRNA behandelten Zellen. Nach 24h war eine nicht signifikante Reduktion der Migration für die Gruppe a2 auffallend.

Die Invasion, welche mit der BD Matrigel Invasion Chamber BioCoat (BD Biosciences, Bedford, UK) untersucht wurde, zeigte für die mit siRNA gegen AMPK α 1 und die mit siRNA gegen AMPK α 2 behandelten Zellen nur minimale, nicht signifikante Veränderungen. Für die Kombination beider siRNA zeigte sich aber ein deutlicher signifikanter Anstieg des Invasionsindex. Es ist bekannt, dass sowohl Migration als auch Invasion beim CC durch die Behandlung mit Metformin abnehmen (Trinh et al. 2017; Saengboonmee et al. 2017). Auch bei Behandlung von CC-Zellen mit Capsaicin, Bromelain oder Papain, welche auch zu einer AMPK-Aktivierung führen, kann eine Reduktion von Migration und Invasion registriert werden (Lee et al. 2014; Müller et al. 2016). Somit ist die Migrationsreduktion nach 24h für die Gruppe a2 möglicherweise durch die hier erhöhte Gesamt-AMPK-Konzentration zu erklären. Nach 48h ist diese allerdings nicht mehr vorhanden, was durch die verringerte p-AMPK-Expression nachvollziehbar erscheint.

Eine zentrale Rolle bei der Metastasierung spielen auch die Marker der epithelial-mesenchymalen Transition (Li und Li 2015). Entgegen der Erwartungen nach den durch die Migrations- und Invasionsversuche gemachten Beobachtungen nimmt das epitheliale Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin in allen mit siRNA behandelten Zellen zu. Die im Vergleich zu den anderen Gruppen größte Zunahme des E-Cadherins bei der Gruppe a2 könnte ursächlich für die vergleichsweise geringsten Unterschiede bei Migration und Invasion in dieser Gruppe sein und die Reduktion der Migration nach 24h verursachen. Der mesenchymale Marker N-Cadherin zeigt in allen Gruppen eine Zunahme. In anderen Tumoren, wie dem kolorektalen Karzinom, korreliert die Menge an N-Cadherin negativ mit der Menge an E-Cadherin, dies war im vorliegenden Versuch für das CC nicht zu beobachten (Yan et al. 2015). Bezüglich der EMT-Marker ist bei Behandlung von CC Zellen mit Metformin eine Zunahme der epithelialen und eine Abnahme der mesenchymalen Marker bekannt (Trinh et al. 2017). Ein Verlust von E-Cadherin bei Zellen des CC ist außerdem mit einer höheren Metastasierungsrate und kürzeren Überlebensdauer assoziiert (Techasen et al. 2014). Die Zunahme beider EMT-Marker unter siRNA-Behandlung war dementsprechend nicht erwartungsgemäß, könnte aber auch ein Grund für

die nicht signifikante Zunahme der Migration sein. Die einzig signifikante Zunahme der Invasion für die Kombination beider siRNAs entsprach immerhin der größten Zunahme des N-Cadherins. Es scheint, dass die siRNA-Behandlung nicht den gegenteiligen Effekt auf Migration und Invasion wie die Aktivierung der AMPK durch Metformin hatte. Dies sollte an verschiedenen Zellreihen des CC und mit anderen Methoden der Suppression der AMPK überprüft werden. Der Wundheilungsassay wirkt durch etwaige minimale Verschiebung der Messpunkte, eine ungleichmäßige Breite der Wunde und durch ungenaue Grenzsetzung bei der Bestimmung der Wundfläche auch etwas fehleranfällig. Bei der Invasion war eine erhöhte Rate an invadierten Zellen in der Mitte der Membran im Vergleich zu Randbezirken auffällig, dies könnte sowohl durch materielle Ungleichheiten als auch durch Ungenauigkeiten bei der Zellzugabe begründet sein.

Der nukleare Faktor κB (n κB) spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zellwachstum, Zelltod und Immunantwort (Baud und Karin 2009). Er aktiviert IL-6, zur Einleitung einer Entzündungsreaktion, welches wiederum STAT-3 aktiviert. Bei HCC-Zellen zeigte sich unter Metformin-Behandlung eine Reduktion der Aktivität des n κB und damit einhergehend eine Reduktion der Aktivität von IL-6 und des p-STAT-3. Hierbei zeigte sich auch für eine Inhibition der AMPK α 1/2 eine erhöhte n κB -Aktivität (Zheng et al. 2013). Auch eine erhöhte N-Cadherin-Aktivität führt zu einer vermehrten n κB -Aktivität (Ge et al. 2015). Beim CC konnte hingegen keine relevante Aktivitätsreduzierung des n κB unter Metformin-Behandlung festgestellt werden. Leidglich eine vermehrte Translokation des n κB vom Zellkern ins Zytoplasma wurde registriert (Saengboonmee et al. 2017). Im vorliegenden Versuch zeigte sich ein Anstieg der n κB -Expression in allen mit siRNA behandelten Zellen, was bedeutet, dass die Suppression der AMPK-Aktivität zu einer erhöhten n κB -Aktivität geführt hat. Damit konnte die gleiche Verbindung zwischen n κB und AMPK für das CC gezeigt werden, welche Zheng et al. für das HCC beobachteten (Zheng et al. 2013).

