

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin I**

**(Schwerpunkte: Gastroenterologie, Hepatologie,  
Infektionskrankheiten)**

**Antitumoröse Wirkung von Bromelain und Papain auf  
humane Zellen des Cholangiokarzinoms**

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

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

**vorgelegt von  
Müller, Alena**

**2017**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. R. Plentz

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Weisel

Tag der Disputation: 20. Juli 2017



## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>15</b>
1.1 <u>Cholangiozelluläres Karzinom (CCC)</u> .....	<u>15</u>
1.1.1 Definition und Klassifikation.....	15
1.1.2 Epidemiologie.....	15
1.1.3 Risikofaktoren.....	16
1.1.4 Pathogenese.....	17
1.1.5 Klinik.....	19
1.1.6 Diagnostik.....	19
1.1.6.1 Laborwerte.....	19
1.1.6.2 Bildgebung.....	20
1.1.7 Stadieneinteilung.....	20
1.1.8 Therapie.....	21
1.1.8.1 Chirurgische Verfahren.....	21
1.1.8.1.1 Operative Resektion.....	21
1.1.8.1.2 Lebertransplantation.....	21
1.1.8.2 Chemotherapie.....	22
1.1.8.3 Target-Therapie.....	23
1.1.8.4 Supportive Maßnahmen und Ausblick auf mögliche Therapieoptionen.....	23
1.1.9 Prognose.....	23
1.2 <u>Bromelain</u> .....	<u>24</u>
1.3 <u>Papain</u> .....	<u>25</u>
1.4 <u>NFκB /AMPK- Signalweg</u> .....	<u>26</u>

1.5 <u>Ziel der Arbeit</u>	28
<b>2 <u>Materialien und Methoden</u></b>	<b>29</b>
2.1 <u>Materialien</u>	29
2.1.1 Chemikalien	29
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	31
2.1.3 Geräte	32
2.1.4 Antikörper und siRNA	35
2.1.5 Gele, Puffer und Lösungen	37
2.1.6 Software- Programme	39
2.2 <u>Methoden</u>	40
2.2.1 Methoden der Zellkultur	40
2.2.1.1 Zelllinien	40
2.2.1.2 Zellkultivierung	40
2.2.1.3 Subkultivierung der Zellen	40
2.2.1.4 Quantifizieren der Zellen	40
2.2.1.5 Kryokonservierung der Zellen	41
2.2.2 Herstellung der Bromelain- und Papain- Stammlösung	42
2.2.3 Analyse der Proliferation mit dem WST-1 Assay	42
2.2.4 Analyse der Migration mit dem Wound-Healing Assay	43
2.2.5 Analyse der Invasion mit dem Invasions- Assay	44

2.2.6	Durchflusszytometrische Apoptosemessung mit Annexin V- FITC.....	45
2.2.7	Western- Blot.....	47
2.2.7.1	Zellkultivierung, -ernte und -lyse.....	47
2.2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration und Herstellung der Proben für die Elektrophorese...	48
2.2.7.3	Herstellung der Trenn- und Sammelgele.....	48
2.2.7.4	Elektrophorese.....	49
2.2.7.5	Proteintransfer.....	49
2.2.7.6	Antikörper- Inkubation und Entwicklung.....	50
2.2.8	Herunterregulation der Genexpression mit siRNA.....	50
2.2.9	Statistik.....	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
3.1	<u>Analyse der Zellproliferation nach Bromelain-/ Papain- Applikation</u>	<u>52</u>
3.2	<u>Analyse der Migration nach Bromelain-/Papain- Applikation</u>	<u>56</u>
3.3	<u>Analyse der Invasion nach Bromelain-/Papain- Applikation</u>	<u>60</u>
3.4	<u>Analyse der Apoptose nach Bromelain-/Papain- Applikation</u>	<u>63</u>
3.5	<u>Analyse der Bromelain-/ Papain-Wirkung auf CCC-Zellen auf Proteinebene</u>	<u>66</u>
3.5.1	Ergebnisse des Western-Blots mit dem Marker PARP.....	66

3.5.2	Ergebnisse der EMT- Untersuchung.....	66
3.5.3	Ergebnisse der Untersuchung des NFκB/ AMPK- Signalweges.....	68
3.6	<u>Ergebnisse der Stilllegung des NFκB- Gens mit siRNA</u> .....	71
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>94</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Studie von Valle et al.....	22
Abb. 2:	NFκB/ AMPK- Signalweg.....	27
Abb. 3:	WST-1 Assay nach Bromelain- Applikation.....	54
Abb. 4:	WST-1 Assay nach Papain- Applikation.....	55
Abb. 5:	Migrations- Assay nach Bromelain- Applikation.....	58
Abb. 6:	Migrations- Assay nach Papain-Applikation.....	59
Abb. 7:	Invasions- Assay nach Bromelain- Applikation.....	61
Abb. 8:	Invasions- Assay nach Papain- Applikation.....	62
Abb. 9:	Apoptosemessung nach Bromelain- Applikation.....	64
Abb. 10:	Apoptosemessung nach Papain- Applikation.....	65
Abb. 11:	EMT- Expression in mit Bromelain behandelten CCC- Zellen (TFK-1, SZ-1).....	67
Abb. 12:	EMT- Expression in mit Papain behandelten CCC- Zellen (TFK-1, SZ-1).....	67
Abb. 13:	Immunoblot des Effekts von Bromelain auf den NFκB/ AMPK- Signalweg und auf die nachgeschalteten Signalwege.....	69
Abb. 14:	Immunoblot des Effekts von Papain auf den NFκB/ AMPK- Signalweg und auf die nachgeschalteten Signalwege.....	70
Abb. 15:	Effekt der NFκB siRNA Behandlung auf CCC-Zellen.....	72

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Liste der Primärantikörper für den Immunoblot.....	35
Tab. 2:	Liste der Sekundärantikörper für den Immunoblot.....	36
Tab. 3:	Liste der siRNA für die NFkB- Genstilllegung.....	36
Tab. 4:	Protokoll zur Herstellung der Trenn- und Sammelgele (Polyacrylamidgele) für den Immunoblot.....	37

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AICAR	5- Aminoimidazole- 4- Carboxamide- Ribonukleotide
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
p-AMPK	phosphorilierte Adenosinmonophosphat -aktivierte Proteinkinase
APC-Gen	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
APS	Ammoniumpersulfat
ASIR	Altersstandardisierte Inzidenzrate
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-Proteine	B-cell-lymphoma-Protein
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CEA	Carcinoembryonales Antigen
Cox-2	Cyclooxygenase 2
C. sinensis	Clonorchis sinensis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
DPC4	Deleted in Pancreatic Carcinoma, Locus 4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor

EGFR	epithelial growth factor receptor = epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EH-CCC	extrahepatisches Cholangiozelluläres Karzinom
EMT	Epithelial- mesenchymale Transition
ERCP	Endoskopisch Retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	extracellular-signal regulated kinases
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GI-Zellen	Gastrointestinale Zellen
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	hepatocyte growth factor = Hepatozytenwachstumsfaktor
HUVEC	humane Endothelzellen der Nabelvene
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-1	Insulin-like-growth-factor 1
IH-CCC	intrahepatisches Cholangiozelluläres Karzinom
IL-6	Interleukin 6
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
Mcl-1	myeloid leukemia-1
MEK	mitogen aktivierte ERK Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie

MRT	Magnetresonanztomographie
NFκB	nuclear factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
O. viverrini	Opisthorchis viverrini
PARP	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	phosphat buffered saline = Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDT	Photodynamische Therapie
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTCP	Perkutane Transhepatische Cholangiopankreatikographie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFA	intraduktale Radiofrequenzablation
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid = Boten-Ribonukleinsäure
siRNA	small interfering ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumdodecylsulfat
SIRT	Selektive Interne Radiotherapie
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TACE	transarterielle Chemoembolisation

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNM	Tumor Nodes Metastasis = Tumor Lymphknoten Metastasen
cTNM	klinische TNM Klassifikation
pTNM	pathologische TNM Klassifikation
TNT	Trinitrotoluen
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WST-1	WatersolubleTetrazolium

### Einheiten

A	Ampere
°C	Grad Celsius
d	Tag
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
m	Meter
min	Minute

mol	Mol
U	Unit
V	Volt

### Einheitenpräfixe

k	Kilo
m	Milli
μ	Mikro
n	Nano

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Cholangiozelluläres Karzinom (CCC)**

#### **1.1.1 Definition und Klassifikation**

Das CCC ist ein primärer Lebertumor, der aus der malignen Transformation der Epithelzellen der intra- und extrahepatischen Gallengänge entsteht [3-5]. Bei über 90 % der CCC handelt es sich um Adenokarzinome, die in gut, mäßig und schlecht differenziert eingeteilt werden [6, 7].

Die Klassifikation des CCC erfolgt üblicherweise anhand der anatomischen Lokalisation [4]. So wird zwischen dem intra- (IH-CCC) und extrahepatischen CCC (EH-CCC) unterschieden, wobei das EH-CCC mit 80-90 % der CCC häufiger vorkommt als das IH-CCC [4, 5]. Das EH-CCC wird abhängig von seiner Lage innerhalb des extrahepatischen Gallengangsystems noch weiter unterteilt in eine proximale perihiliäre Form, auch als Klatskin-Tumor bezeichnet, und eine distale Form [4].

#### **1.1.2 Epidemiologie**

Das CCC ist nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) der zweit häufigste primäre Lebertumor und für 10–20 % der Todesfälle durch hepatobiliäre Malignitäten verantwortlich [5, 8-11]. So starben 2010 in Deutschland 2182 Menschen an einem IH-CCC und 991 Menschen an einem EH-CCC [12]. Die Prävalenz und Inzidenz des CCC zeigen eine große geographische Variabilität, was unter anderem auf eine unterschiedliche Verteilung der Risikofaktoren und auf genetische Ursachen zurückgeführt werden kann [6, 10, 13, 14]. So liegt die höchste altersstandardisierte Inzidenzrate (ASIR) des IH-CCC in den nordöstlichen Provinzen Thailands, wo der Leberegel *Opisthorchis viverrini* endemisch ist (ASIR bis zu 113 pro 100 000 Personen pro Jahr bei Männern und 50 pro 100 000 bei Frauen). In diesem Gebiet stellt das CCC auch 89 % der primären Lebertumore dar [15, 16]. In Europa beträgt die ASIR hingegen weniger als 1.5 Fälle pro 100 000 Einwohner [13, 14]. Epidemiologische Studien lassen einen weltweiten Anstieg der Inzidenz des CCC vermuten [17, 18]. Das typische

Erkrankungsalter liegt in westlichen Nationen bei > 65 Jahren [9]. Eine Ausnahme hierbei bilden Patienten mit einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), die deutlich früher an einem CCC erkranken können (30.-50. Lebensjahr) [6, 9]. Vergleicht man die Häufigkeit eines CCC zwischen Männern und Frauen zeigt sich eine geringe männliche Prädominanz für das CCC [4].

### **1.1.3 Risikofaktoren**

Bei der Mehrheit der Patienten tritt das CCC sporadisch auf und die genaue Ursache ist unbekannt [4, 6]. Es gibt zahlreiche Studien, die sich mit möglichen Risikofaktoren für die Entstehung eines CCC beschäftigt haben. So gelten unter anderem Erkrankungen wie Cholangitis, PSC, Leberzirrhose, primär biliäre Zirrhose (PBC), Choledochuszysten, Choledocholithiasis, Cholezystitis und parasitäre Gallengangsinfektionen mit Leberegeln sowie Diabetes mellitus Typ II und ein Alkoholkonsum > 80 g/d zu möglichen Risikofaktoren für die Entstehung eines EH-CCC und IC-CCC. Eine Hepatitis-B - und -C Infektion, Hepatolithiasis, Nikotinkonsum und Adipositas stellen vor allem Risikofaktoren für die Entwicklung eines IH-CCC dar [19, 20].

Als bekannter Risikofaktor für die Entwicklung eines CCC gilt die PSC [4]. Patienten mit einer PSC haben ein Lebenszeitrisiko von 7-14 % ein CCC zu entwickeln [21-25]. Dabei werden bis zu 50 % der Tumore begleitend zur Diagnose PSC oder innerhalb eines Jahres nach der Diagnose PSC entdeckt, danach liegt die jährliche Inzidenz zwischen 0,5 und 1,5 % pro Jahr [21, 22, 24, 25].

Zu den Risikofaktoren, die mitverantwortlich für die geographische Variabilität in Inzidenz und Prävalenz des CCC sind, gehören Infektionen mit Leberegeln und Hepatolithiasis [26]. Bei den Leberegeln zählen vor allem die Spezies *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis* zu den möglichen Risikofaktoren für die Entwicklung eines CCC [27]. Sie sind in Teilen von Japan und Südostasien endemisch und werden über den Verzehr von ungekochtem Fisch aufgenommen [6, 26, 28]. Die Parasiten können über Jahre im menschlichen Körper persistieren

und chronische Entzündungen im biliären System verursachen, wodurch das Risiko für die Entwicklung eines CCC zunimmt [29]. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum die höchste altersstandardisierte Inzidenzrate (ASIR) des IH-CCC in den nordöstlichen Provinzen Thailands gefunden wurde [16]. Die IARC (International Agency for Research on Cancer) erkannte 1994 *O. viverrini* und 2009 *C. sinensis* als karzinogen für Menschen an. Hepatolithiasis ist ebenfalls in einigen Teilen Asiens endemisch, wohingegen es in der westlichen Welt selten auftritt. Es kann durch die Vermittlung von Entzündungen und epithelialer Proliferation zur Entwicklung eines CCC führen. Die Inzidenzrate eines CCC bei Hepatolithiasis liegt bei 10 % [20, 30].

Als weiterer Risikofaktor gelten Gallengangszysten, die eine seltene kongenitale Anomalie sind. Das Lebenszeitrisko für die Entwicklung eines CCC liegt beim Erwachsenen zwischen 10-30 % [31, 32]. Die Exposition gegenüber bestimmten chemischen Stoffen und Radionukliden wie Nitrosaminen, Dioxin, Asbest, Radon oder Thorotrast gilt ebenfalls als Risikofaktor für ein CCC [6, 26, 33].

#### **1.1.4 Pathogenese**

Die exakten molekularen Mechanismen, die für die Entwicklung, das Wachstum und die Metastasierung beim CCC verantwortlich sind, sind noch nicht vollständig verstanden. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass eine chronische Inflammation und biliäre Obstruktion zwei wesentliche Faktoren sind, die die Entwicklung eines CCC begünstigen [6]. Durch die Entzündung kommt es zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) und HGF (Hepatozytenwachstumsfaktor) in die biliäre Mikroumgebung [34-36]. So spielt unter anderem das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) eine wichtige Rolle, das von CCC-Zellen in hohem Maße produziert wird [37, 38]. IL-6 aktiviert die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, die unter anderem an Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Zellen beteiligt zu sein scheint [39, 40]. Zudem reguliert IL-6 die Expression des Proteins Mcl-1 (myeloid leukemia-1), welches zur anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinfamilie gehört, über STAT3- und AKT-

regulierte Signalwege hoch [5, 41, 42] und führt so zur Umgehung der Apoptose der Cholangiozyten [5, 37, 38]. Auch Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine wesentliche Rolle in der CCC-Karzinogenese. Durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 oder Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wird die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) aktiviert, wodurch es zur erhöhten Bildung von NO und reaktiven Sauerstoff-Spezien kommt, die mit der zellulären DNA interagieren und so die Entstehung verschiedener Mutationen triggern können. Eine Überexpression der iNOS wurde in mehr als 70 % der CCC immunhistochemisch nachgewiesen [43-46]. Weitere Studien belegen, dass auch die Cyclooxygenase COX-2 eine Rolle in der Pathogenese des CCC spielt. COX-2 ist ein Enzym in der Prostaglandin-Biosynthese und führt indirekt über Substrate aus dieser Biosynthese wie z.B. Prostaglandin E zu einer Beschleunigung des Zellzyklus und Inhibition apoptotischer Signale [47]. Es kann durch pro-inflammatorische Zytokine, NO und Oxysterole aus der Gallenflüssigkeit aktiviert werden [47, 48]. Weitere Faktoren, die eine Rolle in der Entwicklung, im Wachstum oder in der Metastasierung des CCC spielen könnten sind Östrogene, Insulin-like-growth-factor 1 (IGF-1), Leptin, Opioid-Rezeptormodulatoren, Endothelin und Serotonin [43, 49-52]. Durch diese biliäre Mikroumgebung wird die Entstehung von Schäden in den DNA-Mismatch-Reparaturgenen, Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen begünstigt, wodurch es zur malignen Transformation des Gallengangepithels kommen kann. In Studien wurde unter anderem eine Mutation im Proto-Onkogen k-Ras und im Tumorsuppressorgen p53 beschrieben, die mit einer Zunahme der zytologischen Atypie und Tumoraggressivität assoziiert sind [53-55]. Andere Studien zeigten außerdem eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p16<sup>INK4a</sup>, DPC4/Smad4, und APC [56-58].

Die Entwicklung des CCC stellt einen mehrstufigen Prozess dar. Auf Basis einer chronischen Entzündung und biliären Obstruktion kommt es zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber proliferativen Stimuli, zur Umgehung wachstumshemmender Faktoren, zur Dysregulation von apoptotischen Signalen und zur Reaktion auf angiogenetische Signale [34, 43]. Einige Signalwege, die dabei eine Rolle spielen, wurden bereits entschlüsselt und bilden Angriffspunkte

neuer Therapieansätze. Allerdings sind weiterhin die exakten molekularen Mechanismen der CCC-Karzinogenese nicht ausreichend verstanden, sodass die Erforschung von neuen Ansätzen aufgrund der bisher nur mäßig erfolgreichen Therapie notwendig ist.

### **1.1.5 Klinik**

Das CCC verläuft bei der Mehrheit der Patienten zunächst klinisch unauffällig und führt erst in fortgeschrittenen Stadien zu klinischen Symptomen, weshalb es oft erst in einem lokal fortgeschrittenen, nicht mehr resezierbaren Stadium diagnostiziert wird [5]. Patienten mit einem IH-CCC präsentieren sich meist mit unspezifischen Symptomen wie Abdominalschmerzen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Krankheitsgefühl und Nachtschweiß [59]. Patienten mit einem EH-CCC weisen Symptome wie Ikterus, dunkler Urin, heller Stuhl, Pruritus, Krankheitsgefühl und Gewichtsverlust auf [59].

### **1.1.6 Diagnostik**

Besteht der Verdacht auf ein CCC, kann dieser über eine Laboruntersuchung, eine entsprechende Bildgebung und pathologische Untersuchung verifiziert werden.

#### **1.1.6.1 Laborwerte**

Im Labor kann die Erhöhung der Cholestaseparameter Bilirubin, alkalische Phosphatase und  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase den Verdacht auf ein CCC verstärken, ist allerdings sehr unspezifisch [3, 60]. Als Tumormarker werden das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und das Carbohydrate-Antigen 19-9 (CA-19-9) verwendet, allerdings erreichen beide keine adäquate Spezifität für das CCC. Das CEA ist bei ungefähr 30 % der Patienten mit einem CCC erhöht [25, 61, 62]. CA-19-9 kann außer beim CCC auch bei einigen anderen Tumorarten wie Pankreas- und Magenkrebs und bei der PBC erhöht sein. Auch bei Rauchern kann es durch eine Cholangitis und Cholestase vorübergehend erhöht sein [5].

Da CA-19-9 typischerweise im Verlauf der Tumorerkrankung ansteigt, erlaubt es die Diagnose erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, in welchem keine radikale Therapie mehr möglich ist [5]. Interleukin-6 kann ebenfalls bei der Diagnose eines CCC helfen, wobei es auch bei Patienten mit einer benignen Gallenwegserkrankung, einem HCC und einer metastatischen Läsion erhöht sein kann [37, 63].

#### 1.1.6.2 Bildgebung

Bei der Bildgebung spielt zunächst die Sonographie eine wichtige Rolle, um Leber und Gallenwege darzustellen. Allerdings ist die Unterscheidung zu anderen intrahepatischen Raumforderungen in der Sonographie schwierig [64]. Durch ein MRT und eine Magnetresonananz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) können vaskuläre Invasion, Lymphknotenstatus und Metastasen beurteilt werden [65, 66]. Um die Diagnose eines CCC zu sichern, ist eine Histologie erforderlich. Mithilfe der endoskopischen retrograden Cholangiopankreatikographie (ERCP) und der perkutanen transhepatischen Cholangiographie (PTCD) kann eine Histologie der entsprechenden Läsion entnommen werden [67]. Die Cholangioskopie und endoskopische Sonographie mit Feinnadelaspiration sind weitere Methoden, um Gewebe histologisch zu untersuchen. Da das EH-CCC ein hoch desmoplastischer Tumor ist, der nur aus wenigen malignen Zellen in fibrotischem Gewebe besteht, kann eine Gewebsdiagnose auch negativ ausfallen [59].

#### 1.1.7 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des CCC erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der „Union for International Cancer Control“. Dabei werden Tumorausbreitung (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasen (M) berücksichtigt. Weiterhin wird zwischen cTNM und pTNM unterschieden, wobei cTNM die prätherapeutische klinische Klassifikation darstellt und für die Therapieauswahl wichtig ist, und pTNM die postoperative pathologische Einteilung darstellt, die für Prognose und die weitere Therapieplanung von Bedeutung ist [68]. Der Klatskin- Tumor kann

außerdem nach Bismuth-Corlette klassifiziert werden [69]. Je nachdem, welche anatomischen Strukturen infiltriert sind, kann er in Typ I bis IV eingeteilt werden. Dabei sind Typ I- Tumore unterhalb der Hepatikusgabel lokalisiert. Typ II- Tumore beziehen die Hepatikusgabel mit ein. Ist zusätzlich der rechte Hauptgallengang infiltriert, liegt ein Typ IIIa- Tumor vor, ist der linke Hauptgallengang betroffen, liegt ein Typ IIIb- Tumor vor. Sind beide Hauptgallengänge betroffen, liegt ein Typ IV- Tumor vor [69].

### **1.1.8 Therapie**

In der Therapie des CCC stellen die operative Resektion des Tumors oder in seltenen Fällen eine Lebertransplantation die einzigen kurativen Therapieoptionen dar [4, 5]. Allerdings befindet sich die Mehrheit der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, in dem nur noch die Möglichkeit einer palliativen Chemotherapie besteht [2, 59].

#### **1.1.8.1 Chirurgische Verfahren**

##### **1.1.8.1.1 Operative Resektion**

Für Patienten mit einem resezierbaren CCC stellt die R0-Resektion (= mikroskopisch freie Tumorränder) den Schlüssel zur kurativen Therapie dar [70]. Dabei ist eine ausgedehnte Leberresektion mit oder ohne Gefäßrekonstruktion und eine komplette Entfernung des extrahepatischen Gallengangsystems der momentane Goldstandard [71, 72]. In spezialisierten Zentren können so 5-Jahresüberlebensraten von bis zu 50 % erreicht werden [71, 72].

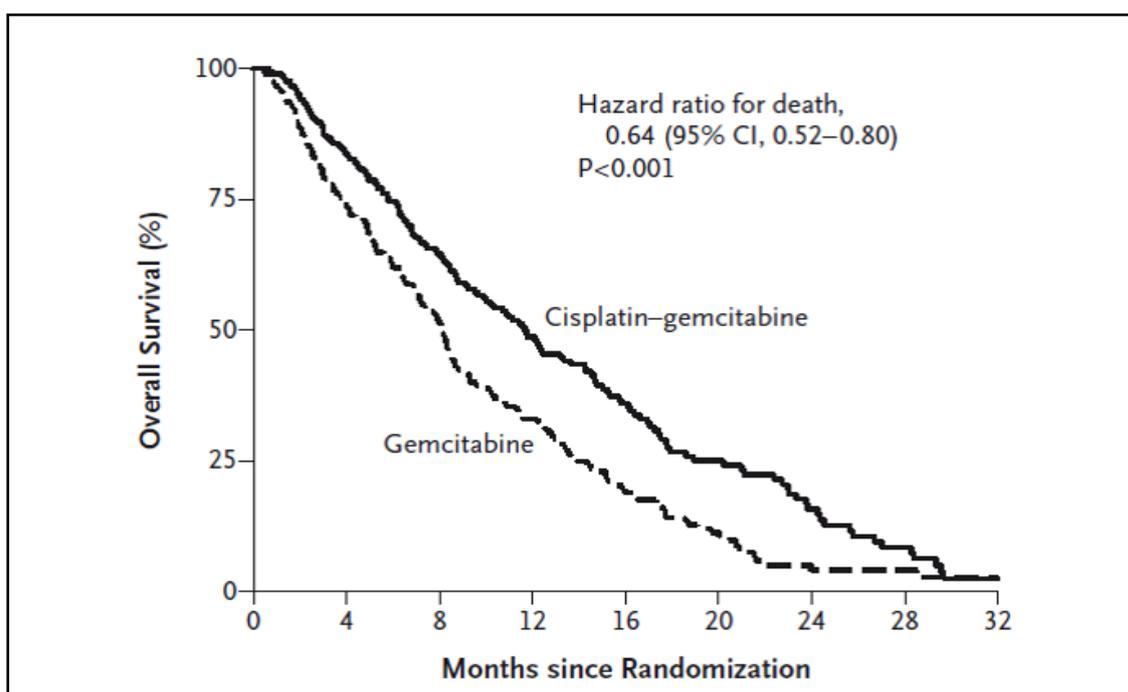
##### **1.1.8.1.2 Lebertransplantation**

Für sehr wenige, selektiv ausgewählte CCC- Patienten besteht die Möglichkeit einer orthotopen Lebertransplantation mit guten Überlebensergebnissen [59, 71]. Sie stellt allerdings keine Standardtherapie beim CCC dar, da Studien in den 1990er Jahren gezeigt hatten, dass es durch die anschließende Immunsuppression zu nicht akzeptablen Rückfallszahlen kam und aufgrund der

Knappheit an Organen eine Lebertransplantation Patienten mit einer höheren Überlebenschance vorbehalten wurde [73-76].

### 1.1.8.2 Chemotherapie

Für Patienten, die sich in einem fortgeschrittenen Tumorstadium mit lokaler Infiltration oder Metastasen befinden, kommt eine Operation nicht mehr in Frage und es besteht nur noch die Möglichkeit einer palliativen Chemotherapie. In einer Studie von Valle et al. wurde gezeigt, dass die Kombination aus Gemcitabine und Cisplatin zu einem signifikant längeren Überleben im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabine führte (11.7 vs. 8.1 Monate), sodass diese Kombination die momentane Standardtherapie in der palliativen Erstlinien- Behandlung des CCC darstellt (Abbildung 1) [2, 77]. Liegen Kontraindikationen gegen eine Therapie mit Cisplatin vor (z.B. Niereninsuffizienz) kann dieses durch Oxiplatin ersetzt werden. Studien zeigen dabei ein Gesamtüberleben von 8.3 bis 11 Monaten [78, 79]. Bei älteren oder komorbiden Patienten kann auch eine Monotherapie mit Gemcitabine erwogen werden [77].



**Abb. 1: Studie von Valle et al.:** Gegenüberstellung des Gesamtüberlebens (in %) bei einer Therapie mit Gemcitabine verglichen mit der Kombinationstherapie aus Gemcitabine und Cisplatin. Die Kombinationstherapie führt zu einem signifikant längeren Gesamtüberleben (11.7 vs. 8.1 Monate) [2].

### 1.1.8.3 Target- Therapie

Unter einer Target-Therapie versteht man den Einsatz von Wirkstoffen, die zielgerichtet auf Rezeptoren und Kinasen in einer Signalkaskade einwirken und so das Tumorstadium beeinflussen können. Seit das genetische Profil von verschiedenen Tumoren besser verstanden wird, kommt die Target-Therapie immer mehr zum Einsatz [77]. Auch beim CCC wurde in Studien unter anderem die Inhibition des EGFR (epithelial growth factor receptor), VEGF (Vascular endothelial growth factor), MEK (mitogen aktivierte ERK Kinase) und Multi-Kinase-Inhibitoren getestet. Allerdings zeigten sich bisher keine allzu großen Erfolge bzw. nur bei einzelnen Patienten, sodass die Target-Therapie beim CCC zum jetzigen Zeitpunkt keine große Rolle spielt [80-88].

### 1.1.8.4 Supportive Maßnahmen und Ausblick auf mögliche Therapieoptionen

Neben der antitumorösen Therapie spielen auch supportive Maßnahmen wie die endoskopische und perkutane Gallendrainage eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Patienten mit einem CCC, um Morbidität und Mortalität zu senken und die Lebensqualität bestmöglich zu erhalten [89-91]. Lokale Verfahren wie die Transarterielle Chemoembolisation (TACE), perkutane Ethanolinjektion, Selektive Interne Radiotherapie (SIRT) sowie lokale ablativ Behandlungen wie die Photodynamische Therapie (PDT) oder intraduktale Radiofrequenzablation (RFA) wurden bisher nur in kleinen Studien getestet, größere und randomisierte Studien laufen noch [92-99].

### 1.1.9 Prognose

Die Prognose des CCC ist abhängig vom Tumorstadium und der entsprechend durchgeführten Therapie. So liegt das 5- Jahresüberleben eines nicht mehr resezierbaren CCC bei weniger als 5 % [100]. Nach Resektion eines CCC hängt das Langzeitüberleben unter anderem davon ab, ob histopathologisch freie Resektionsränder erreicht wurden, wie viele Lymphknoten bereits betroffen waren und wo genau das CCC lokalisiert war [101, 102]. So liegt das 5- Jahresüberleben beim IH-CCC zwischen 44-48 %, beim perihiliären CCC zwischen 11-30 % und beim distalen CCC bei 28 % [103-105].

## **1.2 Bromelain**

Bromelain ist ein Extrakt aus dem Stamm und der unreifen Frucht der Ananas (*Ananas comosus*) [106]. Es besteht aus einem Gemisch von Proteasen und nicht-proteolytischen Bestandteilen [107], wobei es sich hauptsächlich um Sulfhydryl-enthaltende proteolytische Enzyme handelt. Außerdem enthält es Escharase [108], Peroxidase, saure Phosphatase, Glucosidase, Zellulase, verschiedene Proteaseinhibitoren, Glykoproteine, Kohlenhydrate und organisch gebundenes Calcium [106, 109]. Bromelain wird im Reformhaus als Nahrungsergänzungsmittel verkauft, welches die Verdauung und Wundheilung fördern und anti-entzündlich wirken soll [110, 111].

Die Wirkung von Bromelain auf den menschlichen Organismus wurde in verschiedenen experimentellen und klinischen Studien untersucht. So wurden anti-inflammatorische, anti-ödematöse, anti-thrombotische/ fibrinolytische und immunmodulatorische Effekte von Bromelain nachgewiesen [106, 112, 113]. Auch eine anti-angiogenetische Wirkung wurde beschrieben [114].

Mehrere Studien haben sich auch mit der Wirkung von Bromelain auf verschiedene Tumorentitäten beschäftigt. So wurde unter anderem die Wirkung von Bromelain auf gastrointestinale Zellen untersucht. Amini et al. zeigten in ihrer Studie, dass Bromelain in der Lage ist, die Proliferation von humanen Magen- und Kolon-Karzinomzellen zu inhibieren und Apoptose zu induzieren [115]. Romano et al. zeigten ebenfalls, dass Bromelain anti-proliferative und pro-apoptische Effekte auf kolorektale Karzinomzellen vermittelt und zudem eine chemopräventive Wirkung in der Kolon-Karzinogenese *in vivo* hat [116]. Weiterhin wurde eine antitumoröse Wirkung von Bromelain auf maligne peritoneale Mesotheliom-Zellen [117], Brustkrebszellen (GI101A humane Brustkrebs-Zelllinie) [118], humane A431 Epidermoid-Karzinom-Zellen und A375 Melanom-Zellen [119] nachgewiesen. Auch wurde eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums von Sarkom-Zellen (Sarkom L1-Zellen) im Mausmodell beobachtet [120] und eine reversible Inhibition der invasiven Eigenschaften von Gliomzellen [121].

Die genauen molekularen Mechanismen, mit denen Bromelain seine Wirkungen vermittelt, sind bisher noch nicht bekannt. Eckert et al. beschrieben in ihrer Studie, dass Bromelain eine Modulation der Expression von Oberflächenmolekülen hauptsächlich auf immunkompetenten Zellen bewirkt [122], was wahrscheinlich die Zell-Zell Kommunikation stört [123-125]. Mehrere Studien zeigten, dass Cystein-Proteasen aus Pflanzen die Aktivierung von Entzündungs-Signalwegen wie z.B. NFκB verhindern könnten [119, 126, 127]. Außerdem wurde gezeigt, dass Bromelain die Phosphorylierung von AKT, ERK 1/2 und p38-MAPK beeinflussen kann [126-128]. Diese sind wichtige regulatorische Proteine in der Angiogenese, in der sie Wachstum, Migration und Überleben von Endothelzellen regulieren [114].

### **1.3 Papain**

Papain ist eine Sulfhydryl- Protease und stammt aus der Frucht, dem Stamm, den Blättern, der Fruchtschale und den Samen der *Carica papaya latex* [129]. Es ist in vielen Ländern ein bekannter Wirkstoff aus der Pflanzenheilkunde und wird im Reformhaus als Nahrungsergänzungsmittel angeboten [130]. So wird gesagt, dass es eine starke Verdauungswirkung ausübe, die Pankreatin oder den pankreatischen Enzymen überlegen sei [129]. Die Zusammensetzung hat außerdem toxische Effekte auf pflanzenfressendes Ungeziefer.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Wirkung von Papain auf den menschlichen Organismus beschäftigt haben. Mohr et al. zeigten in ihrer Studie, dass Papain einen starken anti-angiogenetischen Effekt auf VEGF aktivierte HUVEC (humane Endothelzellen der Nabelvene) *in vitro* hatte [130]. In weiteren Studien wurde nachgewiesen, dass der Saft der reifen Papaya anti- diabetische und anti-oxidative Effekte hat und dadurch auch Einfluss auf die Entwicklung verschiedener Tumorarten wie Leber-, Blut-, Brust- und Prostata- Krebs bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ-2 nehmen könnte [131-134]. Raffaelli et al. zeigten, dass Stoffe aus der *Carica papaya* in der Lage sind, Einfluss auf entzündliche Prozesse zu nehmen und somit eine Rolle für die Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen spielen könnten. Außerdem legten sie

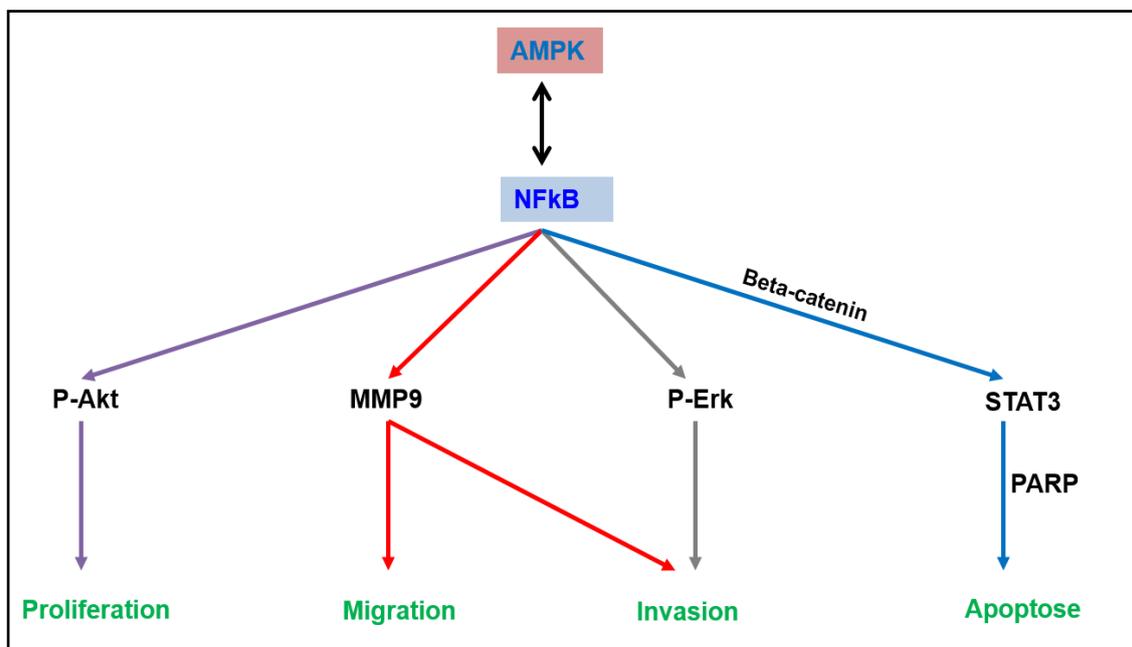
nahe, dass Carica papaya die natürlichen Abwehrmechanismen des Immunsystems unterstützen konnte [135]. Weitere Studien über mögliche antitumoröse Wirkungen oder den molekularen Wirkmechanismus von Papain gibt es bisher noch nicht.

#### **1.4 NFκB/ AMPK- Signalweg**

Wie bereits unter 1.1.4 Pathogenese beschrieben sind mittlerweile einige Signalwege bekannt, die eine Rolle in der CCC-Karzinogenese spielen. Trotzdem sind die exakten molekularen Vorgänge bei der Entstehung eines CCC noch nicht vollständig verstanden.

Die AMP-aktivierte Proteinkinase AMPK scheint eine wichtige Rolle im Wachstum und Metabolismus von Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft wie Prostata, Lunge und Brust zu spielen [136, 137]. Zheng et al. zeigten in ihrer Studie zum ersten Mal, dass der Signalweg zwischen AMPK und NFκB eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) spielt [137]. AMPK dient in eukaryotischen Zellen als Energiesensor und wird typischerweise durch eine Zunahme des zellulären AMP/ATP-Verhältnisses bei z.B. Glukosemangel, Hypoxie, Ischämie und Hitzeschock aktiviert [138, 139]. Die aktivierte phosphorylierte AMPK (p-AMPK) fördert die Energieproduktion und reduziert den Energieverbrauch, um so das Überleben der Zelle zu sichern [138]. Die Aktivierung von AMPK führt sowohl in nicht-malignen als auch malignen Zellen zu einer Inhibition der Zellproliferation [137]. AMPK vermittelt diese Wirkungen durch multiple Mechanismen, die die Regulation des Zellzyklus, Apoptose, Autophagie und die Inhibition der Proteinsynthese beinhalten [140]. Zheng et al. zeigten, dass die Expression von AMPK in engem Zusammenhang mit der Expression von NFκB steht [137]. NFκB gilt als Schlüsselmolekül, von dem zahlreiche Signalwege ausgehen, die einen Einfluss auf die Karzinogenese von Tumorzellen haben (Abbildung 2). So führt ein Signalweg zu AKT, welches eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Überleben und Apoptose spielt [141-143]. Ein weiterer Signalweg führt zu ERK, welches in Zellproliferation, Differenzierung, Motilität und Zelltod involviert ist [144]. Weiterhin kann über

NFκB die Expression von STAT3 reguliert werden, welches ein Signalprotein für viele Zytokine und Wachstumsfaktor-Rezeptoren darstellt [145] und zudem ein onkogenes Potenzial [146] und eine anti-apoptotische Aktivität besitzt [147]. In mehreren humanen Tumoren ist es konstitutiv aktiv [147, 148]. Ein weiterer Signalweg führt zur Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9), die einen wichtigen Faktor beim Remodeling während der Embryogenese, bei der Wundheilung, Tumordinvasion, Angiogenese, Karzinogenese und Apoptose darstellt [149-151]. Die MMP-Aktivität korreliert mit der Tumorentwicklung [149]. PARP als Marker für Zellen, die der Apoptose untergehen, wird ebenfalls über NFκB reguliert [152]. Zheng et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Expression von p-AMPK in der Mehrheit der HCC-Gewebe herunterreguliert war [137]. Außerdem fanden sie heraus, dass das Wiederauftreten eines HCC umso höher und die Prognose umso schlechter war, je niedriger die Expression von p-AMPK im HCC des Patienten war. Sie zeigten, dass die Behandlung von HCC-Zellen mit Metformin zu einer Aktivierung von p-AMPK und zu einer Unterdrückung der Expression von NFκB führte. Dadurch kam es zu einer Inhibition der NFκB regulierten Gen-Expression und zu einer Inhibition des Wachstums des HCC [137].



**Abb. 2: NFκB/ AMPK- Signalweg:** Darstellung des NFκB/ AMPK- Signalweges und der nachgeschalteten Signalwegen.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Die Diagnose eines CCC stellt bis heute für die Mehrheit der Patienten eine Erkrankung mit infauster Prognose dar. Nur für eine Minderheit der Patienten besteht die Möglichkeit einer operativen Resektion als kurative Therapieoption. Daher werden dringend neue Therapieansätze benötigt, die auch Patienten in einem inoperablen Tumorstadium ein besseres Überleben ermöglichen. Die weitere Entschlüsselung der molekularen Vorgänge und der beteiligten Signalwege in der CCC-Karzinogenese könnte eine Möglichkeit darstellen, neue Therapieansätze zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Untersuchung, ob die zwei Pflanzenextrakte Bromelain und Papain eine antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen haben und so in Wachstum und Metastasierung eingreifen können. Zum anderen wurde überprüft, welche Rolle der NFκB/ AMPK- Signalweg in der CCC-Karzinogenese spielt und ob dieser durch eine Bromelain- und Papain-Applikation beeinflusst wird.

Im Detail wurden folgende Ziele festgelegt:

- Analyse der CCC-Zellproliferation unter Bromelain-/ Papain-Applikation
- Analyse der CCC-Zellmigration unter Bromelain-/ Papain-Applikation
- Analyse der CCC-Zellinvasion unter Bromelain-/ Papain-Applikation
- Analyse der Apoptose nach Bromelain-/ Papain-Applikation
- Analyse des NFκB/AMPK- Signalweges in der CCC-Karzinogenese und der Beeinflussung durch Bromelain/ Papain

## **2 MATERIALIEN UND METHODEN**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Acrylamid-Lösung (30%) Mix 37, 5:1	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Borax (Natrium Tetraborate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromelain	Sigma-Aldrich, Germany
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim
DC protein assay kit	Biorad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
EGTA	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II	BD Biosciences, San Diego, USA
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
HiPerfect	Qiagen, Hilden
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt

Magnesiumchlorid	AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Papain	Sigma-Aldrich, Germany
Penicillin- Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Polyscreen PVDF Transfer Membrane	PerkinElmer, Rodgau
Propidium-Iodid	Fluka, Steinheim
RPMI 1640 + Glutamax-1	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	AppliChem, Darmstadt
SuperSignal West Pico Chemiluminescent	Thermo scientific, USA
Substrate	
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton X 100	AppliChem, Darmstadt
Trypsin/ EDTA- Lösung	Biochrom, Berlin
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid- Lösung (30 % in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf

Xylenecyanol

Applichem, Darmstadt

### **2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber

BD Biosciences, Bedford, UK

Deckgläser

Menzel-Gläser, Braunschweig

Glaspipetten (5, 10, 25 ml)

BRAND, Wertheim

Hyperfilm TM ECL

Amersham Bioscience,  
Braunschweig

Immersionsöl

Leica, Wetzlar

Kryoröhrchen

Sarstedt, Nümbrecht

Objektträger

Menzel-Gläser, Braunschweig

Parafilm

Pechiney Plastic Packaging,  
Chicago, USA

Pipettenspitzen 0,1-10 µl

Sarstedt, Nümbrecht

20 µl

Sarstedt, Nümbrecht

200 µl

Sarstedt, Nümbrecht

1000 µl

Greiner, Solingen

für Gelladung

Corning LifeSciences, USA

Reagenz- und Zentrifugenröhrchen

Sarstedt, Nümbrecht

- 15 ml Röhrchen

- 50 ml Röhrchen

Rundbodenröhrchen 5ml

BD Biosciences, Bedford, UK

Skalpell

FEATHER, Osaka, Japan

Transfermembran	PerkinElmer, Rodgau
6-wells-Zellkulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht
96-wells-Zellkulturplatte	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman-Filterpapier	Omnilab, Elbingeröder
Zellkulturschalen 1000 x 15 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen 60 x 15 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

### **2.1.3 Geräte**

Elektronische Waage	Sartorius, Göttingen
LSRFortessa flow cytometer	Becton-Dickinson, USA
BD FACSCalibur™	BD Bioscience, Germany
Gel-Kammer für Proteine	Bio-RAD, München
Brutschrank	Heidolph, Kelheim
Magnetrührer	Bio-RAD, München
MicroPulser™	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Microtiterplate luminometer	Bauknecht, Stuttgart
Microplate reader	Titertek-Berthold, Pforzheim
Mikroskope	Leica, Wetzlar
Leica DM 5000B	
Leica DMI 6000B	
Mini Protein Electrophoresis System	Bio-RAD, München

Mini Trans Blot cell	Bio-RAD, München
Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Multipette® plus	InoLab, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Hirschmann, Eberstadt
0,5 – 10 µl	
2 – 20 µl	
20 – 200 µl	
100 – 1000 µl	
Pipettierhilfe	Bio-RAD, München
Chaker vibramax 110	Heidolph, Kelheim
Sonifier UP 200H	Bio-RAD, München
Spannungsgeräte	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
Spannungsgerät für Elektrophorese	Leica DM 5000, Leica, Wetzlar
Steril-Bank	Hera Safe, Kendro, Osterode
Thermo cycler	Hielscher, Stahnsdorf
Thermomixer 5436	MWG-Biotech AG, Ebersberg
ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie	Eppendorf, Hamburg
Wärmeblock	Heraeus Instruments GmbH, Osterode
Wasserbad	Janke & Kunkel, Staufen
Neubauerzählkammer	Marienfeld Superior, Lauda- Königshofen

## Zentrifugen

Zentrifuge 5415 D	Carl Roth, Karlsruhe
Zentrifuge Mikro 220 R cooled	Heraeus, Osterode
Megafuge 1.0	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotina 38R	Beckman GmbH, Sinsheim
Zentrifuge L8-55M	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel

## 2.1.4 Antikörper und siRNA

**Tab. 1:** Liste der Primärantikörper für den Immunoblot

	Größe (kDa)	Quelle	Verdünnung	Hersteller
β-Actin- Antikörper (AC-74)	45	Kaninchen	2: 10000	Sigma
PARP- Antikörper	89, 116	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology
E-Cadherin- Antikörper (24E10)	135	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology
N-Cadherin Antikörper (EPR1792Y)	140	Kaninchen	2: 10000	Millipore
AMPKα- Antikörper	62	Kaninchen	1: 500	Cell Signaling Technology
Phospho-AMPKα- Antikörper (Thr172) (40H9)	62	Kaninchen	1: 500	Cell Signaling Technology
p44/42 MAPK (Erk1/2) - Antikörper (137F5)	42, 44	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)- Antikörper (Thr202/Tyr204)	42, 44	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology
Akt- Antikörper (4691)	60	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology
Phospho-Akt- Antikörper (Ser473)	60	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology
Anti-NF-κB p65 Antikörper	65	Kaninchen	1: 1000	Abcam

MMP-9- Antikörper (G657)	92	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology
Stat3- Antikörper (79D7)	79, 86	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology
Phospho-Stat3- Antikörper (Tyr705)	79, 86	Kaninchen	1: 1000	Cell Signaling Technology

**Tab. 2:** Liste der Sekundäantikörper für den Immunoblot

	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus IgG Peroxidase- konjugiert	1:10000	GE healthcare Amersham
Anti-Kaninchen IgG Peroxidase- konjugiert	1:10000	GE healthcare Amersham

**Tab. 3:** Liste der siRNA für die NFκB- Genstilllegung

	Hersteller
Control siRNA-A: sc-37007	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
NFκB p65 siRNA (h): sc-29410	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

## 2.1.5 Gele, Puffer und Lösungen

**Tab. 4:** Protokoll zur Herstellung der Trenn- und Sammelgele (Polyacrylamidgele) für den Immunoblot

	<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel (12%)</u>
ddH <sub>2</sub> O	3,2 ml	3,4 ml
Tris 6,8 pH	1,75 ml	-
Tris 8,0 pH	-	2,5 ml
10 % SDS	70 µl	100 µl
10 % APS	70 µl	105 µl
TEMED	7 µl	15 µl
Acrylamid	1,13 ml	3,4 ml

### Annexin- Binding- Puffer pH 7,4

HEPS	10 mM
NaCl	140 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mM

### SDS-Gellaufpuffer (10 x)

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

### Western Transferpuffer (10 x)

Tris	250 mM
Glycin	1,92 M

### 4x Protein-Ladepuffer

0,25 M Tris-HCl pH 6,8

8% SDS

40% Glycerol

10% beta-Mercaptoethanol

0,05% Bromphenolblau

In ddH<sub>2</sub>O

### Western Lysepuffer

20 mM Tris pH 7,5

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

1% Triton x-100

### 10 x PBS

NaCl                    137 mM

KCl                     2,7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>             100 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>             2 mM

### Blockierungslösung (Western Blot)

5% Magermilchpulver in 1 x TNT

### Entwicklungslösung

Luminol Enhancer	50%
Peroxidase Solution	50%

### Toluidinblaulösung

1% Toluidinblau

1% Borax

In ddH<sub>2</sub>O

### **2.1.6 Software-Programme**

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, San Jose, USA
BD Cell Quest Pro™	BD Biosciences, Mississauga, USA
FlowJo Version 7.3	Tree Star Inc., Ashland, USA
Graphpad Prism Version 5.0	Graphpad Software, San Diego, CA, USA
ImageJ 1.42	Free Software Foundation, Inc., Boston, USA
Microsoft Excel 2007	Microsoft Inc., Remond, Washington, USA
Microsoft Word 2007	Microsoft Inc., Remond, Washington, USA
SPSS Version 11.0	SPSS, Chicago, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Methoden der Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Zelllinien**

Es wurden zwei humane CCC-Zelllinien (TFK-1, SZ-1) für die Versuche verwendet, die von der AG Prof. Malek zur Verfügung gestellt wurden. Bei den TFK-1 Zellen handelte es sich um Tumorzellen aus einem extrahepatischen Tumor, bei den SZ-1 Zellen um Tumorzellen aus einem intrahepatischen Tumor.