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Entzündungsmediator, welcher beim CC vermehrt vorkommt. Es fördert das Tumorzellwachstum und Faktoren, die die Überlebensfähigkeit der Zellen verbessern (Braconi et al. 2010). Der Signal Transducer und Aktivator der Transkription-3 (STAT-3) wird von IL-6 und anderen Wachstumsfaktoren aktiviert und fördert Zellproliferation, Migration und Invasion (Hu et al. 2017; Wake und Watson 2015; Zheng et al. 2014). Die Aktivierung der AMPK durch Metformin führt zu keiner Erniedrigung des aktivierten STAT-3, jedoch zu einer vermehrten Lokalisation des STAT-3 im Zytoplasma. Zur Aktivierung muss zunächst eine Translokation in den Zellkern stattfinden (Saengboonmee et al. 2017). Im HCC führt eine Metformin-Behandlung der Zellen zu einer verringerten Aktivität von IL-6 und des p-STAT-3 (Zheng et al. 2013). Im vorliegenden Versuch konnte nun für die mit beiden siRNAs behandelten Zellen ein sehr starker, signifikanter Anstieg des IL-6 festgestellt werden. Dies entsprach auch dem Anstieg für Proliferation, Migration und Invasion in dieser Gruppe. Für die a1+2-Gruppe blieb der p-STAT-3-Spiegel nahezu unverändert, wohingegen die STAT-3-Expression deutlich verringert war. Für die mit siRNA gegen AMPK α 1 behandelten Zellen zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme des IL-6, jedoch eine deutliche Zunahme des p-STAT-3. Somit konnte hier der gegenteilige Effekt zur Kombination beider siRNAs beobachtet werden. Für die mit siRNA gegen AMPK α 2 behandelten Zellen zeigte sich der zu erwartende Effekt, dass ein nicht signifikant erhöhtes IL-6 eine deutliche Erhöhung des p-STAT-3 zur Folge hatte. Somit konnte im vorliegenden Versuch die Aktivierung des STAT-3 durch IL-6 lediglich für die Gruppe a2 nachgewiesen werden, ansonsten zeigte sich sogar das Gegenteil.

Die Zunahme der nfkb-Expression in jeder Gruppe führte im durchgeführten Versuch nur bei den Gruppen a2 und a1+2 zu einer Erhöhung von IL-6, der p-STAT-3 hingegen nahm nur in den Gruppen a1 und a2 zu. Dementsprechend waren die für den nfkb/IL-6/STAT-3-Signalweg bereits bekannten Zusammenhänge in diesem Versuch an den TFK1-Zellen nicht zutreffend (Zheng et al. 2013). Ob dies an methodischen Fehlern, Beeinflussungen der normalen Regulierung der Zellen durch die siRNA, der geringen AMPK-Aktivität oder unbe-

kannten Mutationen der TFK1-Zellen lag, sollte in weiteren Versuchen überprüft werden.

Die von Ge et al. beschriebene Aktivierung des nfkb durch N-Cadherin erscheint hingegen möglich, da sowohl die nfkb- als auch die N-Cadherin-Expression in allen mit siRNA behandelten Zellen zunahm (Ge et al. 2015).

In der immunhistochemischen Färbung auf AMPK der murinen Gewebeproben zeigte sich eine deutlich verringerte Anfärbbarkeit der AMPK im tumorverdächtigen Gewebe im Vergleich zum tumorumgebenden Gewebe. Die Expression der AMPK ist demnach im intrahepatischen CC vermindert. Eine verminderte Expression der AMPK in Tumorgewebe konnten Cheng et al. auch für das HCC beobachten (Cheng et al. 2014). Die deutlich verminderte Expression der AMPK im tumorverdächtigen Anteil der murinen Gewebeprobe unterstützt den Verdacht, dass ein Verlust der AMPK mit einem verstärkten Tumorwachstum einhergeht und eine vermehrte AMPK-Expression womöglich tumorprotektive Effekte hat (Cheng et al. 2014; Chuang et al. 2014; Hardie 2015; Li et al. 2015b; Motoshima et al. 2006).

Für die mit siRNA gegen AMPK α 1 behandelten TFK1-Zellen ist zusammenfassend festzustellen, dass eine signifikante Reduktion der AMPK α 1 eine nicht signifikante Reduktion der AMPK α 2 und im Western Blot eine deutliche Reduktion der p-AMPK und der Gesamt-AMPK gezeigt werden konnten. Dies hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Zellkulturversuche, wobei für Migration und Invasion eine leichte Zunahme, für die Proliferation eine leichte Abnahme zu verzeichnen war. Die EMT-Marker wurden beide verstärkt exprimiert. Nfkb zeigte eine Zunahme, IL-6 hingegen eine nicht signifikante Abnahme. STAT-3 nahm ebenso zu wie p-STAT-3.

Für die mit siRNA gegen AMPK α 2 behandelten TFK1-Zellen ist zusammenfassend festzustellen, dass eine nicht signifikante Reduktion der AMPK α 2 mit einer signifikanten Erhöhung der AMPK α 1 einherging. Die p-AMPK war deutlich erniedrigt, die Gesamt-AMPK erhöht. Die Proliferation blieb unverändert, die Migration stieg leicht an und die Invasion zeigte eine leichte Reduktion. Für die bei-

den untersuchten EMT-Marker zeigte sich auch hier eine Zunahme für E-Cadherin und N-Cadherin. Für nfkb und p-STAT-3 zeigte sich eine Zunahme, STAT-3 blieb unverändert, IL-6 stieg nicht signifikant an.

Für die mit siRNA gegen AMPK α 1 und AMPK α 2 behandelten Zellen lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sowohl eine signifikante Reduktion der AMPK α 1 als auch eine signifikante Reduktion der AMPK α 2 eine Reduktion der Gesamt-AMPK und eine deutliche Reduktion der p-AMPK mit der siRNA-Behandlung erzielt wurde. Die Proliferation nach 48h stieg signifikant an, nach 96h war sie unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Die Migration nahm zu und auch die Invasion stieg signifikant an. Die EMT-Marker E-Cadherin und N-Cadherin nahmen zu. Die nfkb-Expression war verstärkt und IL-6 signifikant vermehrt. STAT-3 hingegen war vermindert, der aktivierte p-STAT-3 leicht vermindert. Abgesehen von der Reduktion des STAT-3 und des p-STAT-3, sowie der Zunahme von E-Cadherin, zeigten sich für diese Gruppe die zur AMPK-Aktivierung durch Metformin entgegengesetzten und somit erwarteten Effekte (Saengboonmee et al. 2017).

Dies lässt darauf schließen, dass beide α -Untereinheiten der AMPK eine wichtige Rolle bei der Regulation des Tumorwachstums und der Tumorentstehung spielen. Die Suppression einer einzelnen katalytischen Untereinheit scheint von den Tumorzellen kompensiert werden zu können, sodass hier keine Verstärkung des Tumorwachstums und Progression zu größerer Malignität feststellbar war. Somit wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen den α -Untereinheiten in den Versuchen erkannt. Lediglich die verstärkte AMPK α 1-Expression bei Herunterregulation der AMPK α 2-Untereinheit überraschte, sodass dies in weiteren Versuchen, auch bei anderen Zellreihen des CC, überprüft werden müsste.

Um eine Aktivierung der AMPK als Therapieoption etablieren zu können sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich. Es sollte zum Beispiel gezeigt werden, ob eine AMPK-Suppression bei anderen CC die gleichen Effekte bewirkt wie bei den TFK-1-Zellen. Dabei sind auch die Unterschiede zwischen intrahepatischem, perihilärem und extrahepatischem CC zu berücksichtigen.

Außerdem ist die Wirkung einer AMPK-Aktivierung auf das Tumorwachstum des CC zu überprüfen. Sollten hierbei keine zu der in diesem Projekt durchgeführten Suppression der AMPK gegenteiligen Effekte erkennbar sein, spricht das gegen einen therapeutischen Einsatz eines AMPK-Aktivators. Mit Metformin steht bereits eine Substanz zur Verfügung, welche als sicher und risikoarm angesehen wird und eine unspezifische AMPK-Aktivierung bedingt. Hierbei wäre es von zentraler Bedeutung, den genauen Wirkmechanismus, welcher noch unbekannt ist, zu beschreiben (Pawlyk et al. 2014; Florez 2017). Zumindest als Ergänzung zu einer etablierten Chemotherapie könnte die Einnahme von Metformin ein interessanter Ansatz sein, deren Wirksamkeit in klinischen Studien zu überprüfen ist. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre die Entwicklung eines spezifischen AMPK-Aktivators, der im besten Fall ebenso sicher wie Metformin ist. Da auch Nahrungsmittelbestandteile, wie Capsaicin, Bromelain oder Papain beschrieben sind, welche unter anderem über eine AMPK-Aktivierung zu verminderter Tumorprogression führen, könnten auch diese eine Möglichkeit sein, eine etablierte Therapie zu ergänzen (Lee et al. 2014; Müller et al. 2016). Da die in diesem Projekt erhobenen Daten teilweise nicht signifikant und teilweise auch widersprüchlich zu vorherigen Publikationen sind, stellt sich allgemein die Frage, ob AMPK überhaupt als Zielprotein einer Tumorbehandlung geeignet ist. Des Weiteren steht in bestimmten Stadien der Tumorentwicklung eine tumorfördernde Wirkung der AMPK weiter zur Diskussion, da sie zum Beispiel in Phasen von schnellem Wachstum die Zelle widerstandsfähiger macht. Ein noch genaueres Verständnis der molekularen Funktionsweise der AMPK im Tumorgewebe in Abhängigkeit des Tumorstadiums ist deshalb sehr wichtig (Hardie 2015; Chuang et al. 2014).