#### **2.2.1.2 Zellkultivierung**

Die Zellen wurden auf 1000 x 15 mm Zellkulturschalen in Vollmedium (89 % RPMI 1640 + Glutamax, 10 % Fetales Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin) bei 37 °C in fünfprozentiger CO<sub>2</sub>- Umgebung im Brutschrank kultiviert.

#### **2.2.1.3 Subkultivierung der Zellen**

Nach Erreichen einer Zelldichte von ungefähr 80 % konnten die Zellen entweder für Versuche verwendet werden oder mussten für die weitere Zellkultivierung auf zwei bis fünf 1000 x 15 mm Zellkulturplatten verteilt werden. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 4 ml 1x PBS gewaschen und 1 ml Trypsin-EDTA zu den noch adhären Zellen dazugegeben, um sie von der Platte zu lösen. Nach zweiminütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Trypsinaktivität mittels Zugabe von 1 ml Vollmedium aufgehoben. Die Zellsuspension wurde auf die vorbereiteten Zellkulturplatten, die jeweils 9 ml Vollmedium enthielten, verteilt und erneut im Brutschrank bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte inkubiert.

#### **2.2.1.4 Quantifizieren der Zellen**

Die Anzahl an Zellen in einer Probe wurde mithilfe der Neubauerzählkammer bestimmt. Dafür wurde zunächst wie unter 2.2.1.3 Subkultivierung beschrieben fortgefahren mit der Ausnahme, dass die Zellsuspension am Ende nicht auf Zellkulturplatten, sondern in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen gegeben wurde.

Dieses wurde für fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit 1 ml Medium (abhängig vom Versuch Vollmedium, 2% FKS-haltiges Medium, FKS-freies Medium) vermischt. Ein Teil der Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und im Verhältnis 1:100 mit Medium verdünnt. Von dieser Suspension wurde 10 µl in die Neubauerzählkammer gegeben, sodass die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden konnten. Die Anzahl an Zellen pro ml wurde folgendermaßen berechnet:

Zellen/ml = Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat x Verdünnungswert x  $10^4$

(Jedes Quadrat hat eine Kammerfläche von 1 mm<sup>2</sup> und eine Kammerhöhe von 0,1 mm).

Die Anzahl an Zellen in der gesamten Suspension wurde folgendermaßen berechnet:

Gesamtzellzahl = Zellen/ml x Volumen der Zellsuspension, von welcher die Probe entnommen wurde.

#### 2.2.1.5 Kryokonservierung der Zellen

Wurden die Zellen zwischenzeitlich nicht mehr für ein Experiment benötigt, konnten sie bei -80°C gelagert werden. Hierfür wurde zunächst wie unter 2.2.1.3 Subkultivierung der Zellen beschrieben verfahren mit der Ausnahme, dass am Ende die Zellsuspension nicht auf die Zellkulturplatten verteilt wurde, sondern in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen gegeben und mit 3 ml Vollmedium gemischt wurde. Dieses wurde in der Zentrifuge bei 1000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und erneut bei 1000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Medium zum Einfrieren (10ml FKS+ 1ml DMSO) zu den Zellen gegeben, das Zellpellet resuspendiert und in Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

Bei Bedarf konnten die Zellen wieder aufgetaut werden. Dafür wurde das Kryoröhrchen in ein Wasserbad mit 36 °C gegeben und anschließend die Zellsuspension auf 1000 x 15 mm Zellkulturplatten mit 9 ml Vollmedium verteilt.

### **2.2.2 Herstellung der Bromelain- und Papain- Stammlösung**

Die Bromelain-Stammlösung wurde hergestellt, indem Bromelain in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde. Für die Papain-Stammlösung wurde Papain in destilliertem Wasser gelöst. Die Zellen wurden in den Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen Bromelain (150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) und Papain (25  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) behandelt, wobei für Bromelain DMSO und für Papain destilliertes Wasser als Kontrolle diente.

### **2.2.3 Analyse der Proliferation mit dem WST-1 Assay**

Das WST-1 Assay (water-soluble tetrazolium) diente dazu, die Proliferation und Viabilität der Tumorzellen zu untersuchen und damit zu überprüfen, ob durch die Bromelain- bzw. Papain- Behandlung eine antiproliferative Wirkung auf die CCC-Zelllinien vermittelt wird. Das Prinzip des WST-1 Assays ist, dass das schwach rote Tetrazoliumsalz WST-1 durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System in den orangenen Farbstoff Formazan gespalten wird, dessen Konzentration spektralphotometrisch gemessen werden kann. Da nur viable Zellen ein funktionsfähiges Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System als Teil der Atmungskette besitzen, kann über die Konzentration an Formazan auf die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen in der Kultur geschlossen werden (gemäß Herstellerinformation).

#### **Versuchsdurchführung:**

Die jeweilige Zelllinie wurde mit einer Konzentration von 2000 Zellen/ml auf fünf 96-wells-Zellkulturplatten mit je 100  $\mu\text{l}$  Vollmedium pro Kavität ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde eine der 96-wells-Zellkulturplatten ausgewählt, um deren Zellkonzentration als Null-Stundenwert zu bestimmen. Hierfür wurden 10  $\mu\text{l}$  WST-1-Reagenz pro Kavität hinzugefügt und unter Lichtausschluss für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorbanz bei einer Wellenlänge von 492 nm mit der Referenzwellenlänge 650 nm gemessen. Bei den übrigen Zellkulturplatten wurde nach der 24-stündigen Inkubation das Vollmedium abgesaugt und die Zellen wurden

entweder mit DMSO oder destilliertem Wasser als Kontrolle, Bromelain (150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) oder Papain (25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) behandelt. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde erneut jeweils eine Platte ausgewählt und deren Zellkonzentration mithilfe des WST-1-Reagenz bestimmt. Der Proliferationszuwachs wurde ermittelt, indem der Mittelwert der Formazankonzentration am jeweiligen Messzeitpunkt auf die Formazankonzentration der Kontrolle am Tag Null bezogen wurde.

#### **2.2.4 Analyse der Migration mit dem Wound-Healing Assay**

Zellmigration spielt sowohl beim physiologischen Prozess der Wundheilung als auch als Teilschritt der Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle. Mithilfe des Wound-Healing Assays konnte *in vitro* überprüft werden, ob eine Bromelain- bzw. Papain- Behandlung von CCC-Zellen zu einer Inhibition dieser gerichteten Zellmigration führt (gemäß Herstellerinformation).

##### Versuchsdurchführung:

Die Aussaat der jeweiligen Zelllinie erfolgte auf eine 6-well-Zellkulturplatte, wobei pro Kavität dieselbe Zellkonzentration mit 2 ml Vollmedium gegeben wurde. Die Zellkulturplatte wurde bis zum Erreichen einer 80%igen Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Um später Unterschiede zwischen den Behandlungen lediglich auf die verwendete Substanz und deren Konzentration zurückführen zu können, mussten sich alle Tumorzellen zu Beginn der Behandlung im gleichen Zustand befinden. Dafür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und durch lediglich 2% FKS enthaltendes Medium ersetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurde mithilfe einer 20  $\mu$ l-Pipettenspitze eine Wunde quer durch den Zellrasen gezogen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, mit 1x PBS gewaschen und durch 2% FKS enthaltendes Medium ersetzt, welches entweder DMSO oder destilliertes Wasser als Kontrolle, Bromelain (150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) oder Papain (25  $\mu$ M, 40 $\mu$ M, 100  $\mu$ M) enthielt. Dann wurden lichtmikroskopische Bilder der Wunde an jeweils drei verschiedenen Stellen gemacht und die Stellen markiert (Zeitpunkt 0). Nach 48-stündiger Inkubation der Zellen wurden erneut lichtmikroskopische

Bilder der jeweils markierten Stellen der Wunde gemacht (Zeitpunkt 1). Um das Ausmaß der Zellmigration unter den verschiedenen Behandlungen vergleichen zu können, wurde der Durchmesser der jeweiligen Wunde zum Zeitpunkt 0 und 1 mithilfe von Adobe Photoshop bestimmt und der Migrationsindex berechnet, indem die Differenz des Wunddurchmessers zwischen Zeitpunkt 0 und Zeitpunkt 1 auf den Wunddurchmesser zum Zeitpunkt 0 bezogen wurde.

$$\text{Migrationsindex} = \frac{\text{Wunddurchmesser zum Zeitpunkt 0} - \text{Wunddurchmesser zum Zeitpunkt 1}}{\text{Wunddurchmesser zum Zeitpunkt 0}} * 100$$

### **2.2.5 Analyse der Invasion mit dem Invasions- Assay**

Das Invasions-Assay diene dazu, das Invasionsverhalten von CCC-Zellen *in vitro* nachzuahmen und zu überprüfen, ob durch die Bromelain- bzw. Papain-Behandlung eine Inhibition der Invasion der Tumorzellen bewirkt wird. Hierfür wurde die BD BioCoat™ Matrigel™ Invasionskammer verwendet, die aus einer Zellkulturplatte mit sechs Kavitäten besteht. Jede Kavität enthält eine Umgebungskammer mit Vollmedium und eine innere Kammer mit FKS- freiem Medium. Die Kammern werden durch eine Membran getrennt, welche 8 µm große Poren enthält und von einer dünnen Lage MATRIGEL Basement Membran Matrix überzogen ist. Die MATRIGEL Basement Membran Matrix dient als Basalmembran *in vitro*, die die Poren der Membran verdeckt und so verhindert, dass nicht-invasive Zellen durch die Membran gelangen. Invasive Zellen dagegen können sich von der Membran ablösen und vom FKS-freien Medium durch die Poren ins Vollmedium invadieren (gemäß Herstellerinformation).

#### Versuchsdurchführung:

Die bei -20°C gelagerten Invasionskammern wurden zunächst unter Lichtausschluss bis zum Erreichen der Raumtemperatur aufgewärmt und mit FKS-freiem Medium für zwei Stunden im Inkubator rehydriert. Das Medium wurde entfernt und in der Umgebungskammer durch 2 ml Vollmedium ersetzt. In die innere Kammer wurde eine Zellsuspension mit je  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro 2 ml FKS-

freiem Medium gegeben, welches zusätzlich entweder DMSO oder destilliertes Wasser als Kontrolle, Bromelain (150 µM, 200 µM) oder Papain (25 µM, 40 µM, 100 µM) enthielt.

Die Invasionskammern wurden für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert, sodass invasive Zellen durch die Poren auf die Unterseite der *in vitro* Basalmembran invadieren konnten, während nicht-invasive Zellen an der Membranoberfläche blieben und im Anschluss an die Inkubationszeit mit einem Wattestäbchen entfernt werden konnten. Um das Ausmaß der Invasion unter den verschiedenen Behandlungen zu bestimmen und vergleichen zu können mussten die invadierten Zellen ausgezählt werden. Hierfür wurden die invadierten Zellen an der Membranunterseite zwei Minuten in 100%igem Methanol fixiert, zwei Minuten mit 1%iger Toluidineblaulösung gefärbt, in destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit einem Skalpell ausgeschnitten und auf einem Objektträger mit Immersionsöl und Deckglas fixiert. Es wurden lichtmikroskopische Bilder (40x Vergrößerung) angefertigt und die Zellen an fünf Gesichtsfeldern ausgezählt. Um den Invasionsindex zu berechnen, wurden die entsprechenden Mittelwerte auf die Mittelwerte der Kontrolle bezogen.

$$\text{Invasionsindex} = \frac{\% \text{ Invasion der behandelten Zellen}}{\% \text{ Invasion der Kontroll-Zellen}}$$

### **2.2.6 Durchflusszytometrische Apoptosemessung mit Annexin V-FITC**

Die durchflusszytometrische Apoptosemessung mit Annexin V-FITC wurde genutzt um zu überprüfen, ob die Apoptose ein möglicher Mechanismus der Inhibition des Tumorwachstums von CCC-Zellen durch die Bromelain- bzw. Papain- Behandlung ist.

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist durch die Abfolge bestimmter morphologischer Merkmale gekennzeichnet. Die Änderung der Plasmamembran ist eines der frühesten Merkmale. Dabei wird das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren in die äußere Membran transloziert, sodass die Zelle für Makrophagen markiert ist. Die Zellmembran selbst bleibt

dabei intakt. Dieses morphologische Merkmal wird in der durchflusszytometrischen Apoptosemessung mit Annexin V-FITC genutzt, um den Prozentsatz an Zellen zu bestimmen, die aktiv der Apoptose untergehen. Annexin V ist ein Kalzium-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität zu PS hat und daher an apoptotische Zellen bindet. Es kann zu Fluorochromen wie FITC konjugiert und durchflusszytometrisch gemessen werden. Da Annexin V nicht nur an das PS von apoptotischen Zellen, sondern auch an das von nekrotischen Zellen bindet, wird Annexin V typischerweise mit Propidiumiodid (PI) kombiniert. Da die FITC Annexin V Färbung dem Verlust der Membranintegrität vorausgeht, sind apoptotische Zellen nicht permeabel für PI, tote und geschädigte Zellen dagegen schon. Lebende Zellen sind also Annexin V und PI negativ, früh-apoptotische Zellen sind Annexin V positiv und PI negativ, in später Apoptose befindliche Zellen bzw. tote Zellen sind Annexin V und PI positiv. Wird die Apoptosemessung zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, kann besser zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden, da die Zellen im Falle der Apoptose alle drei der genannten Schritte nacheinander durchlaufen (gemäß Herstellerinformation).

#### Versuchsdurchführung:

Die jeweilige Zelllinie wurde zunächst auf 60 x 15 mm-Zellkulturschalen (3 ml Vollmedium pro Kavität) bis zum Erreichen einer 50%igen Konfluenz kultiviert und anschließend entweder mit DMSO oder destilliertem Wasser als Kontrolle, Bromelain (150 µM, 200 µM) oder Papain (25 µM, 40 µM, 100 µM) behandelt. Nach jeweils 48 und 96 Stunden erfolgte die Zellernte. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA zwei Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach proteolytischer Ablösung der Zellen wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von Vollmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette in ein Zentrifugen-Röhrchen gegeben und bei 1000 U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit eisgekühltem 1x PBS gewaschen, wobei nach jedem Waschen die Probe erneut für fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurden

$1 \times 10^6$  Zellen/ml in 400  $\mu$ L 1x Binding-Puffer (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II) resuspendiert und jeweils 100  $\mu$ l in drei Rundbodenröhrchen gegeben (unmarkierte Kontrolle, Annexin Kontrolle und PI Kontrolle). Zu den Röhrchen der Annexin Kontrolle wurden jeweils 5  $\mu$ l FITC Annexin V und zu den Röhrchen der PI Kontrolle jeweils 5  $\mu$ l PI dazugegeben und für 15 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400  $\mu$ M des 1x Binding-Puffers zu jeder Probe dazugegeben. Innerhalb einer Stunde wurde mit dem BD FACSCalibur™ gemessen und mithilfe der Software FlowJo Version 8.7 analysiert.

### **2.2.7 Western-Blot**

Das Western-Blot ermöglicht es, bestimmte Proteine in einem Zelllysate nachzuweisen und so auf bestimmte Vorgänge in einer Zelle rückzuschließen. Das aus einem Zelllysate extrahierte Gemisch aus Proteinen wird zunächst nach Molekulargewicht durch die Gelelektrophorese aufgetrennt und das Ergebnis auf eine Membran transferiert, die für jedes Protein eine Bande darstellt. Mithilfe eines Primärantikörpers kann das entsprechende Protein auf der Membran detektiert werden. Durch Zugabe eines Sekundärantikörpers können die Proteinbanden anschließend sichtbar gemacht werden, indem die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase das Substrat Luminol umsetzt und so chemilumineszente Signale abgibt, die auf einem Röntgenfilm abgebildet werden können. Da der Antikörper spezifisch nur an ein Protein bindet, sollte nur eine Bande sichtbar sein. Die Dicke der Bande korreliert dabei mit der vorhandenen Menge an Protein (gemäß Herstellerinformation).

#### **2.2.7.1 Zellkultivierung, -ernte und -lyse**

Die CCC- Zelllinien wurden auf 60 x 15 mm-Zellkulturplatten bis zum Erreichen einer 50%igen Konfluenz kultiviert (4 ml Vollmedium pro Kavität) und anschließend entweder mit DMSO oder destilliertem Wasser als Kontrolle, Bromelain (150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) oder Papain (25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) behandelt. Nach jeweils 48 und 96 Stunden erfolgte die Zellernte und -lyse. Dafür wurden

die Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Zellkulturplatte gelöst und in ein 15ml Zentrifugen- Röhrcchen gegeben. Dieses wurde für fünf Minuten bei 1000U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das überschüssige Medium abgesaugt, die Zellen mit eisgekühltem 1x PBS gewaschen und erneut bei 1000U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Das 1x PBS wurde abgesaugt und die Zellen mit 200 µl Lysepuffer gemischt. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Zellmembran von den Zellen zu lösen und so die Proteine in der Zelle freizusetzen wurde die Zellsuspension sonifiziert (pro Probe zweimal 15 Sekunden) und für 30 Minuten bei 1300 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (= Puffer mit Proteinen) wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration und Herstellung der Proben für die Elektrophorese

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des DC Protein Assays (Biorad) ermittelt. Dafür wurden von jeder Probe 5 µl der Proteinlösung in jeweils drei Kavitäten einer 96-well-Zellkulturplatte gegeben. Zu jeder Kavität wurden 25 µl des Reagenz A (alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung) und 200 µl des Reagenz B (Folin-Reagenz) hinzugefügt und für 20 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Dabei reagierten die Proteine zunächst mit der alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und führten anschließend zu einer Reduktion des Folin-Reagenz, was zu einem Farbumschlag führte. Anschließend wurde die Absorption bei 650 nm mit dem Mikrotiterplatten-Reader gemessen. Die Proteinkonzentration errechnete sich aus dem Mittelwert x der drei gemessenen Konzentrationen einer Probe. Mithilfe der Formel  $\frac{100}{(X - 0,107)/0,1169}$  wurde das von jedem Zelllysate für die Elektrophorese benötigte Volumen berechnet, durch Western Lysepuffer auf 75 µl aufgefüllt und mit 25 µl Proteinladepuffer ergänzt.

#### 2.2.7.3 Herstellung der Trenn-und Sammelgele

Zunächst wurde die Lösung des Trenngels hergestellt, zwischen zwei Glasplatten bis zur entsprechenden Markierung gegeben und mit Ethanol

beschichtet. Nach 20 Minuten wurde das Ethanol entfernt und durch die Sammelgellösung ersetzt, in welche ein 10-Kammer-Kamm eingesetzt wurde. Nach weiteren 20 Minuten konnte der Kamm entfernt und die Gele für die Elektrophorese verwendet werden.

Das Sammelgel mit einer niedrigen Acrylamid-Konzentration sorgte dafür, dass die Proteine dünne definierte Banden bilden und gleichzeitig ins Trenngel migrieren konnten. Das Trenngel hatte eine höhere Acrylamid-Konzentration und damit schmalere Poren, sodass die Proteine nach Größe getrennt wurden.

#### 2.2.7.4 Elektrophorese

Zunächst wurde das zwischen zwei Glasscheiben befindliche Gel in der Elektrophoresekammer platziert und 1x SDS Gellaufpuffer in die Kammer dazugegeben. Nachdem die Proben im Wärmeblock für fünf Minuten bei 95°C erwärmt wurden, konnten jeweils 30 µl der Proben geladen werden. Als Proteinmarker wurden pro Gel 15 µl Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder geladen. Als Ladungskontrolle diente β-Actin. Die Elektrophorese wurde bei 60V gestartet, bis die Proteine das Trenngel erreichten, und anschließend auf 140 V erhöht.

#### 2.2.7.5 Proteintransfer

Um die im Gel nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran zu transferieren, wurde zunächst die PVDF-Membran für 1-2 Sekunden in Methanol und danach für 10-15 Minuten in 1x Western Transferpuffer aktiviert. Die Filterpapiere und Schwämme wurden ebenfalls im 1x Western Transferpuffer angefeuchtet. Das Gel wurde von den Glasscheiben gelöst und zusammen mit der Membran, den Filterpapieren und Schwämmen in den Blottingsandwich eingebaut (Schwamm-Filterpapier-Gel-PVDF-Membran-Filterpapier-Schwamm). Für den Transfer (eine Stunde bei 90 V, 0.35 mA) wurde der Sandwich durch Eis auf 4 °C abgekühlt und mit 1x Western Transferpuffer bedeckt. Anschließend wurde die Membran zunächst für eine Stunde in Magermilch geblockt, um zu verhindern, dass Antikörper im Anschluss

unspezifisch binden. Dann wurde die Membran dreimal mit 1x TNT für jeweils fünf Minuten gewaschen.

#### 2.2.7.6 Antikörper-Inkubation und Entwicklung

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C Raumtemperatur in ständiger Schwenkbewegung. Am folgenden Tag wurde dreimal mit 1x TNT für jeweils 10 Minuten gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Dann wurde der Sekundärantikörper dazugegeben und für eine Stunde in ständiger Schwenkbewegung inkubiert. Nachdem die Membran dreimal mit 1x TNT für jeweils 10 Minuten gewaschen wurde, wurden im Dunkelraum 3 ml Entwicklungslösung auf die Membran gegeben und für drei Minuten inkubiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt und nach einer Expositionszeit zwischen 1-20 Minuten bzw. über Nacht entwickelt.

#### 2.2.8 Herunterregulation der Genexpression mit siRNA

Die Deletion eines Gens mithilfe von siRNA ermöglicht, die Funktion des entsprechenden Proteins in einem Signalweg zu untersuchen. Damit konnte überprüft werden, ob NFκB in CCC- Zellen exprimiert wird und ob es durch eine Bromelain- bzw. Papain- Applikation beeinflusst werden kann. Die siRNA besteht aus einem 19 - 21 Basenpaare langem RNA-Doppelstrang, dessen Einzelstränge am 3'-Ende jeweils um zwei bis vier Nukleotide überhängen. Einer der Stränge ist homolog zu einem Gebiet in der mRNA des Zielgens. Um unspezifische oder toxische Effekte der siRNA zu erkennen, wird zusätzlich eine Kontroll-siRNA verwendet, die in keinem Zusammenhang mit der Ziel-mRNA in allen Experimenten steht. Die Transfektion wird durch ein Transfektions-Reagenz (hier: HiPerFect) erreicht.

#### Versuchsdurchführung:

Die Zellen wurden mit einer Konzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml auf einer 6-wells Zellkulturplatte kultiviert. Das Transfektions-Gemisch, welches aus siRNA in

einer Konzentration von 5 nM, 10 nM und 20 nM NF- $\kappa$ B siRNA, 100  $\mu$ l serumfreiem Medium und 6  $\mu$ l HiPerFect bestand, wurde für 10 Minuten inkubiert und tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben. Die Analyse der Gen-Stillelegung erfolgte 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion mittels Immunoblots.

### **2.2.9 Statistik**

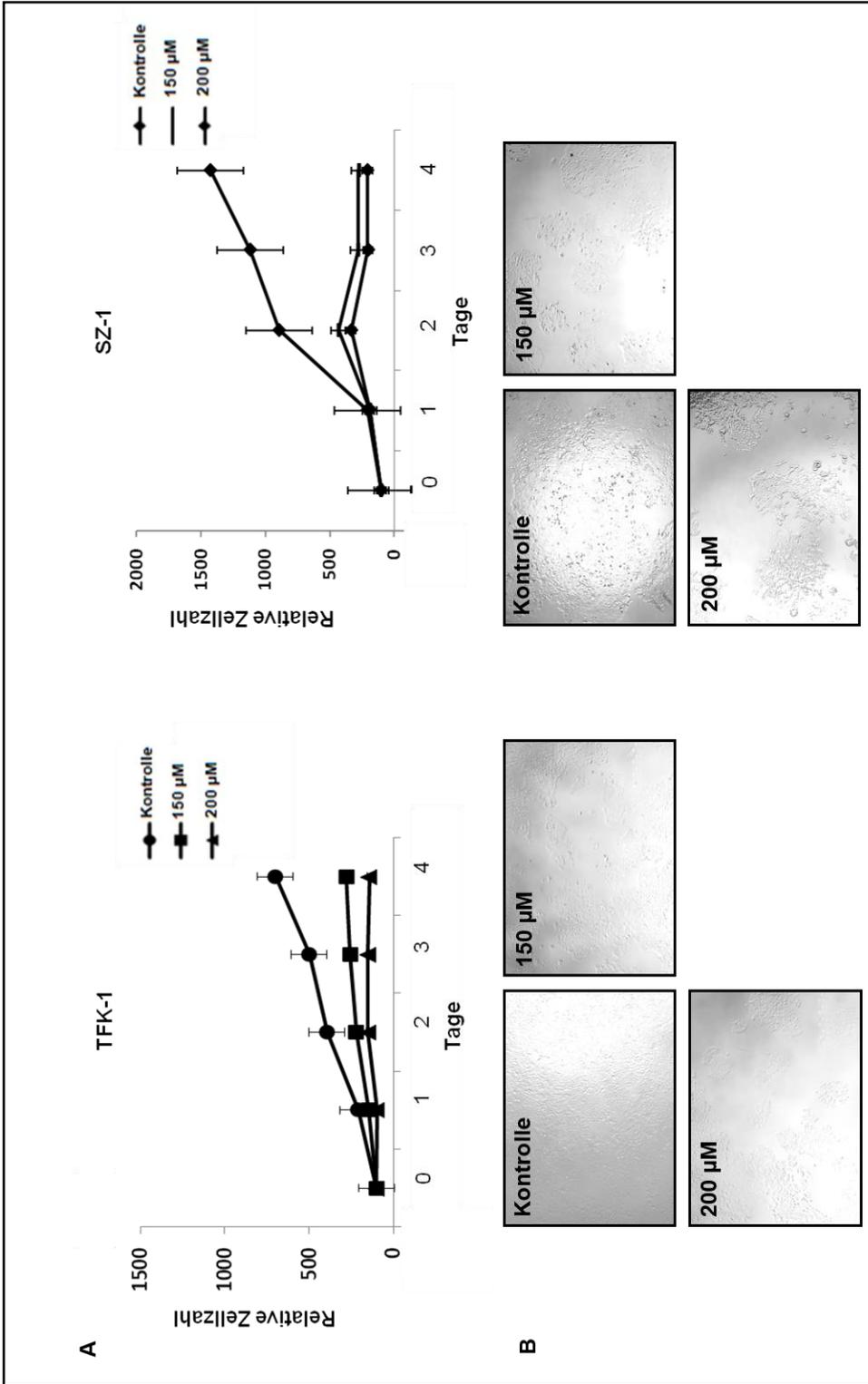
Alle Experimente wurden dreimal wiederholt. Die Ergebnisse wurden mithilfe der Software Graphpad prism Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und SPSS Version 11.0 (SPSS, Chicago, USA) ausgewertet. Dabei wurden der One Way ANNOVA Test und Student's T-Test zusammen mit Bonferroni post test und T-Test für verbundene und unverbundene Stichproben verwendet. Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der p-Wert kleiner als 0.05 (\*), <0.005 (\*\*) und <0.001 (\*\*\*) war.

### **3 ERGEBNISSE**

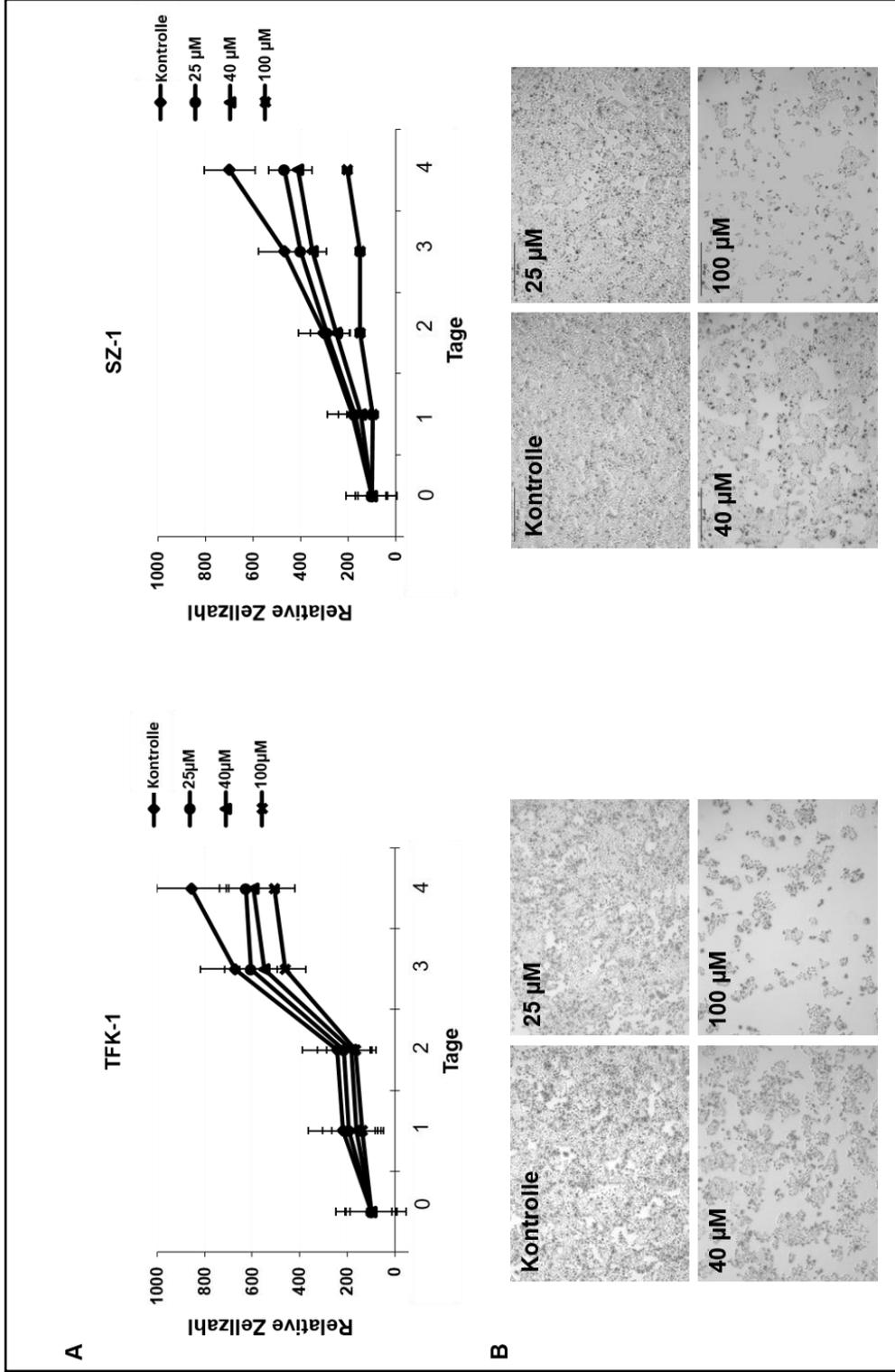
#### **3.1 Analyse der Zellproliferation nach Bromelain-/Papain- Applikation**

Der Zellproliferations-Assay (WST-1) diente dazu, die Viabilität der Tumorzellen in Abhängigkeit von der Bromelain- und Papain- Applikation zu untersuchen. Zunächst mussten die Konzentrationen ermittelt werden, mit denen die CCC-Zellen behandelt werden sollten. Für Bromelain gab es bereits in Publikationen beschriebene IC 50-Werte für die Behandlung von Tumorzellen, sodass diese übernommen werden konnten und eine Bromelain-Behandlung der CCC-Zellen mit den Konzentrationen 150  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  erfolgte [153, 154]. Da es für Papain keine entsprechenden Vordaten gab, wurde mithilfe einer dosisabhängigen Wachstumskurve die Wirkung verschiedener Papain-Konzentrationen auf CCC-Zellen untersucht und so die IC-50-Werte ermittelt (Abbildung 4A). Dabei ergaben sich für die Papain-Behandlung die Konzentrationen 25  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ . Die in Abbildung 3A und 4A dargestellten Ergebnisse des WST-1-Assays zeigen, dass sowohl die Bromelain- als auch Papain-Behandlung zu einer effektiven Reduktion der Proliferation der TFK-1 und SZ-1 Zellen nach 24, 48, 72 und 96 Stunden führte. Während die Kontrollen beider Zelllinien (DMSO bei Bromelain, destilliertes Wasser bei Papain) ein kontinuierliches Wachstum über die vier Tage aufwiesen, war insbesondere unter der Bromelain-, aber auch unter der Papain-Behandlung, eine deutliche Abnahme der Proliferation der CCC-Zellen zu beobachten. Weiterhin zeigte sich bei beiden Substanzen eine dosisabhängige Inhibition der Zellproliferation (bei Bromelain 200  $\mu\text{M}$  > 150  $\mu\text{M}$ ; bei Papain 100  $\mu\text{M}$  > 40  $\mu\text{M}$  > 25  $\mu\text{M}$ ), sodass die stärkste antiproliferative Wirkung bei beiden Substanzen nach 96 Stunden und unter der höchsten Konzentration zu sehen war (200  $\mu\text{M}$  bei Bromelain, 100  $\mu\text{M}$  bei Papain). Die 48 Stunden nach der Bromelain-bzw. Papain-Behandlung aufgenommenen lichtmikroskopischen Bilder der TFK-1 und SZ-1 Zellen (Abbildung 3B und 4B) verdeutlichen die Ergebnisse der Wachstumskurven. So wiesen die Kontrollen beider Zelllinien nach 48 stündiger Inkubation eine sehr hohe Zelldichte auf und der Zellrasen erschien an einigen Stellen fast vollständig geschlossen. Bei den

mit Bromelain und Papain behandelten TFK-1 und SZ-1 Zellen zeigte sich bei allen Konzentrationen eine kleinere Zelldichte im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, die umso geringer war je höher die Bromelain- bzw. Papain-Konzentration war. Entsprechend der Wachstumskurven war somit der geringste Proliferationszuwachs bei den mit 200  $\mu$ M Bromelain bzw. 100  $\mu$ M Papain behandelten CCC-Zellen zu beobachten. Sowohl die Wachstumskurven als auch die lichtmikroskopischen Bilder zeigen, dass Bromelain und Papain das Tumorwachstum von CCC-Zellen inhibieren konnten, wobei sich eine Dosisabhängigkeit der Stärke der Inhibition erkennen ließ.



**Abb. 3: WST-1 Assay nach Bromelain- Applikation:** Dosis- und zeitabhängige Inhibition der Zellproliferation von TFK-1 und SZ-1 Zellen durch Bromelain- Applikation (150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ). A) Darstellung der relativen Zellzahl 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der jeweiligen Behandlung. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. B) Lichtmikroskopische Bilder der Zellproliferation von TFK-1 und SZ-1 Zellen 48 Stunden nach Behandlung mit Bromelain (10x Vergrößerung) [1].

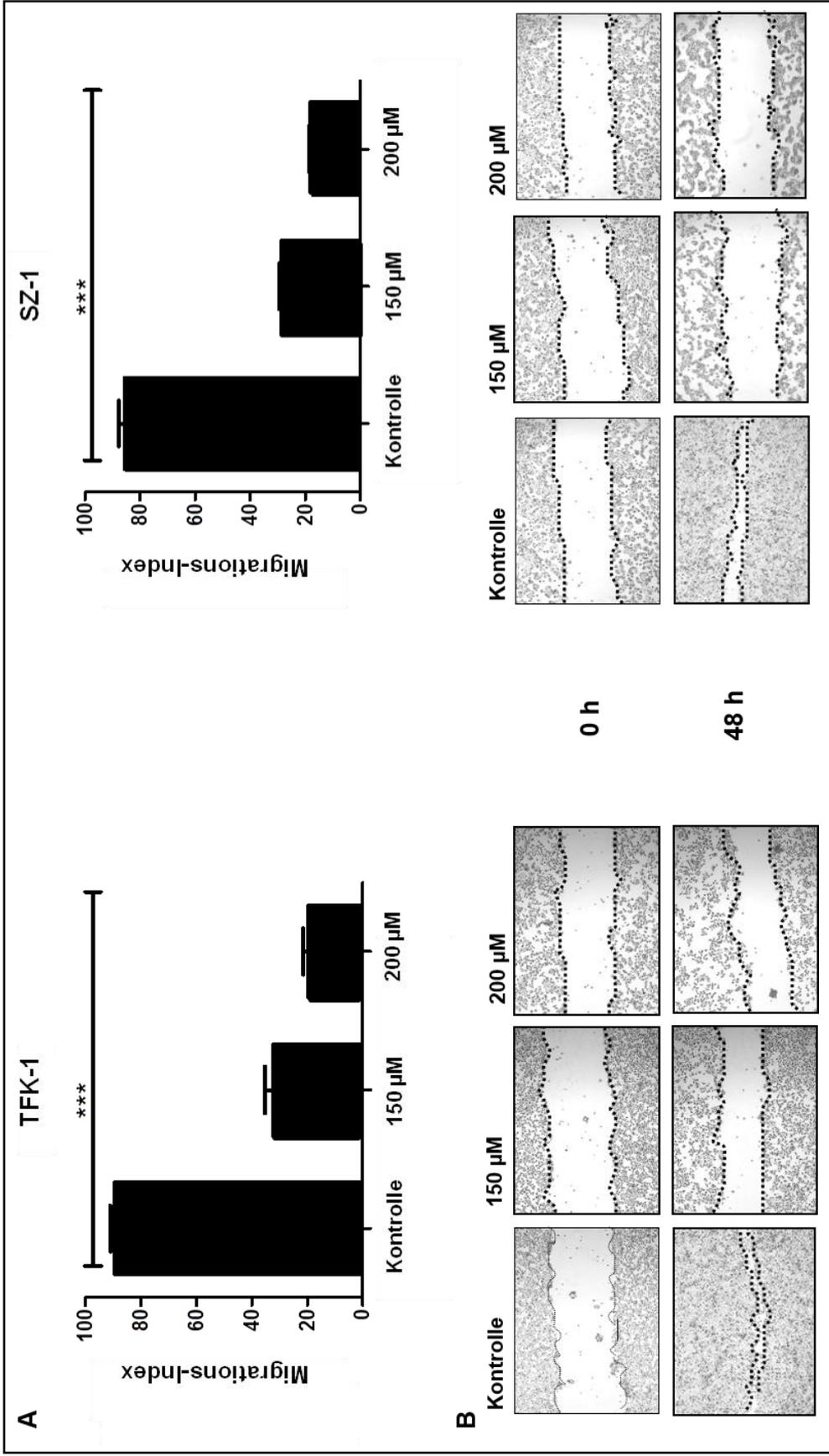


**Abb. 4: WST-1 Assay nach Papain- Applikation:** Dosis- und zeitabhängige Inhibition der Zellproliferation von TFK-1 und SZ-1 Zellen durch Papain-Applikation (25 µM, 40 µM, 100 µM). A) Darstellung der relativen Zellzahl 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der jeweiligen Behandlung. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. B) Lichtmikroskopische Bilder der Zellproliferation von TFK-1 und SZ-1 Zellen 48 Stunden nach Behandlung mit Papain (10x Vergrößerung) [1].

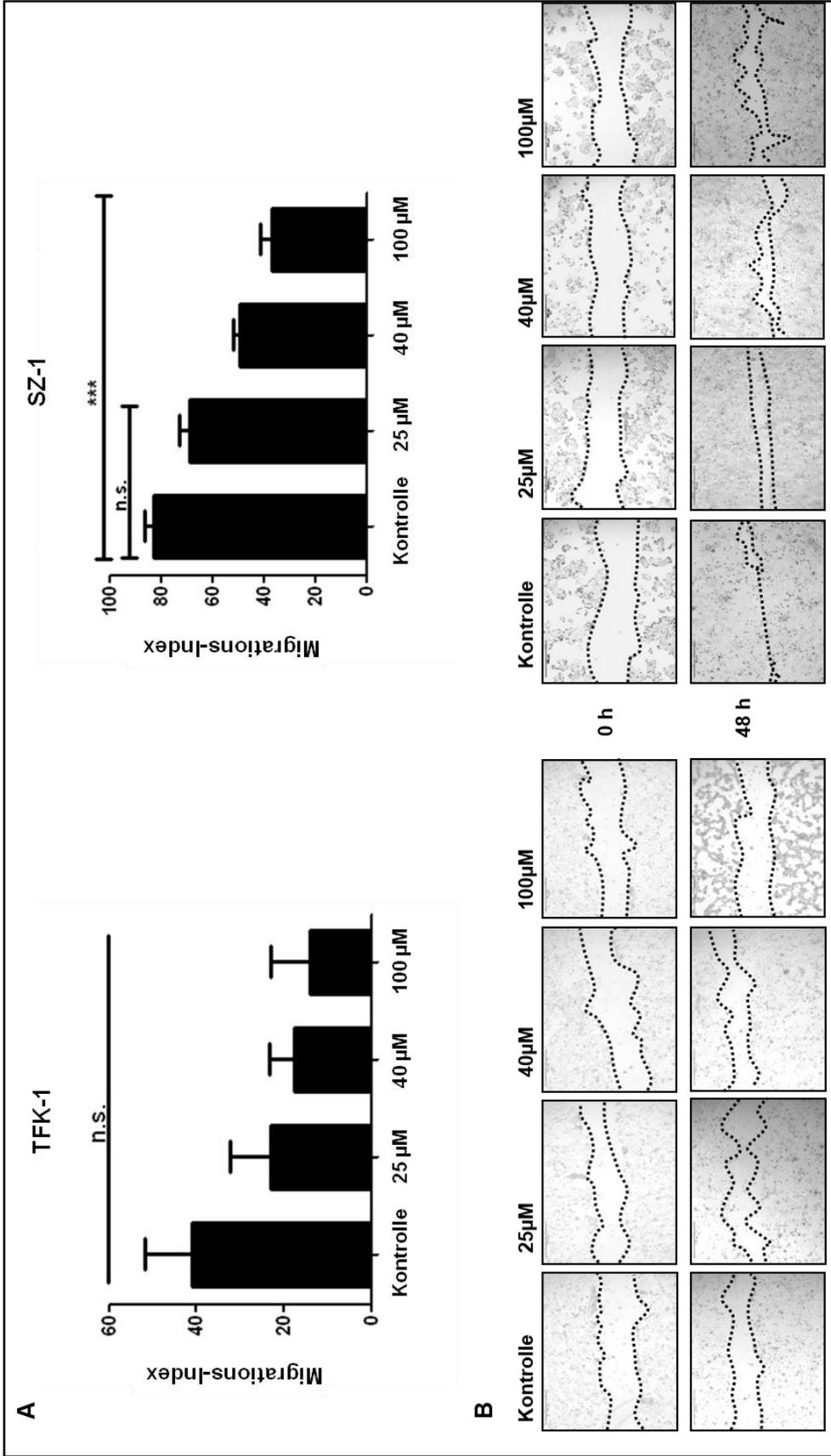
### **3.2 Analyse der Migration nach Bromelain-/ Papain- Applikation**

Der Einfluss von Bromelain und Papain auf die Motilität von CCC-Zellen wurde mithilfe des Wound-Healing Assays untersucht. Wie unter 2.2.4 Analyse der Migration mit dem Wound-Healing Assay beschrieben, wurden lichtmikroskopische Bilder der durch den Zellrasen gezogenen Wunde zu Beginn und 48 Stunden nach Behandlung mit Bromelain (150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) bzw. Papain (25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) aufgenommen und aus dem Ausmaß des Wundverschlusses der Migrationsindex ermittelt (Abbildung 5 und 6). Die lichtmikroskopischen Bilder der Bromelain-Behandlung zeigten bei beiden Zelllinien eine effektive Inhibition der Wundheilung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5B). Während die Kontrolle der TFK- 1 und SZ-1 Zellen einen fast vollständigen Wundschluss nach 48 stündiger Inkubation zeigte, war bei den mit Bromelain behandelten CCC-Zellen nur eine geringe Verschmälerung der Wundfläche bei beiden Konzentrationen zu erkennen. Der aus diesen lichtmikroskopischen Aufnahmen ermittelte Migrationsindex (Abbildung 5A) zeigte zudem, dass es eine signifikante Dosisabhängigkeit der Inhibition der Migration durch die Bromelain-Behandlung gab. So war der Migrationsindex der mit 150  $\mu$ M Bromelain behandelten TFK-1 und SZ-1 Zellen um 57 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert, bei den mit 200  $\mu$ M behandelten TFK-1 Zellen um 70 % und bei mit 200  $\mu$ M behandelten SZ-1 Zellen um 65 % im Vergleich zur Kontrolle. Auch die lichtmikroskopischen Bilder der mit Papain behandelten CCC-Zellen zeigten eine deutliche Inhibition der Wundheilung (Abbildung 6B). So war bei den Kontrollen, insbesondere bei SZ-1, ein fast vollständiger Wundverschluss zu beobachten, wohingegen bei den mit Papain behandelten CCC- Zellen auch nach 48 stündiger Inkubation noch deutliche Wundflächen erkennbar waren. Wie bereits bei Bromelain zeigte der Migrationsindex auch bei Papain eine signifikante dosisabhängige Inhibition der Motilität der CCC-Zellen (Abbildung 6A). So war der Migrationsindex bei den mit 25  $\mu$ M Papain behandelten Zellen um 18 % (TFK-1) bzw. 10 % (SZ-1), bei den mit 40  $\mu$ M Papain behandelten Zellen um 23 % (TFK-1) bzw. 17 % (SZ-1) und bei den mit 100  $\mu$ M Papain behandelten Zellen um 27% (TFK-1) bzw. 22% (SZ-1) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle vermindert. Das Wound-Healing-Assay zeigte, dass sowohl Bromelain als auch

Papain die Zellmigration inhibieren können, wobei eine signifikante Dosisabhängigkeit des inhibitorischen Effektes erkennbar war (200  $\mu\text{M}$  > 150  $\mu\text{M}$  Bromelain, 100  $\mu\text{M}$  > 40  $\mu\text{M}$  > 25  $\mu\text{M}$  Papain). Weiterhin zeigte sich, dass das Ausmaß des Wundverschlusses unter der Bromelain-Behandlung verglichen mit dem unter der Papain-Behandlung deutlich geringer war und so eine effektivere Inhibition des Wundverschlusses und damit der Migration durch Bromelain erzielt wurde.