Bezüglich der Wirkung der katalytischen α -Untereinheiten erbrachte das vorliegende Projekt neue Erkenntnisse. Es erscheint wahrscheinlich, dass bei Zellen des CC keine der beiden Untereinheiten eine vorrangige Bedeutung innehat. Sogar ein ausgleichender Kompensationsmechanismus bei Verlust einer α -Untereinheit erscheint durchaus möglich, da lediglich eine gesamte Suppression der AMPK zu einer Proliferationszunahme führte. Folglich sollte bei weiteren Untersuchungen der Hauptfokus auf die gesamte AMPK gelegt werden, da eine

alleinige Suppression einer α -Untereinheit keinen Effekt auf das Tumorwachstum hatte. Eine etwaige Wirkung einer Aktivierung einer einzelnen α -Untereinheit der AMPK auf die Proliferation erscheint durch die erhobenen Daten unwahrscheinlich, ist aber nicht komplett auszuschließen.

Es lässt sich festhalten, dass AMPK im CC eine wichtige Rolle spielt, da eine gleichzeitige Suppression beider α -Untereinheiten das Tumorwachstum beschleunigt und die Malignität erhöht. Auch eine deutlich reduzierte Anfärbbarkeit der AMPK im murinen CC im Vergleich zum tumorumgebenden Lebergewebe spricht dafür. Die Bedeutsamkeit der AMPK α 1 entspricht derjenigen der AMPK α 2. Lediglich zusammen nehmen sie Einfluss auf die Tumorprogression, ansonsten scheint der Ausfall einer Isoform kompensiert werden zu können.

5. Zusammenfassung

Das Cholangiokarzinom (CC) ist ein seltener Tumor mit zunehmender Inzidenz. Die chirurgische Resektion stellt die einzig kurative Therapie dar, Gemcitabine/Cisplatin ist die Standard-Chemotherapie für Patienten mit inoperablem CC. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt lediglich bei 10%.

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) besitzt eine katalytische α -Untereinheit, von welcher beim Menschen zwei Isoformen, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, vorkommen. AMPK spielt eine wichtige Rolle dabei, die Zelle im energetischen Gleichgewicht zu halten. In Tumoren führt eine Aktivierung der AMPK zu einer Verringerung des Tumorwachstums. Da die Auswirkungen der verschiedenen α -Untereinheiten sowie die Auswirkungen einer Suppression der AMPK auf das CC bislang unbekannt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit mittels siRNA-Technologie Untersuchungen an humanen CC-(TFK-1) Zellen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Herunterregulierung der aktivierten p-AMPK durch die siRNA erfolgreich war. Im Proliferationsversuch stellte sich nach 48h für die kombinierte Suppression beider α -Untereinheiten eine signifikante Zunahme dar. Auch die Invasion war für diese Gruppe signifikant erhöht. Hingegen blieb die Migration ohne wesentliche Veränderungen. Ferner ergab sich ein signifikanter Anstieg der IL-6-Expression nach siRNA-Therapie. Die alleinige Suppression der AMPK $\alpha 1$ hatte, ebenso wie die alleinige Suppression der AMPK $\alpha 2$, keine Veränderung des Tumorzellwachstums zur Folge. Die siRNA-Behandlung ging in allen Gruppen mit einer Erhöhung der nfkb-Expression sowie einer Erhöhung von Markern der epithelialen-mesenchymalen Transition (E-Cadherin, N-Cadherin) einher.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass lediglich die kombinierte Suppression beider α -Untereinheiten zu einer signifikant verstärkten Malignität führte. Eine einzelne Suppression einer α -Untereinheit veränderte das Tumorwachstum nicht signifikant und auch zwischen den beiden α -Untereinheiten konnten keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden.

Eine Aktivierung beider AMPK-Untereinheiten könnte somit eine mögliche zukünftige Therapieoption für das CC sein, jedoch bedarf es hierzu weiterer Untersuchungen, insbesondere *in vivo* Versuche könnten weitere Erkenntnisse liefern.

6. Literaturverzeichnis

Baud, Veronique; Karin, Michael (2009): Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. In: *Nature reviews. Drug discovery* 8 (1), S. 33–40. DOI: 10.1038/nrd2781.

Ben-Menachem, Tamir (2007): Risk factors for cholangiocarcinoma. In: *European journal of gastroenterology & hepatology* 19 (8), S. 615–617. DOI: 10.1097/MEG.0b013e328224b935.

Blechacz, Boris; Gores, Gregory J. (2008): Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (1), S. 308–321. DOI: 10.1002/hep.22310.

Boudeau, Jerome; Sapkota, Gopal; Alessi, Dario R. (2003): LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. In: *FEBS Letters* 546 (1), S. 159–165.

Braconi, Chiara; Swenson, Erica; Kogure, Takayuki; Huang, Nianyuan; Patel, Tushar (2010): Targeting the IL-6 dependent phenotype can identify novel therapies for cholangiocarcinoma. In: *PloS one* 5 (12), e15195. DOI: 10.1371/journal.pone.0015195.

Cantó, Carles; Auwerx, Johan (2010): AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67 (20), S. 3407–3423. DOI: 10.1007/s00018-010-0454-z.

Cardinale, Vincenzo; Semeraro, Rossella; Torrice, Alessia; Gatto, Manuela; Napoli, Cristina; Bragazzi, Maria Consiglia et al. (2010): Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma. New insight into epidemiology and risk factors. In: *World journal of gastrointestinal oncology* 2 (11), S. 407–416. DOI: 10.4251/wjgo.v2.i11.407.

Carling, David; Mayer, Faith V.; Sanders, Matthew J.; Gamblin, Steven J. (2011): AMP-activated protein kinase. Nature's energy sensor. In: *Nature chemical biology* 7 (8), S. 512–518. DOI: 10.1038/nchembio.610.

Carretero, J.; Medina, P. P.; Blanco, R.; Smit, L.; Tang, M.; Roncador, G. et al. (2007): Dysfunctional AMPK activity, signalling through mTOR and survival in

response to energetic stress in LKB1-deficient lung cancer. In: *Oncogene* 26 (11), S. 1616–1625. DOI: 10.1038/sj.onc.1209951.

Chaiteerakij, Roongruedee; Yang, Ju Dong; Harmsen, William S.; Slettedahl, Seth W.; Mettler, Teresa A.; Fredericksen, Zachary S. et al. (2013): Risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma. Association between metformin use and reduced cancer risk. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57 (2), S. 648–655. DOI: 10.1002/hep.26092.

Cheng, Jidong; Huang, Tianliang; Li, Youfeng; Guo, Yubai; Zhu, Yuzhang; Wang, Qingjia et al. (2014): AMP-activated protein kinase suppresses the in vitro and in vivo proliferation of hepatocellular carcinoma. In: *PloS one* 9 (4), e93256. DOI: 10.1371/journal.pone.0093256.

Chuang, Hsiao-Ching; Chou, Chih-Chien; Kulp, Samuel K.; Chen, Ching-Shih (2014): AMPK as a potential anticancer target - friend or foe? In: *Current pharmaceutical design* 20 (15), S. 2607–2618.

Dokduang, Hasaya; Techasen, Anchalee; Namwat, Nisana; Khuntikeo, Narong; Pairojkul, Chawalit; Murakami, Yoshinori et al. (2014): STATs profiling reveals predominantly-activated STAT3 in cholangiocarcinoma genesis and progression. In: *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences* 21 (10), S. 767–776. DOI: 10.1002/jhbp.131.

Faubert, Brandon; Boily, Gino; Izreig, Said; Griss, Takla; Samborska, Bozena; Dong, Zhifeng et al. (2013): AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. In: *Cell metabolism* 17 (1), S. 113–124. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.12.001.

Florez, Jose C. (2017): The pharmacogenetics of metformin. In: *Diabetologia* 60 (9), S. 1648–1655. DOI: 10.1007/s00125-017-4335-y.

Fujimori, Takayuki; Kato, Kiyohito; Fujihara, Shintaro; Iwama, Hisakazu; Yamashita, Takuma; Kobayashi, Kiyoyuki et al. (2015): Antitumor effect of metformin on cholangiocarcinoma. In vitro and in vivo studies. In: *Oncology reports* 34 (6), S. 2987–2996. DOI: 10.3892/or.2015.4284.

Ge, Rongbin; Wang, Zongwei; Wu, Shulin; Zhuo, Yangjia; Otsetov, Aleksandar G.; Cai, Chao et al. (2015): Metformin represses cancer cells via alternate pathways in N-cadherin expressing vs. N-cadherin deficient cells. In: *Oncotarget* 6 (30), S. 28973–28987. DOI: 10.18632/oncotarget.5023.

Hardie, D. Grahame (2004): The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. In: *Journal of cell science* 117 (Pt 23), S. 5479–5487. DOI: 10.1242/jcs.01540.

Hardie, D. Grahame (2014): AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. In: *Cell metabolism* 20 (6), S. 939–952. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.09.013.

Hardie, D. Grahame (2015): Molecular Pathways: Is AMPK a Friend or a Foe in Cancer? In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (17), S. 3836–3840. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3300.