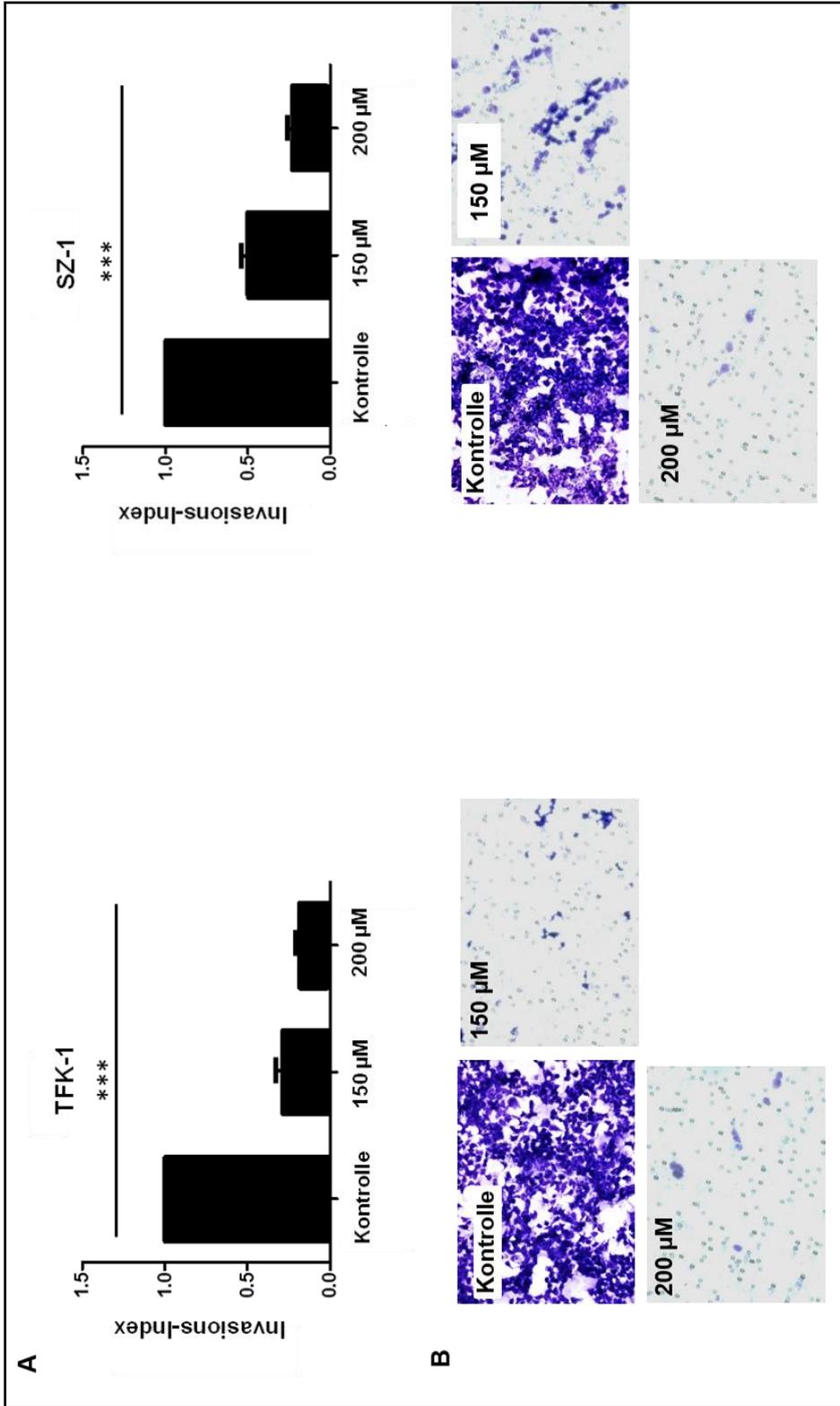
**Abb. 5: Migrations- Assay nach Bromelain- Applikation:** Dosisabhängige Inhibition der Motilität von TFK-1 und SZ-1 Zellen nach Bromelain- Applikation (150 µM, 200 µM). A) Darstellung des Migrationsindex nach entsprechender Behandlung mit Bromelain. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen; signifikant unterschiedliche Werte zur Kontrolle sind gekennzeichnet. B) Lichtmikroskopische Bilder zu Beginn und 48 Stunden nach Behandlung mit Bromelain (10x Vergrößerung) [1].



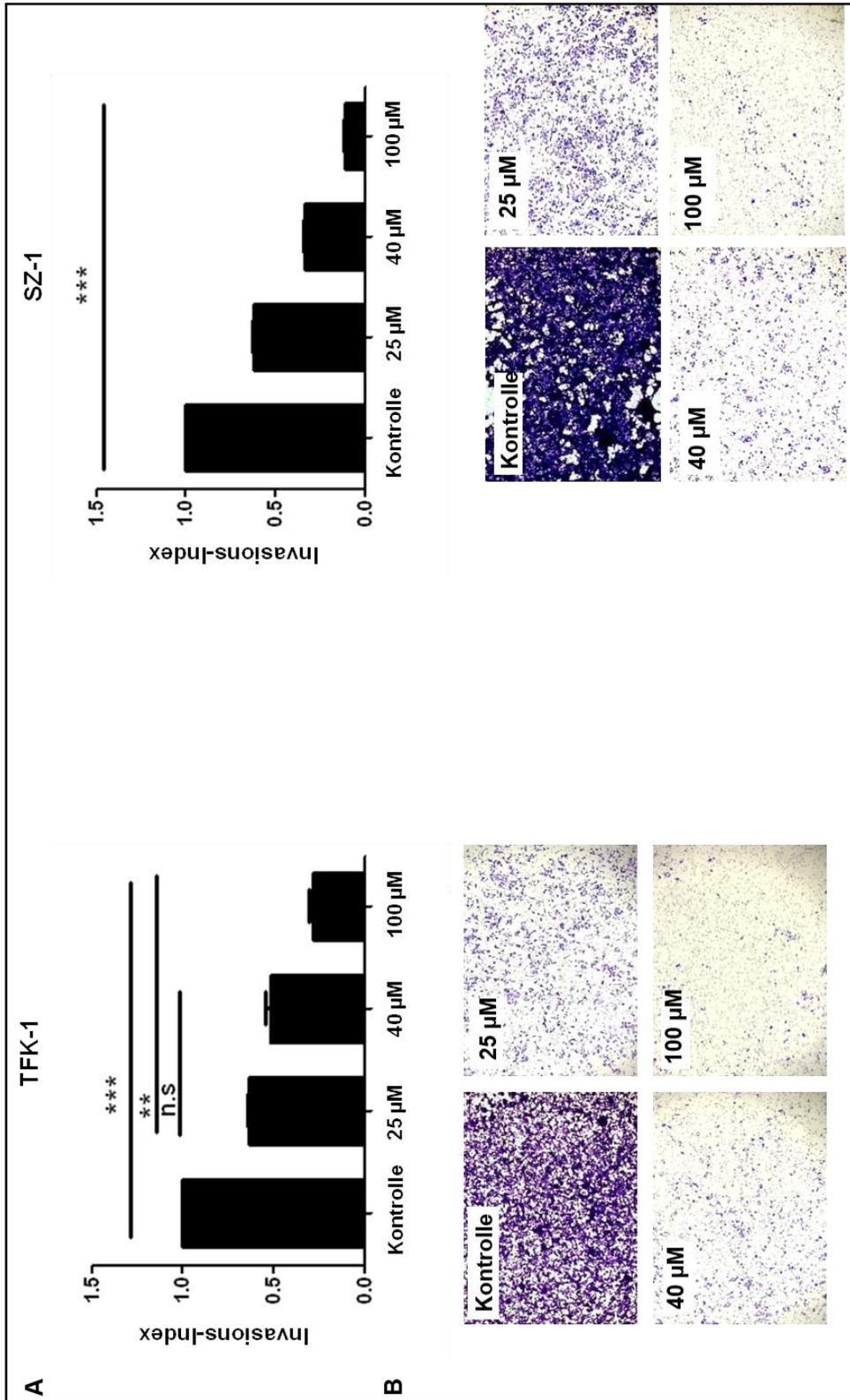
**Abb. 6: Migrations- Assay nach Papain-Applikation:** Dosisabhängige Inhibition der Motilität von TFK-1 und SZ-1 Zellen nach Papain-Applikation (25 µM, 40 µM, 100 µM). A) Darstellung des Migrationsindex nach entsprechender Behandlung mit Papain. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen; signifikant unterschiedliche Werte zur Kontrolle sind gekennzeichnet. B) Lichtmikroskopische Bilder zu Beginn und 48 Stunden nach Behandlung mit Papain (10x Vergrößerung) [1].

### **3.3 Analyse der Invasion nach Bromelain-/ Papain- Applikation**

Um den Einfluss von Bromelain und Papain auf die Invasion von CCC-Zellen zu untersuchen, wurden BD BioCoat™ Matrigel™ Invasionskammern verwendet. Damit konnte das Invasionsverhalten von mit Bromelain (150 µM, 200 µM) und Papain (25 µM, 40 µM, 100 µM) behandelten TFK-1 und SZ-1 Zellen mit dem der jeweiligen Kontrolle verglichen werden (Abbildung 7 und 8). Die Bromelain-Behandlung führte bei beiden CCC-Zelllinien zu einer signifikanten, dosisabhängigen Inhibition der Zellinvasion (Abbildung 7). Die lichtmikroskopischen Bilder (Abbildung 7B) der mit Bromelain behandelten CCC-Zellen zeigten eine deutlich geringere Dichte an invadierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, wobei die geringste Zelldichte unter der 200 µM Bromelain-Behandlung zu beobachten war. Der aus den lichtmikroskopischen Bildern ermittelte Invasionsindex ist in Abbildung 7A dargestellt. Bei den TFK-1 Zellen war die Invasion der mit 150 µM Bromelain behandelten Zellen um 72 %, die Invasion der mit 200 µM Bromelain behandelten Zellen um 81 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Bei den SZ-1 Zellen führte die Behandlung mit 150 µM Bromelain zu einer Reduktion der Zellinvasion um 50 %, die Behandlung mit 200µM Bromelain zu einer Reduktion um 77 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Papain-Behandlung der CCC-Zellen führte zu einer ähnlichen dosisabhängigen Inhibition der Invasion im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 8). Auch hier zeigten die lichtmikroskopischen Bilder der Kontrolle eine sehr hohe Dichte an invadierten Zellen, wohingegen die mit Papain behandelten TFK-1 und SZ-1 Zellen eine deutlich geringere Dichte an invadierten Zellen aufwiesen (Abbildung 8B). Wie auch bei Bromelain war die geringste Zelldichte unter der höchsten Dosis (100 µM Papain) zu beobachten. So zeigte der Invasionsindex der mit 100µM Papain behandelten CCC-Zellen eine signifikante Reduktion der Invasion um 69 % (TFK-1) bzw. um 90 % (SZ-1) im Vergleich zur Kontrolle (Reduktion der Invasion um 38 % (TFK-1 und SZ-1) bei 25 µM Papain und um 51 % (TFK-1) bzw. 67 % (SZ-1) bei 40 µM Papain im Vergleich zur Kontrolle) (Abbildung 8A). Das Invasions- Assay zeigte, dass die Invasion von CCC-Zellen durch die Behandlung mit Bromelain und Papain dosisabhängig reduziert werden konnte.



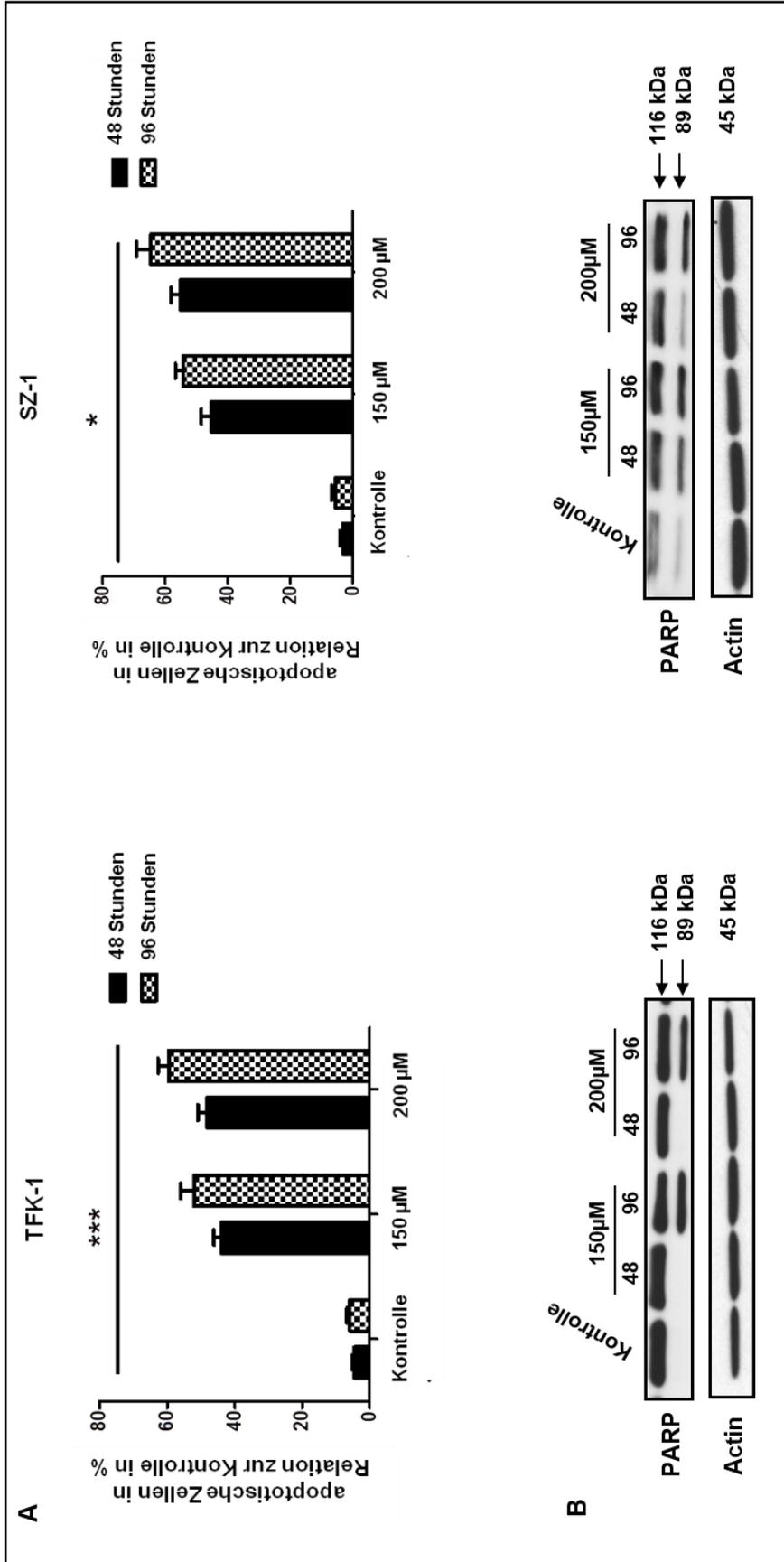
**Abb. 7: Invasions- Assay nach Bromelain- Applikation:** Dosisabhängige Reduktion der Invasionsrate von TFK-1 und SZ-1 Zellen nach 48 stündiger Behandlung mit Bromelain (150 µM, 200 µM). A) Darstellung des Invasionsindex nach der jeweiligen Behandlung. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikant unterschiedliche Werte zur Kontrolle sind markiert. B) Darstellung der korrespondierenden lichtmikroskopischen Bilder (20x Vergrößerung) [1].



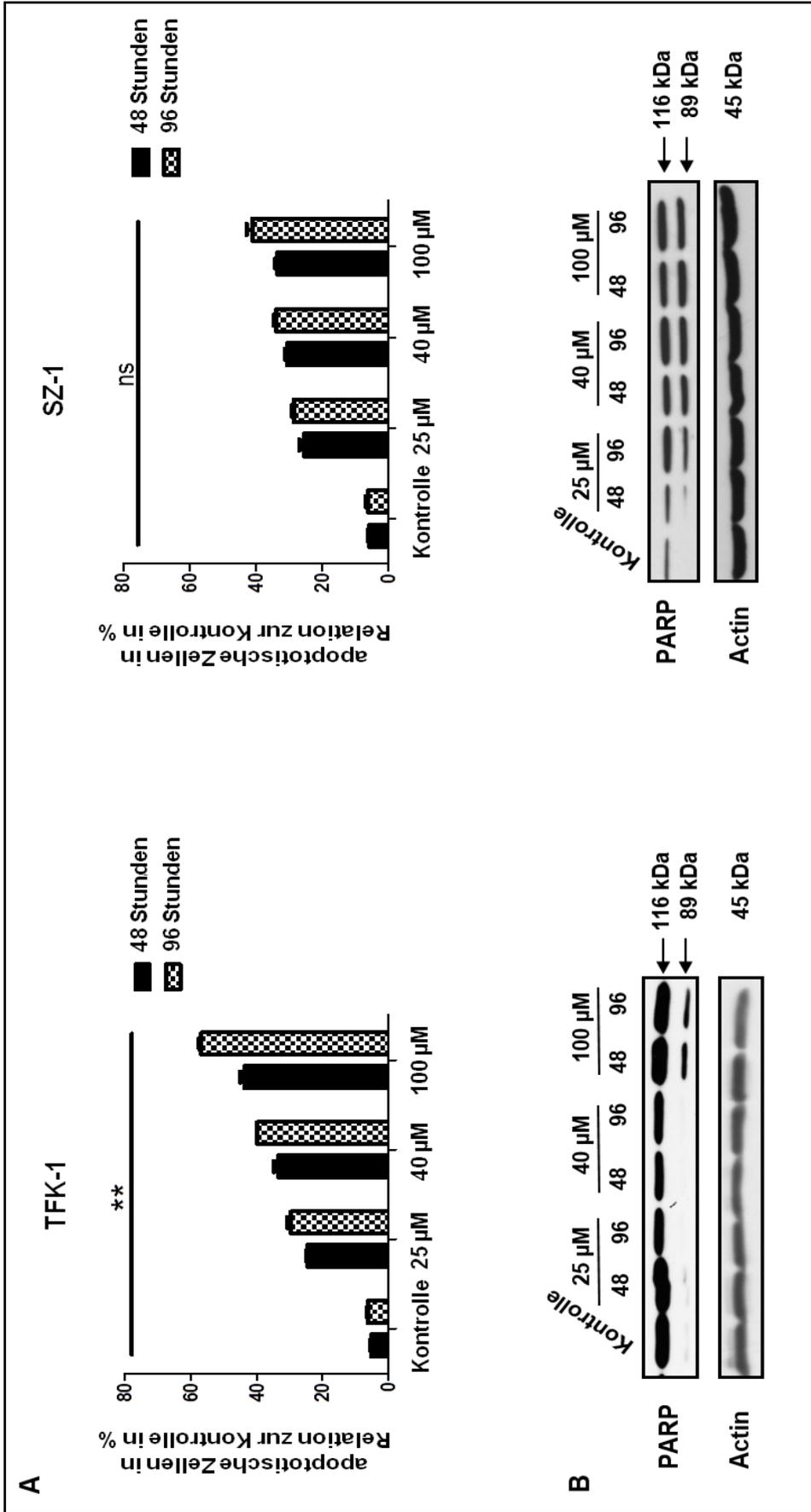
**Abb. 8: Invasions- Assay nach Papain- Applikation:** Dosisabhängige Reduktion der Invasionsrate von TFK-1 und SZ-1 Zellen nach 48 stündiger Behandlung mit Papain (25 µM, 40 µM, 100 µM). A) Darstellung des Invasionsindex nach der jeweiligen Behandlung. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikant unterschiedliche Werte zur Kontrolle sind markiert. B) Darstellung der korrespondierenden lichtmikroskopischen Bilder (20x Vergrößerung) [1].

### **3.4 Analyse der Apoptose nach Bromelain-/ Papain- Applikation**

Die Apoptose als programmierter Zelltod stellt einen möglichen Mechanismus dar, wie antiproliferative Medikamente auf Tumorzellen wirken können. Um zu überprüfen, ob Bromelain und Papain ihre Wirkung auf TFK-1 und SZ-1 Zellen über die Induktion von Apoptose vermitteln, wurde die durchflusszytometrische Apoptosemessung mit Annexin V/PI durchgeführt. Die in Abbildung 9A dargestellten Ergebnisse der Bromelain-Applikation zeigen, dass die Behandlung der CCC-Zellen mit Bromelain zu signifikant höheren Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle führte, die nur sehr geringe Apoptoseraten aufwies (4,2 % (TFK-1), 5,1 % (SZ-1) nach 96 stündiger Inkubation). Dabei zeigte sich außerdem, dass der prozentuelle Anteil an apoptotischen Zellen von Dosis und Zeit abhängig war. Die Behandlung mit 150  $\mu$ M Bromelain führte nach 48 Stunden zu einem prozentuellen Anteil an apoptotischen Zellen von 42 % (TFK-1), wohingegen nach 96 Stunden ein Anteil von 52 % (TFK-1) gemessen wurde. Bei der Applikation von 200  $\mu$ M Bromelain wurde nach 48 Stunden eine Apoptoserate von 52 % (TFK-1) ermittelt und nach 96 Stunden 60 % (TFK-1). Bei der Apoptosemessung nach Papain-Behandlung zeigte sich ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 10A). Auch hier war die Apoptoserate der Kontrollen sehr gering (6,2% (TFK-1) bzw. 6,7 % (SZ-1) nach 96 stündiger Inkubation), wohingegen der prozentuelle Anteil an apoptotischen Zellen nach Papain-Applikation mit zunehmender Zeit und Dosis anstieg. So lag die Apoptoserate nach 48 stündiger Inkubation bei 25  $\mu$ M Papain bei 24,0 %, bei 40  $\mu$ M bei 32,0 % und bei 100  $\mu$ M bei 42,5 % (TFK-1). Nach 96 stündiger Inkubation wurde bei den mit 100  $\mu$ M Papain behandelten TFK-1 Zellen ein Anteil an apoptotischen Zellen von 56,2 % gemessen. Die durchflusszytometrische Apoptosemessung mit Annexin V/ PI zeigte, dass sowohl Bromelain als auch Papain eine sehr hohe Apoptoserate bei beiden CCC-Zelllinien induzierte, deren Höhe abhängig von Dosis und Zeit war.



**Abb. 9: Apoptosemessung nach Bromelain- Applikation:** Dosisabhängige Zunahme apoptotischer TFK-1 und SZ-1 Zellen nach Bromelain- Applikation (150 µM, 200 µM). A) Darstellung der Apoptoserate nach 48- und 96-stündiger Behandlung mit Bromelain. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikant unterschiedliche Werte zur Kontrolle sind markiert. B) Analyse der Spaltung von PARP in mit Bromelain behandelten TFK-1 und SZ-1 Zellen mithilfe des Immunoblots. Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet [1].



**Abb. 10: Apoptosemessung nach Papain- Applikation:** Dosisabhängige Zunahme apoptotischer TFK-1 und SZ-1 Zellen nach Papain-Applikation (25 µM, 40 µM, 100 µM). A) Darstellung der Apoptoserate nach 48- und 96-stündiger Behandlung mit Papain. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikant unterschiedliche Werte zur Kontrolle sind markiert. B) Analyse der Spaltung von PARP in mit Papain behandelten TFK-1 und SZ-1 Zellen mithilfe des Immunoblots. Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet [1].

### **3.5 Analyse der Bromelain-/Papain-Wirkung auf CCC-Zellen auf Proteinebene**

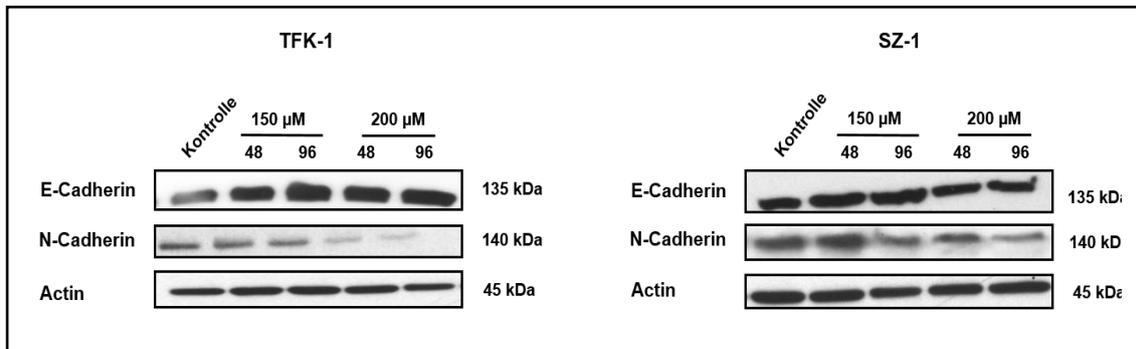
#### **3.5.1 Ergebnisse des Western-Blots mit dem Marker PARP**

Neben der durchflusszytometrischen Apoptosemessung mit Annexin V/PI wurde auch ein Western-Blot mit dem Antikörper PARP, welcher als Marker für Apoptose gilt, durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Bromelain- als auch Papain- Behandlung zu einer zeit- (96 > 48 Stunden) und dosisabhängigen (200 µM > 150 µM Bromelain, 100µM > 40µM > 25 µM Papain) Zunahme der Spaltung der Poly-(ADP-Ribose) Polymerase bei den TFK-1 und SZ-1 Zellen führte (Abbildung 9B und 10B). Damit wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Apoptosemessung bestätigt und gezeigt, dass Bromelain und Papain in der Lage waren, Apoptose in den CCC-Zellen auszulösen, wobei eine Dosis- und Zeitabhängigkeit in der Stärke der Apoptose-Induktion erkennbar waren.