Hu, Ming-Hung; Chen, Li-Ju; Chen, Yen-Lin; Tsai, Ming-Shen; Shiau, Chung-Wai; Chao, Tzu-I et al. (2017): Targeting SHP-1-STAT3 signaling. A promising therapeutic approach for the treatment of cholangiocarcinoma. In: *Oncotarget* 8 (39), S. 65077–65089. DOI: 10.18632/oncotarget.17779.

Jing, Ming; Ismail-Beigi, Faramarz (2007): Critical role of 5'-AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in response to inhibition of oxidative phosphorylation. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 292 (1), C477-87. DOI: 10.1152/ajpcell.00196.2006.

Jones, Russell G.; Plas, David R.; Kubek, Sara; Buzzai, Monica; Mu, James; Xu, Yang et al. (2005): AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. In: *Molecular cell* 18 (3), S. 283–293. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.03.027.

Kaewpitoon, Soraya J.; Loyd, Ryan A.; Rujirakul, Ratana; Panpimanmas, Sukij; Matrakool, Likit; Tongtawee, Taweesak et al. (2015): Benefits of Metformin Use for Cholangiocarcinoma. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 16 (18), S. 8079–8083.

Kennedy, Lindsey; Hargrove, Laura; Demieville, Jennifer; Francis, Nicole; Seils, Rowan; Villamaria, Sara; Francis, Heather (2017): Recent Advances in Understanding Cholangiocarcinoma. In: *F1000Research* 6, S. 1818. DOI: 10.12688/f1000research.12118.1.

Kirstein, Martha M.; Vogel, Arndt (2016): Epidemiology and Risk Factors of Cholangiocarcinoma. In: *Visceral medicine* 32 (6), S. 395–400. DOI: 10.1159/000453013.

Lee, Gong-Rak; Jang, Soo Hwa; Kim, Chang Jae; Kim, Ah-Ram; Yoon, Dong-Joon; Park, Neung-Hwa; Han, In-Seob (2014): Capsaicin suppresses the migration of cholangiocarcinoma cells by down-regulating matrix metalloproteinase-9 expression via the AMPK-NF-kappaB signaling pathway. In: *Clinical & experimental metastasis* 31 (8), S. 897–907. DOI: 10.1007/s10585-014-9678-x.

Li, Linna; Li, Wenliang (2015): Epithelial-mesenchymal transition in human cancer. Comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetics, and differentiation. In: *Pharmacology & therapeutics* 150, S. 33–46. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.004.

Li, Weidong; Hua, Baojin; Saud, Shakir M.; Lin, Hongsheng; Hou, Wei; Matter, Matthias S. et al. (2015a): Berberine regulates AMP-activated protein kinase signaling pathways and inhibits colon tumorigenesis in mice. In: *Molecular carcinogenesis* 54 (10), S. 1096–1109. DOI: 10.1002/mc.22179.

Li, Weidong; Saud, Shakir M.; Young, Matthew R.; Chen, Guohong; Hua, Baojin (2015b): Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. In: *Oncotarget* 6 (10), S. 7365–7378. DOI: 10.18632/oncotarget.3629.

Ling, Sunbin; Feng, Tingting; Ke, Qinghong; Fan, Ning; Li, Lei; Li, Zhongxing et al. (2014): Metformin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. In: *Oncology reports* 31 (6), S. 2611–2618. DOI: 10.3892/or.2014.3151.

Ling, Sunbin; Xie, Haiyang; Yang, Fan; Shan, Qiaonan; Dai, Haojiang; Zhuo, Jianyong et al. (2017): Metformin potentiates the effect of arsenic trioxide suppressing intrahepatic cholangiocarcinoma. Roles of p38 MAPK, ERK3, and

mTORC1. In: *Journal of hematology & oncology* 10 (1), S. 59. DOI: 10.1186/s13045-017-0424-0.

Mihaylova, Maria M.; Shaw, Reuben J. (2011): The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. In: *Nature cell biology* 13 (9), S. 1016–1023. DOI: 10.1038/ncb2329.

Morales, Daniel R.; Morris, Andrew D. (2015): Metformin in cancer treatment and prevention. In: *Annual review of medicine* 66, S. 17–29. DOI: 10.1146/annurev-med-062613-093128.

Motoshima, Hiroyuki; Goldstein, Barry J.; Igata, Motoyuki; Araki, Eiichi (2006): AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. In: *The Journal of physiology* 574 (Pt 1), S. 63–71. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.108324.

Müller, Alena; Barat, Samarpita; Chen, Xi; Bui, Khac Cuong; Bozko, Przemyslaw; Malek, Nisar P.; Plentz, Ruben R. (2016): Comparative study of anti-tumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines. In: *International journal of oncology* 48 (5), S. 2025–2034. DOI: 10.3892/ijo.2016.3411.