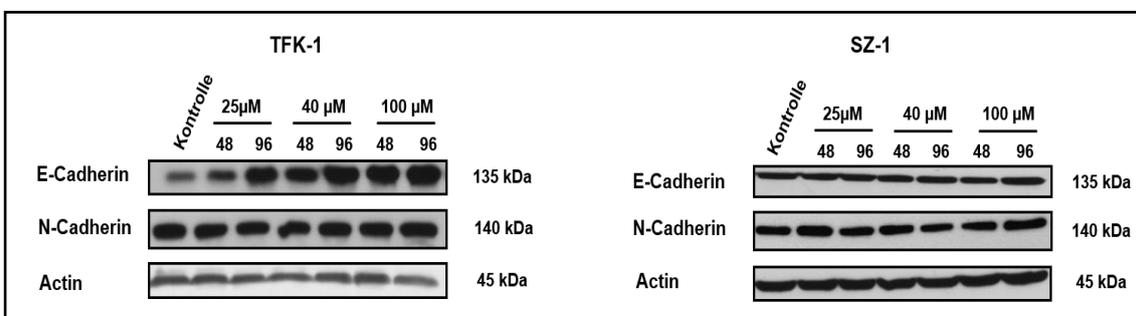
#### **3.5.2 Ergebnisse der EMT-Untersuchung**

Die epithelial- mesenchymale Transition (EMT) wird als einer der entscheidenden Schritte bei der Karzinogenese von Tumorzellen angesehen. Um zu überprüfen, ob Bromelain oder Papain die EMT bei CCC-Zellen inhibieren können, wurden die Zellen entweder als Kontrolle, mit Bromelain (150 µM, 200 µM) oder Papain (25 µM, 40 µM, 100 µM) für 48 und 96 Stunden behandelt und die Expression der EMT-Marker (E-Cadherin, N-Cadherin) mithilfe des Western-Blots ausgewertet. Dabei zeigte die Bromelain-Behandlung eine zeit- (96 > 48 Stunden) und dosisabhängige (200 µM > 150 µM Bromelain) Zunahme der Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und eine Abnahme des mesenchymalen Markers N-Cadherin sowohl bei TFK-1 als auch SZ-1 Zellen (Abbildung 11). Die Papain-Behandlung hingegen führte zu keiner wesentlichen Änderung der Expression von E- oder N-Cadherin bei beiden Zelllinien sowohl nach 48 als auch 96 stündiger Behandlung (Abbildung 12). Somit wurde durch das Immunoblot gezeigt, dass die Bromelain- Behandlung der CCC-Zellen zu

einer effektiven Inhibition der EMT führte, wohingegen Papain keinen Einfluss auf die EMT in humanen CCC-Zellen nahm.



**Abb. 11: EMT- Expression in mit Bromelain behandelten CCC- Zellen (TFK-1, SZ-1):** TFK-1 und SZ-1 Zellen wurden mit Bromelain (150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) oder ihrer Kontrolle (DMSO) für 48 und 96 Stunden behandelt. Die Zellysate wurden mittels Immunoblot mit Antikörper gegen E- und N-Cadherin analysiert. Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Man erkennt einen dosis- (200  $\mu$ M > 150  $\mu$ M) und zeitabhängigen (96 > 48 Stunden) Anstieg der Expression von E-Cadherin und Abnahme der Expression von N-Cadherin [1].

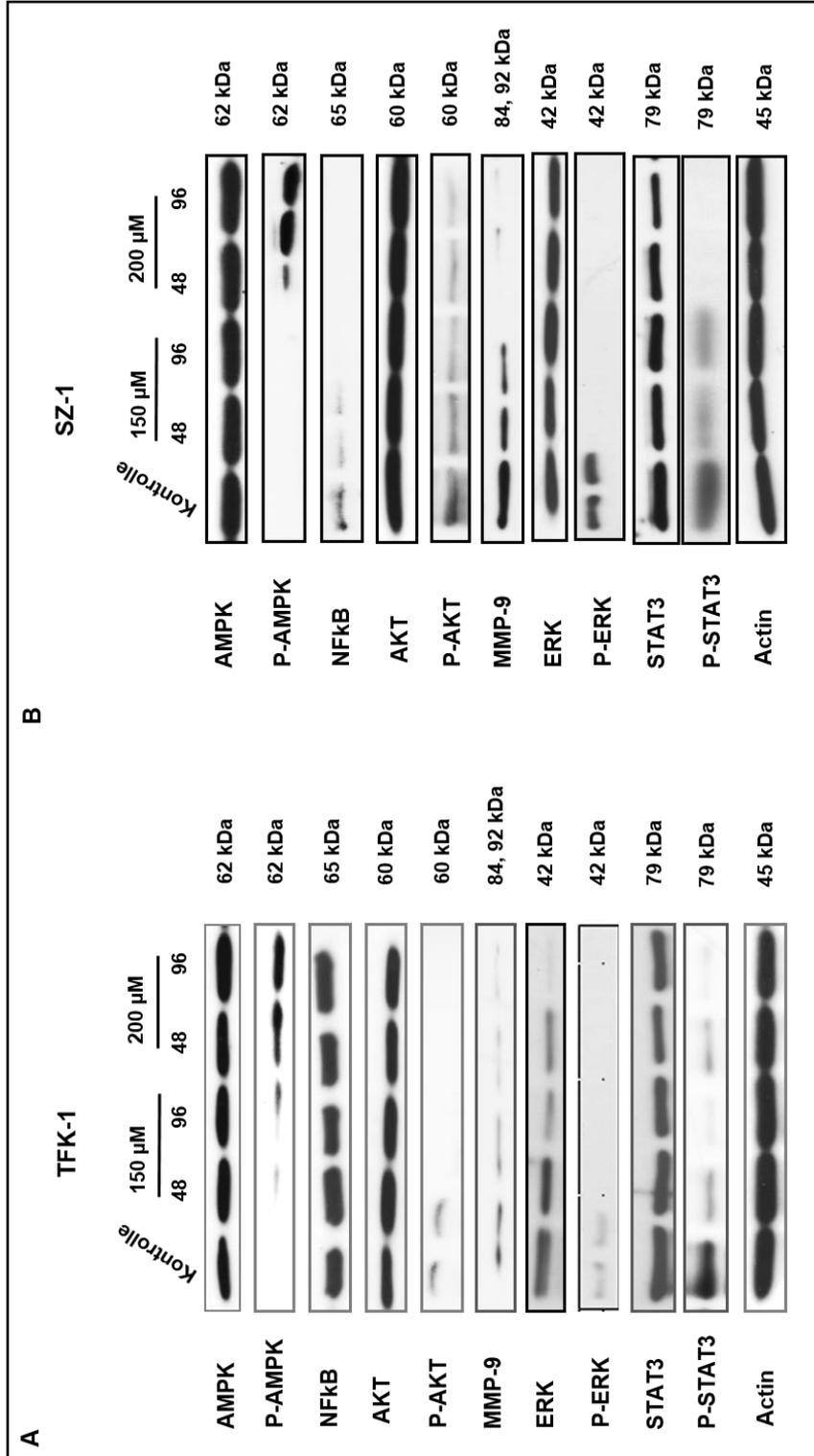


**Abb. 12: EMT- Expression in mit Papain behandelten CCC- Zellen (TFK-1, SZ-1):** TFK-1 und SZ-1 Zellen wurden mit Papain (25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) oder ihrer Kontrolle ( $H_2O$ ) für 48 und 96 Stunden behandelt. Die Zellysate wurden mittels Immunoblot mit Antikörper gegen E- und N-Cadherin analysiert. Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Man erkennt keine wesentliche Beeinflussung beider EMT- Marker durch die Papain-Behandlung der CCC- Zellen [1].

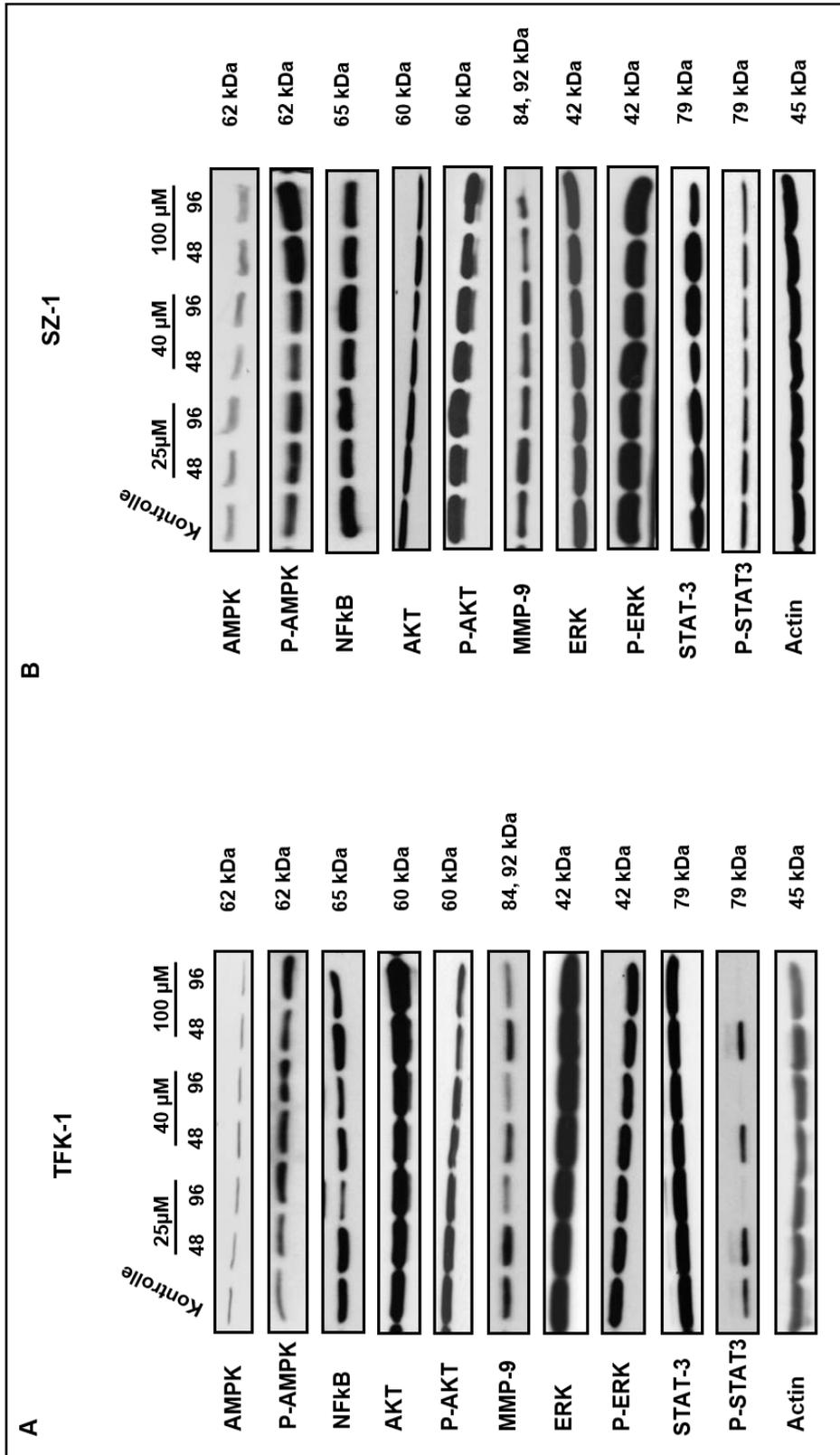
### **3.5.3 Ergebnisse der Untersuchung des NFκB/ AMPK- Signalweges**

Der bereits in der Einleitung (1.4 NFκB/ AMPK- Signalweg) beschriebene NFκB/ AMPK- Signalweg spielt in der Karzinogenese einiger Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle [136, 137]. Um zu überprüfen, welche Rolle die untersuchten Substanzen (Bromelain, Papain) auf den Status von NFκB, AMPK und einigen ihnen im Signalweg nachgeschalteten Proteine haben, führten wir verschiedene Immunoblots durch (Abbildung 13 und 14). Die Behandlung mit Bromelain (150 μM, 200 μM) führte bei beiden CCC-Zelllinien zu einer zeit- (96 > 48 Stunden) und dosisabhängigen (200μM > 150 μM) Abnahme der Expression von NFκB und Zunahme der Expression von phospho AMPK. Das nicht phosphorylierte AMPK hingegen blieb unverändert. Die Expression von phospho AKT, phospho ERK, phospho STAT3 und MMP-9 wurde mit zunehmender Zeit und Dosis herunterreguliert, während die entsprechenden nicht phosphorylierten Formen unverändert blieben (Abbildung 13). Folglich führte die Bromelain-Behandlung von CCC- Zellen zu einer effektiven Inhibition des NFκB/ AMPK- Signalweges. Die Papain-Behandlung (25 μM, 40 μM, 100 μM) führte bei beiden CCC-Zelllinien zu keiner effektiven Abnahme der Expression von NFκB. Die Expression von phospho AMPK nahm mit zunehmender Zeit und Dosis zwar ab, war allerdings nicht so stark ausgeprägt wie bei Bromelain. Das nicht phosphorylierte AMPK blieb unverändert. Die Expression der im NFκB/ AMPK- Signalweg nachgeschalteten Proteine unterschied sich teilweise zwischen TFK-1 und SZ-1 Zellen. Bei TFK-1 kam es zu einer leichten, zeit- (96 > 48 Stunden) und dosisabhängigen (100 μM > 40 μM > 25 μM Papain) Abnahme der Expression von phospho AKT, phospho ERK, phospho STAT3 und MMP-9. Die entsprechenden nicht phosphorylierten Formen blieben bei allen Dosen und zu allen Zeitpunkten unverändert. Bei SZ-1 nahm die Expression von phospho AKT und MMP-9 mit zunehmender Zeit und Dosis leicht ab und war vor allem nach 96- stündiger Behandlung mit 100 μM Papain geringer im Vergleich zur Kontrolle ausgeprägt, das nicht phosphorylierte AKT blieb unverändert. Bei phospho ERK und phospho STAT3 sowie deren nicht phosphorylierten Formen zeigte sich zu allen Zeitpunkten und bei allen Dosen keine Veränderung der Stärke der Expression (Abbildung 14). Folglich kam es durch die Papain-Behandlung nur zu

einer teilweisen Beeinflussung des NFκB/ AMPK- Signalweges in CCC-Zellen und nicht zu einer deutlichen Inhibition wie es unter der Bromelain-Behandlung zu beobachten war.



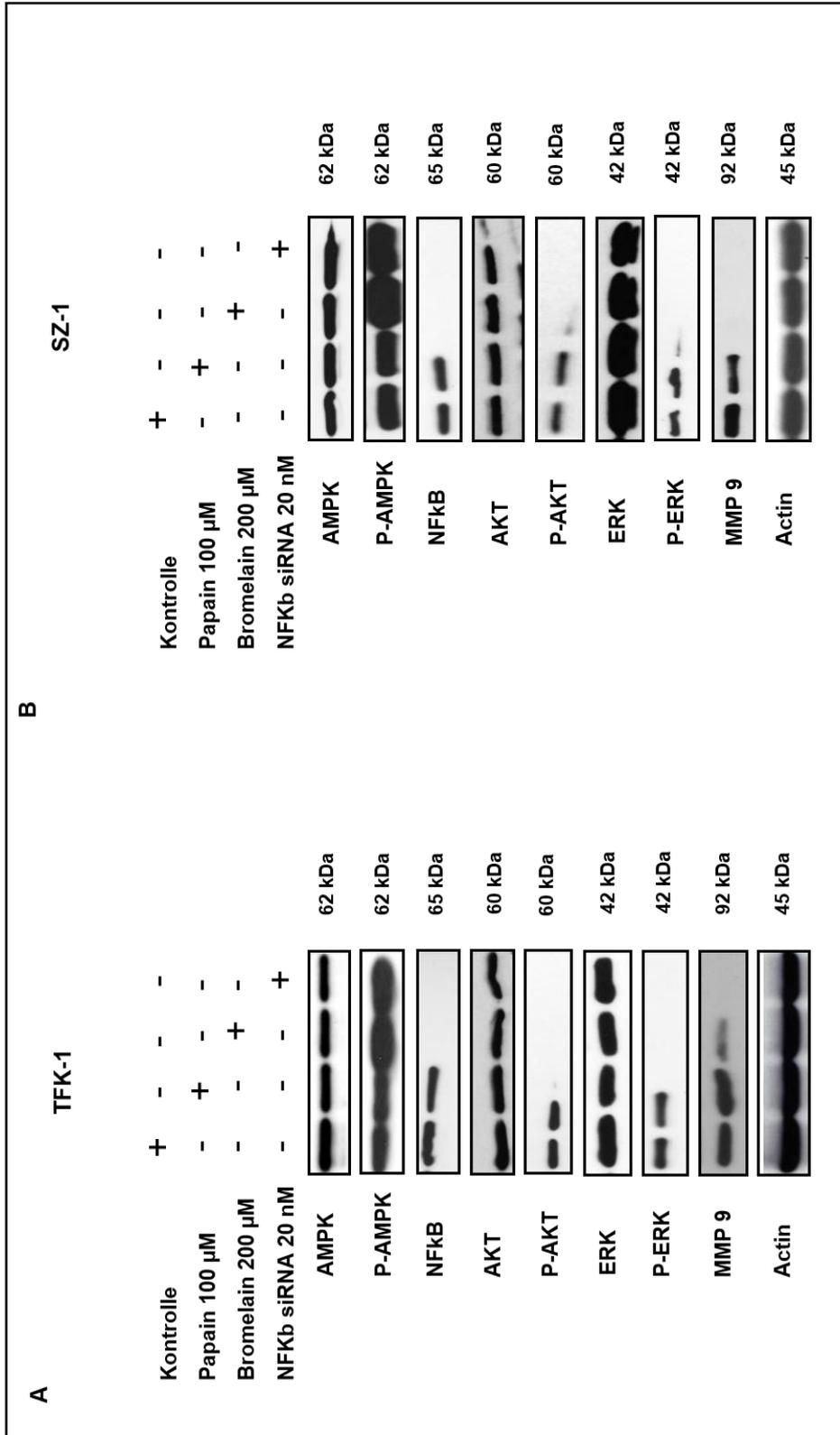
**Abb. 13: Immunoblot des Effekts von Bromelain auf den NFκB/ AMPK- Signalweg und auf die nachgeschalteten Signalwege:** TFK-1 (A) und SZ-1 Zellen (B) wurden mit Bromelain (150 μM, 200 μM) oder ihrer Kontrolle (DMSO) für 48 und 96 Stunden behandelt. Die Zellysate wurden mittels Immunoblot mit Antikörper gegen AMPK, p-AMPK, NFκB, AKT, p-AKT, MMP-9, ERK, p-ERK, STAT3 und p-STAT3 analysiert. Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die Bromelain-Behandlung der CCC-Zellen zeigte eine deutliche Inhibition des NFκB/ AMPK- Signalweges [1].



**Abb. 14: Immunoblot des Effekts von Papain auf den NFκB/ AMPK- Signalweg und auf die nachgeschalteten Signalwege:** TFK-1 (A) und SZ-1 Zellen (B) wurden mit Papain (25 μM, 40 μM, 100 μM) oder ihrer Kontrolle (H<sub>2</sub>O) für 48 und 96 Stunden behandelt. Die Zellslysate wurden mittels Immunoblot mit Antikörper gegen AMPK, p-AMPK, NFκB, AKT, p-AKT, MMP-9, ERK, p-ERK, STAT3 und p-STAT3 analysiert. Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Die Papain-Behandlung der CCC-Zellen zeigte nur eine teilweise Inhibition des NFκB/ AMPK- Signalweges [1].

### **3.6 Ergebnisse der Stilllegung des NFκB- Gens mit siRNA**

Die Deletion eines Gens ermöglicht die Untersuchung, welche Rolle das entsprechende Protein in einem Signalweg spielt. Um die Ergebnisse des Immunoblots zu ergänzen, wurde eine siRNA Therapie mit Deletion von NFκB durchgeführt und die Auswirkung auf die Expression der im NFκB/ AMPK-Signalweg nachgeschalteten Proteine überprüft (Abbildung 15). Durch die Deletion des NFκB- Gens wurde eine effektive Inhibition der Expression von phospho AKT, phospho ERK und MMP-9 in beiden CCC-Zelllinien beobachtet. Die Behandlung mit 200 μM Bromelain erzielte eine ähnlich effektive Inhibition der Expression dieser Proteine sowohl in TFK-1 als auch SZ-1 Zellen. Die bereits durch den Immunoblot vermutete geringere Beeinflussung des NFκB Status durch die Papain-Behandlung wurde durch die siRNA bestätigt, bei welcher die Behandlung mit 100 μM Papain keine effektive Inhibition der Expression von phospho AKT, phospho ERK und MMP-9 im Gegensatz zur NFκB Silencing zeigte. Basierend auf den Ergebnissen des Immunoblots und der siRNA zeigte sich, dass der NFκB/ AMPK- Signalweg eine Rolle in der Karzinogenese des CCC spielt und durch Bromelain inhibiert werden konnte, durch Papain dagegen nicht.



**Abb. 15: Effekt der NFKB siRNA Behandlung auf CCC-Zellen:** Vergleich der Bromelain-, Papain-, DMSO-, und H<sub>2</sub>O Behandlungen mit der Stilllegung von NFKB mit siRNA in TFK-1 (A) und SZ-1 Zellen (B). Die Zellen wurden mit 20 nM NFKB siRNA oder mit Kontroll-siRNA (20 nM) transfiziert. Die Zellysate wurden mittels Immunoblot mit Antikörper gegen AMPK, p-AMPK, NFKB, AKT, p-AKT, Erk, p-Erk und MMP-9 analysiert. Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet. Nur Bromelain beeinflusste signifikant den NFKB/ AMPK-Signalweg im Vergleich zu Papain [1].

## **4 DISKUSSION**

Das CCC stellt mit einer altersstandardisierten Inzidenzrate (ASIR) von weniger als 1.5 Fällen pro 100 000 Einwohner zwar eine, im Vergleich zu anderen Tumorentitäten, seltene Tumorart in der westlichen Welt dar [13, 14], allerdings lassen epidemiologische Studien einen weltweiten Anstieg der Inzidenz des CCC vermuten [17, 18]. Die operative Resektion des CCC stellt bisher die einzige kurative Therapieoption dar [4, 5]. Da das CCC bei der Mehrheit der Patienten allerdings erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert wird, in welchem eine chirurgische Resektion nicht mehr möglich ist, kommt für diese Patienten nur noch eine palliative Chemotherapie in Frage [2, 59]. Valle et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Kombination aus Gemcitabine und Cisplatin zu einem signifikant längeren Überleben im Vergleich zu einer Monotherapie mit Gemcitabine führte (11.7 vs. 8.1 Monate), sodass diese Kombination die momentane Erstlinien- Standardtherapie in der palliativen Behandlung des CCC darstellt [2, 77]. Die Erforschung neuer Therapieoptionen ist daher dringend erforderlich, um auch in einem fortgeschrittenen Tumorstadium ein besseres Überleben zu ermöglichen.

Neue Therapieansätze könnten hierbei aus Pflanzen gewonnene Extrakte wie Bromelain, ein Extrakt aus dem Stamm und der unreifen Frucht der Ananas (*Ananas comosus*) [106], oder Papain, ein Extrakt aus der *Carica papaya latex* [129], darstellen. Sie spielen in der Naturheilkunde schon seit langem eine wichtige Rolle und werden zur Behandlung verschiedener Erkrankungen eingesetzt [106, 110-114, 129-135]. Auch in der medizinischen Forschung gewinnen Pflanzenextrakte zunehmend an Bedeutung. So wurden für Bromelain bereits anti-inflammatorische, anti-ödematöse, anti-thrombotische/fibrinolytische, anti-angiogenetische und immunmodulatorische Effekte nachgewiesen [106, 112-114]. Für Papain wurde eine anti-angiogenetische, anti-diabetische, anti-entzündliche und anti-infektiöse Wirkung beschrieben [130-135]. Auch in der Tumorforschung spielen Pflanzenextrakte eine wichtige Rolle. Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass Bromelain *in vitro* und *in vivo* effektiv auf die Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten wirkt. So wurde eine antitumoröse Wirkung auf humane Magen- und Kolon-Karzinomzellen [115],

maligne peritoneale Mesotheliom-Zellen [117], Brustkrebszellen (GI101A humane Brustkrebs-Zelllinie) [118], humane A431 Epidermoid-Karzinom-Zellen und A375 Melanom-Zellen [119], Sarkom-Zellen (Sarkom L1-Zellen) [120] und auf Gliomzellen [121] beobachtet. Der genaue Wirkmechanismus, wie Bromelain diese Wirkungen vermittelt, ist bisher noch nicht geklärt. Für Papain gibt es bis jetzt keine Nachweise für eine antitumoröse Aktivität.

Die exakten molekularen Vorgänge in der Karzinogenese des CCC sind noch nicht vollständig verstanden. Daher könnte auch die Entschlüsselung der beteiligten Signalwege und Signalmoleküle in der CCC-Karzinogenese zu neuen Therapieansätzen in der Behandlung eines fortgeschrittenen CCC führen. Zheng et al. zeigten in ihrer Studie, dass der Signalweg zwischen AMPK und NF $\kappa$ B eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des hepatozellulären Karzinoms (HCC) spielt [137]. Weitere Studien zeigten, dass AMPK auch in anderen Tumorentitäten wie Prostata-, Lungen- oder Brust-Krebs eine Rolle im Wachstum und Metabolismus der Tumorzellen zu spielen scheint [136, 137].

Das Ziel unserer Studie war zu untersuchen, ob die beiden Pflanzenextrakte Bromelain und Papain in der Lage sind, in die CCC-Karzinogenese einzugreifen und so Wachstum und Metastasierung der Tumorzellen zu beeinflussen. Weiterhin haben wir überprüft, ob der Signalweg zwischen AMPK und NF $\kappa$ B auch eine Rolle in der Entwicklung des CCC spielt und ob er durch eine Bromelain- bzw. Papain-Applikation beeinflusst werden kann. Wir haben dafür zwei humane CCC-Zelllinien (TFK-1, SZ-1) mit verschiedenen Bromelain- (150  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) und Papain- Konzentrationen (25  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) behandelt und den Einfluss auf Proliferation, Migration, Invasion, Apoptose und auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) sowie die Beeinflussung des NF $\kappa$ B/ AMPK-Signalweges untersucht. Dabei sind wir zu folgenden Ergebnissen gekommen: i.) Sowohl Bromelain als auch Papain zeigten eine antitumoröse Aktivität gegen CCC-Zellen, ii.) Bromelain hatte eine effektivere antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen im Vergleich zu Papain, iii) die Therapie mit beiden Extrakten induzierte Apoptose, iv) die signifikante Restriktion der CCC-Zellen wurde hauptsächlich via Inhibition des NF $\kappa$ B/ AMPK- Signalwegs erreicht, v) die EMT wurde nur teilweise beeinflusst.

Im ersten Schritt wurden die Konzentrationen von Bromelain und Papain, mit denen die CCC-Zellen behandelt werden sollten, ermittelt. Da Bromelain schon auf eine antitumoröse Wirkung in anderen Tumormodellen getestet wurde, haben wir zwei weit verbreitete und etablierte Konzentrationen verwendet (150 µM, 200µM) [117, 155]. Auch unsere Experimente zeigten, dass diese beiden Konzentrationen effektiv die Karzinogenese von CCC-Zellen beeinflussen konnten. Verglichen mit der in der *Ananas comosus* enthaltenen Bromelain-Konzentration lag die von uns verwendete Bromelain-Konzentration deutlich darüber [106]. Da Papain zuvor nie als antitumoröses Medikament getestet wurde, haben wir in unserer Studie zum ersten Mal IC 50- Experimente durchgeführt und drei Konzentrationen (25 µM, 40 µM, 100 µM) gewählt, die eine effektive Inhibition, aber noch keine toxische Wirkung auf CCC-Zellen zeigten. Verglichen mit den Bromelain-Konzentrationen (150 µM, 200 µM) waren diese deutlich geringer, was zum einen daran lag, dass wir einen Bereich abdecken wollten, der von niedrigen zu hohen Konzentrationen reichte (25 µM bis 100 µM). Zum anderen waren bereits unter der Papain-Behandlung mit 100 µM deutliche inhibitorische Effekte und unter höheren Konzentrationen beginnende toxische Effekte auf CCC-Zellen zu beobachten, sodass wir 100 µM als oberen Wert festlegten.

Der Proliferations-Assay zeigte, dass das Tumorwachstum von beiden CCC-Zelllinien sowohl durch Bromelain als auch Papain im Vergleich zur Kontrolle effektiv inhibiert werden konnte. Dabei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit in der Stärke des inhibitorischen Effekts (200 µM > 150 µM Bromelain; 100 µM > 40 µM > 25 µM Papain). Auch in anderen Studien wurde eine antiproliferative Wirkung von Bromelain auf Tumorzellen nachgewiesen. So zeigten Amini et. al in ihrer Studie, dass Bromelain die Proliferation von humanen gastrointestinalen Tumorzellen (MKN45 und KATO-III) dosisabhängig inhibieren konnte [115]. Auch Romano et al. demonstrierten, dass Bromelain in der Lage war, die Proliferation von humanen Kolon-Adenokarzinom-Zellen (Caco-2) zu inhibieren [116]. Taussig et al. wiesen nach, dass Bromelain die Proliferation von drei Zelllinien dosisabhängig inhibieren konnte (Lewis lung carcinoma, YC-8 lymphoma und MCA-1 ascitic tumour cells) [156]. In einer weiteren Studie von Grabowska et al.

wurde demonstriert, dass Bromelain die Proliferation von Melanomzellen inhibieren konnte [157].

Mithilfe des Wound-Healing-Assays konnten wir darstellen, dass sowohl Bromelain als auch Papain in der Lage sind, die Motilität von CCC-Zellen zu inhibieren. Dabei zeigte sich erneut eine Dosisabhängigkeit des inhibitorischen Effektes auf die Migration der TFK-1 und SZ-1 Zellen (200  $\mu$ M > 150  $\mu$ M Bromelain; 100  $\mu$ M > 40  $\mu$ M > 25  $\mu$ M Papain). Weiterhin war zu beobachten, dass das Ausmaß des Wundverschlusses unter der Bromelain-Behandlung verglichen mit dem unter der Papain-Behandlung deutlich geringer war und so eine effektivere Inhibition des Wundverschlusses und damit der Migration durch Bromelain erzielt wurde.

Der Invasions-Assay diente der Analyse des Invasionsverhaltens von mit Bromelain bzw. Papain behandelten CCC-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Bromelain- und Papain- Behandlung führte bei beiden CCC-Zelllinien zu einer signifikanten, dosisabhängigen Inhibition der Zellinvasion (200  $\mu$ M > 150  $\mu$ M Bromelain; 100  $\mu$ M > 40  $\mu$ M > 25  $\mu$ M Papain). Auch Grabowska et al. zeigten in ihrer Studie, dass Bromelain nicht nur in der Lage war, die Proliferation von Melanomzellen zu reduzieren, sondern auch deren invasives Verhalten inhibieren konnte [157].

Wir haben gezeigt, dass Bromelain und Papain in der Lage sind, Proliferation, Migration und Invasion von CCC-Tumorzellen zu beeinflussen. Um herauszufinden, durch welche Mechanismen diese antitumorösen Wirkungen vermittelt werden, haben wir im Folgenden die Apoptose-Induktion, die Beeinflussung des NF $\kappa$ B/ AMPK- Signalweges und der EMT untersucht.

Mithilfe der durchflusszytometrischen Apoptosemessung mit Annexin V/ PI konnten wir zeigen, dass sowohl Bromelain als auch Papain Apoptose in CCC-Zellen induzieren konnten. Die Höhe der Apoptoserate war dabei abhängig von Zeit (96 h > 24 h) und Dosis (200  $\mu$ M > 150  $\mu$ M Bromelain; 100  $\mu$ M > 40  $\mu$ M > 25 $\mu$ M Papain). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in mit Bromelain behandelten CCC-Zellen die Apoptoserate deutlich höher war als in mit Papain behandelten CCC-Zellen. Bestätigt wurden die Ergebnisse der

durchflusszytometrischen Apoptosemessung durch das Immunoblot mit der Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), welche als Marker für Apoptose gilt. Dabei zeigte sich eine deutliche zeit- (96 > 48 Stunden) und dosisabhängige (200 µM > 150 µM Bromelain; 100µM > 40µM > 25 µM Papain) Zunahme der Spaltung von PARP und damit der Apoptoserate nach Behandlung der CCC-Zellen mit Bromelain bzw. Papain. Auch in einer Studie von Amini et al. wurde gezeigt, dass Bromelain in humanen gastrointestinalen Tumorzellen (MKN45 und KATO-III) Apoptose induzierte [115]. Dort führte die Bromelain-Behandlung zu einer dosisabhängigen Aktivierung von Caspase 3 und 8, zu einer Überexpression von Cytochrom C sowie zu einer Spaltung des p53 Proteins. Auch sie beobachteten, dass eine Spaltung von PARP in den höheren Bromelain-Konzentrationen prominenter war. In einer Studie von Bhui et al. wurde demonstriert, dass Bromelain Apoptose in Papillomzellen einer Maus induzierte [126]. Die Bromelain-Behandlung führte dort zu einer Hochregulation der Expression des Tumorsuppressorgens p53 und zu einer nachfolgenden Aktivierung von Caspase 3 und 9. Wir konnten zeigen, dass die Apoptose-Induktion ein Mechanismus ist, wie Bromelain und Papain ihre antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen vermitteln. Da durch die Bromelain-Behandlung eine stärkere Apoptose-Induktion vermittelt wurde, könnte dies eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Bromelain in den vorherigen Versuchen eine effektivere antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen im Vergleich zu Papain zeigte.

Wie unter 1.1.4 Pathogenese beschrieben, sind bisher nur einige wenige Signalmoleküle und -wege, die eine Rolle in der CCC-Karzinogenese spielen, entschlüsselt. In den letzten zehn Jahren gab es einige Evidenzen, dass die Inaktivierung von AMPK eine Rolle im Wachstum und Metabolismus von Tumorzellen spielt [136]. So haben verschiedene Studien gezeigt, dass die Aktivierung von AMPK z.B. durch Metformin, Phenformin, AICAR, A769662, Cannabinoide und Aspirin das Auftreten eines Tumors in verschiedenen Tier-Krebsmodellen inhibieren oder verzögern konnte [140, 158, 159]. Zheng et al. zeigten in ihrer Studie zum ersten Mal, dass der Signalweg zwischen AMPK und NFκB eine wichtige Rolle in der Karzinogenese des HCC spielt [137]. Sie zeigten, dass p-AMPK in der Mehrheit der HCC geringer exprimiert war im Vergleich zum

gesunden Lebergewebe und brachten eine niedrige Expression von p-AMPK mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang [137]. Um zu überprüfen, ob dieser Signalweg auch eine Rolle in der CCC-Karzinogenese spielt, haben wir die Expression der beiden Proteine AMPK und NFκB in TFK-1 und SZ-1 Zellen mittels Immunoblot überprüft. Dabei zeigten sich eine deutliche Expression von NFκB und eine sehr geringe Expression von AMPK. Somit kann davon ausgegangen werden, dass dieser Signalweg auch eine Rolle in der Pathogenese des CCC spielt. Weiterhin zeigten Zheng et al., dass durch eine Metformin-Behandlung die Expression von p-AMPK erhöht werden konnte und damit das Wachstum von HCC Zellen inhibiert werden konnte [137]. Um zu überprüfen ob auch Bromelain bzw. Papain in der Lage sind, die Expression von p-AMPK zu erhöhen und Einfluss auf den Signalweg zwischen NFκB und AMPK zu nehmen, wurde die Expression von NFκB und AMPK nach Bromelain- und Papain-Behandlung von TFK-1 und SZ-1 Zellen überprüft. Dabei zeigte sich, dass Bromelain zu einer zeit- (96 > 48 Stunden) und dosisabhängigen (200µM > 150 µM) Abnahme der Expression von NFκB und Zunahme der Expression von p-AMPK führte. Bei Papain zeigte sich nur eine geringe Änderung dieser Parameter, sodass davon ausgegangen werden kann, dass durch Bromelain eine deutliche, durch Papain hingegen nur eine teilweise Beeinflussung des NFκB/ AMPK- Signalweges erfolgt und dieser Signalweg vor allem für Bromelain einen Mechanismus für dessen antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen darstellt.

Da von NFκB weitere Signalwege ausgehen, die eine Rolle in der CCC-Karzinogenese spielen, wurde die Expression der jeweiligen Schlüsselproteine mittels Immunoblot überprüft. Für Bromelain zeigte sich dabei eine deutliche Abnahme der Expression von phospho AKT. Dieses spielt eine Rolle in der Kontrolle von Überleben und Apoptose von Zellen, sodass die Herunterregulation dieses Proteins ein möglicher Mechanismus für die Inhibition der Proliferation von CCC-Zellen darstellt. Ebenso wurde auch die Herunterregulation von phospho ERK durch die Bromelain-Behandlung beobachtet, was eine mögliche Erklärung für die Inhibition des invasiven Verhaltens der CCC-Zellen sein könnte. Auch die Expression von phospho STAT3 wurde durch die Bromelain-Behandlung herunterreguliert, was eine Erklärung für die Apoptose- Induktion sein könnte.

Die Expression von MMP-9 nahm ebenfalls unter der Bromelain-Behandlung ab, was mit der Inhibition von Migration und Invasion der CCC-Zellen in Verbindung gebracht werden kann. Auch Bhui et al. und Kalra et al. zeigten, dass Bromelain in der Lage ist, NFκB zu inaktivieren und so seine antitumoröse Wirkung zu vermitteln [126, 127]. Kalra et al. wiesen zudem nach, dass durch Bromelain die Phosphorylierung von ERK 1/2 und AKT reduziert wird, was sie in Zusammenhang mit der Wirkung von Bromelain auf Zellwachstum, -differenzierung und -überleben brachten [127]. Amini et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Bromelain-Behandlung zu einer reduzierten Expression von phospho AKT in gastrointestinalen Tumorzellen führte und so an der Induktion von Apoptose beteiligt zu sein schien [115]. Die Papain-Behandlung zeigte keine so deutliche Beeinflussung der Expression dieser Proteine.

Die Herunterregulation von NFκB mittels siRNA bestätigte die Ergebnisse des Immunoblots bezüglich des NFκB/ AMPK- Signalweges. Die Behandlung von CCC-Zellen mit Bromelain erzielte -im Gegensatz zu Papain- ähnliche Ergebnisse, wie durch die Stilllegung des NFκB-Gens mittels siRNA erreicht wurden.

Die Untersuchungen des NFκB/ AMPK- Signalwegs mittels Immunoblot und siRNA zeigten, dass dieser Signalweg auch in der Entwicklung eines CCC eine Rolle zu spielen scheint und er durch die Bromelain-Behandlung deutlich, durch die Papain-Behandlung weniger stark inhibiert werden kann. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Beeinflussung des NFκB/ AMPK- Signalweges einen wichtigen Mechanismus darstellt, wie Bromelain seine antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen vermittelt, wohingegen es für Papain andere, bisher noch unbekannte Mechanismen gibt, mit denen es die CCC-Karzinogenese beeinflusst.

Die EMT wird als einer der entscheidenden Schritte in der Karzinogenese von Tumorzellen angesehen. Mithilfe des Immunoblots haben wir herausgefunden, dass die Bromelain-Applikation zu einer effektiven Inhibition der EMT von humanen CCC- Zellen führte, wohingegen Papain keinen Einfluss auf diese nahm.

Durch unsere Experimente haben wir gezeigt, dass die beiden Pflanzenextrakte Bromelain und Papain eine antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen haben und Proliferation, Migration und Invasion effektiv inhibieren können, wobei unter der Bromelain-Behandlung stärkere Effekte zu beobachten waren als unter der Papain-Behandlung. Als mögliche Mechanismen, wie Bromelain und Papain ihre antitumoröse Wirkung auf die CCC-Zellen vermitteln, haben wir herausgefunden, dass beide Extrakte Apoptose in den Tumorzellen induzieren können. Außerdem haben wir gezeigt, dass der NFκB/ AMPK- Signalweg eine Rolle in der CCC-Karzinogenese spielt und durch Bromelain deutlich, durch Papain teilweise beeinflusst werden kann. Die EMT wurde durch die Bromelain-Behandlung effektiv inhibiert, durch Papain hingegen nicht.

Da wir die Wirkung dieser beiden Substrate lediglich *in vitro* getestet haben, können keine Aussagen darüber getroffen werden, wie die Wirksamkeit und Verträglichkeit der beiden Stoffe im Organismus tatsächlich ist und welche Konzentrationen *in vivo* benötigt werden, um die *in vitro* beobachteten Effekte zu erzielen. Auch die Frage nach möglichen Nebenwirkungen im Organismus lässt sich mit unserer Arbeit nicht beantworten. Daher könnte man im nächsten Schritt die beiden Substanzen im Mausmodell testen, um so Aussagen über Wirksamkeit, effektive Konzentrationen und Nebenwirkungen zu treffen. Hierbei wäre auch eine Kombination mit der derzeitigen Chemotherapie Gemcitabine und Cisplatin denkbar, sodass insbesondere Bromelain eine Ergänzung zur bisherigen Therapie darstellen könnte.

## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

Das CCC stellt mit einer altersstandardisierten Inzidenzrate (ASIR) von weniger als 1.5 Fällen pro 100 000 Einwohner zwar eine seltene Tumorentität in der westlichen Welt dar [13, 14], allerdings lassen epidemiologische Studien einen weltweiten Anstieg der Inzidenz vermuten [17, 18]. Nur für ein sehr kleines Patientenkollektiv kommt eine kurative operative Resektion des CCC in Frage, für die Mehrheit der Patienten besteht lediglich die Möglichkeit einer palliativen Chemotherapie mit sehr begrenzter Überlebensdauer [2, 59]. Daher werden dringend neue Therapieansätze benötigt, die auch Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium ein besseres Überleben ermöglichen.

Aus Pflanzen gewonnene Extrakte wie Bromelain aus der *Ananas comosus* [106] oder Papain aus der *Carica papaya latex* [129] sind zunehmend Gegenstand medizinischer Forschung bei verschiedenen Erkrankungen [106, 110-114, 129-135]. Auch in der Erforschung neuer Therapieansätze bei verschiedenen Tumorentitäten spielen sie zunehmend eine wichtige Rolle [115, 117-121].

Weiterhin könnte auch die Entschlüsselung der exakten molekularen Vorgänge, die eine Rolle in der Entwicklung und der Metastasierung des CCC spielen, neue Therapieansätze für die Behandlung des CCC liefern.

Ziel unsere Arbeit war es zu untersuchen, ob Bromelain und Papain eine antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen vermitteln und so deren Wachstum und Metastasierung inhibieren können. Außerdem haben wir überprüft, ob der NFκB/AMPK- Signalweg eine Rolle in der CCC-Karzinogenese spielt und ob dieser durch Bromelain oder Papain beeinflusst werden kann.

Wir haben hierfür zwei humane CCC-Zelllinien (TFK-1, SZ-1) verwendet und mithilfe des WST-1-, Wound- Healing- und Invasions-Assays die Wirkung von Bromelain und Papain auf Proliferation, Migration und Invasion von CCC Zellen untersucht. Außerdem haben wir mithilfe der Apoptosemessung mit Annexin V/PI überprüft, ob Bromelain und Papain den Zelltod in CCC-Zellen induzieren können und mithilfe verschiedener Immunoblot- und siRNA- Untersuchungen haben wir

die Wirkung von Bromelain und Papain auf den NFκB/ AMPK- Signalweg überprüft.

Wir haben gezeigt, dass sowohl Bromelain als auch Papain in der Lage sind, die Proliferation von CCC-Zellen dosisabhängig zu reduzieren. Außerdem konnten sie die Motilität und das Invasionsverhalten der CCC-Zellen dosisabhängig signifikant inhibieren. Die Apoptosemessung mit Annexin V/PI zeigte, dass beide Pflanzenextrakte eine signifikante Rate an apoptotischen Zellen in beiden CCC-Zelllinien induzieren konnten. In unseren Versuchen hat sich außerdem gezeigt, dass Bromelain eine effektivere antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen im Vergleich zu Papain hatte. Mithilfe der Immunoblots fanden wir heraus, dass der NFκB/ AMPK- Signalweg eine Rolle in der CCC-Karzinogenese spielt und er vor allem durch die Bromelain-Behandlung der CCC-Zellen beeinflusst werden konnte. Die Papain-Behandlung führte hingegen nur zu einer teilweisen Beeinflussung dieses Signalweges. Die Stilllegung des NFκB-Gens mittels siRNA betätigte die Ergebnisse des Immunblots bezüglich des NFκB/ AMPK Signalweges. Bromelain konnte zudem die EMT der CCC-Tumorzellen inhibieren.

Als Limitation unserer Arbeit ist anzuführen, dass wir die Wirkung der beiden Pflanzenextrakte lediglich *in vitro* geprüft haben und somit keine Aussagen bezüglich der Wirksamkeit, Verträglichkeit, Nebenwirkungen und der Dosierung *in vivo* getroffen werden können.

In unserer Arbeit haben wir gezeigt, dass sowohl Bromelain als auch Papain eine antitumoröse Wirkung auf CCC-Zellen vermitteln und so Wachstum und Metastasierung *in vitro* inhibieren konnten, wobei die beobachteten Effekte unter der Bromelain-Therapie stärker waren. Weiterhin haben wir gezeigt, dass der NFκB/AMPK- Signalweg eine Rolle in der CCC-Karzinogenese spielt und vor allem durch Bromelain beeinflusst werden kann.

## **6 LITERATURVERZEICHNIS**

1. Müller, A., et al., *Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human cholangiocarcinoma cell lines*. Int J Oncol., 2016(48(5)): p. 2025-2034.
2. Valle, J., et al., *Cisplatin plus Gemcitabine versus Gemcitabine for Biliary Tract Cancer*. N Engl J Med, 2010(362): p. 1273-1281.
3. De Groen, P.C., et al., *Biliary tract cancers*. N Engl J Med, 1999(341): p. 1368-1378.
4. Blechacz, B. and G.J. Gores, *Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment*. Hepatology, 2008(48): p. 308-321.
5. Gatto, M. and D. Alvaro, *New insights on cholangiocarcinoma*. World J Gastrointest Oncol, 2010(2): p. 136-145.
6. Mosconi, S., et al., *Cholangiocarcinoma*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009(69): p. 259-270.
7. Lim, J.H. and C.K. Park, *Pathology of cholangiocarcinoma*. Abdom Imaging, 2004(29): p. 540-547.
8. von Hahn, T., et al., *Epidemiological trends in incidence and mortality of hepatobiliary cancers in Germany*. Scand J Gastroenterol, 2011(46): p. 1092-1098.
9. Shaib, Y. and H.B. El-Serag, *The epidemiology of cholangiocarcinoma*. Semin Liver Dis, 2004(24): p. 115-125.
10. Rizvi, S. and G.J. Gores, *Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma*. Gastroenterology, 2013(145): p. 1215-1229.
11. Ustundag, Y. and Y. Bayraktar, *Cholangiocarcinoma: a compact review of the literature*. World J Gastroenterol, 2008(14): p. 6458-6466.
12. *Statistisches Bundesamt Deutschland. Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland. 2011: [www.destatis.de](http://www.destatis.de)*.
13. Curado, M.P., et al., *Cancer incidence in five continents, vol. IX*. Lyon: IARC Scientific Publications, 2007 (No. 160).
14. Parkin, D.M., et al., *Cancer incidence in five continents Vol. VIII*. LYON: IARC Press, 2002(IARC Scientific Publications No. 155).
15. Sriamporn, S., et al., *Prevalence of Opisthorchis viverrini infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand*. Trop Med Int Health, 2004(9): p. 588-594.
16. Sripa, B. and C. Pairojkul, *Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand*. Curr Opin Gastroenterol, 2008(24): p. 349-356.
17. Khan, S.A., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update*. Gut, 2012(61): p. 1657-1669.
18. Welzel, T.M., et al., *Impact of Classification of Hilar Cholangiocarcinomas (Klatskin Tumors) on the Incidence of Intra- and Extrahepatic Cholangiocarcinoma in the United States*. J Natl Cancer Inst, 2006(98): p. 873-875.
19. Cardinale, V., et al., *Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors*. World J Gastrointest Oncol, 2010(2): p. 407-416.

20. Welzel, T.M., et al., *Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a population-based case-control study*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007(5): p. 1221-1228.
21. Burak, K., et al., *Incidence and risk factors for cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis*. Am J Gastroenterol, 2004(99): p. 523-526.
22. Bergquist, A., et al., *Hepatic and extrahepatic malignancies in primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2002(36): p. 321-327.
23. Boberg, K.M., et al., *Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis: risk factors and clinical presentation*. Scand J Gastroenterol, 2002(37): p. 1205-1211.
24. Fevery, J., et al., *Incidence, diagnosis, and therapy of cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis*. Dig Dis Sci, 2007(52): p. 3123-3135.
25. Morris-Stiff, G., et al., *Cholangiocarcinoma complicating primary sclerosing cholangitis: a 24-year experience*. Dig Surg, 2008(25): p. 126-132.
26. Okuda, K., Y. Nakanuma, and M. Miyazaki, *Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 1: epidemiology and etiology*. J Gastroenterol Hepatol, 2002(17): p. 1049-1055.
27. Watanapa, P. and W.B. Watanapa, *Liver fluke-associated cholangiocarcinoma*. Br J Surg, 2002(89): p. 962-970.
28. Haswell-Elkins, M.R., et al., *Immune responsiveness and parasite-specific antibody levels in human hepatobiliary disease associated with Opisthorchis viverrini infection*. Clin Exp Immunol, 1991(84): p. 213-218.
29. Sithithaworn, P., et al., *Roles of liver fluke infection as risk factor for cholangiocarcinoma*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2014(21): p. 301-308.
30. Kubo, S., et al., *Hepatolithiasis associated with cholangiocarcinoma*. World J Surg, 1995(19): p. 637-641.
31. Mabrut, J.Y., et al., *Management of congenital bile duct cysts*. Dig Surg, 2010(27): p. 12-18.
32. Søreide, K., et al., *Bile duct cysts in adults*. Br J Surg, 2004(91): p. 1538-1548.
33. Sahani, D., et al., *Thorotrast-induced cholangiocarcinoma: case report*. Abdom Imaging, 2003(28): p. 72-74.
34. Fava, G., et al., *Molecular pathology of biliary tract cancers*. Cancer Lett., 2007(250(2)): p. 155-67.
35. Yoshikawa, D., et al., *Vandetanib (ZD6474), an inhibitor of VEGFR and EGFR signalling, as a novel molecular-targeted therapy against cholangiocarcinoma*. Br J Cancer, 2009(100): p. 1257-1266.
36. Leelawat, K., et al., *Involvement of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in cholangiocarcinoma cell invasion and its therapeutic inhibition with small interfering RNA specific for c-Met*. J Surg Res, 2006(136): p. 78-84.
37. Goydos, J.S., et al., *Marked elevation of serum interleukin-6 in patients with cholangiocarcinoma: validation of utility as a clinical marker*. Ann Surg, 1998(227): p. 398-404.
38. Yokomuro, S., et al., *Growth control of human biliary epithelial cells by interleukin 6, hepatocyte growth factor, transforming growth factor beta 1,*

- and activin A: comparison of a cholangiocarcinoma cell line with primary cultures of non-neoplastic biliary epithelial cells.* Hepatology, 2000(32): p. 26-35.
39. Park, J., et al., *Inhibition of interleukin 6-mediated mitogen-activated protein kinase activation attenuates growth of a cholangiocarcinoma cell line.* Hepatology, 1999(30): p. 1128-1133.
  40. Tadlock, L. and T. Patel, *Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling in transformed growth of a cholangiocarcinoma cell line.* Hepatology, 2001(33): p. 43-51.
  41. Isomoto, H., et al., *Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells.* Hepatology, 2005(42): p. 1329-1338.
  42. Kobayashi, S., et al., *Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells.* Gastroenterology, 2005(128): p. 2054-2065.
  43. Sirica, A.E., *Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy.* Hepatology, 2005(41): p. 5-15.
  44. Prawan, A., et al., *Inflammatory cytokines suppress NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 and induce oxidative stress in cholangiocarcinoma cells.* J Cancer Res Clin Oncol, 2009(135): p. 515-522.
  45. Pinlaor, S., et al., *Nitrative and oxidative DNA damage in intrahepatic cholangiocarcinoma patients in relation to tumor invasion.* World J Gastroenterol, 2014(11): p. 4644-4649.
  46. Mon, N.N., T. Kokuryo, and M. Hamaguchi, *Inflammation and tumor progression: a lesson from TNF-alpha-dependent FAK signaling in cholangiocarcinoma.* Methods Mol Biol, 2009(512): p. 279-293.
  47. Itatsu, K., et al., *Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor-alpha.* Am J Pathol, 2009(174): p. 829-841.
  48. Yoon, J.H., et al., *Oxysterols induce cyclooxygenase-2 expression in cholangiocytes: implications for biliary tract carcinogenesis.* Hepatology, 2004(39): p. 732-738.
  49. Alvaro, D., et al., *Estrogens and insulin-like growth factor 1 modulate neoplastic cell growth in human cholangiocarcinoma.* Am J Pathol, 2006(169): p. 877-888.
  50. Mancino, A., et al., *Estrogens stimulate the proliferation of human cholangiocarcinoma by inducing the expression and secretion of vascular endothelial growth factor.* Dig Liver Dis, 2009(41): p. 156-163.
  51. Fava, G., et al., *Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth.* Cancer Res, 2008(68): p. 6752-6761.
  52. Alpini, G., et al., *Serotonin metabolism is dysregulated in cholangiocarcinoma, which has implications for tumor growth.* Cancer Res, 2008(68): p. 9184-9193.
  53. Isa, T., et al., *Analysis of microsatellite instability, K-ras gene mutation and p53 protein overexpression in intrahepatic cholangiocarcinoma.* Hepatogastroenterology, 2002(49): p. 604-608.

54. Levi, S., et al., *Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique.* Cancer Res, 1991(51): p. 3497-3502.
55. Ahrendt, S.A., et al., *p53 overexpression and K-ras gene mutations in primary sclerosing cholangitis-associated biliary tract cancer.* J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2000(7): p. 426-431.
56. Kang, Y.K., et al., *Mutation of p53 and K-ras, and loss of heterozygosity of APC in intrahepatic cholangiocarcinoma.* Lab Invest, 1999(79): p. 477-483.
57. Hahn, S.A., et al., *Mutations of the DPC4/Smad4 gene in biliary tract carcinoma.* Cancer Res, 1998(58): p. 1124-1126.
58. Taniai, M., et al., *p16INK4a promoter mutations are frequent in primary sclerosing cholangitis (PSC) and PSC-associated cholangiocarcinoma.* Gastroenterology, 2002(123): p. 1090-1098.
59. Lazaridis, K.N. and G.J. Gores, *Cholangiocarcinoma.* Gastroenterology, 2005(128): p. 1655-1667.
60. Mosconi, S., et al., *Cholangiocarcinoma.* Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2009: p. 259-270.
61. Patel, T. and P. Singh, *Cholangiocarcinoma: emerging approaches to a challenging cancer.* Curr Opin Gastroenterol, 2007(23): p. 317-323.
62. Schulick, R.D., *Primary sclerosing cholangitis: detection of cancer in strictures.* J Gastrointest Surg, 2008(12): p. 420-422.
63. Alvaro, D., *Serum and bile biomarkers for cholangiocarcinoma.* Curr Opin Gastroenterol, 2009(25): p. 279-284.
64. Slattery, J.M. and D.V. Sahani, *What is the current state-of-the-art imaging for detection and staging of cholangiocarcinoma?* Oncologist, 2006(11): p. 913-922.
65. Manfredi, R., et al., *Magnetic resonance imaging of cholangiocarcinoma.* Semin Liver Dis, 2004(24): p. 155-164.
66. Khan, S.A., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document.* Gut, 2002(Suppl 6:VI1-9).
67. Rösch, T., et al., *A prospective comparison of the diagnostic accuracy of ERCP, MRCP, CT, and EUS in biliary strictures.* Gastrointest Endosc, 2002(55): p. 870-876.
68. Wittekind, C., *TNM-Klassifikation maligner Tumoren.* 2010(Siebente Auflage ed).
69. Bismuth, H., R. Nakache, and T. Diamond, *Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma.* Ann Surg, 1992(215): p. 31-38.
70. Neumann, U.P. and M. Schmeding, *Role of surgery in cholangiocarcinoma: From resection to transplantation.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015(29): p. 295-308.
71. Kondo, S., et al., *Forty consecutive resections of hilar cholangiocarcinoma with no postoperative mortality and no positive ductal margins: results of a prospective study.* Ann Surg, 2004(240): p. 95-101.
72. Neuhaus, P. and A. Thelen, *Radical surgery for right-sided klatskin tumor.* HPB (Oxford), 2008(10): p. 171-173.
73. Lamesch, P., et al., *Surgical treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma.* Chirurgie, 1997(122): p. 88-91.

74. Goldstein, R.M., et al., *Is liver transplantation indicated for cholangiocarcinoma?* Am J Surg, 1993(166): p. 768-771.
75. Jeyarajah, D.R. and G.B. Klintmalm, *Is liver transplantation indicated for cholangiocarcinoma?* J Hepatobiliary Pancreat Surg, 1998(5): p. 48-51.
76. Meyer, C.G., I. Penn, and L. James, *Liver transplantation for cholangiocarcinoma: results in 207 patients.* Transplantation, 2000(69): p. 1633-1637.
77. Schweitzer, N. and A. Vogel, *Systemic therapy of cholangiocarcinoma: From chemotherapy to targeted therapies.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015(29): p. 345-353.
78. André, T., et al., *Gemcitabine and oxaliplatin in advanced biliary tract carcinoma: a phase II study.* Br J Cancer, 2008(99): p. 862-867.
79. Harder, J., et al., *Outpatient chemotherapy with gemcitabine and oxaliplatin in patients with biliary tract cancer.* Br J Cancer, 2006(95): p. 848-852.
80. Gruenberger, B., et al., *Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study.* Lancet Oncol, 2010(11): p. 1142-1148.
81. Paule, B., et al., *Cetuximab plus gemcitabine-oxaliplatin (GEMOX) in patients with refractory advanced intrahepatic cholangiocarcinomas.* Oncology, 2007(72): p. 105-110.
82. Malka, D., et al., *Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO): a randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial.* Lancet Oncol, 2014(15): p. 819-828.
83. Philip, P.A., et al., *Phase II study of erlotinib in patients with advanced biliary cancer.* J Clin Oncol, 2006(24): p. 3069-3074.
84. Zhu, A.X., et al., *Efficacy and safety of gemcitabine, oxaliplatin, and bevacizumab in advanced biliary-tract cancers and correlation of changes in 18-fluorodeoxyglucose PET with clinical outcome: a phase 2 study.* Lancet Oncol, 2010(11): p. 48-54.
85. Bengala, C., et al., *Sorafenib in patients with advanced biliary tract carcinoma: a phase II trial.* Br J Cancer, 2010(102): p. 68-72.
86. El-Khoueiry, A.B., et al., *SWOG 0514: a phase II study of sorafenib in patients with unresectable or metastatic gallbladder carcinoma and cholangiocarcinoma.* Invest New Drugs, 2012(30): p. 1646-1651.
87. Lee, J.K., et al., *A phase II study of gemcitabine and cisplatin plus sorafenib in patients with advanced biliary adenocarcinomas.* Br J Cancer, 2013(109): p. 915-919.
88. Bekaii-Saab, T., et al., *Multi-institutional phase II study of selumetinib in patients with metastatic biliary cancers.* J Clin Oncol, 2011(29): p. 2357-2363.
89. Iacono, C., et al., *Role of preoperative biliary drainage in jaundiced patients who are candidates for pancreatoduodenectomy or hepatic resection: highlights and drawbacks.* Ann Surg, 2013(257): p. 191-204.
90. Shepherd, H.A., et al., *Endoscopic biliary endoprosthesis in the palliation of malignant obstruction of the distal common bile duct: a randomized trial.* Br J Surg 1988(75): p. 1166-1168.

91. Smith, A.C., et al., *Randomised trial of endoscopic stenting versus surgical bypass in malignant low bile duct obstruction*. Lancet, 1994(344): p. 1655-1660.
92. Dumoulin, F.L., et al., *Phase II study of photodynamic therapy and metal stent as palliative treatment for nonresectable hilar cholangiocarcinoma*. Gastrointest Endosc, 2003(57): p. 860-867.
93. Figueroa-Barojas, P., et al., *Safety and efficacy of radiofrequency ablation in the management of unresectable bile duct and pancreatic cancer: a novel palliation technique*. J Oncol, 2013(2013: 910897).
94. Kuhlmann, J.B., et al., *Treatment of unresectable cholangiocarcinoma: conventional transarterial chemoembolization compared with drug eluting bead-transarterial chemoembolization and systemic chemotherapy*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012(24): p. 437-443.
95. Lee, T.Y., Y.K. Cheon, and C.S. Shim, *Current status of photodynamic therapy for bile duct cancer*. Clin Endosc, 2013(46): p. 38-44.
96. Ortner, M.E., et al., *Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study*. Gastroenterology, 2003(125): p. 1355-1363.
97. Scheuermann, U., et al., *Comparison of resection and transarterial chemoembolisation in the treatment of advanced intrahepatic cholangiocarcinoma--a single-center experience*. Eur J Surg Oncol, 2013(39): p. 593-600.
98. Schoppmeyer, K., et al., *Radiochemotherapy followed by gemcitabine and capecitabine in extrahepatic bile duct cancer: a phase I/II trial*. Am J Clin Oncol, 2006(29): p. 576-582.
99. Wiedmann, M., et al., *Current diagnostics and therapy for carcinomas of the biliary tree and gallbladder*. Z Gastroenterol, 2005(43): p. 305-315.
100. Shaib, Y., et al., *Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase?* J Hepatol, 2004(40): p. 472-477.
101. Howell, M. and J.W. Valle, *The role of adjuvant chemotherapy and radiotherapy for cholangiocarcinoma*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015(29): p. 333-343.
102. Aoba, T., et al., *Assessment of nodal status for perihilar cholangiocarcinoma: location, number, or ratio of involved nodes*. Ann Surg, 2013(257): p. 718-725.
103. Nakeeb, A., et al., *Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors*. Ann Surg, 1996(224): p. 463-473.
104. Nagino, M., et al., *Hepatectomy with simultaneous resection of the portal vein and hepatic artery for advanced perihilar cholangiocarcinoma: an audit of 50 consecutive cases*. Ann Surg, 2010(252): p. 115-123.
105. Ercolani, G., et al., *Intrahepatic cholangiocarcinoma: primary liver resection and aggressive multimodal treatment of recurrence significantly prolong survival*. Ann Surg, 2010(252): p. 107-114.
106. Maurer, H.R., *Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use*. Cell Mol Life Sci, 2001(58): p. 1234-1245.
107. Chobotova, K., A.B. Vernallis, and F.A. Majid, *Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives*. Cancer Lett, 2010(290): p. 148-156.

108. Houck, J.C., C.M. Chang, and G. Klein, *Isolation of an effective debriding agent from the stems of pineapple plants*. *Int J Tissue React*, 1983(5): p. 125-134.
109. Hale, L.P., et al., *Proteinase activity and stability of natural bromelain preparations*. *Int Immunopharmacol*, 2005(5): p. 783-793.
110. Gruenwald, J., T. Brendler, and C. Jaenicke, *PDR for Herbal Medicines*. 4th ed. NJ. 2007, Montvale.
111. Blumenthal, M., *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. 1998, Austin, TX: American Botanical Council.
112. *Bromelain. Monograph*. *Altern Med Rev*, 2010(15): p. 361-368.
113. Pavan, R., et al., *Properties and Therapeutic Application of Bromelain: A Review*. *Biotechnol. Res. Int*, 2012.
114. Koch, S., et al., *Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors*. *Biochem J*, 2011(437): p. 169-183.
115. Amini, A., et al., *Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21)*. *Onco Targets Ther.*, 2013(6): p. 403-409.
116. Romano, B., et al., *The chemopreventive action of bromelain, from pineapple stem (Ananas comosus L.), on colon carcinogenesis is related to antiproliferative and proapoptotic effects*. *Mol Nutr Food Res*, 2014(58): p. 457-465.
117. Pillai, K., et al., *Anticancer effect of bromelain with and without cisplatin or 5-FU on malignant peritoneal mesothelioma cells*. *Anticancer Drugs*, 2014(25): p. 150-160.
118. Paroulek, A.F., M. Jaffe, and A. Rathinavelu, *The Effects of the Herbal Enzyme Bromelain Against Breast Cancer Cell Line G1101A*. *The FASEB Journal*, 2009. **23**.
119. Bhui, K., et al., *Bromelain inhibits nuclear factor kappa-B translocation, driving human epidermoid carcinoma A431 and melanoma A375 cells through G(2)/M arrest to apoptosis*. *Mol Carcinog*, 2012(51): p. 231-243.
120. Beuth, J. and J.M. Braun, *Modulation of murine tumor growth and colonization by bromelaine, an extract of the pineapple plant (Ananas comosum L.)*. *In Vivo*, 2005(19): p. 483-485.
121. Tysnes, B.B., et al., *Bromelain reversibly inhibits invasive properties of glioma cells*. *Neoplasia*, 2001(3): p. 469-479
122. Eckert, K., et al., *Effects of oral bromelain administration on the impaired immunocytotoxicity of mononuclear cells from mammary tumor patients*. *Oncol Rep*, 1999(6): p. 1191-1199.
123. Hale, L.P. and B.F. Haynes, *Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8, and Leu 8/LAM1 surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation*. *J Immunol*, 1992(149): p. 3809-3816.
124. Munzig, E., et al., *Bromelain protease F9 reduces the CD44 mediated adhesion of human peripheral blood lymphocytes to human umbilical vein endothelial cells*. *FEBS Lett*, 1994(351): p. 215-218.

125. Hale, L.P., P.K. Greer, and G.D. Sempowski, *Bromelain treatment alters leukocyte expression of cell surface molecules involved in cellular adhesion and activation*. Clin Immunol, 2002(104): p. 183-190.
126. Bhui, K., et al., *Bromelain inhibits COX-2 expression by blocking the activation of MAPK regulated NF-kappa B against skin tumor-initiation triggering mitochondrial death pathway*. Cancer Lett, 2009(282): p. 167-176.
127. Kalra, N., et al., *Regulation of p53, nuclear factor kappaB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008(226): p. 30-37.
128. Hou, R.C., et al., *Cross-linked bromelain inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production involving cellular signaling suppression in rats*. J Agric Food Chem, 2006(54): p. 2193-2198.
129. da Silva, C.R., et al., *Genotoxic and Cytotoxic Safety Evaluation of Papain (Carica papaya L.) Using In Vitro Assays*. J Biomed Biotechnol, 2010.
130. Mohr, T. and L. Desser, *Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro*. BMC Complement Altern Med, 2013(13): p. 231.
131. Webman, E.J., G. Edlin, and H.F. Mower, *Free radical scavenging activity of papaya juice*. Int J Radiat Biol, 1989(55): p. 347-351.
132. Mehdipour, S., et al., *Antioxidant potentials of Iranian Carica papaya juice in vitro and in vivo are comparable to alpha-tocopherol*. Phytother Res, 2006(20): p. 591-594.
133. Oloyede, O.I., *Chemical Profile of Unripe Pulp of Carica papaya*. Pakistan Journal of Nutrition, 2005(4): p. 379-381.
134. Aruoma, O.I., et al., *Diabetes as a risk factor to cancer: Functional role of fermented papaya preparation as phytonutraceutical adjunct in the treatment of diabetes and cancer*. Mutat Res, 2014(768): p. 60-68.
135. Raffaelli, F., et al., *In vitro effects of fermented papaya (Carica papaya, L.) on platelets obtained from patients with type 2 diabetes*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2015(25): p. 224-229.
136. Luo, Z., et al., *AMPK, the metabolic syndrome and cancer*. Trends Pharmacol Sci, 2005(26): p. 69-76.
137. Zheng, L., et al., *Prognostic Significance of AMPKA ctivation andTherapeutic Effects of Metformin in Hepatocellular Carcinoma*. Clin Cancer Res., 2013(19): p. 5372-5380.
138. Mihaylova, M.M. and R.J. Shaw, *The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism*. Nat Cell Biol, 2011(13): p. 1016-1023.
139. Hardie, D.G., D. Carling, and M. Carlson, *The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?* Annu Rev Biochem, 1998(67): p. 821-855.
140. Motoshima, H., et al., *AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer*. J Physiol, 2006(574): p. 63-71.
141. Franke, T.F., D.R. Kaplan, and L.C. Cantley, *PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis*. Cell, 1997(88): p. 435-437.

142. Cantley, L.C. and B.G. Neel, *New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999(96): p. 4240-4245.
143. Burgering, B.M. and P.J. Coffey, *Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction*. Nature, 1995(376): p. 599-602.
144. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. Oncogene, 2007(26): p. 3291-3310.
145. Heim, M.H., *The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus*. J Recept Signal Transduct Res, 1999(19): p. 75-120.
146. Bromberg, J.F., et al., *Stat3 as an oncogene*. Cell, 1999(98): p. 295-303.
147. Catlett-Falcone, R., et al., *Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells*. Immunity, 1999(10): p. 105-115.
148. Garcia, R. and R. Jove, *Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling*. J Biomed Sci, 1998(5): p. 79-85.
149. Coussens, L.M., B. Fingleton, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. Science, 2002(295): p. 2387-2392.
150. Sternlicht, M.D., et al., *The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis*. Cell, 1999(98): p. 137-146.
151. Vu, T.H., et al., *MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes*. Cell, 1998(93): p. 411-422.
152. Oliver, F.J., et al., *Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant*. J Biol Chem, 1998(273): p. 33533-33539.
153. Pillai, K., et al., *Anticancer effect of bromelain with and without cisplatin or 5-FU on malignant peritoneal mesothelioma cells*. Anticancer Drugs, 2014(25(2)): p. 150-60.
154. Amini, A., et al., *Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21)*. Onco Targets Ther, 2013(6): p. 403-409.
155. Amini, A., et al., *Cytotoxic effects of bromelain in human gastrointestinal carcinoma cell lines (MKN45, KATO-III, HT29-5F12, and HT29-5M21)*. Onco Targets Ther. , 2013(16): p. 403-409.
156. Taussig, S.J., J. Szekerczes, and S. Batkin, *Inhibition of Tumour Growth in vitro by Bromelain, an Extract of the Pineapple Plant (Ananas comosus)*. Planta Med, 1985(51): p. 538-539.
157. Grabowska, E., et al., *Bromelain proteases suppress growth, invasion and lung metastasis of B16F10 mouse melanoma cells*. Int J Oncol, 1997(11): p. 243-248.
158. Vara, D., et al., *Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy*. Cell Death Differ, 2011(18): p. 1099-1111.
159. Hawley, S.A., et al., *The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase*. Science, 2012(336): p. 918-922.

## **7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL**

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen, Abteilung Innere Medizin I- Gastroenterologie, Hepatologie, Infektionskrankheiten- unter Betreuung von Prof. Dr. Ruben R. Plentz durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ruben R. Plentz (geschäftsführender Oberarzt der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Tübingen) und Samarpita Barat (Doktorandin in der Inneren Medizin I). Die Versuche mit der Substanz Papain wurden nach Einarbeitung durch Samarpita Barat von mir eigenständig durchgeführt. Auch die statistische Auswertung erfolgte eigenständig. Die Versuche mit der Substanz Bromelain wurden von Samarpita Barat durchgeführt. Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Alena Müller

## **8 VERÖFFENTLICHUNGEN**

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

### Publikation:

Müller, A., Barat, S., Chen, X., Bui, K. C., Bozko, P., Malek, N.P., Plentz, R.R.,  
*Comparative study of antitumor effects of bromelain and papain in human  
cholangiocarcinoma cell lines.*

Int J Oncol., 2016(48(5)): p. 2025-2034.

### Abstracts / Kongressbeiträge:

Müller A, Barat S, Chen X, Bui C, Bozko P, Malek NP, Plentz RR.

*Anti-tumor effects of Bromelain and Papain on human cholangiocarcinoma cells*

In: 32. Deutscher Krebskongress 2016, Berlin.

Müller A, Barat S, Chen X, Bui C, Bozko P, Malek NP, Plentz RR

*Anti-tumor effects of Bromelain and Papain on human cholangiocarcinoma cells*

In: The International Liver Congress 2016, Barcelona (Spain).

Müller A, Barat S, Chen X, Bui C, Bozko P, Malek NP, Plentz RR

*Antitumoröse Wirkung von Bromelain und Papain auf humane Zellen des  
Cholangiokarzinoms*

In: 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM)  
2016, Mannheim.

## **9 DANKSAGUNG**

Für die Möglichkeit, in der Medizinischen Klinik I - Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektionskrankheiten des Universitätsklinikums Tübingen meine Promotion durchführen zu können, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. N. Malek bedanken. Außerdem möchte ich mich für die Bereitstellung der cholangiozellulären Zelllinien TFK-1 und SZ-1 bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ruben Plentz für die Überlassung des Themas sowie die ausgezeichnete Unterstützung während der gesamten Dauer meiner Promotion. Vielen Dank für die kontinuierlich vorhandene und intensive Betreuung, die zahlreichen, motivierenden Gespräche und die Geduld.

Ebenso möchte ich mich herzlich bedanken bei Samarpita Barat, die mich während meiner Labortätigkeit hervorragend betreut hat. Vielen Dank für die Einarbeitung, die engagierte Unterstützung und Zusammenarbeit im Labor.

Auch möchte ich Xi Chen sowie den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Plentz für die Zusammenarbeit danken.

Bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. N. Malek möchte ich mich für die Unterstützung während meiner Labortätigkeit bedanken.