O'Dell, Michael R.; Huang, Jing Li; Whitney-Miller, Christa L.; Deshpande, Vikram; Rothberg, Paul; Grose, Valerie et al. (2012): Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma. In: *Cancer research* 72 (6), S. 1557–1567. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3596.

Pawlyk, Aaron C.; Giacomini, Kathleen M.; McKeon, Catherine; Shuldiner, Alan R.; Florez, Jose C. (2014): Metformin pharmacogenomics: current status and future directions. In: *Diabetes* 63 (8), S. 2590–2599. DOI: 10.2337/db13-1367.

Plentz, Ruben R.; Malek, Nisar P. (2015): Clinical presentation, risk factors and staging systems of cholangiocarcinoma. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 29 (2), S. 245–252. DOI: 10.1016/j.bpg.2015.02.001.

Rajamohan, Francis; Reyes, Allan R.; Frisbie, Richard K.; Hoth, Lise R.; Sahasrabudhe, Parag; Magyar, Rachelle et al. (2016): Probing the enzyme kinetics, allosteric modulation and activation of alpha1- and alpha2-subunit-

containing AMP-activated protein kinase (AMPK) heterotrimeric complexes by pharmacological and physiological activators. In: *The Biochemical journal* 473 (5), S. 581–592. DOI: 10.1042/BJ20151051.

Razumilava, Nataliya; Gores, Gregory J. (2014): Cholangiocarcinoma. In: *The Lancet* 383 (9935), S. 2168–2179. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61903-0.

Rizvi, Sumera; Gores, Gregory J. (2013): Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. In: *Gastroenterology* 145 (6), S. 1215–1229. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.013.

Saengboonmee, Charupong; Seubwai, Wunchana; Cha'on, Ubon; Sawanyawisuth, Kanlayanee; Wongkham, Sopit; Wongkham, Chaisiri (2017): Metformin Exerts Antiproliferative and Anti-metastatic Effects Against Cholangiocarcinoma Cells by Targeting STAT3 and NF- κ B. In: *Anticancer research* 37 (1), S. 115–123. DOI: 10.21873/anticancerres.11296.

Saijyo, S.; Kudo, T.; Suzuki, M.; Katayose, Y.; Shinoda, M.; Muto, T. et al. (1995): Establishment of a new extrahepatic bile duct carcinoma cell line, TFK-1. In: *The Tohoku journal of experimental medicine* 177 (1), S. 61–71.

Sanli, Toran; Steinberg, Gregory R.; Singh, Gurmit; Tsakiridis, Theodoros (2014): AMP-activated protein kinase (AMPK) beyond metabolism: a novel genomic stress sensor participating in the DNA damage response pathway. In: *Cancer biology & therapy* 15 (2), S. 156–169. DOI: 10.4161/cbt.26726.

Shaib, Yasser; El-Serag, Hashem B. (2004): The epidemiology of cholangiocarcinoma. In: *Seminars in liver disease* 24 (2), S. 115–125. DOI: 10.1055/s-2004-828889.

Shaw, R. J. (2009): LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 196 (1), S. 65–80. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2009.01972.x.

Shaw, Reuben J.; Kosmatka, Monica; Bardeesy, Nabeel; Hurley, Rebecca L.; Witters, Lee A.; DePinho, Ronald A.; Cantley, Lewis C. (2004): The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. In: *Proceedings of the National Acade-*

my of Sciences of the United States of America 101 (10), S. 3329–3335. DOI: 10.1073/pnas.0308061100.

Sinnett, Sarah E.; Brenman, Jay E. (2014): Past strategies and future directions for identifying AMP-activated protein kinase (AMPK) modulators. In: *Pharmacology & therapeutics* 143 (1), S. 111–118. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.02.008.

Techasen, Anchalee; Loilome, Watcharin; Namwat, Nisana; Khuntikeo, Narong; Puapairoj, Anucha; Jearanaikoon, Patcharee et al. (2014): Loss of E-cadherin promotes migration and invasion of cholangiocarcinoma cells and serves as a potential marker of metastasis. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (9), S. 8645–8652. DOI: 10.1007/s13277-014-2087-6.

Trinh, Son Xuan; Nguyen, Huyen Thi Bich; Saimuang, Kween; Prachayasittikul, Virapong; Chan On, Waraporn (2017): Metformin Inhibits Migration and Invasion of Cholangiocarcinoma Cells. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 18 (2), S. 473–477. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.2.473.

Valle, Juan; Wasan, Harpreet; Palmer, Daniel H.; Cunningham, David; Anthony, Alan; Maraveyas, Anthony et al. (2010): Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. In: *The New England journal of medicine* 362 (14), S. 1273–1281. DOI: 10.1056/NEJMoa0908721.

van Zijl, Franziska; Krupitza, Georg; Mikulits, Wolfgang (2011): Initial steps of metastasis. Cell invasion and endothelial transmigration. In: *Mutation research* 728 (1-2), S. 23–34. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.05.002.

Viollet, Benoit; Athes, Yoni; Mounier, Remi; Guigas, Bruno; Zarrinpashneh, Elham; Horman, Sandrine et al. (2009): AMPK. Lessons from transgenic and knockout animals. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14, S. 19–44.

Viollet, Benoit; Horman, Sandrine; Leclerc, Jocelyne; Lantier, Louise; Foretz, Marc; Billaud, Marc et al. (2010): AMPK inhibition in health and disease. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45 (4), S. 276–295. DOI: 10.3109/10409238.2010.488215.

- Vogel, Arndt; Wege, Henning; Caca, Karel; Nashan, Bjorn; Neumann, Ulf (2014): The diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. In: *Deutsches Arzteblatt international* 111 (44), S. 748–754. DOI: 10.3238/arztebl.2014.0748.
- Wake, Matthew S.; Watson, Christine J. (2015): STAT3 the oncogene - still eluding therapy? In: *The FEBS journal* 282 (14), S. 2600–2611. DOI: 10.1111/febs.13285.
- Watanapa, P.; Watanapa, W. B. (2002): Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. In: *The British journal of surgery* 89 (8), S. 962–970. DOI: 10.1046/j.1365-2168.2002.02143.x.
- Wheelock, Margaret J.; Shintani, Yasushi; Maeda, Masato; Fukumoto, Yuri; Johnson, Keith R. (2008): Cadherin switching. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 6), S. 727–735. DOI: 10.1242/jcs.000455.
- Yan, Xuebing; Yan, Leilei; Liu, Sihong; Shan, Zezhi; Tian, Yuan; Jin, Zhiming (2015): N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. In: *Molecular medicine reports* 12 (2), S. 2999–3006. DOI: 10.3892/mmr.2015.3687.
- Zheng, Longyi; Yang, Wen; Wu, Fuquan; Wang, Chao; Yu, Lexing; Tang, Liang et al. (2013): Prognostic significance of AMPK activation and therapeutic effects of metformin in hepatocellular carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (19), S. 5372–5380. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0203.
- Zheng, Tongsen; Hong, Xuehui; Wang, Jiabei; Pei, Tiemin; Liang, Yingjian; Yin, Dalong et al. (2014): Gankyrin promotes tumor growth and metastasis through activation of IL-6/STAT3 signaling in human cholangiocarcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (3), S. 935–946. DOI: 10.1002/hep.26705.
- Zhou, J.; Huang, W.; Tao, R.; Ibaragi, S.; Lan, F.; Ido, Y. et al. (2009): Inactivation of AMPK alters gene expression and promotes growth of prostate cancer cells. In: *Oncogene* 28 (18), S. 1993–2002. DOI: 10.1038/onc.2009.63.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Ich habe die Doktorarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. Ruben R. Plentz in der Medizinischen Klinik I der Universitätskliniken Tübingen durchgeführt.

Das Konzept des Projekts entstammt Prof. Dr. Plentz. Meine Einarbeitung und Anleitung im Labor übernahm Cuong Bui Khac. Die immunhistochemische Färbung führte Cuong Bui Khac gemeinsam mit mir durch. Alle weiteren Versuche habe ich nach abgeschlossener Einarbeitung selbständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Die Tabellen und Bilder wurden von mir erstellt. Die in der Einleitung von mir übernommenen Grafiken wurden dementsprechend gekennzeichnet. Das Manuskript wurde selbständig von mir, mit Hilfe von Verbesserungsvorschlägen von Prof. Dr. Plentz, geschrieben. Cuong Bui Khac hat, stellvertretend für mich, unter dem Titel „Rolle der katalytischen Anteile von AMPK (5´ Adenosin monophosphat-aktivierte Protein Kinase) beim Cholangiokarzinom“ am 14.09.2017 auf dem Kongress Viszeralmedizin 2017 in Dresden einen Vortrag mit Teilen meiner Ergebnisse gehalten. Ich versichere, dass alle verwendeten Quellen im Literaturverzeichnis aufgeführt sind und alle übernommenen Stellen entsprechend gekennzeichnet sind.

Tübingen, den

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ruben R. Plentz für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Forschungsgruppe durchzuführen, die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der Arbeit im Labor und während des Schreibprozesses.

Ein besonderer Dank gilt Cuong Bui Khac für die Einarbeitung und Unterstützung im Labor, Hilfe bei der Durchführung der Versuche, ständige Bereitschaft bei Fragen und das freundschaftliche Miteinander. Genauso danke ich allen weiteren Mitgliedern der AG Plentz und der AG Malek für die interessanten fachlichen Diskussionen und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Des Weiteren danke ich Ye-Si Shin-Junghanß für die moralische Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei Marcel Wurdak bedanke ich mich für die Ablenkung in den zahlreichen gemeinsamen Mittagspausen und die emotionale Unterstützung.

Ein weiterer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit.