

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
(Schwerpunkt: Gastroenterologie, Hepatologie, Infektionskrankheiten)

In vitro Therapie des Cholangiozellulären Karzinom mit dem pflanzlichen Alkaloid Capsaicin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von:
Wutka, Annika Stefanie

2017

Dekan:	Professor Dr. I.B. Autentrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Plentz
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H.- G. Kopp
Tag der Disputation:	21.02.2017

Gib auf dich acht

Achte auf deine Gedanken, denn sie werden Worte.

Achte auf deine Worte, denn sie werden Handlung.

Achte auf deine Handlungen, denn sie werden Gewohnheit.

Achte auf deine Gewohnheiten, denn sie werden Charakter.

Achte auf deinen Charakter, denn er wird dein Schicksal.

Aus dem Talmud

Inhalt

Inhalt	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Cholangiozelluläres Karzinom.....	8
1.1.1 Einführung	8
1.1.2 Epidemiologie	8
1.1.3 Risikofaktoren	10
1.1.4 Diagnostik.....	11
1.1.5 Therapie	13
1.2 Capsaicin	17
1.2.1 Einführung	17
1.2.2 TRPV1-Rezeptor.....	18
1.2.3 Antiproliferative Wirkung von Capsaicin	19
1.2.4 Karzinogenität von Capsaicin.....	21
1.3 Hedgehog Signalweg	22
1.4 Ziel dieser Doktorarbeit	23
2 Materialien und Methoden	24
2.1 Materialien.....	24
2.1.1 Chemikalien.....	24
2.1.2 Geräte.....	26
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.4 Software.....	27
2.1.5 Puffer, Lösungen, Gele	29
2.1.6 Antikörper und Primer	31
2.2 Methoden	33
2.2.1 Methoden der Zellkultur	33
2.2.2 WST1 Assay	35
2.2.3 Western Blot	36

2.2.4 Semiquantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion.....	38
2.2.5 Wound-Healing Assay.....	41
2.2.6 Invasion Assay.....	42
2.2.7 Koloniebildungsassay	43
2.2.8 Apoptosemessung	44
3. Ergebnisse	46
3.1 Auswertung der Zellproliferation.....	46
3.2 Untersuchung der epithelial-mesenchymalen Transition auf Proteinebene	47
3.3 Semiquantitative Analyse der Hedgehog Signalwegbestandteile.....	52
3.4 Auswertung der Migration und Invasion nach Behandlung mit Capsaicin	55
3.4.1 Migrations Assay.....	55
3.4.2 Invasions Assay.....	55
3.5 Auswertung der Koloniebildung in Softagar	59
3.6 Apoptosemessung	61
4. Diskussion	63
5. Zusammenfassung.....	68
6. Literaturverzeichnis	70
7. Erklärung zum Eigenanteil	89
8. Veröffentlichungen.....	90
9. Danksagungen.....	91

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
APS	Ammoniumpersulfat
β	Beta
Bp	Basenpaare
Bzw	Beziehungsweise
CA	Carboanhydrate Antigen
Ca	Circa
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonale Antigen
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
CUP	cancer of unknown primary
Dhh	Desert Hedgehog
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E2F	Transkriptionsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EH-CC	extrahepatisches Gallengangskarzinom
EMT	epitheliale- mesenchymale Transition
ERCP	endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
FDG	Fluordesoxyglucose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
Ggf	Gegebenenfalls
Gli	Glioma-associated Oncogene Homolog

HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HER-2	humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2
Hh	Hedgehog
ICD-O-2	International classification of disease of oncology
IH-CC	intrahepatisches Gallengangskarzinom
Ihh	Indian Hedgehog
KCl	Kaliumchlorid
LTx	Lebertransplantation
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NF-kappaB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase – Kettenreaktion
PDT	photodynamische Therapie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
PTC	perkutane transhepatische Cholangiographie
Ptch	Patched
PTD	perkutane transhepatische Drainage
RF	Radiofrequenztherapie
RT	Realtime
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumdodecylsulfat
Shh	Sonic Hedgehog
SHU	Scoville heat units
SIRT	selektive intrahepatische Radiotherapie
Smo	Smoothened
TACE	transarterielle Chemoembolisation

TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNT	Trinitrotoluen
TPA	Tetradecanoylphorbol-acetat
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vs	versus
WST	water soluble tetrazolium
Z. B.	Zum Beispiel

Einheiten

A	Ampère
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	Molar
m	Meter
min	Minute
U	Unit
V	Volt
%	Prozent

Einheitenpräfixe

c	Zenti
k	Kilo
m	Milli
n	Nano
μ	Mikro

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Strukturformel von Capsaicin	18
Abbildung 2: Zellproliferationsassay von SZ-1 Zellen.....	48
Abbildung 3: Zellproliferationsassay von TFK-1 Zellen	49
Abbildung 4: Western Blot der SZ-1 Zellen	50
Abbildung 5: Western Blot der TFK-1 Zellen	51
Abbildung 6: semiquantitative PCR	53
Abbildung 7: semiquantitative PCR: graphische Darstellung der Banden	54
Abbildung 8: Migrations Assay der SZ-1 Zellen.....	56
Abbildung 9: Migrations Assay der TFK-1 Zellen	57
Abbildung 10: Invasions Assay.....	58
Abbildung 11: Softagar	60
Abbildung 12: Apoptosemessung.....	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	24
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	26
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 4: Verwendete Software	29
Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen	29
Tabelle 6: Herstellung eines 5 %igen und 12 %igen Polyacrylamidgel	31
Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für den Western Blot.....	31
Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für den Western Blot.....	31
Tabelle 9: Verwendete Primer für die PCR.....	32
Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Medien	34

1 Einleitung

1.1 Cholangiozelluläres Karzinom

1.1.1 Einführung

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist ein maligner Tumor, welcher vom Epithel der Gallenwege ausgeht. Nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) stellt es die zweithäufigste Neoplasie der Leber dar [1]. Obwohl es unter den gastrointestinalen Tumoren nur 3 % ausmacht, konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass seine Inzidenz in der westlichen Welt signifikant zunimmt [2-4].

Anatomisch unterscheidet man ein intra- (IH-CC) von einem extrahepatischen Gallengangskarzinom (EH-CC). Letzteres wird weiter in ein proximales bzw. hiläres (die sogenannten Klatskin-Tumoren) und distales Gallengangskarzinom unterteilt. Mit 80-90 % stellt das EH-CC die Mehrheit der CCCs dar [5]. Histologisch sind sowohl IH-CCs als auch EH-CCs zu über 90 % Adenokarzinome. Diese können als gut bis schlecht differenzierte bzw. undifferenzierte Tumore vorkommen [1, 6].

1.1.2 Epidemiologie

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eines CCCs ist die Mehrzahl der Patienten über 65 Jahre. Das Durchschnittsalter der Frauen liegt bei 71 Jahren, das der Männer bei 76 Jahren [7, 8].

In den unterschiedlichsten Ländern der Welt sowie unter den Geschlechtern ist eine ausgeprägte Varianz der Inzidenz des IH-CCs zu beobachten. So sind beispielsweise im nordöstlichen Thailand 96 von 100.000 Männern betroffen, wohingegen es bei den Frauen 38 von 100.000 sind. In Australien sind es dagegen nur 0,2 bzw. 0,1 von 100.000 Männern und Frauen. Selbst innerhalb eines Landes variieren die Zahlen in Abhängigkeit des dort vorherrschenden

Risikofaktors [8]. In nordöstlichen Regionen von Thailand ist die hohe Anzahl der Neuerkrankungen im Gegensatz zu anderen Landesteilen auf eine Infektion mit dem Leberegel zurückzuführen [9].

In den letzten Jahrzehnten war ein Anstieg der Inzidenz in den Vereinigten Staaten zu beobachten. Sie stieg zwischen den Jahren 1973 und 1997 von 0,13 auf 0,67 pro 100.000 Einwohner an. Im selben Zeitraum war auch ein Anstieg der altersstandardisierten Mortalitätsrate von 0,07 auf 0,69 pro 100.000 Einwohner zu verzeichnen, was auf die schlechte Prognose dieses Tumors hinweist [7]. Das 5-Jahresüberleben liegt bei unter 5 % [8].

Die Inzidenz für das EH-CC variiert zwischen 0,53 pro 100.000 Einwohnern im Vereinigten Königreich und 1,14 pro 100.000 in Kanada [10]. Auch sind hier geschlechtsspezifische Unterschiede in der altersstandardisierten Inzidenz festzustellen. Zwischen 1973 und 1987 betrug diese in den Vereinigten Staaten für Männer 1,2 und für Frauen 0,8 pro 100.000 Einwohner [11]. Im Gegensatz zum IH-CC konnte ein Rückgang der altersstandardisierten Inzidenz beim EH-CC festgestellt werden. Diese nahm zwischen den Jahren 1979 und 1998 von 1,08 auf 0,82 pro 100.000 ab [8]. Ebenso war weltweit (mit Ausnahme von Italien und Japan) im selben Zeitraum eine Abnahme in den altersstandardisierten Mortalitätsraten zu verzeichnen [12]. Das 5-Jahresüberleben stieg zwischen den Jahren 1973 und 1983 von 11,7 % auf 15,1 % an [8, 11].

Es stellt sich die Frage wodurch der Inzidenzanstieg des IH-CC hervorgerufen wird. Ein Grund könnten verbesserte diagnostische Verfahren sein. Doch müsste dann nach einiger Zeit ein Plateau des Inzidenzanstiegs erreicht sein. Allerdings steigen die Zahlen seit Mitte der 1980er Jahre stetig an. Durch eine verbesserte Diagnostik wären auch höhere Patientenzahlen in früheren Tumorstadien, mit kleineren Tumorgrößen und einer Verlängerung der Kurzzeitüberlebensdauer zu erwarten [8]. Auch wurden früher sicherlich einige Tumoren als CUP (cancer of unknown primary) diagnostiziert. Ein weiterer Grund könnte eine Fehlklassifizierung sein. So wurden im Zeitraum von 1992

bis 2000 die Klatskin-Tumoren, obwohl sie zu den extrahepatischen Gallenwegstumoren zählen, nach der *International classification of disease of oncology* (ICD-O-2) histologisch zu den intrahepatischen Tumoren gezählt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nach Ausklammerung der Klatskin-Tumoren trotzdem ein Inzidenzanstieg der IH-CC festzustellen war [2]. Außerdem spricht der permanente Inzidenzanstieg über einen Zeitraum von 25 Jahren sowie das Fehlen einer abrupten Veränderung in den Inzidenz- als auch Mortalitätsraten gegen eine systematische Fehlklassifizierung [7].

1.1.3 Risikofaktoren

Es gibt einige anerkannte Risikofaktoren, welche zur Entstehung eines CCCs führen. In ungefähr 10 % der Fälle geht der Entwicklung eines Karzinoms eine chronische Entzündung der Gallenwege voraus. Die Mehrheit (90 %) der CCC entwickelt sich allerdings sporadisch [8]. Zu den Risikofaktoren des IH-CC sowie EH-CC zählen: Choledochuszysten, Cholangitis, primär sklerosierende Cholangitis (PSC), Leberzirrhose, Choledocholithiasis, Cholezystitis, Diabetes mellitus Typ II sowie parasitäre Infektionen. Auch übermäßiger Alkoholkonsum (>80 g/d) stellt einen Risikofaktor dar. Durch ein Gallenblasensteinleiden, eine Cholezystektomie sowie Adipositas sind hauptsächlich die extrahepatischen Gallengänge betroffen. Nikotinabusus, Hepatolithiasis, Hämochromatose sowie virale Entzündungen mit HBV und HCV, vor allem im Zusammenhang mit einer Leberzirrhose, führen zur Entstehung eines IH-CCs [13].

Einer der wichtigsten Risikofaktoren in der westlichen Welt ist die PSC [14]. Ungefähr 10 % aller CCCs entstehen auf dem Boden einer PSC [15]. Betroffene Patienten erkranken bereits in jüngeren Jahren (meist in der fünften Lebensdekade) mit einer Prävalenz von 5 bis 15 % [16].

Durch den Verzehr von rohem Fisch kommt es vor allem in südöstlichen Gebieten von Asien zu einer Infektion mit dem Leberegel. Dieser stellt den wichtigsten Risikofaktor eines CCCs in asiatischen Ländern dar. Zwei Leberegel konnten als Auslöser identifiziert werden. *Opisthorcis viverrini* und

Clonorchis sinensis. Wobei letzterer wohl eine untergeordnete Rolle spielt [8, 14, 17, 18].

1.1.4 Diagnostik

1.1.4.1 Klinik

Zu Beginn verläuft das CCC in der Mehrheit der Fälle ohne klinische Symptome. Erst in fortgeschrittenen Stadien stellen sich die Patienten mit Beschwerden vor [5]. Ein schmerzloser Ikterus ist bei ungefähr 90 % der Patienten mit einem EH-CC das Hauptsymptom, gefolgt von Gewichtsverlust (36 %) und abdominalen Beschwerden (28 %). Im Gegensatz hierzu fallen Patienten mit einem IH-CC vor allem in späteren Stadien mit abdominalen Beschwerden (54 %), Ikterus (16 %) und Gewichtsabnahme (16 %) auf [19, 20].

1.1.4.2 Laboruntersuchungen

Laborchemische Untersuchungen dienen der Diagnosestellung eines CCCs, sind aber oft recht unspezifisch. Aufgrund der tumorbedingten Gallenabflussstörung kommt es zu einer Erhöhung von alkalischer Phosphatase, Bilirubin, γ -Glutamyltransferase sowie Gallensäuren. Die Aminotransferasen können normal bis leicht erhöht sein. Eine länger anhaltende Obstruktion der Gallenwege kann sich in einem Mangel an fettlöslichen Vitaminen und einer verlängerten Prothrombinzeit zeigen [1]. Als Tumormarker kann bei einem Gallengangskarzinom das *Carcinoembryonale Antigen CEA* herangezogen werden. Allerdings ist dieses recht unspezifisch, da eine Erhöhung bei anderen gastrointestinalen Tumorerkrankungen sowie einer Cholangitis ebenfalls möglich ist [5]. In Patienten mit einer PSC und einem CEA-Anstieg von mehr als 5,2 ng/ml liegt die Sensitivität bei 68 % und die Spezifität bei 81,5 % [21]. Der am häufigsten verwendete Tumormarker ist das *Carboanhydrate Antigen CA 19-9* [5]. In Abhängigkeit vom jeweiligen Toleranzwert liegt bei Patienten mit einer PSC die Sensitivität bei 60-75 %

sowie die Spezifität bei 91-98 % [21-23]. Die höchste Sensitivität von 100 % wird bei einer Kombination aus CEA und CA 19-9 erzielt. Die Spezifität liegt hier bei 78,4 % [21].

1.1.4.3 Bildgebung

Die Bildgebung spielt eine wesentliche Rolle in der Diagnosestellung des CCCs. Sie dient zum einen der Unterscheidung von benignen und malignen Veränderungen, zum anderen kann festgestellt werden, ob bei der vorkommenden Raumforderung eine operative Resektion möglich ist. Ein weiterer Einsatz ist das präoperative Staging bei Patienten, welche für eine Resektion in Frage kommen.

Als initiale Untersuchung dient die Abdomen-Sonographie, die vor allem zur Beurteilung der Gallenwege bei Verdacht auf ein EH-CC angewandt wird. Das IH-CC ist mittels Ultraschall oft schwer von anderen innerhalb des Leberparenchyms gelegenen Raumforderungen zu unterscheiden [24]. Allerdings hängt die Sensitivität und Spezifität stark vom Tumortyp, dem Ultraschallgerät sowie dem Untersucher ab [1]. Unabhängig vom Untersucher sind hingegen MRT (Magnetresonanztomographie) und MRCP (Magnetresonanztomographie-Cholangiopankreatikographie). Diese bildgebenden Verfahren ermöglichen die Beurteilung aller involvierten Strukturen wie Gallenwege, Blutgefäße sowie das Leberparenchym [24, 25]. Eine Metaanalyse zeigte, dass die MRCP eine Sensitivität von 88 % und eine Spezifität von 95 % besitzt um maligne von benignen Gallenwegsobstruktionen zu unterscheiden [26]. Zur Detektion von Lymphknotenmetastasen sowie zum Ausschluss einer peritonealen Aussaat kommt das FDG-PET-CT (Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie) zum Einsatz, da CT (Computertomographie) sowie MRT diesbezüglich in ihrer Aussage eingeschränkt sind [24]. Weitere Möglichkeiten zur Untersuchung stellen die ERCP (endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) sowie die PTC (perkutane transhepatische Cholangiographie) dar. Diese erlauben zusätzlich eine therapeutische Intervention sowie das Entnehmen von Gewebeproben zur weiteren pathologischen und zytologischen Analyse [5].

1.1.5 Therapie

1.1.5.1 Operative Verfahren

1.1.5.1.1 Resektion

Die einzige Therapieoption mit Aussicht auf Heilung stellt die operative Resektion dar. Da sich die Patienten meist erst in fortgeschrittenen Stadien vorstellen, kommen nur um die 30 % für eine kurative Resektion in Frage [27, 28]. Während einer explorativen Laparotomie zeigt sich dann oft, dass bereits eine Invasion in die Gefäße stattgefunden hat. Auch können Metastasen der Lymphknoten, des Peritoneums sowie der Leber vorliegen, was eine kurative Resektion nicht mehr möglich macht [28, 29]. Das operative Vorgehen richtet sich immer nach der Lokalisation des Tumors. So wird bei intrahepatischen Tumoren eine Leberresektion durchgeführt. Bei distal gelegenen Tumoren kann sogar eine Duodenopankreatektomie nötig sein [30]. Jarnagin et al. konnten zeigen, dass das Langzeitüberleben von einer R0-Resektion mit zusätzlicher Leberteilektomie abhängig ist. Auch trägt ein histologisch gut differenzierter Tumor zu einem längeren Überleben bei [27]. Wird eine R0-Resektion erreicht, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für das IH-CC bei 63 %, für das hiläre bei 30 % und für die distalen Tumore bei 27 % [19]. Allerdings entwickeln 51-62 % dieser Patienten ein Tumorrezidiv. Dies kann im Bereich der Resektionsränder auftreten, oder sich in Form von Fernmetastasen manifestieren [28, 31]. Die 3-Jahres-Überlebensrate nach einem Rezidiv liegt bei 56 % [32].

1.1.5.1.2 Transplantation

Durch die Tumorausdehnung oder eine zugrundeliegende Zirrhose kann eine kurative Resektion oft nicht mehr durchgeführt werden (siehe auch 1.2.5.1.1). In diesen Fällen und nach dem Ausschluss einer Lymphknoten-Dissemination, Lebermetastasen sowie einer extrahepatischen Manifestation kann eine totale Hepatektomie mit anschließender Lebertransplantation (LTx) durchgeführt werden [33, 34]. Allerdings waren die Ergebnisse zu Beginn nicht so wie man sich dies erhofft hatte. Im Jahre 2000 veröffentlichte das *Cincinnati Transplant*

Tumor Registry Daten von 207 Patienten mit einem CCC, bei welchen eine LTx durchgeführt wurde. Hier lag die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 23 %, 51 % der Patienten entwickelten ein Tumorrezidiv [35]. Verschiedene Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass es keinen Unterschied zwischen einer Resektion und einer LTx bezüglich dem Langzeitüberleben gebe [34, 36, 37]. Allerdings ist nach einer LTx die Einnahme von Immunsuppressiva indiziert und die damit ggf. verbundene begünstigte Tumoraussaat. Grund für obig genannte nicht zufriedenstellende Ergebnisse kann die schlechte Auswahl der Patienten gewesen sein. Einige Patienten hatten bereits eine portale sowie arterielle Invasion. Auch wurde keine explorative Laparotomie durchgeführt und somit eine peritoneale Tumoraussaat sowie bereits betroffene Lymphknoten übersehen. Auch erhielt keiner der Patienten eine neoadjuvante Therapie [38].

Zwischen den Jahren 1993 und 2004 verglich die *Mayo Klinik* in Rochester Daten von Patienten, welche eine LTx oder eine Resektion erhalten hatten. Alle Patienten, welche nach der TNM-Klassifikation ein Tumorstadium von I-II hatten, wurden einer LTx zugeführt. Außerdem erfolgte eine neoadjuvante Behandlung in Form einer Radiochemotherapie. Bei dieser Untersuchung lag die 5-Jahres-Überlebensrate nach einer LTx bei 82 %, wohingegen in der Gruppe der resezierten noch 21 % lebten. Auch war die Entstehung eines Tumorrezidivs nach LTx geringer (13 % vs. 27 %) [39].

Auch Daten aus Deutschland von 11 Transplantationszentren zeigen, dass eine genauere Auswahl der Patienten sich im Langzeitüberleben widerspiegelt. Lag die 5-Jahres-Überlebensrate vor 1998 noch bei 31 % stieg sie danach auf 48 % an [40].

Eine gezielte Auswahl der Patienten mit genauem Staging sowie einer neoadjuvanten Behandlung (Radiochemotherapie) kann zu einem verbesserten Langzeitüberleben führen. So liegt aktuell für das hiläre CCC die 5-Jahres-Überlebensrate nach LTx und neoadjuvanter Therapie bei 65 % [38].

1.1.5.2 Palliative Therapie

Patienten, welche für eine kurative Tumorresektion nicht mehr in Frage kommen, können einer palliativen Therapie zugeführt werden [31]. Aufgrund der tumorbedingten Obstruktion der Gallenwege, kommt es zu wiederkehrenden Cholangitiden, Leberfunktionsstörungen, Schmerzen, Juckreiz und Ikterus. [41]. Zur Symptomlinderung stehen derzeit unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Hierzu zählen die Drainage der Gallenwege mittels ERCP oder perkutaner transhepatischer Drainage (PTD) [42]. Als lokoregionäre Therapieverfahren kommen die transarterielle Chemoembolisation (TACE), die selektive intrahepatische Radiotherapie (SIRT) [43, 44], die photodynamische Therapie (PDT) [28] und Radiofrequenztherapie (RF) [45] zum Einsatz.

1.1.5.2.1 Chemotherapie

Zwischen den Jahren 1990 und 2006 wurde vom *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York* Daten von 594 Patienten mit einem IH-CC ausgewertet. 156 Patienten erhielten aufgrund ihres fortgeschrittenen Krankheitsstadiums eine palliative Therapie. In den ersten Jahren (1990 bis 1999) wurden diese mit einer Kombination aus 5-Fluoruracil und Leukovorin behandelt. Zwischen 2000 und 2006 fand eine Therapie mit Gemcitabin und Irinotecan statt. Aufgrund dieser Änderung im Therapieregime wurde ein Anstieg des mittleren Überlebens von 6 auf 15 Monate erreicht [31]. Durch die statistische Auswertung von 104 Studien konnte eine Verbesserung der Ansprechraten unter einer Therapie mit Gemcitabin und Platinderivaten (Cisplatin oder Oxaliplatin) festgestellt werden [46]. In einer ersten randomisierten Phase II Studie wurden Patienten, welche entweder eine Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin oder eine alleinige Therapie mit Gemcitabin erhielten, verglichen. Es konnte in der Gemcitabin/Cisplatin Gruppe ein verlängertes progressionsfreies Überleben von 8 Monaten im Vergleich zu 4 Monaten unter Gemcitabin allein verzeichnet werden [47]. Nach diesen Ergebnissen wurde die Untersuchung zu einer Phase III Studie ausgeweitet. Es konnte signifikant gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben unter der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie von 8,1 Monate auf 11,7

Monate verlängert wurde [48]. Aufgrund dieser „ABC-Studie“ wird derzeit eine Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin als Standardtherapie in der palliativen Behandlung eines CCCs eingesetzt.

1.1.5.2.2 Molekulare Therapie

Da durch eine systemische Chemotherapie das Überleben der Patienten mit einem CCC nur mäßig beeinflusst werden kann, spielt die Erforschung einer zielgerichteten molekularen Therapie eine wichtige Rolle. In einer randomisierten Phase III Studie wurde die Gabe von Gemcitabin und Oxaliplatin zusammen mit Erlotinib, einem selektiven Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors (epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor) und der alleinigen Gabe des Chemotherapeutikums verglichen. Das mittlere Gesamtüberleben unterschied sich in beiden Gruppen nicht und lag bei 9,5 Monaten [49]. Bei alleiniger Gabe von Erlotinib lag die Ansprechratesogar nur bei 8 % und das mittlere Gesamtüberleben bei 7,5 Monaten [50]. Die Kombination aus Erlotinib und Bevacizumab, ein Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor, zeigte hingegen eine Ansprechrates von 12 % und ein mittleres Gesamtüberleben von 9,9 Monaten [51]. Bei einer Kombination aus Gemcitabin, Oxaliplatin und Bevacizumab konnte eine Ansprechrates von 40 % und ein mittleres Gesamtüberleben von 12,7 Monaten verzeichnet werden [52]. Die höchste Ansprechrates von 63 % wurde mit einer Kombination aus Gemcitabin und Oxaliplatin sowie Cetuximab, ein Inhibitor des EGF-Rezeptors, erreicht. Neun von 30 Patienten konnten nach dieser Therapie einer kurativen Resektion zugeführt werden. Das mittlere Gesamtüberleben lag hier bei 15,2 Monaten [53]. Die Daten zeigen, dass durch eine zielgerichtete Therapie mittels Antikörper kein wesentlicher Anstieg im Gesamtüberleben der Patienten zu verzeichnen ist, weswegen eine Antikörpertherapie aktuell keinen Stellenwert in der Behandlung eines CCCs hat.

1.2 Capsaicin

1.2.1 Einführung

Capsaicin (trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamid), ein Derivat der Homovanillinsäure [54], kommt in verschiedenen Arten der Gattung *Capsicum* vor (die Gattung *Capsicum* gehört zur Familie der Nachtschattengewächse *Solanaceae*) und verleiht den Paprikaschoten ihre Schärfe. Die Pflanzen sind in Mittel- und Südamerika heimisch und wurden bereits 7500 v.Chr. dort kultiviert [55]. Heutzutage wird es zum Würzen von Speisen auf der ganzen Welt verwendet, v.a. in den südöstlichen Landesteilen Asiens und in Lateinamerika. Außerdem findet es Anwendung in der topischen Schmerzbehandlung und kommt zur Selbstverteidigung in Pfeffersprays zum Einsatz [56, 57]. Die Schärfe der Chilischoten wird in SHU (Scoville heat units) gemessen. Die gemessene Zahl gibt an, wie oft eine Substanz in Wasser verdünnt werden muss, um ihre Schärfe zu verlieren. Die SHU reichen von 0 bei Paprika über 3.000 bis 6.0000 SHU bei Jalapeños. Reines Capsaicin erreicht eine Schärfe von 16.000.000 SHU [58].

Im Jahre 1816 konnte Capsaicin zum ersten Mal in halb gereinigter kristalliner Form von Buchholz isoliert werden. 1876 gelang es dann Thresh die reine kristalline Form zu gewinnen. Er nannte dieses Isolat *Capsaicin* [59]. Reines Capsaicin ist hydrophob, farb- sowie geruchslos und bei Raumtemperatur fest [58]. Hogenes vermutete kurze Zeit später, dass Extrakte der Gattung *Capsicum* durch die selektive Stimulation sensorischer Neurone zu Schmerzen sowie Transpiration führen können [60]. Im Jahre 1919 entschlüsselte Nelson schließlich die molekulare Struktur. Er bezeichnete diese als 8-methyl-vanillyl-6-nonenamid [54].

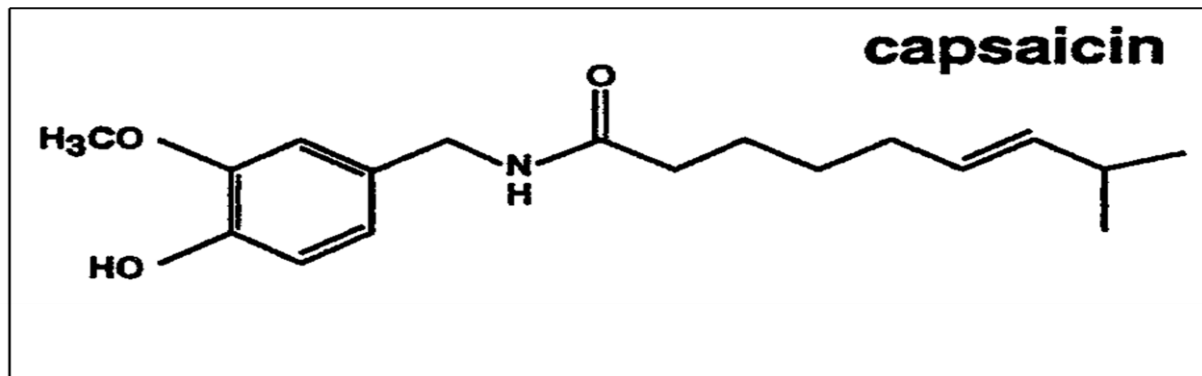


Abbildung 1: Chemische Strukturformel von Capsaicin [60]

In den 1950er und 1960er Jahren konnten Jancso et al. zeigen, dass es durch die wiederholte Gabe von Capsaicin zu einer Desensibilisierung der Schmerzrezeptoren kommt [61]. So findet Capsaicin heutzutage breite Anwendung im Bereich der Schmerztherapie von viralen und diabetischen Neuropathien, sowie in der Therapie der rheumatoiden Arthritis [62].

1.2.2 TRPV1-Rezeptor

Wird Capsaicin lokal auf die Haut aufgetragen, so kommt es zu einer heißen, feuerähnlichen Empfindung. Das menschliche Gehirn ist nämlich nicht in der Lage zu unterscheiden, ob diese Sinnesempfindung durch Capsaicin oder durch thermische Hitze hervorgerufen wird. So ging man davon aus, dass Capsaicin seine Wirkung direkt an sensorischen Neuronen entfaltet [63]. In verschiedenen Arbeiten konnte schließlich gezeigt werden, dass durch Capsaicin Schmerzrezeptoren stimuliert werden und es zu einer erhöhten Leitfähigkeit der Plasmamembran für Kationen, insbesondere für Kalzium, kommt [64, 65]. Im Jahre 1997 wurde die Frage nach der genauen Wirkung an den Neuronen geklärt, als durch Caterina et al. ein Gen, welches für einen Capsaicinrezeptor codiert, entdeckt wurde. Dieser sogenannte TRPV1-Rezeptor (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) ist ein unselektiver Kationenkanal, welcher aus sechs transmembranären Domänen besteht [62] und vor allem auf A δ - und C-Schmerzfasern lokalisiert ist [63, 66]. Der TRPV1-

Rezeptor kann durch Hitze (~ bei 43°C), Azidose (pH < 6) und exogene Agonisten wie Capsaicin aktiviert werden [66]. Wird der Rezeptor stimuliert, kommt es zu einem Einstrom von Kationen vor allem von Kalzium wodurch die Nervenzelle erregt wird. Gleichzeitig werden Entzündungsmediatoren, wie Substanz P, ausgeschüttet was zu einer Schmerzempfindung führt. Bei längerer Exposition kommt es schließlich zu einer Desensibilisierung der Nozizeptoren auf Capsaicin sowie andere schmerzhafte Stimuli [62, 67]. Aufgrund dieser schmerzstillenden Eigenschaft wird Capsaicin in Crèmes, Lotionen und Pflastern zur topischen Schmerzbehandlung bei diabetischer Polyneuropathie, Post-Zoster-Neuralgie sowie bei HIV assoziierten Neuralgien eingesetzt. [68, 69]. Bei Tumorpatienten mit postoperativen Nervenschmerzen kann ebenfalls eine Schmerzlinderung herbei geführt werden [70].

Der TRPV1-Rezeptor kommt auf den unterschiedlichsten Geweben und Zellen vor. Wie bereits oben erwähnt, ist er auf Schmerzfasern lokalisiert, befindet sich aber auch in großer Anzahl auf den viszeralen Afferenzen [71], sowie im Plexus myentericus und submucosus des Gastrointestinaltraktes [72]. Er ist aber auch in der Haut auf Keratinozyten sowie Hautanhangsgebilde wie Talg- und Schweißdrüsen, den Haarfollikeln und in der Wand von dermalen Gefäßen zu finden [73-75]. Außerdem konnte er auf Endothelzellen von Blutgefäßen [76], Zellen des Immunsystems wie T-Zellen [77] sowie Mastzellen [78] nachgewiesen werden. Des Weiteren befindet sich der TRPV1- Rezeptor auf Zellen verschiedener Organe wie Urothelzellen [79-81] und Hepatozyten [82].

1.2.3 Antiproliferative Wirkung von Capsaicin

Es ist beschrieben, dass bestimmte Inhaltsstoffe in Pflanzen, Früchten und Gemüse die antikarzinogenen Eigenschaften sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene von bestimmten Krebserkrankungen beeinflussen [83, 84].

Auch für Capsaicin konnte in verschiedenen Arbeiten ein antiproliferativer Effekt sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen werden. Hierzu zählen maligne

Tumoren der Leber [85, 86], das Magenkarzinom [87], Kolonkarzinom [88], Pankreaskarzinom [89, 90], Blasenkarzinom [81], Prostatakarzinom [91], Lungenkrebs [92, 93], das Mammakarzinom [94, 95] sowie leukämische Zellen [96].

Der genaue Wirkmechanismus von Capsaicin bezüglich seines antiproliferativen Effektes konnte allerdings noch nicht genau geklärt werden. Es scheint als würden unterschiedliche Signalwege beeinflusst werden. Kim et al. untersuchten die Wirkung von Capsaicin auf Mikrogliazellen. Durch die Stimulation des TRPV1-Rezeptors kommt es zu einem vermehrten Kalziumeinstrom in die Zellen mit Zerstörung der Mitochondrien sowie Freisetzung von Cytochrom C und anschließender Apoptose der Zellen [97]. In der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 konnte gezeigt werden, dass durch Capsaicin eine Herunterregulierung des Phosphoinositid 3- Kinase/ Akt Signalwegs *in vivo* als auch *in vitro* stattfindet, was schließlich ebenfalls zur Apoptose der Zellen führt [89]. Ein weiterer Mechanismus, durch welchen es zum Zelltod kommt, ist die Inhibition der Atmungskette in den Mitochondrien und die damit verbundene Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [90, 98, 99]. Interessant ist, dass für gesunde Pankreaszellen dieser Effekt allerdings nicht nachgewiesen werden konnte [90]. Capsaicin verhindert des Weiteren das Wachstum von malignen Zellen durch Arrest des Zellzyklus [100], eine Modulation des EGFR/ HER-2- [95] sowie E2F- Signalwegs [93] sowie durch eine Dysfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems [101]. Ebenfalls spielt die Inhibition der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB eine Rolle [102, 103]. Ein weiterer Signalweg, welcher durch Capsaicin beeinflusst wird, ist der Hedgehog Signalweg. Bai et al. konnten zeigen, dass im Pankreasgewebe einer chronischen Pankreatitis sowie einer Intraepithelialen Neoplasie nach Gabe von Capsaicin ein Rückgang der mRNA-Level des Liganden Sonic Hedgehog und des Transkriptionsfaktors Gli 1 zu verzeichnen war [104].

1.2.4 Karzinogenität von Capsaicin

In der Literatur wird immer wieder ein karzinogener Effekt von Capsaicin diskutiert. So wurde beispielsweise in Tierexperimenten auf einen Zusammenhang zwischen dem Entstehen von Magen- sowie Lebertumoren und einer chilihaltigen Ernährung hingewiesen [58, 105]. Proudlock et al. konnten allerdings zeigen, dass durch reines Capsaicin keine Genotoxizität auszulösen ist [106]. Laut Tsuchiya et al. muss zwischen reinem Capsaicin und dem Chiligewürz bezüglich den mutagenen bzw. kanzerogenen Eigenschaften unterschieden werden. Sie stellten fest, dass das kanzerogene Potential durch eine Verunreinigung mit Aflatoxinen zustande kommt. Bei reinem Capsaicin war keine signifikante mutagene Aktivität festzustellen [107]. Chanda et al. untersuchten die Wirkung von Capsaicin auf chromosomaler Ebene. Auch hier war kein signifikanter Anstieg in der Anzahl der Chromosomenaberrationen oder einer vermehrten Polyploidie festzustellen [57]. In Zellen des Knochenmarks von „*Swiss albino mice*“ war durch die Behandlung mit Capsaicin ein signifikanter Rückgang der durch Cyclophosphamid induzierten Chromosomenaberrationen und DNA Strangbrüchen zu verzeichnen. De et al. konnten so zeigen, dass Capsaicin auch einen schützenden Effekt auf das Erbgut *in vivo* besitzt [108]. In verschiedenen Arbeiten, welche die Karzinogenität von Capsaicin *in vivo* untersuchten, konnte ebenfalls kein signifikanter Anstieg eines Tumorwachstums gezeigt werden. Auch waren keine klinischen Zeichen einer Toxizität zu erkennen. Selbst die lokale Anwendung von Capsaicin auf der Haut zeigte keinen Anstieg der Inzidenz von präneoplastischen oder neoplastischen Veränderungen der Haut [56, 57, 109-111]. Ferner zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Anstieg in der Entwicklung von Hauttumoren nach topischer Behandlung mit karzinogenen Stoffen in Kombination mit Capsaicin [112, 113]. Im Gegensatz zu obigen Arbeiten stehen die Ergebnisse von Hwang et al.. Über die Stimulation des EGFR-Signalwegs durch Capsaicin kommt es in durch Tetradeccanoylphorbol-acetat (TPA) induzierten Hauttumoren zum Überleben der Tumorzellen [114]. Jang et al. untersuchten den Einfluss von Capsaicin auf Lungengewebe nach Gabe von

karzinogenen Substanzen. Sie konnten einen signifikanten Rückgang in der Inzidenz von Adenomen der Lunge fest stellen. Allerdings wurde ein Anstieg der Inzidenz einer Hyperplasie der Harnblase beobachtet. Sie schlossen daraus, dass die karzinogenen Eigenschaften des Capsaicins vom jeweiligen Organ abhängen [115, 116].

1.3 Hedgehog Signalweg

Der Hedgehog (Hh) Signalweg ist an der Proliferation, Apoptose sowie Migration von Zellen beteiligt [117]. Eine wichtige Rolle spielt er bei der Zelldifferenzierung während der embryonalen Entwicklung. Auch ist er an der Regulation der Selbsterneuerung von Zellen beteiligt. In adultem Gewebe ist er normalerweise abgeschaltet und wird nur während einer Gewebsregeneration reaktiviert [118]. Ende der 1970er Jahre wurde der Hedgehog Signalweg erstmals in den Larven von *Drosophila melanogaster* beschrieben. Hier führte eine Mutation im Signalweg zu einer Fehlentwicklung der Segmente. Da es durch die Mutation zusätzlich zu einer starken Borstenbildung kam, war diese Beobachtung namensgebend für den Signalweg: *Hedgehog*, was Igel bedeutet [119]. Während in *Drosophila* nur ein Hedgehog Gen vorhanden ist, existieren in höheren Vertebraten drei verschiedene Gene, welche für folgende drei Liganden kodieren: Sonic (Shh), Indian (Ihh) und Desert (Dhh) Hedgehog [120]. Alle drei Gene spielen während der Organentwicklung eine wichtige Rolle. Während Dhh wichtig für die Entwicklung der Hoden sowie peripheren Nerven ist, nimmt Ihh Einfluss auf die Reifung von Chondrozyten. Shh induziert die Angiogenese, die Proliferation von Stammzellen und ist beteiligt an der Entwicklung von Kleinhirn, Neuralleiste, Hypophyse, olfaktorischem System, Oligodendrozyten, Augen, Darm, Haare, Herz, Lunge, Muskeln, Extremitäten, Pankreas, Prostata, Zähne und Zunge [121].

Im Folgenden soll nur auf den Sonic Hedgehog Signalweg eingegangen werden. Kommt es zu einer Bindung des Liganden Shh an den Transmembranrezeptor Patched (Ptch), wird dieser durch Initialisierung

inaktiviert, was zu einer Aktivierung des transmembranen Proteins Smoothened (Smo) führt und die Transkriptionsfaktoren Gli 1, Gli 2 und Gli 3 aktiviert werden [117, 118, 122, 123]. Eine Dysregulation dieses Signalwegs führt zu der Entstehung verschiedener Krebserkrankungen wie der Haut, des Kleinhirns, dem Verdauungstrakt, Pankreas sowie Prostata [121, 124, 125]. Auch in der Pathogenese des CCCs spielt der Sonic Hedgehog Signalweg eine wichtige Rolle. Durch eine autokrine Aktivierung des Signalwegs kommt es hier zur Induktion und Entstehung eines CCCs. [126]

1.4 Ziel dieser Doktorarbeit

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) wird häufig erst im fortgeschrittenen / metastasierten Stadium diagnostiziert und in den meisten Fällen ist daher nur noch eine palliative Chemotherapie möglich. Es sind aktuell nur wenig chemotherapeutische Therapien beim CCC verfügbar und die Suche nach neuen antiproliferativen Substanzen spielt daher eine bedeutende Rolle. In Fremdpublikationen konnte gezeigt werden, dass das pflanzliche Alkaloid Capsaicin wachstumshemmende Eigenschaften hat. Bis dato wurde aber der Stellenwert von Capsaicin beim CCC nicht untersucht. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es zu untersuchen, in welchem Ausmaß Capsaicin anti-tumoröse Eigenschaften beim CCC *in vitro* hat. Hierfür werden eine intrahepatische und eine extrahepatische CCC Zelllinie verwendet. Abschließend soll dann untersucht werden welche Mechanismen zu einer Wachstumshemmung durch Capsaicin beim CCC zu Grunde liegen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Lösung (30%) Mix 37, 5:1	AppliChem, Darmstadt
Agarose-Multi-Purpose	Bioline, Luckenwalde
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Annexin V Apoptosis Detection Kit II	BD Biosciences, San Diego, USA
Borax (Sodium Tetraborate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Capsaicin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Mannheim
DC Protein Assay	Biorad, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
EGTA	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumpromid	AppliChem, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Gene Ruler 1kb DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glycerin wasserfrei	AppliChem, Darmstadt
Glyzin	AppliChem, Darmstadt
P-Iodotetrazolium Violet	Sigma-Aldrich, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad, USA
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt

β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat- Heptahydrat	Merck, Darmstadt
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
Nobel Agar	Difco; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon Rot
Penicillin/Streptomycin Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
RNeasy protect Mini Kit (50)	QIAGEN, Hilden
RPMI 1640 + Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS ultrapure	AppliChem, Darmstadt
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo scientific, Rockford, USA
Taq DNA Polymerase	QIAGEN, Hilden
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Thermopol Reaction Buffer 10x	Biolabs, Frankfurt
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Triton X 100	AppliChem, Darmstadt
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom, Berlin
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingham
Watman Filter Paper	Omnilab, Bremen
Xylenecyanol	AppliChem, Darmstadt

2.1.2 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Agarose Gelelektrophorese System	Bio-RAD, München
Brutschrank	Heidolph, Kelheim
Durchflusszytometer	LSRFortessa flowcytometer, Becton, Dickinson
Gelkammern für Proteine	Bio-RAD, München
Mikroskop Leica DMI 6000 B	Leica, Wetzlar
Magnetrührer	Bio-RAD, München
Mikrotiterplatten Luminometer	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Mikrowelle	Bauknecht, Stuttgart
Mini-Protein Electrophoresis System	Bio-RAD, München
Mini-Sub Cell GT Cell Electrophoresis System	Bio-RAD, München
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-RAD, München
Neubauerzählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 0,5 – 10 µl 2 – 20 µl 20 – 200 µl 100 – 10000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Rocky, Heidolph, Schwabach
Sonifier UP 200H	Hielscher, Stahnsdorf
Spannungsgeräte	Biorad, München

PowerPac Basic Power Supply PowerPac HC Power Supply	
Sterilbank	Hera Safe, Kendro, Osterode
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	MWG-Biotech AG, Ebersberg
ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Janke & Kunkel, Staufen
Zentrifugen	
Zentrifuge 5415 D	Roth Karlsruhe
Zentrifuge Mikro 220 R cooled	Heraeus, Osterode
Megafuge 1.0	Hettich, Tuttlingen
Centrifuge "Rotina 38R"	Beckman GmbH, Düsseldorf
Centrifuge "L8-55M"	GFL, Burgwedel

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber	BD Biosciences, Bedford, UK
Deckgläser 24*50 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Eppendorfgefäße 0,2 ml Multiply-PCR-Gefäße 1,5 ml Zentrifugiergefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpipettenspitzen 0,1-10 µl 2-20 µl 20-200 µl 100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Greiner, Solingen

Glaspipetten 5 ml Messpipetten 10 ml Messpipetten 25 ml Messpipetten	BRAND, Wertheim
Hyperfilm TM ECL	Amersham Bioscience, Braunschweig
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Nadel 21G	B. Braun, Melsungen
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Polyscreen PVDF Transfer Membrane	Vector Laboratories, Inc., Burlingham
Reagenzgefäße 15 ml 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Rundbodenröhrchen 5 ml	BD Biosciences, Bedford, UK
Spritze 1 ml	B. Braun, Melsungen
Transfermembran	PerkinElmer, Rodgau
Whatmanpaper	Omnilab, Elbingeröder
Zellkulturplatten 6-well 96-well 60x15 mm 1000x15 mm	Sarstedt, Nümbrecht Sarstedt, Nümbrecht Greiner Bio-One, Frickenhausen Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Software

Tabelle 4: Verwendete Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 8.0	Adobe Systems, San Jose, USA
BD Cell Quest Pro™	BD Biosciences, Mississauga, USA
EndNote X6.0.1 (Bld 6599)	Thomson Reuters, New York, USA
Graphpad Prism Version 5.0	Graphpad Software, San Diego, CA, USA
FlowJo Version 8.7	Tree Star Inc., Ashland, USA
Microsoft Excel 2002	Microsoft Inc., Redmond, Washington, USA
Microsoft Word 2007	Microsoft Inc., Redmond, Washington, USA

2.1.5 Puffer, Lösungen, Gele

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer, Lösungen	Zusammensetzungen
ABC- Reagenz	1 Tropfen Solution A 1 Tropfen Solution B 2,5 ml 1x PBS
6x Agaroseladepuffer	150 mM Tris pH 7,6 10 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylenecyanol
Blockierungslösung (Western Blot)	5 % Magermilchpulver in 1x TNT
Elektrophoresepuffer TBE 10x (Tris-Borat-EDTA)	890 mM Tris 890 mM Borsäure

	20 mM Na ₂ EDTA pH 8,0
Entwicklungslösung	50 % Luminol Enhancer 50 % Peroxidase Solution
10x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM K
4x Protein-Ladepuffer	0,25 M Tris-HCl pH 6,8 8 % SDS 40 % Glycerol 10 % beta-Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau In ddH ₂ O
SDS- Gellaufpuffer (10x)	250 mM Tris pH 8,3-8,6 1% SDS 1,92 M Glyzin
TNT Blotwaschpuffer 10x	150 mM NaCl 25 mM Tris pH 7,5 0,05 % Tween 20
Toluidinblaulösung	1 % Toluidinblau 1 % Borax In ddH ₂ O
Western Lysepuffer	20 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1mM EGTA 1 % Triton x-100
Western Transferpuffer 10x	250 mM Tris 1,92 M Glyzin

Tabelle 6: Herstellung eines 5 %igen und 12 %igen Polyacrylamidgel

	Sammelgel 5 %	Trenngel 12 %
ddH ₂ O	1,96 ml	3,4 ml
Acrylamid	0,565 ml	4,0 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	2,5 ml
0,5 M Tris pH 6,8	0,875 ml	-
10 % SDS	35 µl	100 µl
10 % APS	35 µl	105 µl
TEMED	3,5 µl	15 µl

2.1.6 Antikörper und Primer

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für den Western Blot; M.=monoklonal

Antikörper	Größe (kDa)	Quelle	Verdünnung	Hersteller
M. Anti-β-Aktin (AC-74)	42	Maus	2:10000	Sigma-Aldrich
M. Anti-N-cadherin (EPR1792Y)	140	Kaninchen	1:10000	Milipore
M. Anti-E-cadherin (24E10)	135	Kaninchen	1:10000	Cell Signalling

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für den Western Blot

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

Tabelle 9: Verwendete Primer für die PCR

Primer	Größ (bp)	Sequenzen	Hersteller
Gli 1	248	F5'CTCCCGAAGGACAGGTATGTAAC'3 B5'CCCTACTCTTTAGGCACTAGAGTTG'3	Sigma- Aldrich
Gli 2	200	F5'TGGCCGCTTCAGATGACAGATGTTG'3 B5'CGTTAGCCGAATGTCAGCCGTGAAG'3	
Smo	258	F5'GTTCTCCATCAAGAGCAACCAC'3 B5'CGATTCTTGATCTCACAGTCAGG'3	
18s RNA	155	F5'AAACGGCTACCACATCCAAG'3 B5'CCTCCAATGGATCCTCGTTA'3	

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien und Zellkultur

Für alle Experimente wurden zwei cholangiozelluläre Karzinomzelllinien verwendet. SZ-1, eine intrahepatische Zelllinie, wurde aus dem Resektat eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms gewonnen und TFK-1, eine extrahepatische Zelllinie, wurde käuflich erworben (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Nr. ACC 344).

Die Zellen wurden in 9 ml Vollmedium (siehe Tabelle 10) auf Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5 % kultiviert und nach 2 bis 3 Tagen passagiert.

2.2.1.2 Passage von Zellen

Die Zellen wurden nach 2 bis 3 Tagen passagiert. Das alte Tumormedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen. Dieses wurde anschließend ebenfalls abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Trypsin für 1 Minute im 37°C Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 3 ml Vollmedium wurde die Aktivität des Trypsins gestoppt und die Zellen in eine neue 10 cm Zellkulturplatte, welche bereits 9 ml frisches Vollmedium enthielt, überführt. Die Zellen wurden je nach Bedarf zwischen 1:3 und 1:10 gesplittet.

2. 2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin für eine Minute im 37°C Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Vollmedium hinzugefügt, die Zellen in ein 15 ml Reagenzgefäß überführt und für 3 Minuten bei einer Umdrehung von 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 2 ml des Einfriermediums (siehe Tabelle 10) hinzugefügt. Diese Zellsuspension wurde

dann auf Kryoröhrchen aufgeteilt und im Gefrierschrank bei - 80°C gelagert. Wurden die Zellen für ein Experiment benötigt, wurden sie im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in 10 cm Zellkulturplatten, die bereits 9 ml Vollmedium enthielten, überführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Medien

Vollmedium	Einfriermedium
89% RPMI 1640 + Glutamax	60 % Vollmedium
10% fetales Kälberserum (FKS)	30 % Fetales Kälberserum (FKS)
1% Penicillin/Streptomycin	10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.2.1.4 Aussaht von Zellen

Das alte Tumormedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen, welches anschließend wieder abgesaugt wurde. Nach 1 Minute Inkubation mit 1 ml Trypsin wurden 3 bis 5 ml Vollmedium auf die Zellen gegeben und die komplette Menge in ein 15 ml Reagenzgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in einem Eppendorfgefäß 1:100 mit Vollmedium verdünnt (10 µl Zellsuspension + 990 µl Vollmedium). Von dieser Verdünnung wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und 5 Großquadrate unter dem Lichtmikroskop ausgezählt um die Zellzahl pro Milliliter zu ermitteln. Die Berechnung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Mittelwert der Zellzahl aller Quadrate/ 5 = Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat

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

Zellen/ ml x Verdünnungswert = Gesamtzellzahl

Anschließend wurde die Menge an Zellsuspension, die für die gewünschte Zelldichte erforderlich war, ermittelt.

Die Zellen wurden schließlich in die für das jeweilige Experiment erforderlichen Zellkulturplatten ausgesät.

2. 2.1.5 Behandlung und Ernten von Zellen

Waren die zu behandelnden Zellen zu 50 bis 60 % konfluent, wurden sie mit 150 μM und 200 μM in DMSO gelöstem Capsaicin behandelt. Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden nach 24, 48 und 96 Stunden abgeerntet. Nach 48 Stunden wurde das Medium der Zellen, welche nach 96 Stunden abgeerntet werden sollten, abgesaugt und die Zellen erneut mit Capsaicin und DMSO behandelt. Zum Abernten der Zellen wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und zusammen mit dem Medium in ein 15 ml Reagenzgefäß überführt. Dieses wurde bei 1000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen und erneut bei 1000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde nun wieder verworfen und das Zellpellet bei -20°C aufbewahrt oder gleich weiter verarbeitet.

2.2.2 WST1 Assay

Zur Untersuchung der Zellproliferation nach Behandlung mit Capsaicin, wurde der WST1 Assay verwendet. WST1 ist ein farbloses Tetrazonium Salz, welches durch mitochondriale Dehydrogenasen von gesunden vitalen Zellen zu rotem Formazan reduziert wird. Die rote Farbe korreliert mit der Anzahl gesunder Zellen und kann mit einem Spektralphotometer gemessen werden [127].

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $12 \cdot 10^3$ in 100 μl Vollmedium in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils drei Kavitäten mit 150 μM und 200 μM Capsaicin behandelt. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet. Die Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde jeweils nach 24, 48, 72 und 96 Stunden gemessen. Dabei wurde in jede Kavität 10 μl WST1 Reagenz pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden die rote Farbe mit dem Spektralphotometer bei einer

Testwellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Als Nullwert diente eine unbehandelte Platte.

2.2.3 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Mittels SDS-PAGE können Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülmassen im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Als Trennmedium dient meistens ein Polyacrylamid-Gel. Nach der Auftrennung werden die Proteine erneut mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran übertragen (blotting). Die Proteine werden anschließend mit einem spezifischen Primärantikörper detektiert und mit einem Sekundärantikörper, welcher durch ein Enzym markiert ist, sichtbar gemacht (gemäß Herstellerinformation).

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von $8 \cdot 10^4$ in 3 ml Vollmedium in 6 cm Zellkulturplatten ausgesät und wie unter 2.2.1.4 beschrieben behandelt und abgeerntet.

2.2.3.1 Proteinextraktion

150 μ l Lysepuffer wurden auf die Zellpelets gegeben, suspendiert und anschließend in ein Eppendorfgefäß überführt und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Der Lysepuffer wurde zuvor mit einer Tablette Proteaseinhibitor und Phosphataseinhibitor versetzt. Die Tabletten wurden jeweils in 500 μ l destilliertem Wasser gelöst und mit 10 ml Lysepuffer vermischt. Um die Zellmembran zu zerstören, wurden die Zellen zwei Mal für 15-20 Sekunden auf Eis sonifiziert und im Anschluss für 20 min bei 13000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich nun die Proteine befanden, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.2.3.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinmenge in den einzelnen Proben wurde mittels DC Protein Assay gemäß Herstellerinformation durchgeführt. Hierbei kommt es

zunächst zu einer Reaktion der Proteine mit einer alkalischen Kupfer-Tartrate Lösung, anschließend reagieren die Proteine mit dem Folin Reagenz. Diese Reaktionen führen zu einer blauen Farbentwicklung, welche mit einem Mikrotiterplattenreader bei einer Wellenlänge von 650–750 nm gemessen wurde.

Um die erforderliche Proteinmenge zu berechnen, wurde der Mittelwert x der einzelnen Proben verwendet. Mit folgender Formel ließ sich der Proteinanteil in Mikroliter berechnen: $100 / ((x-0,0627)/0,136)$. Gemäß der Berechnung wurde die Proteinmenge sowie Lysepuffer in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und mit 25 μ l 4x Proteinladepuffer versetzt.

2.2.3.3 Herstellung des Trenn- und Sammelgels

Das Trenn- sowie Sammelgel wurde wie in Tabelle 6 beschrieben hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen und sofort mit 100 % Ethanol bedeckt. Nach ca. 10-20 Minuten war das Gel fest, das Ethanol wurde entfernt und das Sammelgel wurde ebenfalls zwischen die Glasplatten gegossen. Um Kavitäten für die Proben zu erhalten wurde ein Kamm zwischen die Platten eingeführt.

2.2.3.4 Trennung der Proteine durch SDS-PAGE

Nach fest werden des Gels, wurde es in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1x SDS-Puffer aufgefüllt. Die Proteine wurden zunächst für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend abzentrifugiert. Nun wurden die Kavitäten mit je 25 μ l Protein befüllt, wobei in die erste Kavität 10 μ l eines Proteinmarkers pipettiert wurden. Die Auftrennung erfolgte für das Sammelgel bei 60 V, für das Trenngel waren es 100-120 V.

2.2.3.5 Transfer der Proteine vom Gel auf eine Membran

Das Gel wurde von den Platten abgelöst und das Sammelgel verworfen. Die Membran wurde für 1-2 Sekunden mit 100 % Methanol sowie mit 1x Western Transfer Puffer benetzt. Anschließend wurde die Blottingkassette wie folgt beladen: Schwämmchen, Whatmanpaper, Gel, Membran, Whatmanpaper,

Schwämmchen. Whatmanpaper und Schwämmchen wurden zuvor in 1x Western Transfer Puffer getränkt. Die Blottingkassette wurde in einer Blottingkammer platziert, mit einem Rührfisch versehen und mit 1x Western Transfer Puffer befüllt. Der Proteintransfer fand bei 100 V und 0,35 A für 1 Stunde 20 Minuten im 4°C Kühlraum statt.

Nach dem Blotten wurde die Membran für 20 Minuten in 5 %iger Milchlösung blockiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minuten in 1x TNT Puffer gewaschen.

2.2.3.6 Inkubation der Antikörper und Entwicklung der Membran

Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit 1x TNT gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend wieder dreimal für 10 Minuten gewaschen und dann für 3 Minuten mit 4 ml der Entwicklungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einer Entwicklungskassette platziert, für 15-30 Sekunden einem Röntgenfilm exponiert und anschließend entwickelt.

2.2.4 Semiquantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine Methode zur Vervielfältigung von DNA Abschnitten *in vitro* dar. Mittels zwei sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) wird die DNA-Sequenz definiert und diese dann durch die TaqPolymerase amplifiziert. Die so gewonnenen DNA Produkte werden anschließend mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Um die DNA Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, wird die DNA mit Ethidiumbromid, welches mit dieser interkaliert, versetzt (gemäß Herstellerinformation).

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $4 \cdot 10^3$ in 6 cm Zellkulturplatten ausgesät und wie unter 2.2.1.4 beschrieben behandelt und abgeerntet.

2.2.4.1 RNA Extraktion

Zur Extraktion der RNA wurde das RNeasy protect Mini Kit (50) verwendet. Auf jedes Zellpellet wurden zunächst 350 µl RLT Puffer gegeben und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut durchmischt. Anschließend wurden 3,5 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt und das Lysat zur Homogenisierung mit einer 1 ml Spritze durch eine 21 G Nadel fünfmal gezogen. Nach Zugabe von 350 µl 70 %igem Ethanol und gutem Durchmischen, wurde das Lysat in Polypropylenfiltersäulen („Spin columns“) mit Sammelröhrchen überführt und für eine Minute bei 7900 U/min zentrifugiert. Das Filtrat in den Sammelröhrchen wurde verworfen, 350 µl RW1 Puffer hinzugefügt und erneut für eine Minute bei 7900 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrates wurde dieser Vorgang wiederholt. Anschließend wurden 500 µl RPE Puffer dazu gegeben, abermals für eine Minute bei 7900 U/min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde ebenfalls wiederholt. Anschließend wurden die Filtersäulen in neue Sammelgefäße überführt, erneut bei 7900 U/min für eine Minute zentrifugiert und in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße plaziert. Nun wurde 25 µl 65°C warmes RNase freies Wasser direkt auf die Membran der „Spin columns“ gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für eine Minute bei 7900 U/min zentrifugiert. Das Filtrat wurde nun nicht verworfen sondern es wurde erneut 25 µl des vorgewärmten RNase freien Wassers hinzugefügt, bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert und abermals zentrifugiert. Die Konzentration der so gewonnen RNA wurde anschließend bestimmt.

2.2.4.2 RNA- Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Spektrometer. Hierbei wurde 1 µl des Filtrats in 99 µl autoklaviertes Wasser gegeben und die Extinktion in µg/ml gemessen.

2.2.4.3 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das iScript cDNA Synthesis Kit verwendet. Alle folgenden Arbeitsschritte fanden auf Eis statt. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA, 4 µl

iScript Reaction Mix sowie 1 µl iScript Reverse Transcriptase verwendet und anschließend alles mit Nuclease freiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Folgendes Programm wurde am Thermocycler verwendet:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)
25.0	5.00
42.0	30.00
85.0	5.00
4.0	Lagerung

2.2.4.4 DNA-Amplifikation

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden wieder auf Eis durchgeführt. Pro Probe wurde in ein Multiply-Gefäß 2 µl cDNA, 2,5 µl Thermopol Buffer, 1 µl sense-Oligonucleotid-Primer, 1 µl antisense-Oligonucleotid-Primer, 1 µl dNTP und 16,5 µl autoklaviertes Wasser pipettiert. Zum Schluss wurde 1 µl der Taq-Polymerase hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Gefäß ohne DNA mitgeführt. Zur endogenen Kontrolle wurde 18s RNA eingesetzt. Folgendes Programm wurde am Thermocycler verwendet:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)
94.0	5.00
94.0	0.30
55.0	0.30 (30–35 Zyklen)
72.0	0.40
72.0	7.00
04.0	Lagerung

2.2.4.5 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2 %iges Agarosegel verwendet. Es wurden zu 200 ml 0,5x TBE 4 g Agarose hinzugefügt und in der Mikrowelle solange erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurden

12 µl Ethidiumbromid zum Gel gegeben und dieses in eine Gelapparatur mit bereits eingesetztem Kamm gegossen. Nachdem das Gel fest war, wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 0,5x TBE bedeckt. Bevor die einzelnen Kammern beladen wurden, wurde jede Probe mit 6 µl Agaroseladepuffer versetzt. Als DNA-Marker wurden 20 µl DNA-Leiter (Gene Ruler 1kb DNA ladder) verwendet. Die Auftrennung erfolgte schließlich bei 120 V. Mittels UV-Licht wurden anschließend die Banden sichtbar gemacht und ein Foto dieser erstellt.

2.2.4.6 Quantifizierung der DNA

Nachdem das Foto eingescannt wurde, wurde mittels Adobe Photoshop® die Intensität der einzelnen Banden ermittelt. Mit Hilfe eines immer gleich großen Rechtecks wurden der Pixelwert sowie der mittlere Helligkeitswert einer Bande bestimmt und miteinander multipliziert. Dieser Wert wurde schließlich durch den Intensitätswert der jeweiligen 18s RNA geteilt und in Bezug zur Intensität der Kontrolle DMSO gesetzt.

2.2.5 Wound-Healing Assay

Während der physiologischen Wundheilung aber auch bei der Tumormetastasierung spielt die Zellmigration eine wichtige Rolle. Der Wound-Healing Assay stellt eine einfache Methode dar, mit welcher die gerichtete Zellmigration *in vitro* untersucht werden kann (gemäß Herstellerinformation).

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ in 6-well Zellkulturplatten ausgesät und im 37°C Brutschrank inkubiert. Hatten die Zellen eine Dichtigkeit von 80 % erreicht (was nach 48 Stunden der Fall war), wurde das Medium entfernt und mit Medium, welches nur 2 % FKS enthielt, ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit 150 µM und 200 µM Capsaicin sowie DMSO behandelt. 48 Stunden nach der Behandlung wurde mit einer

10 µl Pipettenspitze dem Zellrasen eine Wunde zugefügt. Das alte Medium wurde entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend wurden wieder 3 ml des 2 %igen FKS Mediums hinzugefügt. Unter dem Lichtmikroskop wurden Bilder zum Zeitpunkt 0 h und nach 24 h gemacht. Mit Hilfe von Adobe Photoshop® wurden die Abstände der Wundränder zu einander gemessen. Die Differenz der Wundabstände vom Zeitpunkt 0 h zum Zeitpunkt 24 h wurde auf den Zeitpunkt 0 h bezogen und daraus dann der Migrationsindex wie folgt berechnet:

$$\text{Migrationsindex} = \frac{\text{Breite der Wunde}_{0\text{h}} - \text{Breite der Wunde}_{24\text{h}}}{\text{Breite der Wunde}_{0\text{h}}} \times 100$$

2.2.6 Invasion Assay

Die Invasionsfähigkeit von Zellen kann mit diesem Assay *in vitro* untersucht werden. Das Testsystem besteht aus zwei Kammern welche durch eine dünne Membran voneinander getrennt sind. Diese Membran ist mit 8 µm großen Poren versehen, welche durch eine dünne Schicht einer *MATRIGEL Basement Membrane Matrix* bedeckt sind. Diese Matrigel Matrix soll die Basalmembran darstellen. Somit wird verhindert, dass nicht-invasive Zellen durch die Poren gelangen. Die invasiven Zellen hingegen können sich von der Matrix lösen und durch die Poren invadieren (gemäß Herstellerinformation).

Die 6-well Invasionskammern wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurde 37°C warmes FKS freies Medium in die Kammern gegeben und für 2 Stunden im 37°C Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig entfernt und 2,5 ml mit FKS versetztem Vollmedium in die Umgebungskammern gegeben. In die

inneren Kammern wurden die Zellen zusammen mit 150 μM und 200 μM Capsaicin sowie DMSO gegeben. Die Zelldichte betrug $1,25 \cdot 10^5$ Zellen pro 2 ml FKS freiem Medium. Die Zellen wurden anschließend für 48 Stunden im 37°C Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde mit einem Zellschaber und einem Zellstofftuch vorsichtig die Innenseite der Membran von nicht-invasiven Zellen gesäubert. Die invasiven Zellen an der Außenseite der Membran wurden anschließend gefärbt. Sie wurden für 2 Minuten in 100 % Methanol fixiert, dann für 2 Minuten in 1 % Toluidine gefärbt. Um überschüssige Farbe zu entfernen, wurde mit destilliertem Wasser gespült. Nachdem die Zellen an der Luft getrocknet waren, wurde die Membran aus der Kammer heraus gelöst und auf einem Objektträger fixiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 20facher Vergrößerung Bilder gemacht und 5 Blickfelder ausgezählt. Aus diesen gewonnenen Zahlen wurde der Invasionsindex wie folgt berechnet:

$$\text{Invasionsindex} = \frac{\% \text{ Invasion behandelter Zellen}}{\% \text{ Invasion Kontrollzellen}}$$

2.2.7 Koloniebildungsassay

Tumorzellen haben die Eigenschaft unabhängig von äußeren und inneren Einflüssen, welche normalerweise die Zellproliferation beschränken, zu wachsen. Der Koloniebildungsassay stellt eine Methode dar, dies *in vitro* zu untersuchen (gemäß Herstellerinformation)

60 mm Zellkulturplatten wurden vorbereitet und mit 4 ml 1 %igem Agar in Vollmedium befüllt, was als unterste Schicht diente. Der Agar war zuvor in Wasser gelöst und anschließend bis zur vollständigen Verflüssigung autoklaviert worden. Die Zellen beider Zelllinien wurden mit einer Zelldichte von $6 \cdot 10^4$ pro Well sowie DMSO und Capsaicin (150 μM und 200 μM) in 3 ml

Vollmedium, welches mit 0,5 %igem Agar versetzt war, suspendiert. Nachdem die unterste Schicht des Agars fest war, wurde diese mit 2 ml der Zellsuspension bedeckt. Nachdem auch die oberste Schicht bei Raumtemperatur fest geworden war, wurde der Agar mit 1 ml Vollmedium bedeckt und für 3 Wochen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien mit p-Iodonitotetrazonium Violet gefärbt und nach weiteren 3 Wochen im Inkubationsschrank ausgezählt.

2.2.8 Apoptosemessung

Die Apoptose, der programmierter Zelltod, ist ein physiologischer Vorgang und wird durch bestimmte morphologische Eigenschaften gekennzeichnet. Ein frühes Zeichen ist die Umlagerung des Membranphospholipids Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Zellmembran. Die Zellmembran bleibt bei diesem Vorgang allerdings intakt.

Das Protein Annexin V, welches im folgenden Versuch verwendet wurde, kann zu Fluorchromen wie FITC konjugiert werden und so mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Es bindet vor allem an PS. Doch da es auch an das PS von nekrotischen Zellen bindet, wird gleichzeitige eine Färbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. PI gelangt nur durch eine geschädigte Zellmembran, welche bei nekrotischen oder toten Zellen zu finden ist, ins Zellinnere und interkaliert dort mit der DNA. Frühapoptotische Zellen sind also Annexin V positiv sowie PI negativ. Spätapoptotische und nekrotische bzw. tote Zellen sind dagegen Annexin V und PI positiv. Lebende Zellen sind für beide Marker negativ (gemäß Herstellerinformation).

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von $12 \cdot 10^4$ Zellen in 3 ml Vollmedium in 6 cm Zellkulturplatten ausgesät und anschließend wie unter 2.2.1.4 beschrieben behandelt. Nach 24, 48 und 96 Stunden wurden die Zellen geerntet und die relative Anzahl der apoptotischen Zellen mit dem LSRFortessa Durchflusszytometer bestimmt.

Der Überstand des Tumormediums wurde in ein 15 ml großes Reagenzgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml kaltem 1x PBS gewaschen und dieser Überstand ebenfalls dem Reagenzgefäß zugeführt. Dann wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin für 1 Minute im Brutschrank inkubiert, die Aktivität des Trypsins mit 3 ml Vollmedium gestoppt und die Zellen komplett in das Reagenzgefäß überführt. Bei 1000 U/min wurde für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen abermals mit 1 ml kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend nochmals bei 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Reagenzgefäße mit den Zellpellets sofort auf Eis gestellt. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zu den Zellen wurden 300 µl eines 1:10 verdünnten Bindungspuffers (Annexin V Apoptosis Detection Kit II) gegeben (9 ml 4°C kaltes 1x PBS + 1 ml Bindungspuffer). Diese 300 µl wurden anschließend auf drei Rundbodenröhrchen verteilt. Ein Gefäß wurde mit 5 µl Annexin V-FITC gefärbt, eins mit 5 µl PI und das dritte mit je 5 µl Annexin V-FITC und PI. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten im Dunkeln wurden erneut 400 µl Bindungspuffer hinzugefügt. Anschließend wurde die Messung am Durchflusszytometer durchgeführt und mit dem Programm FlowJo Version 8.7 analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der Zellproliferation

Zur Untersuchung der Zellproliferation von SZ-1 und TFK-1 Zellen unter der Behandlung mit Capsaicin wurde der WST1 Assay verwendet. Aufgrund Angaben in der Literatur wurden Konzentrationen von 150 μM und 200 μM gewählt [81, 85, 86, 90, 100]. Zur Kontrolle wurden Zellen beider Zelllinien verwendet, welche nur mit DMSO behandelt wurden. Um die Zellproliferation bestimmen zu können, wurden alle Messwerte auf den Zeitpunkt 0 Stunden bezogen. Die unbehandelten Zellen beider Zelllinien zeigten ein uneingeschränktes Wachstum. Nach 48 Stunden war die erste deutliche Wachstumsdifferenz zwischen den behandelten Zelllinien und den Kontrollzellen zu sehen. So zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle bei den SZ-1 Zellen unter der Behandlung mit 150 μM Capsaicin ein um 70 % geringeres Wachstum. Wurden die Zellen mit einer Konzentration von 200 μM behandelt, betrug der Wachstumsrückgang sogar 127 %. Nach 72 Stunden war eine Wachstumsreduzierung von 111 % (150 μM) sowie von 220 % (200 μM) zu verzeichnen. Nach 96 Stunden war in den behandelten SZ-1 Zellen wieder ein leichter Proliferationsanstieg zu verzeichnen. Das Zellwachstum war im Vergleich zur Kontrolle allerdings immer noch deutlich geringer. Es war bei 150 μM Capsaicin um 129 %, bei 200 μM um 252 % reduziert. Bei den TFK-1 Zellen verhielt sich das Wachstum ähnlich. Nach 48 Stunden war auch hier zum ersten Mal eine deutliche Wachstumsreduzierung festzustellen. Bei einer Capsaicindosis von 150 μM betrug sie 78 % bei 200 μM waren es 90 %. Nach 72 Stunden betrug der Rückgang des Wachstums 216 % (150 μM) sowie 245 % (200 μM). Auch in dieser Zelllinie zeigte sich ein leichter Proliferationsanstieg nach 96 Stunden. Unter der Behandlung mit 150 μM Capsaicin war die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle jedoch immer noch um 183 % geringer, bei 200 μM waren es 234 %. (Abb. 2A und 3A).

Die lichtmikroskopischen Bilder, welche nach 96 Stunden aufgenommen wurden, bestätigten diese Ergebnisse. Hier war ebenfalls eine Abnahme der

Zelldichte unter den verwendeten Dosen von Capsaicin zu sehen. Unter der Behandlung mit 200 μM war der stärkere Effekt zu verzeichnen. Auch konnte eine veränderte Zellmorphologie festgestellt werden. In beiden Zelllinien war zu beobachten, dass die Zellen Zellausläufer bildeten (Abb. 2B und 3B).

3.2 Untersuchung der epithelial-mesenchymalen Transition auf Proteinebene

Für die Migration und Invasion von Tumorzellen spielt die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eine wichtige Rolle. Es wurde bereits gezeigt, dass im cholangiozellulären Karzinom dieser Mechanismus für das aggressive Wachstum und die Prognose der Patienten eine wichtige Rolle spielt [128, 129].

Mittels Westernblot wurden die beiden EMT Marker E-cadherin und N-cadherin analysiert um festzustellen, ob diese durch Capsaicin beeinflusst werden. Bereits nach 48 Stunden war unter beiden verwendeten Dosen (150 μM und 200 μM) ein Expressionsanstieg von E-cadherin sowohl in den SZ-1 als auch in den TFK-1 Zellen zu sehen. In beiden Zelllinien hatte Capsaicin keinen Einfluss auf den Marker N-cadherin (Abb. 4A und 4B sowie Abb. 5A und 5B).

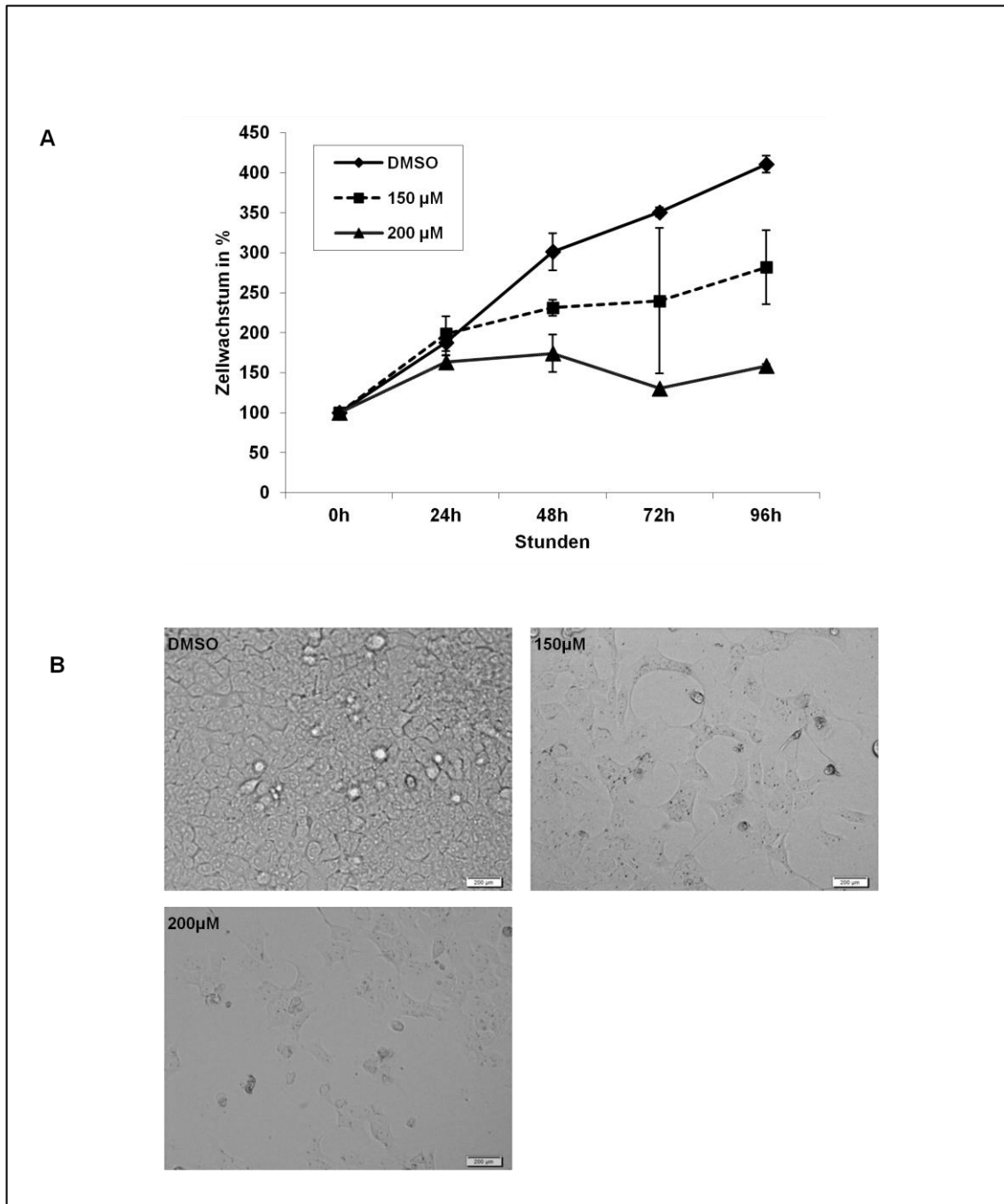


Abbildung 2: Zellproliferationsassay von SZ-1 Zellen

Inhibition der Proliferation von SZ-1 Zellen durch Capsaicin in Abhängigkeit von Zeit und Dosis.
A) Graphische Darstellung des Zellwachstums unter den verwendeten Konzentrationen. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen.
B) Korrespondierende lichtmikroskopische Bilder (96h, 10fache Vergrößerung).

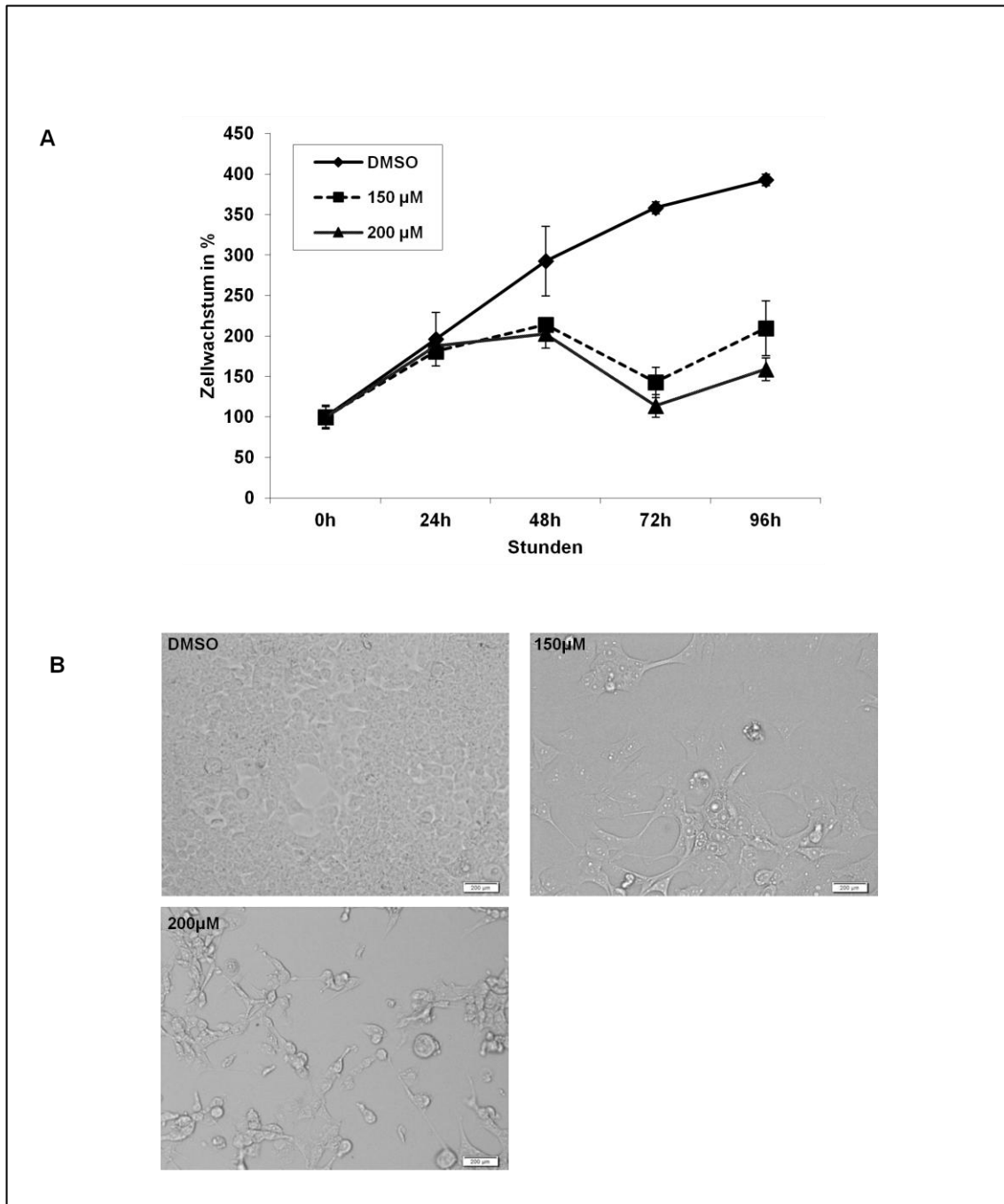


Abbildung 3: Zellproliferationsassay von TFK-1 Zellen

Inhibition der Proliferation von TFK-1 Zellen durch Capsaicin in Abhängigkeit von Zeit und Dosis. A) Graphische Darstellung des Zellwachstums unter den verwendeten Konzentrationen. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen.

B) Korrespondierende lichtmikroskopische Bilder (96h, 10fache Vergrößerung).

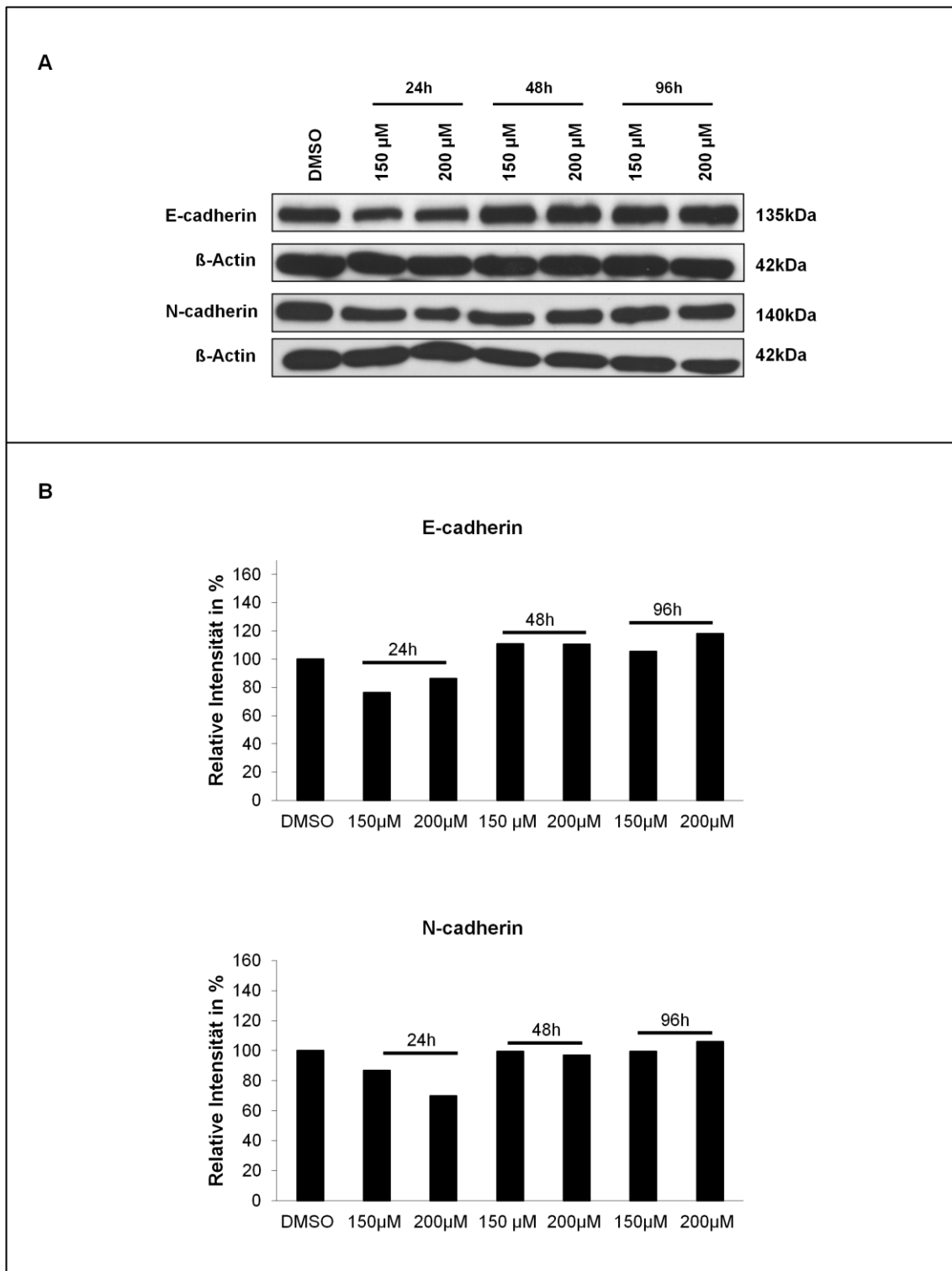


Abbildung 4: Western Blot der SZ-1 Zellen

A) Zeitabhängiger Expressionsanstieg des EMT-Markers E-cadherin in SZ-1 Zellen nach Behandlung mit Capsaicin. Als Ladekontrolle wurde Beta-Actin verwendet.
 B) Darstellung der relativen Intensität der in Abb.4A dargestellten Banden.

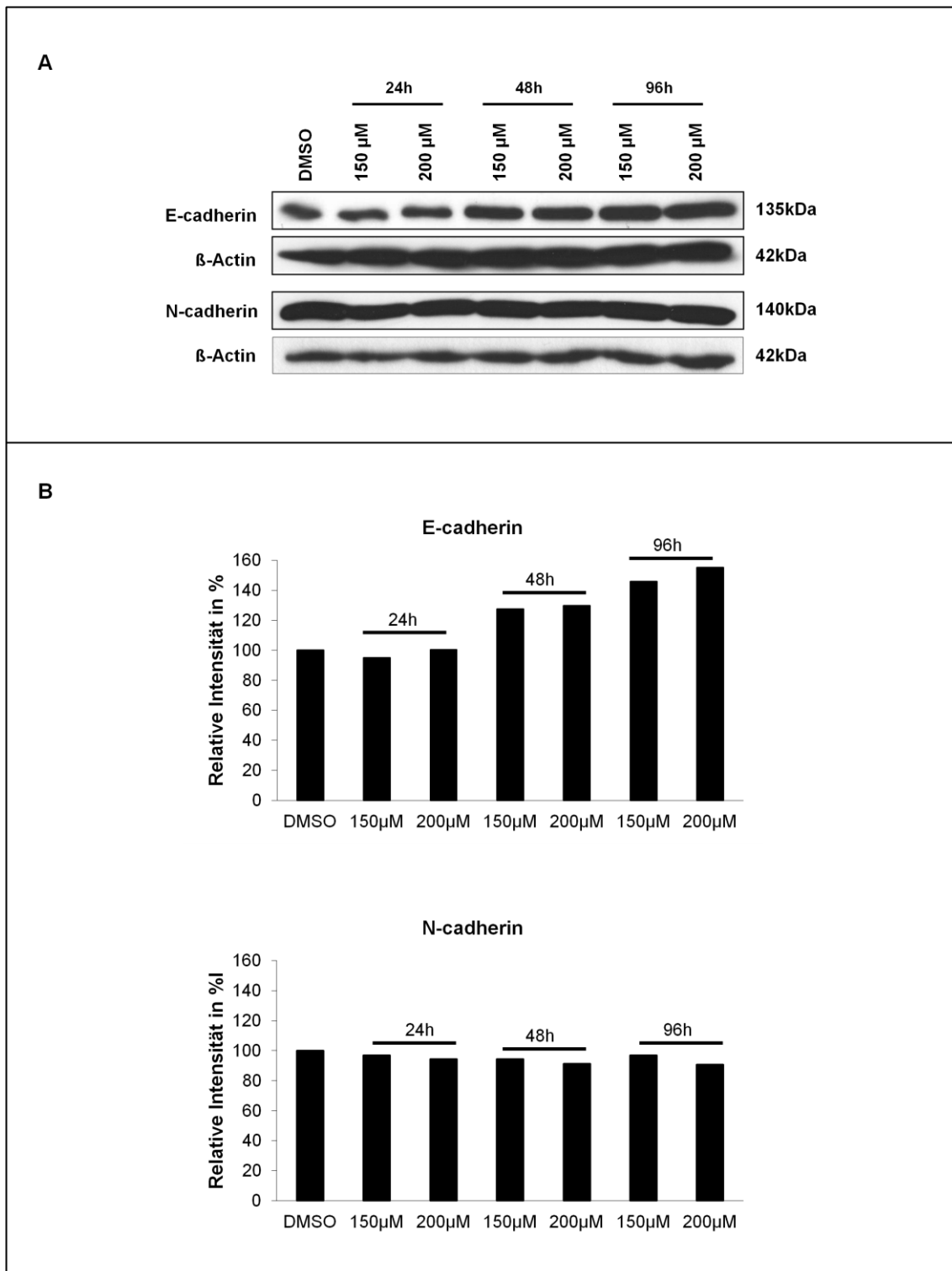


Abbildung 5: Western Blot der TFK-1 Zellen

A) Zeitabhängiger Expressionsanstieg des EMT-Markers E-cadherin in TFK-1 Zellen nach Behandlung mit Capsaicin. Als Ladekontrolle wurde Beta-Actin verwendet.
 B) Darstellung der relativen Intensität der in Abb.5A dargestellten Banden.

3.3 Semiquantitative Analyse der Hedgehog Signalwegbestandteile

In vorherigen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass der Sonic Hedgehog Signalweg einen bedeutenden Einfluss auf die Migration und Invasion der intrahepatischen SZ-1 Zellen als auch der extrahepatischen TFK-1 Zellen nimmt [126]. Mittels semiquantitativer PCR wurde die Beeinflussung von Capsaicin auf die Sonic Hedgehog Signalwegbestandteile Smo, Gli 1 und Gli 2 analysiert.

In den SZ-1 Zellen zeigte sich nach 96 Stunden unter der Behandlung mit 200 μM Capsaicin eine Abnahme der Bandenintensität von Smo. Ebenso war eine Abnahme der Bandenintensität von Gli 1 nach 96 Stunden unter 150 μM und 200 μM zu beobachten. Allerdings konnte hier ein Anstieg der Intensität nach 24 und 48 Stunden unter beiden Dosen verzeichnet werden. Auch die Bandenintensität von Gli 2 nahm über die Zeit kontinuierlich ab und erreichte nach 96 Stunden und unter 200 μM Capsaicin ihr Minimum.

In der TFK-1 Zelllinie zeigte sich eine Abnahme der Bandenintensität von Smo unter 150 μM und 200 μM Capsaicin nach 96 Stunden. Hier war eine leichte Zunahme der Intensität nach 24 und 48 Stunden festzustellen. Die Bandenintensität von Gli 1 nahm bereits nach 24 Stunden und unter beiden Dosen minimal ab. Die Intensität von Gli 2 nahm nach 48 Stunden unter 150 μM und 200 μM ab und erreichte ihr Minimum nach 96 Stunden (Abb. 6 und 7).

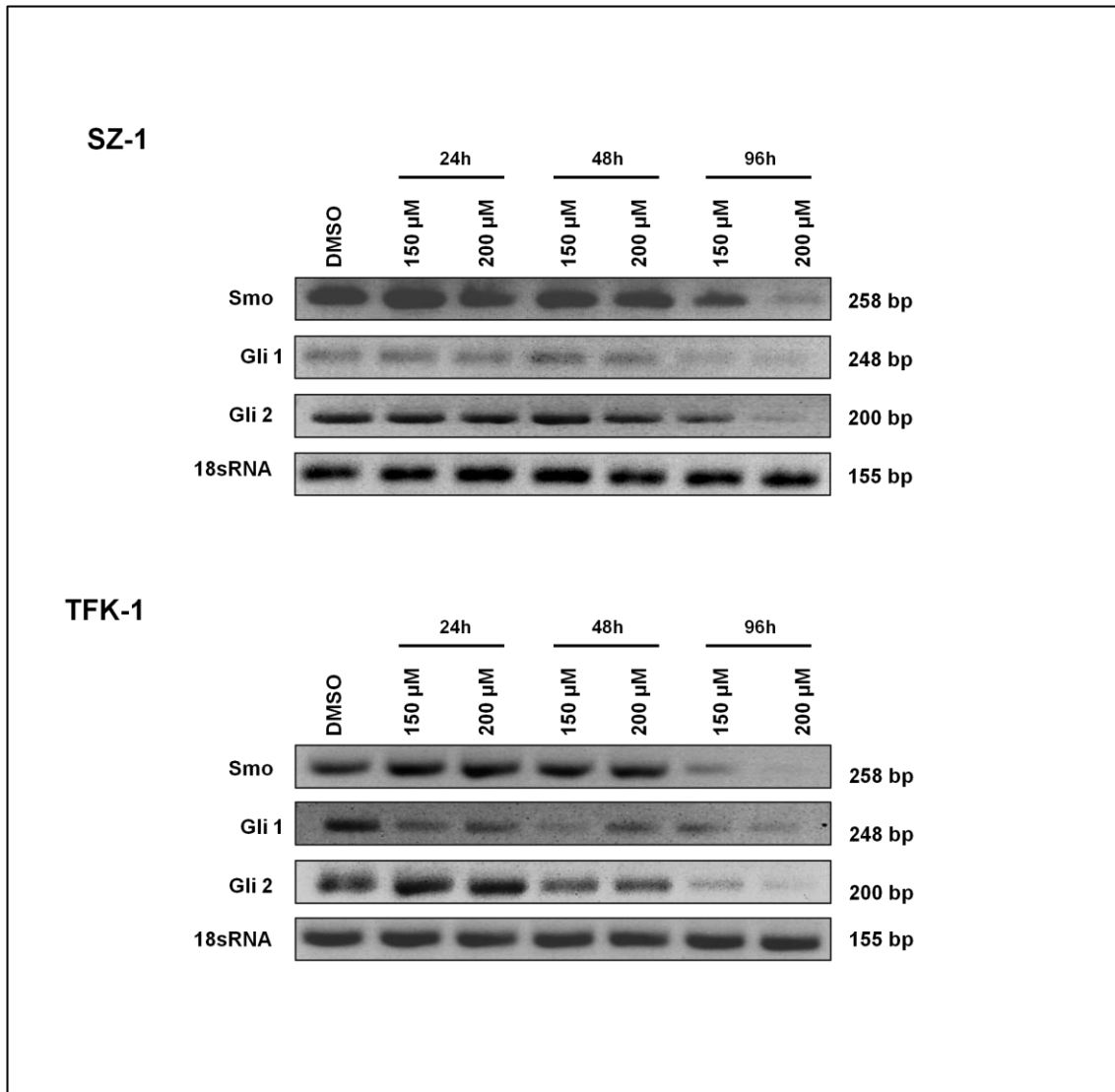


Abbildung 6: semiquantitative PCR

Zeit- und dosisabhängige Herunterregulation der Shh Signalwegbestandteile Smo, Gli 1 und Gli 2 in SZ-1 und TFK-1 Zellen nach Behandlung mit Capsaicin. Als Ladekontrolle wurde 18s RNA verwendet.

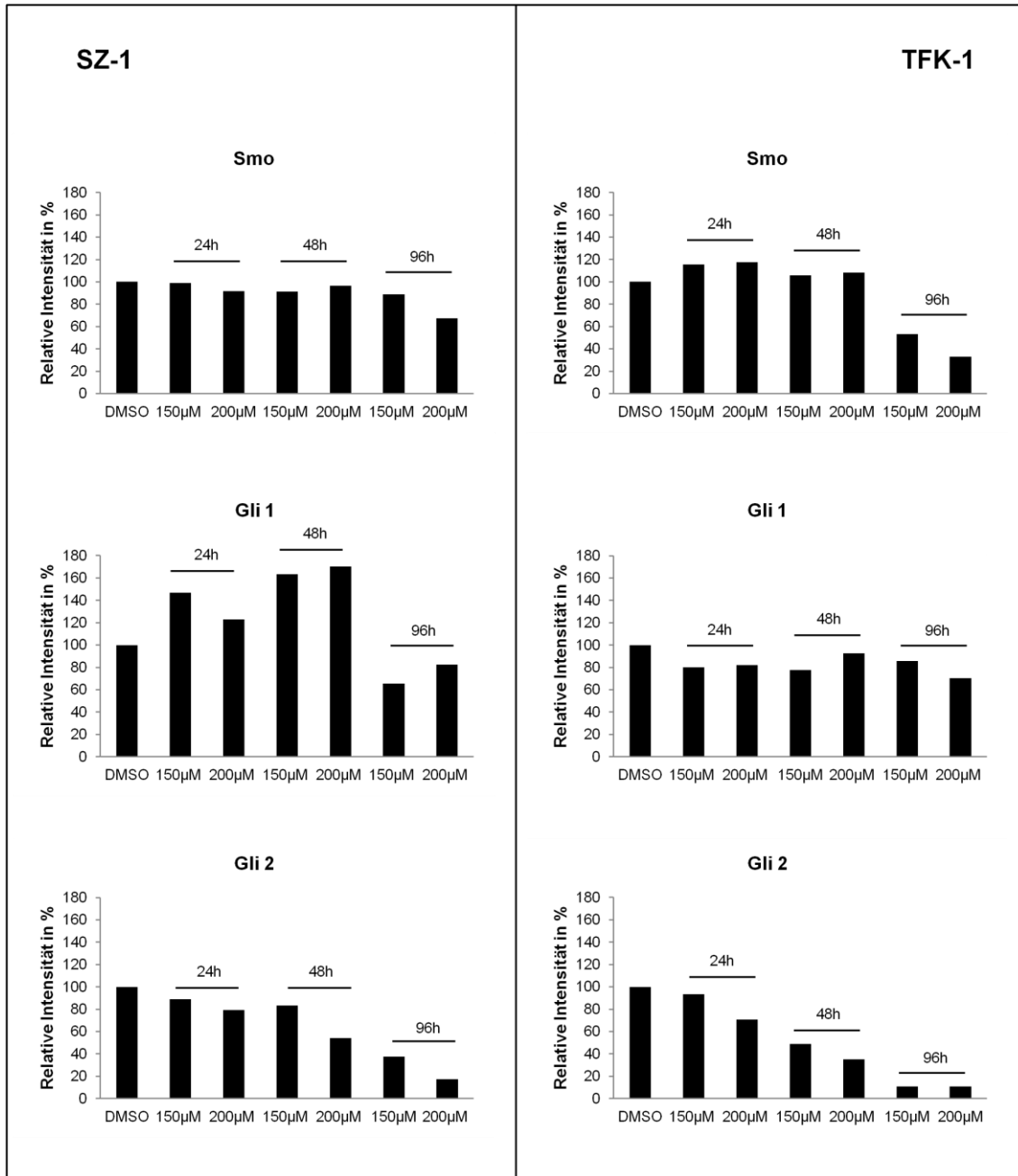


Abbildung 7: semiquantitative PCR: graphische Darstellung der Banden

Zeit- und dosisabhängige Herunterregulation der Shh Signalwegbestandteile Smo, Gli 1 und Gli 2 in SZ-1 und TFK-1 Zellen nach Behandlung mit Capsaicin. Graphische Darstellung der relativen Intensität der in Abb.6 dargestellten Banden.

3.4 Auswertung der Migration und Invasion nach Behandlung mit Capsaicin

Die Wirkung von Capsaicin auf Migration und Invasion von malignen Zellen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht und ein hemmender Effekt beschrieben [130].

3.4.1 Migrations Assay

Zur Untersuchung der Migration beider Zelllinien wurde der Wound-Healing Assay durchgeführt. Als Kontrolle wurden mit DMSO behandelte Zellen verwendet. In den lichtmikroskopischen Bildern 8A und 9A sind die durch den Zellrasen verlaufenden Wunden zum Zeitpunkt 0 und nach 24 Stunden zu erkennen. Der Wundverschluss in den mit DMSO behandelten Zellen lag nach 24 Stunden bei 60 %. Im Vergleich hierzu war in den SZ-1 Zellen nach Behandlung mit Capsaicin ein Wundverschluss von 12 % (150 μ M) und 9 % (200 μ M) zu verzeichnen. In den TFK-1 Zellen waren es 18 % (150 μ M) und 15 % (200 μ M). Die Migration wurde in beiden Zelllinien durch Capsaicin beeinflusst, wobei in den SZ-1 Zellen ein signifikantes Ergebnis zu verzeichnen war (Abb. 8 und Abb. 9).

3.4.2 Invasions Assay

Der Matrigel Invasion Assay wurde zur Untersuchung der Invasion beider Zelllinien durchgeführt. Hier zeigte sich im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen eine verringerte Invasionsfähigkeit der mit Capsaicin (150 μ M und 200 μ M) behandelten SZ-1 und TFK-1 Zellen. In der SZ-1 Zelllinie war die Fähigkeit zur Invasion nach Behandlung mit 150 μ M Capsaicin im Vergleich zur Kontrolle um 72 % reduziert. Bei 200 μ M waren es 88 %. Bei den TFK-1 Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Im Vergleich zur Kontrolle war hier die Invasion um 67 % (150 μ M) und um 86 % (200 μ M) herabgesetzt (Abb. 10B und 10D).

Dieser Rückgang der Invasionsfähigkeit ist in den lichtmikroskopischen Bildern deutlich zu sehen (Abb. 10A und 10C).

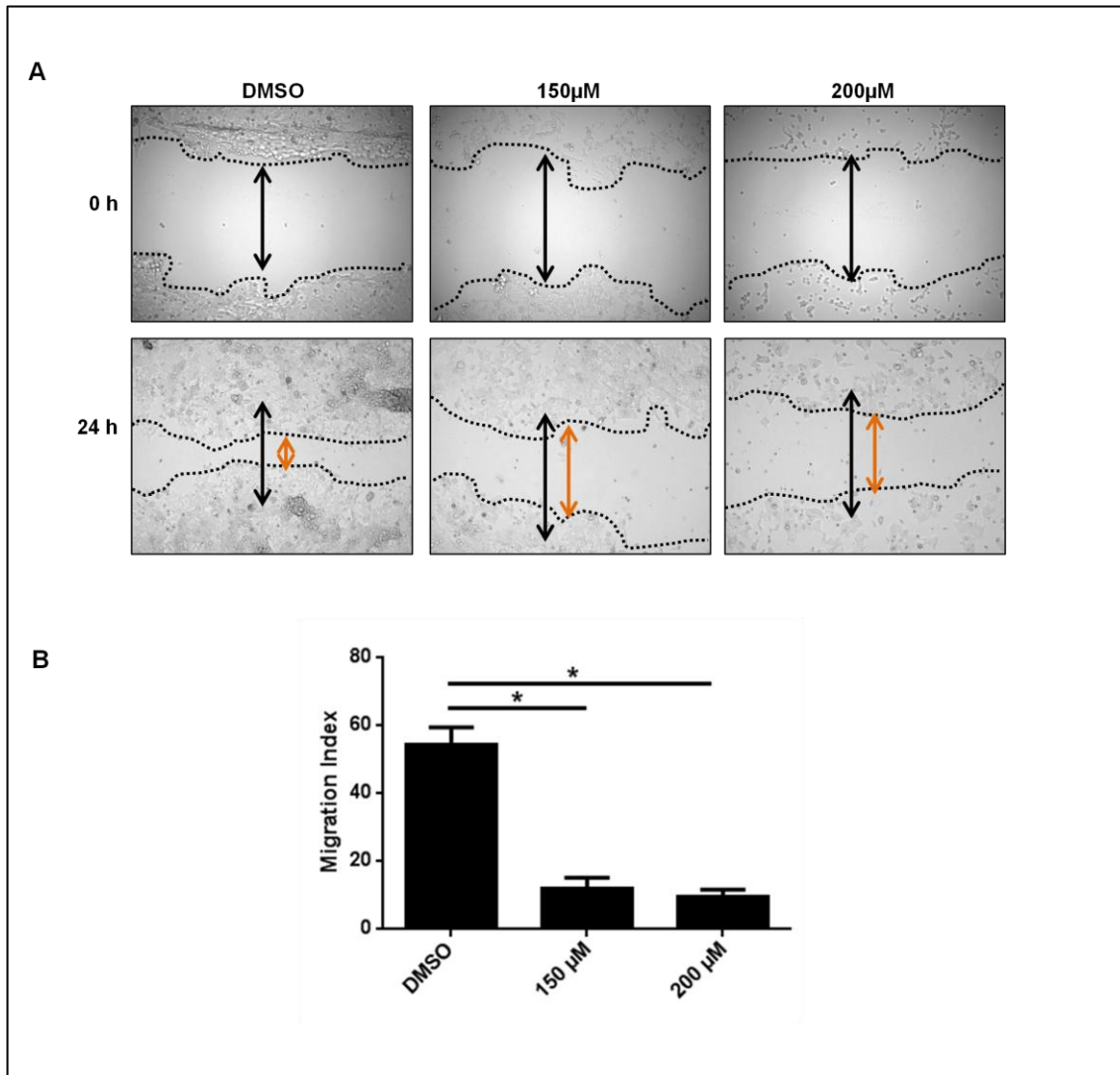


Abbildung 8: Migrations Assay der SZ-1 Zellen

Abnahme der Migrationsfähigkeit von SZ-1 Zellen nach Behandlung mit Capsaicin.

A) Lichtmikroskopische Bilder (10fache Vergrößerung). Die Wundgrößen sind durch Pfeile markiert. Schwarz für 0 h und orange für 24 h. B) Graphische Darstellung des Migrationsindex. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle sind gekennzeichnet, wobei * für $p < 0,05$ steht

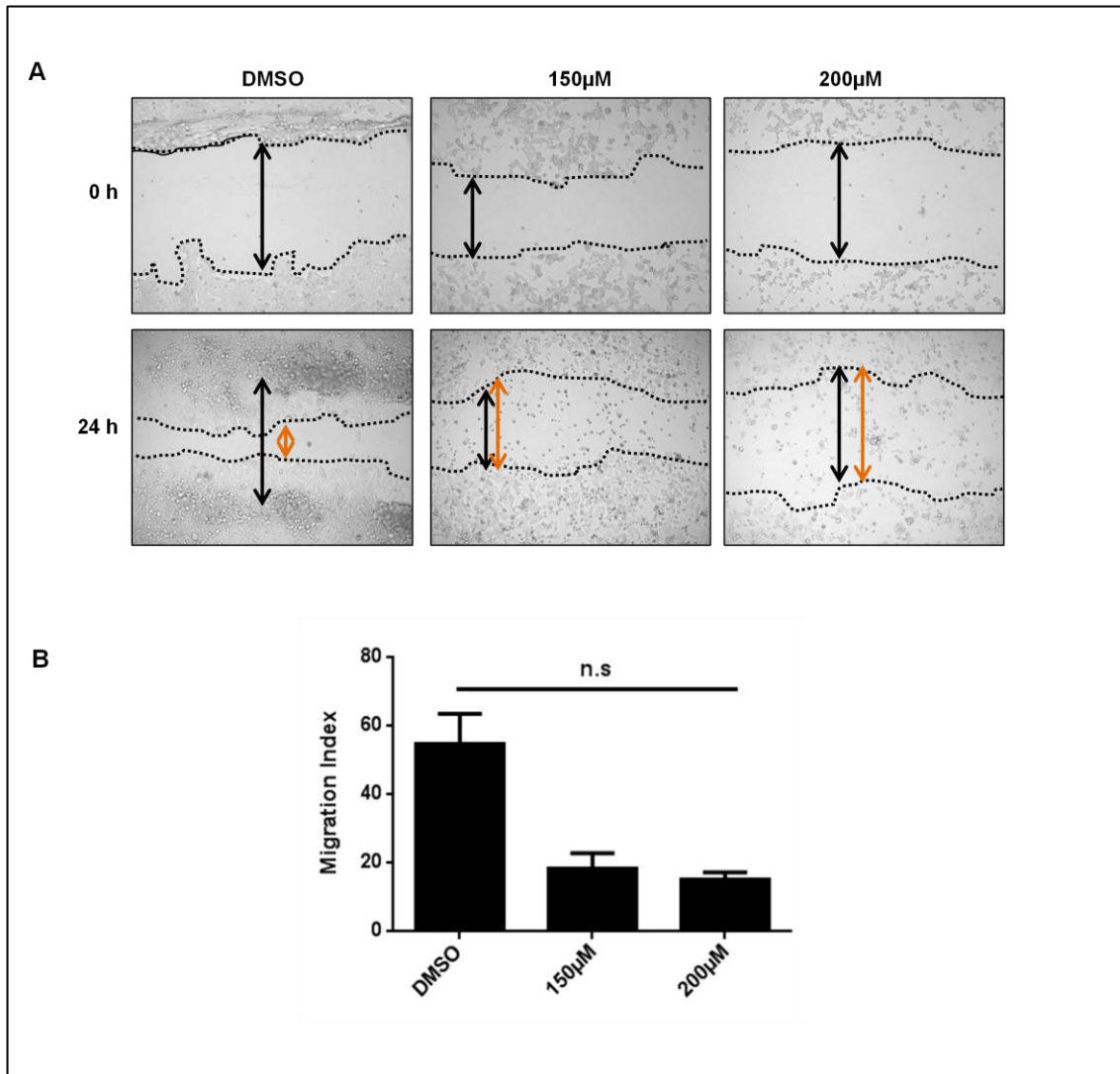


Abbildung 9: Migrations Assay der TFK-1 Zellen

Abnahme der Migrationsfähigkeit von TFK-1 Zellen nach Behandlung mit Capsaicin.

A) Lichtmikroskopische Bilder (10fache Vergrößerung). Die Wundgrößen sind durch Pfeile markiert.

Schwarz für 0 h und orange für 24 h. B) Graphische Darstellung des Migrationsindex. Gezeigt

werden Mittelwerte und Standardabweichungen. N.s steht hier für ein nicht signifikantes Ergebnis.

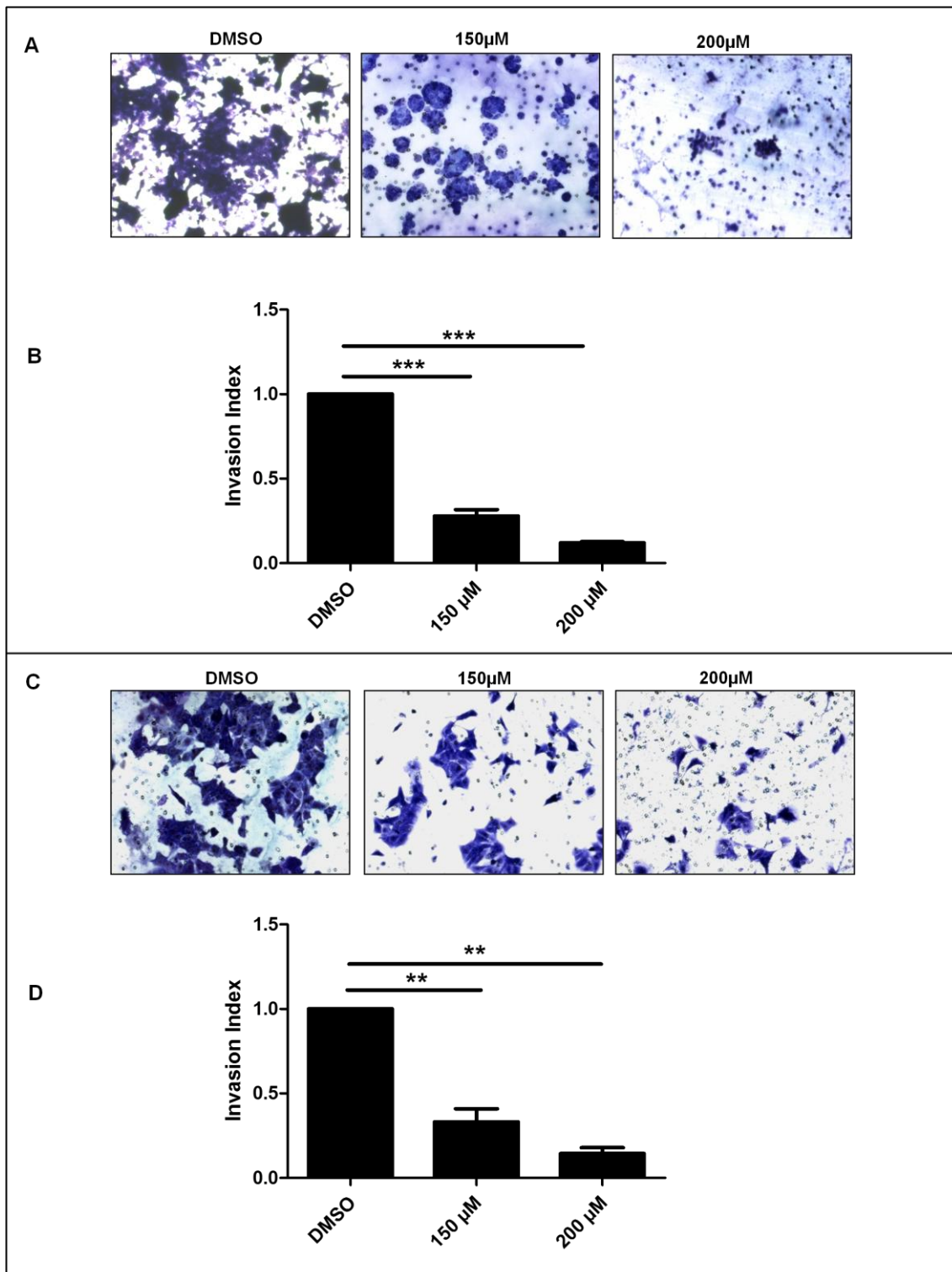


Abbildung 10: Invasions Assay

Dosisabhängige Abnahme der Invasionsfähigkeit von SZ-1 und TFK-1 Zellen nach Behandlung mit Capsaicin. A) Lichtmikroskopische Bilder der SZ-1 Zellen (20fache Vergrößerung). B) Graphische Darstellung des Invasionsindex. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle sind gekennzeichnet, wobei *** für $p < 0,001$ steht. C) Lichtmikroskopische Bilder der TFK-1 Zellen (20fache Vergrößerung). D) Graphische Darstellung des Invasionsindex. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle sind gekennzeichnet, wobei ** für $p < 0,005$ steht.

3.5 Auswertung der Koloniebildung in Softagar

Die Eigenschaft der cholangiozellulären Zelllinien Kolonien in Softagar nach Behandlung mit Capsaicin zu bilden, wurde mit dem Koloniebildungsassay analysiert. Zur Kontrolle wurden Zellen beider Zelllinien mit DMSO behandelt. Nach drei wöchiger Inkubation war ein eindeutiger Rückgang in der Anzahl der Kolonien in den mit Capsaicin behandelten Zellen zu sehen (Abb. 10A und 10C). In den SZ-1 Zellen nahm die Kolonieanzahl von 672 der Kontrolle auf 6 Kolonien (150 μ M) und 11 Kolonien (200 μ M) ab. In der TFK-1 Zelllinie fand eine Reduktion der Kolonieanzahl von 442 (DMSO) auf 140 Kolonien (150 μ M) bzw. 41 Kolonien (200 μ M) statt (Abb. 11B und 11D).

In Abbildung 11A sind unter der Behandlung mit 200 μ M keine Zellen mehr zu sehen. Oben wurde allerdings beschrieben, dass sich die Anzahl der Kolonien auf 11 reduziert habe. Dies ist darauf zurückzuführen, dass alle Experimente 2 bis 3 Mal wiederholt wurden.

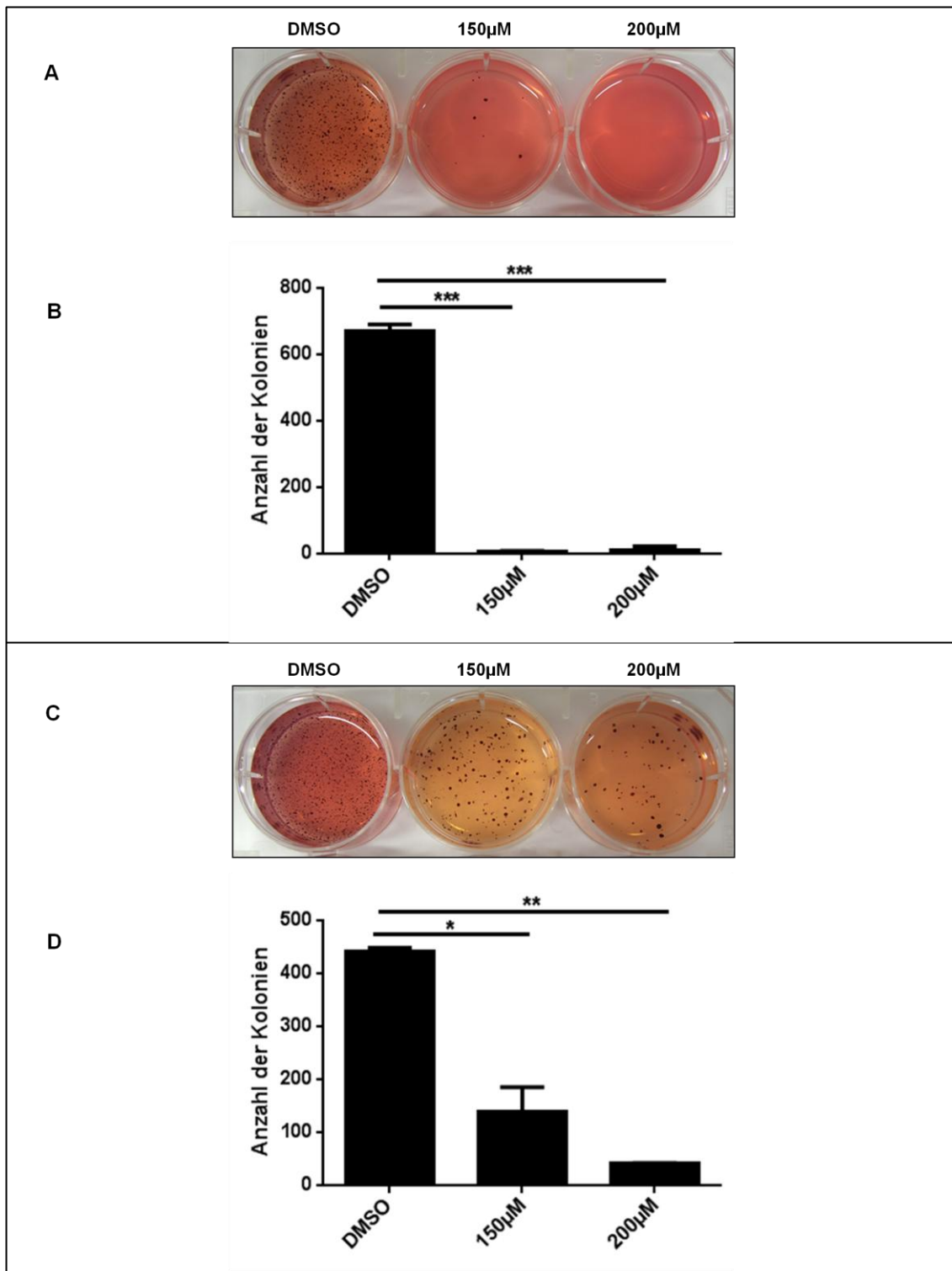


Abbildung 11: Softagar

Dosisabhängige Abnahme der Fähigkeit von SZ-1 und TFK-1 Zellen zur Koloniebildung unter der Behandlung mit Capsaicin. A) digitale Bilder der SZ-1 Zellen. B) Graphische Darstellung der Anzahl der Kolonien. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle sind gekennzeichnet, wobei *** für $p < 0,001$ steht.

C) digitale Bilder der TFK-1 Zellen. D) Graphische Darstellung der Anzahl der Kolonien. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle sind gekennzeichnet, wobei * für $p < 0,05$ und ** für $p < 0,005$ steht.

3.6 Apoptosemessung

Zur Untersuchung ob die antiproliferative Wirkung von Capsaicin durch Induktion der Apoptose zustande kommt, wurde der Annexin V Assay durchgeführt. Die Zellen wurden mit Annexin und PI gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometer gemessen.

In beiden Zelllinien konnte in den mit DMSO behandelten Zellen zu jedem Zeitpunkt (24h, 48h, 96h) nur ein geringer Anteil an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. SZ-1: 24 h 6,4 %, 48 h 5,95 %, 96 h 5,1 %. TFK-1: 24 h 7,2 %, 48 h 7,15 %, 96 h 5,1 %).

In der SZ-1 Zelllinie war nach 24 Stunden ein geringer Anstieg der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl festzustellen. Bei 150 μM waren es 8,2 %, bei 200 μM 11 %. Nach 48 Stunden lagen die Zahlen bei 7,05 % (150 μM) und 13,3 % (200 μM). Nach 96 Stunden konnte bei einer Capsaicindosis von 200 μM im Vergleich zur Kontrolle ein signifikantes Ergebnis verzeichnet werden. Hier betrug der Anteil an apoptotischen Zellen 22,65 % (200 μM) sowie 10,85 % (150 μM) (Abb. 12A). Ähnliche Ergebnisse konnten in der TFK-1 Zelllinie beobachtet werden. Nach 24 Stunden betrug der Anteil an apoptotischen Zellen 8,2 % (150 μM) sowie 11,55 % (200 μM). Der Anteil stieg weiter an und lag nach 48 Stunden bei 8 % (150 μM) und 13,1 % (200 μM). Nach 96 Stunden waren es 11,5 % (150 μM) sowie 22,65 % (200 μM). In dieser Zelllinie war nach 24 Stunden und 96 Stunden ein signifikantes Ergebnis zu verzeichnen (Abb. 12B).

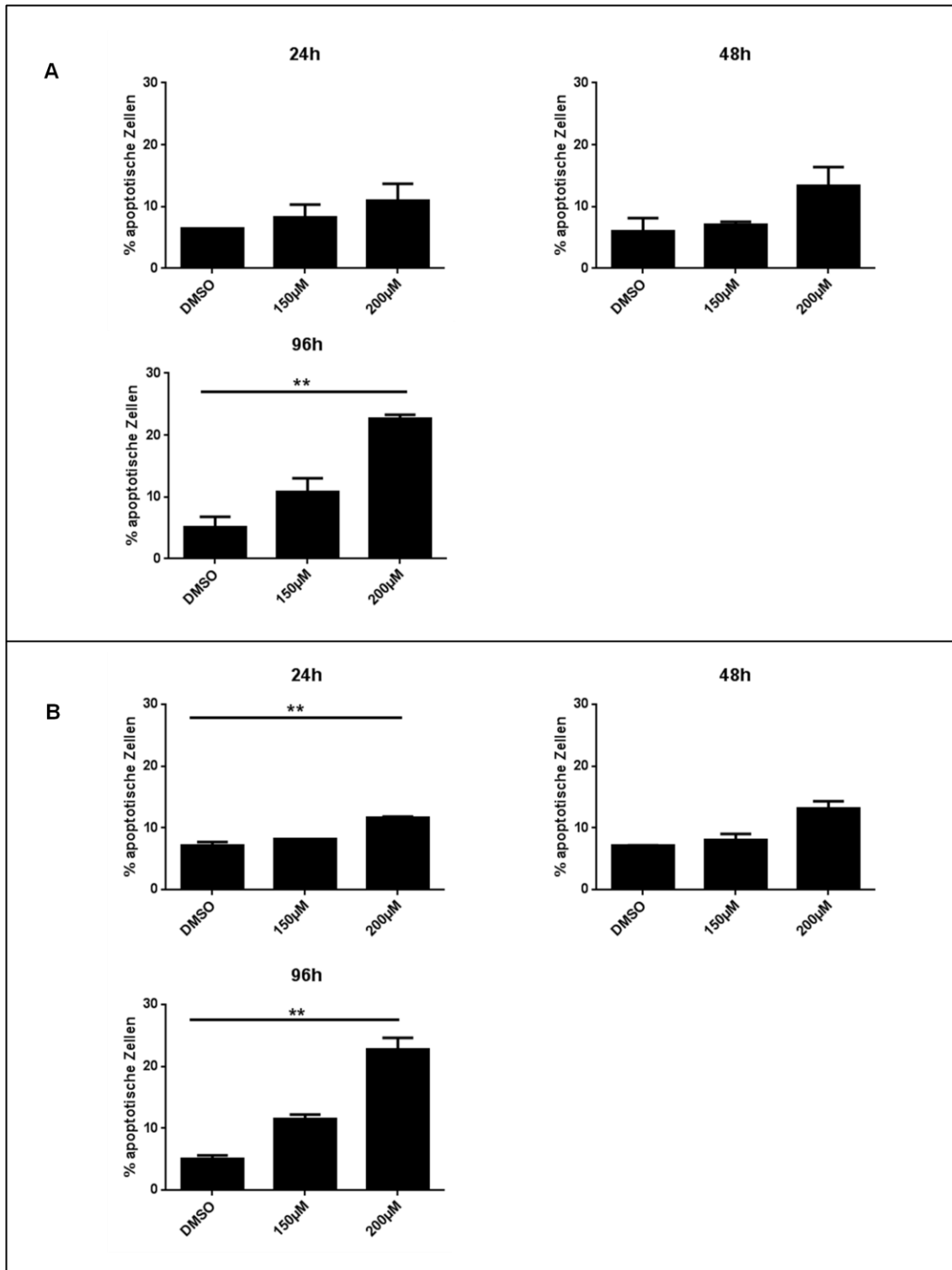


Abbildung 12: Apoptosemessung

Zeit- und dosisabhängige Zunahme apoptotischer Zellen in SZ-1 und TFK-1 Zelllinien nach Behandlung mit Capsaicin. A) Graphische Darstellung der apoptotischen SZ-1 Zellen in Prozent. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle sind gekennzeichnet, wobei ** für $p < 0,005$ steht.

B) Graphische Darstellung der apoptotischen TFK-1 Zellen in Prozent. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle sind gekennzeichnet, wobei ** für $p < 0,005$ steht.

4. Diskussion

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC), die zweithäufigste Neoplasie der Leber, nimmt mit seiner Inzidenz in der westlichen Welt signifikant zu [1-4]. Eine große Schwierigkeit in der Diagnostik bereitet das späte Auftreten von klinischen Symptomen und die daraus resultierende späte Erstdiagnose [5]. Einer kurativen chirurgischen Resektion können nur ca. 30 % der erkrankten Patienten zugeführt werden, wobei bei ca. 50 % ein Tumorrezidiv sowie Fernmetastasen im Verlauf auftreten [27, 28, 31]. Zur palliativen Erstlinientherapie stehen derzeit eine Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin zur Verfügung [48]. Eine zielgerichtete Antikörpertherapie spielt aufgrund fehlender Verlängerung des Gesamtüberlebens gegenüber einer systemischen Chemotherapie aktuell noch keine Rolle bei der palliativen Systemtherapie des CCC [49-53].

Capsaicin, welches den Paprikaschoten ihre Schärfe verleiht, spielt nicht nur zum Würzen von Speisen eine Rolle, sondern nimmt auch einen großen Stellenwert in der topischen Schmerzbehandlung von Neuropathien sowie der rheumatoiden Arthritis ein [54-57, 62]. In vielen durchgeführten Untersuchungen wurde bereits ein anti-inflammatorischer sowie chemo-präventiver Effekt von Capsaicin beschrieben [85-88, 90, 93, 131-134]. Auch wurden verschiedene Mechanismen bezüglich einer antiproliferativen Wirkung von Capsaicin bei malignen Erkrankungen des Gastrointestinal-Traktes postuliert [56]. Ein Einfluss von Capsaicin auf die Karzinogenität beim humanen CCC wurde in der Literatur bis dato noch nicht beschrieben. Aufgrund dieser Datenlage wurde in vorliegender Arbeit die antiproliferative bzw. antikarzinogene Wirkung von Capsaicin auf das humane CCC untersucht.

Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch Capsaicin das Wachstum von sowohl humanen intrahepatischen als auch extrahepatischen CCC Zellen inhibiert wird. Außerdem führte die Behandlung zu einer Induktion der Apoptose sowie zu einer Abschwächung des Tumorsignalwegs Hedgehog.

Die Beeinflussung des programmierten Zelltods scheint eine wesentliche Rolle in der antikarzinogenen Wirkung von Capsaicin auf Tumorzellen zu spielen. In der peripheren Literatur wurde gezeigt, dass durch Capsaicin die Apoptose in Hep-1, HepG2 sowie Pankreaskarzinomzellen durch einen Caspase-3 abhängigen Mechanismus induziert wird [85, 86, 133]. Des Weiteren gibt es Daten für den Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose in menschlichen KB Karzinomzellen (KB Karzinomzellen leiten sich von der menschlichen HeLa Zelllinie ab [135]) sowie Blasenkarzinomzellen [81, 100]. In Übereinstimmung mit dieser Datenlage konnte in vorliegender Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Capsaicin auch in humanen CCC Zelllinien den Zelltod induziert. Im Annexin V Assay (wie unter 3.6 beschrieben) zeigte sich ein Anstieg der apoptotischen Zellen vor allem nach 96 Stunden. Die Apoptoseraten waren allerdings insgesamt nicht sehr hoch, was auf weitere Mechanismen, welche zum Zelltod führen, hinweisen könnte.

Die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) spielt während der Embryogenese sowie der Entwicklung von Organen eine wichtige Rolle. Außerdem wird sie mit der Wundheilung, sowie der Gewebsregeneration nach Traumata oder Entzündungen in Verbindung gebracht. Die EMT ist ein Prozess, bei welchem polarisierte epitheliale Zellen mehrere biochemische Veränderungen durchlaufen. Normalerweise sind epitheliale Zellen mit der Basalmembran fest verankert, doch im Rahmen der EMT nehmen sie einen mesenchymalen Zellcharakter an und sind so zur Migration, Invasion sowie zur erhöhten Resistenz gegenüber Apoptose befähigt [136]. Hierbei spielt der Verlust an epithelialen Markern wie E-cadherin, welches die Zellen in ihrem Zellverband zusammenhält, sowie die Zunahme von mesenchymalen Markern, wie N-cadherin, eine entscheidende Rolle [137]. E-cadherin wird von hepatischen Vorläuferzellen sowie Epithelzellen der Gallengänge exprimiert [138] und zeigt in schlecht differenzierten CCC eine verminderte Expression [139]. Es wurde bereits gezeigt, dass durch die EMT das aggressive Wachstum sowie die Metastasierung des humanen CCC beeinflusst wird [128, 129]. Im Gegensatz zu Yang et al. [140] konnte in vorliegender Arbeit

gezeigt werden, dass die EMT teilweise von Capsaicin beeinflusst wird. So war nach einer Inkubation der Zellen nach 48 Stunden ein Expressionsanstieg von E-cadherin festzustellen. Interessanterweise konnte keine Veränderung der Expression des mesenchymalen Markers N-cadherin nachgewiesen werden, was für eine selektive Beeinflussung der EMT durch Capsaicin sprechen könnte. Wie unter 3.4 erwähnt, wurde bereits von Hwang et al. eine hemmende Wirkung auf die Migration sowie Invasion von malignen Zellen durch Capsaicin beschrieben [130]. Mittels Migrations- und Invasionsassay wurde analysiert, ob diese Beobachtung auch für das humane CCC zutrifft. Auch in vorliegender Arbeit konnte ein Rückgang in der Migration- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen nachgewiesen werden. Eine essentielle Rolle spielt hierbei sicherlich der durch Capsaicin induzierte Expressionsanstieg des Markers E-cadherin.

Maligne Zellen besitzen die Eigenschaft, unabhängig von ihrer Umgebung zu wachsen und sich zu teilen. Diese Fähigkeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Krebsentstehung. Gesunde Zellen hingegen sind auf den Kontakt mit der extrazellulären Matrix angewiesen. Mit dem Softagar Assay kann dieses Merkmal *in vitro* untersucht werden und erbringt den Beleg über das Vorliegen maligner transformierter Zellen [141]. In dieser Arbeit sollte der Nachweis erbracht werden, inwieweit durch Capsaicin eine Hemmung dieses unabhängigen Wachstums der Karzinomzellen herbeigeführt werden könnte. In beiden Zelllinien zeigte sich unter Capsaicin Therapie ein signifikanter Rückgang in der Fähigkeit Kolonien auszubilden.

Der Hedgehog Signalweg ist ein bedeutender Regulator der Zelldifferenzierung, der Polarität von Geweben sowie der Zellproliferation während der embryonalen Entwicklung. Hedgehog spielt auch eine essentielle Rolle in der Selbstregulation von adultem Gewebe. In vielen Krebsentitäten wie dem Basalzellkarzinom [142], Medulloblastom [143], Bronchialkarzinom [144], Pankreaskarzinom, Ösophaguskarzinom, Magenkarzinom sowie dem Gallengangskarzinom [145] ist dieser Signalweg dereguliert. In der Literatur

wurde bereits durch eine gezielte Inhibition des Hedgehog Signalwegs eine Reduktion des Wachstums maligner Zellen der Gallenwege, des Ösophagus, Magens, Pankreas, Leber sowie Niere nachgewiesen [126, 145-149]. Eine Inhibition dieses Signalwegs beruht vor allem auf einer Neutralisierung der Aktivität der Hedgehog Liganden, einer Inhibition des Rezeptors Smoothed sowie einer Inhibition der Aktivität der Gli Transkriptionsfaktoren [117, 126, 144-150]. Ein Einfluss von Capsaicin auf diesen Tumorsignalweg konnte bereits belegt werden. Bai et al. wiesen in einem Mausmodell mit pankreatischer intraepithelialer Neoplasie nach, dass es durch Behandlung mit Capsaicin zu einer Reduzierung von Sonic Hedgehog und Gli 1 auf mRNA-Level kommt [104]. In Übereinstimmung mit dieser Datenlage, konnte in vorliegender Arbeit ebenfalls eine Interaktion von Capsaicin mit dem Hedgehog Signalweg auf RNA Ebene nachgewiesen werden. In beiden untersuchten Zelllinien korrelierte die Capsaicinbehandlung mit einer Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren Gli 1 und Gli 2. Die Expression von SMO wurde ebenso zeitabhängig beeinflusst. Durch diese Untersuchung war allerdings keine Aussage darüber zu treffen, ob die Wirkung von Capsaicin auf den Signalweg über einen autokrinen oder parakrinen Mechanismus erfolgt. Weitere indirekte antitumoröse Effekte von Capsaicin konnten ebenfalls nicht komplett ausgeschlossen werden. Durch die Arbeiten von Omenetti et al. wurde der Nachweis erbracht, dass ein aktivierter Hh Signalweg die EMT in humanen Cholangiozyten reguliert [138]. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Capsaicin die EMT durch einen Expressionsanstieg des Markers E-cadherin partiell beeinflusst wird, was sich in beiden Zelllinien auch auf die Invasion und Migration auswirkte.

In der peripheren Literatur wird immer wieder eine Kombination pflanzlicher Inhaltsstoffe mit den aktuell eingesetzten Chemotherapeutika diskutiert, zumal verschiedene Zellsignalwege durch diese Stoffe beeinflusst werden [151]. So wurde bereits nachgewiesen, dass durch die Kombination von Cisplatin, Docetaxel, Doxorubicin und Gemcitabin mit dem Phytoöstrogen Genistein eine stärkere Hemmung der Proliferation sowie ein größerer Anstieg der

Apoptoseraten in Prostata,- Pankreas,- Brust,- und Lungenkarzinomen erreicht wurde [152-154]. Es wäre somit überlegenswert, ob durch eine Kombination von Cisplatin und Gemcitabin mit Capsaicin eine Dosisreduktion der Chemotherapeutika erzielt werden könnte, um z. B. auch Nebenwirkungen zu verringern. Da bis dato noch kein Nachweis erbracht wurde, dass Capsaicin direkt auf DNA Ebene interagiert [155] und somit zu keiner Resistenzentwicklung führt, könnte es bei bereits chemoresistenten CCC Zellen zum Einsatz kommen. Hwang et al. konnten nachweisen, dass es durch eine Kombination von 5-Fluorouracil mit Genistein zu einer Induktion der Apoptose in bereits chemoresistenten Kolonkarzinomzellen kommt [156]. Um zu analysieren ob dies auch auf Capsaicin übertragen werden kann, sind aber weitere *in vitro* Untersuchungen nötig.

Alle Experimente in der vorliegenden Arbeit fanden *in vitro* statt. Daher wäre es von großer Bedeutung die Experimente auch auf ein Mausmodell zu übertragen, zumal in der peripheren Literatur keine *in vitro* sowie *in vivo* Daten bezüglich der Behandlung eines CCC mit Capsaicin zu finden sind. Bereits durchgeführte *in vivo* Experimente anderer Arbeitsgruppen konnten deren *in vitro* Behandlungsergebnisse mit Capsaicin bestätigen [89, 133]. Erwähnenswert ist sicherlich auch, dass es zu keiner Beeinträchtigung der Tier durch die Behandlung mit Capsaicin kam [92, 93, 104, 133, 157, 158].

Es stellt eine große Herausforderung dar, neue Therapieansätze für die Behandlung des CCC zu erforschen. Hierbei spielt sicherlich die gezielte Inhibition des Hh Signalwegs eine wichtige Rolle. Zusammenfassend zeigen vorliegende *in vitro* Ergebnisse einen starken Einfluss von Capsaicin auf die Zellproliferation und die Karzinogenität des CCC durch eine Inhibition der Aktivität des Tumorsignalwegs Hedgehog. Es kann daher sicherlich die Einnahme von Capsaicin als Nahrungsergänzungsmittel zum zusätzlichen therapeutischen Nutzen bei Patienten mit CCC diskutiert werden.

5. Zusammenfassung

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) ist nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) die zweithäufigste maligne Neoplasie der Leber. Die chirurgische Resektion stellt bis dato das einzige kurative Therapieverfahren dar. Da die Patienten zu Beginn meist nur unspezifische Symptome haben, fällt eine Diagnosestellung schwer und so befindet sich die Mehrzahl der Erkrankten bei Erstdiagnose in einem inoperablen Zustand. Die derzeit zur palliativen Therapie verwendeten Erstlinien-Chemotherapeutika Gemcitabin und Cisplatin führen leider zu einer nur geringen Verlängerung des Gesamtüberlebens. Auch konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Durchbruch mit einer neuen molekularen Therapie erreicht werden. Das pflanzliche Alkaloid Capsaicin wird als Inhaltsstoff der Chilischoten in erster Linie zum Würzen von Speisen verwendet, findet aber auch großen Einsatz in der Schmerzbehandlung. Darüber hinaus besitzt es auch antiproliferative Wirkungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beeinflussung der Karzinogenese durch Capsaicin von sowohl intrahepatischen (IH-) (SZ-1) als auch extrahepatischen (EH-) (TFK-1) Gallengangskarzinomzellen (CCC) untersucht. Es zeigte sich in beiden Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle ein zeit- und dosisabhängiger Rückgang der Proliferationsfähigkeit. Um zu klären welche Ursachen zur Verringerung der Zellproliferation führten, wurden die Apoptoseraten bestimmt. Hier kam es in beiden Zelllinien nach 96 Stunden im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen. Da jedoch die Anzahl dieser Zellen insgesamt recht niedrig war, muss von weiteren Mechanismen, welche zum Zelltod und einer verminderten Proliferation führen, ausgegangen werden. Bei der Analyse der Migrations- sowie Invasionsfähigkeit konnte ebenfalls ein signifikanter Rückgang (ausgenommen beim Migrations Assay der TFK-1 Zellen) verzeichnet werden. Bei Untersuchungen von Markern (E-cadherin, N-cadherin) der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zeigte sich in beiden Zelllinien ein Expressionsanstieg des Proteins E-cadherin. Dieser Anstieg spiegelt eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung von Migration

und Invasion durch Capsaicin wieder. Der Hedgehog Signalweg ist bei verschiedenen Tumoren aktiviert und spielt auch eine bedeutsame Rolle für die embryonale Entwicklung. In vorliegender Arbeit konnte demonstriert werden, dass Capsaicin den Hedgehog Signalweg beim CCC beeinflusst. In beiden Zelllinien konnte eine zeit- und dosisabhängige Herunterregulation der Transkriptionsfaktoren Gli 1, Gli 2 und Smo auf RNA Ebene nachgewiesen werden. Um einen detaillierten Zusammenhang zwischen dem Hedgehog Signalweg und Capsaicin festzustellen, bedarf es aber noch weiterführende Experimente.

Eine Applikation von Capsaicin eignet sich somit möglicherweise auch bei Patienten mit CCC zur anti-tumorösen Therapie. Weitere Datenauswertungen und vor allem aber auch *in vivo* Versuche sind hierfür noch erforderlich um einen validen Therapieeinsatz von Capsaicin zu gewähren.

6. Literaturverzeichnis

1. de Groen, P.C., Gores, G.J., LaRusso, N.F., Gunderson, L.L., and Nagorney, D.M., Biliary Tract Cancers. *New England Journal of Medicine*, 1999. 341(18): p. 1368-1378.
2. Welzel, T.M., McGlynn, K.A., Hsing, A.W., O'Brien, T.R., and Pfeiffer, R.M., 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(12): p. 873-5.
3. Shaib, Y. and El-Serag, H.B., The Epidemiology of Cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*, 2004. 24(02): p. 115-125.
4. Rizvi, S. and Gores, G.J., Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Cholangiocarcinoma. *Gastroenterology*, 2013. 145(6): p. 1215-1229.
5. Blechacz, B. and Gores, G.J., Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology*, 2008. 48(1): p. 308-21.
6. Lim, J.H. and Park, C.K., Pathology of cholangiocarcinoma. *Abdom Imaging*, 2004. 29(5): p. 540-7.
7. Patel, T., Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology*, 2001. 33(6): p. 1353-1357.
8. Shaib, Y. and El-Serag, H.B., The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*, 2004. 24(2): p. 115-25.
9. Parkin, D.M., Ohshima, H., Srivatanakul, P., and Vatanasapt, V., Cholangiocarcinoma: epidemiology, mechanisms of carcinogenesis and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1993. 2(6): p. 537-44.
10. Strom, B.L., Hibberd, P.L., Soper, K.A., Stolley, P.D., and Nelson, W.L., International variations in epidemiology of cancers of the extrahepatic biliary tract. *Cancer Res*, 1985. 45(10): p. 5165-8.
11. Carriaga, M.T. and Henson, D.E., Liver, gallbladder, extrahepatic bile ducts, and pancreas. *Cancer*, 1995. 75(1 Suppl): p. 171-90.

12. Khan, S.A., Taylor-Robinson, S.D., Toledano, M.B., Beck, A., Elliott, P., and Thomas, H.C., Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol*, 2002. 37(6): p. 806-13.
13. Cardinale, V., Semeraro, R., Torrice, A., Gatto, M., Napoli, C., Bragazzi, M.C., Gentile, R., and Alvaro, D., Intra-hepatic and extra-hepatic cholangiocarcinoma: New insight into epidemiology and risk factors. *World J Gastrointest Oncol*, 2010. 2(11): p. 407-16.
14. Tyson, G.L. and El-Serag, H.B., Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology*, 2011. 54(1): p. 173-84.
15. LaRusso, N.F., Shneider, B.L., Black, D., Gores, G.J., James, S.P., Doo, E., and Hoofnagle, J.H., Primary sclerosing cholangitis: summary of a workshop. *Hepatology*, 2006. 44(3): p. 746-64.
16. Suarez-Munoz, M.A., Fernandez-Aguilar, J.L., Sanchez-Perez, B., Perez-Daga, J.A., Garcia-Albiach, B., Pulido-Roa, Y., Marin-Camero, N., and Santoyo-Santoyo, J., Risk factors and classifications of hilar cholangiocarcinoma. *World J Gastrointest Oncol*, 2013. 5(7): p. 132-8.
17. Watanapa, P. and Watanapa, W.B., Liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Br J Surg*, 2002. 89(8): p. 962-70.
18. Abdel-Rahim, A.Y., Parasitic infections and hepatic neoplasia. *Dig Dis*, 2001. 19(4): p. 288-91.
19. DeOliveira, M.L., Cunningham, S.C., Cameron, J.L., Kamangar, F., Winter, J.M., Lillemoe, K.D., Choti, M.A., Yeo, C.J., and Schulick, R.D., Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution. *Ann Surg*, 2007. 245(5): p. 755-62.
20. Nakeeb, A., Pitt, H.A., Sohn, T.A., Coleman, J., Abrams, R.A., Piantadosi, S., Hruban, R.H., Lillemoe, K.D., Yeo, C.J., and Cameron, J.L., Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. *Ann Surg*, 1996. 224(4): p. 463-73; discussion 473-5.
21. Siqueira, E., Schoen, R.E., Silverman, W., Martin, J., Rabinovitz, M., Weissfeld, J.L., Abu-Elmaagd, K., Madariaga, J.R., and Slivka, A., Detecting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *Gastrointest Endosc*, 2002. 56(1): p. 40-7.

22. Ramage, J.K., Donaghy, A., Farrant, J.M., Iorns, R., and Williams, R., Serum tumor markers for the diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, 1995. 108(3): p. 865-9.
23. Chalasani, N., Baluyut, A., Ismail, A., Zaman, A., Sood, G., Ghalib, R., McCashland, T.M., Reddy, K.R., Zervos, X., Anbari, M.A., and Hoen, H., Cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: a multicenter case-control study. *Hepatology*, 2000. 31(1): p. 7-11.
24. Slattery, J.M. and Sahani, D.V., What is the current state-of-the-art imaging for detection and staging of cholangiocarcinoma? *Oncologist*, 2006. 11(8): p. 913-22.
25. Manfredi, R., Barbaro, B., Masselli, G., Vecchioli, A., and Marano, P., Magnetic resonance imaging of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*, 2004. 24(2): p. 155-64.
26. Romagnuolo, J., Bardou, M., Rahme, E., Joseph, L., Reinhold, C., and Barkun, A.N., Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Ann Intern Med*, 2003. 139(7): p. 547-57.
27. Jarnagin, W.R., Fong, Y., DeMatteo, R.P., Gonen, M., Burke, E.C., Bodniewicz, B.J., Youssef, B.M., Klimstra, D., and Blumgart, L.H., Staging, resectability, and outcome in 225 patients with hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg*, 2001. 234(4): p. 507-17; discussion 517-9.
28. Witzigmann, H., Berr, F., Ringel, U., Caca, K., Uhlmann, D., Schoppmeyer, K., Tannapfel, A., Wittekind, C., Mossner, J., Hauss, J., and Wiedmann, M., Surgical and palliative management and outcome in 184 patients with hilar cholangiocarcinoma: palliative photodynamic therapy plus stenting is comparable to r1/r2 resection. *Ann Surg*, 2006. 244(2): p. 230-9.
29. Goere, D., Wagholikar, G.D., Pessaux, P., Carrere, N., Sibert, A., Vilgrain, V., Sauvanet, A., and Belghiti, J., Utility of staging laparoscopy in subsets of biliary cancers : laparoscopy is a powerful diagnostic tool in

- patients with intrahepatic and gallbladder carcinoma. *Surg Endosc*, 2006. 20(5): p. 721-5.
30. Olnes, M.J. and Erlich, R., A review and update on cholangiocarcinoma. *Oncology*, 2004. 66(3): p. 167-79.
 31. Endo, I., Gonen, M., Yopp, A.C., Dalal, K.M., Zhou, Q., Klimstra, D., D'Angelica, M., DeMatteo, R.P., Fong, Y., Schwartz, L., Kemeny, N., O'Reilly, E., Abou-Alfa, G.K., Shimada, H., Blumgart, L.H., and Jarnagin, W.R. Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann Surg* 2008 Jul [cited 248 1]; 2008/06/27:[84-96].
 32. Ercolani, G., Vetrone, G., Grazi, G.L., Aramaki, O., Cescon, M., Ravaioli, M., Serra, C., Brandi, G., and Pinna, A.D., Intrahepatic cholangiocarcinoma: primary liver resection and aggressive multimodal treatment of recurrence significantly prolong survival. *Ann Surg*, 2010. 252(1): p. 107-14.
 33. Bismuth, H., Nakache, R., and Diamond, T., Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg*, 1992. 215(1): p. 31-8.
 34. Casavilla, F.A., Marsh, J.W., Iwatsuki, S., Todo, S., Lee, R.G., Madariaga, J.R., Pinna, A., Dvorchik, I., Fung, J.J., and Starzl, T.E., Hepatic resection and transplantation for peripheral cholangiocarcinoma. *J Am Coll Surg*, 1997. 185(5): p. 429-36.
 35. Meyer, C.G., Penn, I., and James, L., Liver transplantation for cholangiocarcinoma: results in 207 patients. *Transplantation*, 2000. 69(8): p. 1633-7.
 36. Iwatsuki, S., Todo, S., Marsh, J.W., Madariaga, J.R., Lee, R.G., Dvorchik, I., Fung, J.J., and Starzl, T.E., Treatment of hilar cholangiocarcinoma (Klatskin tumors) with hepatic resection or transplantation. *J Am Coll Surg*, 1998. 187(4): p. 358-64.
 37. Robles, R., Parrilla, P., Ramirez, P., Sanchez-Bueno, F., Marin, C., Pastor, P., Pons, J.A., Acosta, F., Perez-Flores, D., and De La Pena Morales, J., [Liver transplantation increases R0 resection and survival of

- patients with a non-disseminated unresectable Klatskin tumour]. *Cir Esp*, 2010. 87(2): p. 82-8.
38. Robles, R., Sanchez-Bueno, F., Ramirez, P., Brusadin, R., and Parrilla, P., Liver transplantation for hilar cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 2013. 19(48): p. 9209-15.
 39. Rea, D.J., Heimbach, J.K., Rosen, C.B., Haddock, M.G., Alberts, S.R., Kremers, W.K., Gores, G.J., and Nagorney, D.M., Liver transplantation with neoadjuvant chemoradiation is more effective than resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg*, 2005. 242(3): p. 451-8; discussion 458-61.
 40. Kaiser, G.M., Sotiropoulos, G.C., Jauch, K.W., Lohe, F., Hirner, A., Kalff, J.C., Konigsrainer, A., Steurer, W., Senninger, N., Brockmann, J.G., Schlitt, H.J., Zulke, C., Buchler, M.W., Schemmer, P., Settmacher, U., Hauss, J., Lippert, H., Hopt, U.T., Otto, G., Heiss, M.M., Bechstein, W.O., Timm, S., Klar, E., Holscher, A.H., Rogiers, X., Stangl, M., Hohenberger, W., Muller, V., Molmenti, E.P., Fouzas, I., Erhard, J., Malago, M., Paul, A., Broelsch, C.E., and Lang, H., Liver transplantation for hilar cholangiocarcinoma: a German survey. *Transplant Proc*, 2008. 40(9): p. 3191-3.
 41. Yao, D., Kunam, V.K., and Li, X., A review of the clinical diagnosis and therapy of cholangiocarcinoma. *J Int Med Res*, 2014. 42(1): p. 3-16.
 42. Gerhards, M.F., den Hartog, D., Rauws, E.A., van Gulik, T.M., Gonzalez Gonzalez, D., Lameris, J.S., de Wit, L.T., and Gouma, D.J., Palliative treatment in patients with unresectable hilar cholangiocarcinoma: results of endoscopic drainage in patients with type III and IV hilar cholangiocarcinoma. *Eur J Surg*, 2001. 167(4): p. 274-80.
 43. Vogl, T.J., Naguib, N.N., Nour-Eldin, N.E., Bechstein, W.O., Zeuzem, S., Trojan, J., and Gruber-Rouh, T., Transarterial chemoembolization in the treatment of patients with unresectable cholangiocarcinoma: Results and prognostic factors governing treatment success. *Int J Cancer*, 2012. 131(3): p. 733-40.

44. Kloeckner, R., Ruckes, C., Kronfeld, K., Worns, M.A., Weinmann, A., Galle, P.R., Lang, H., Otto, G., Eichhorn, W., Schreckenberger, M., Dueber, C., and Pitton, M.B., Selective internal radiotherapy (SIRT) versus transarterial chemoembolization (TACE) for the treatment of intrahepatic cholangiocellular carcinoma (CCC): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 2014. 15: p. 311.
45. Chiou, Y.Y., Hwang, J.I., Chou, Y.H., Wang, H.K., Chiang, J.H., and Chang, C.Y., Percutaneous ultrasound-guided radiofrequency ablation of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*, 2005. 21(7): p. 304-9.
46. Eckel, F. and Schmid, R.M., Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer*, 2007. 96(6): p. 896-902.
47. Valle, J.W., Wasan, H., Johnson, P., Jones, E., Dixon, L., Swindell, R., Baka, S., Maraveyas, A., Corrie, P., Falk, S., Gollins, S., Lofts, F., Evans, L., Meyer, T., Anthoney, A., Iveson, T., Highley, M., Osborne, R., and Bridgewater, J., Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with advanced or metastatic cholangiocarcinomas or other biliary tract tumours: a multicentre randomised phase II study - The UK ABC-01 Study. *Br J Cancer*, 2009. 101(4): p. 621-7.
48. Valle, J., Wasan, H., Palmer, D.H., Cunningham, D., Anthoney, A., Maraveyas, A., Madhusudan, S., Iveson, T., Hughes, S., Pereira, S.P., Roughton, M., and Bridgewater, J., Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med*, 2010. 362(14): p. 1273-81.
49. Lee, J., Park, S.H., Chang, H.M., Kim, J.S., Choi, H.J., Lee, M.A., Jang, J.S., Jeung, H.C., Kang, J.H., Lee, H.W., Shin, D.B., Kang, H.J., Sun, J.M., Park, J.O., Park, Y.S., Kang, W.K., and Lim, H.Y., Gemcitabine and oxaliplatin with or without erlotinib in advanced biliary-tract cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 2012. 13(2): p. 181-8.

50. Philip, P.A., Mahoney, M.R., Allmer, C., Thomas, J., Pitot, H.C., Kim, G., Donehower, R.C., Fitch, T., Picus, J., and Erlichman, C., Phase II study of erlotinib in patients with advanced biliary cancer. *J Clin Oncol*, 2006. 24(19): p. 3069-74.
51. Lubner, S.J., Mahoney, M.R., Kolesar, J.L., Loconte, N.K., Kim, G.P., Pitot, H.C., Philip, P.A., Picus, J., Yong, W.P., Horvath, L., Van Hazel, G., Erlichman, C.E., and Holen, K.D., Report of a multicenter phase II trial testing a combination of biweekly bevacizumab and daily erlotinib in patients with unresectable biliary cancer: a phase II Consortium study. *J Clin Oncol*, 2010. 28(21): p. 3491-7.
52. Zhu, A.X., Meyerhardt, J.A., Blazzkowsky, L.S., Kambadakone, A.R., Muzikansky, A., Zheng, H., Clark, J.W., Abrams, T.A., Chan, J.A., Enzinger, P.C., Bhargava, P., Kwak, E.L., Allen, J.N., Jain, S.R., Stuart, K., Horgan, K., Sheehan, S., Fuchs, C.S., Ryan, D.P., and Sahani, D.V., 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(1): p. 48-54.
53. Gruenberger, B., Schueller, J., Heubrandtner, U., Wrba, F., Tamandl, D., Kaczirek, K., Roka, R., Freimann-Pircher, S., and Gruenberger, T., Cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin in patients with unresectable advanced or metastatic biliary tract cancer: a phase 2 study. *Lancet Oncol*, 2010. 11(12): p. 1142-8.
54. Wang, D.H., The vanilloid receptor and hypertension. *Acta Pharmacol Sin*, 2005. 26(3): p. 286-94.
55. Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D.M., Piperno, D.R., Berman, M.J., Cooke, R.G., Rademaker, K., Ranere, A.J., Raymond, J.S., Sandweiss, D.H., Scaramelli, F., Tarble, K., and Zeidler, J.A., Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 2007. 315(5814): p. 986-8.

56. Bley, K., Boorman, G., Mohammad, B., McKenzie, D., and Babbar, S., A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicol Pathol*, 2012. 40(6): p. 847-73.
57. Chanda, S., Erexson, G., Riach, C., Innes, D., Stevenson, F., Murli, H., and Bley, K., Genotoxicity studies with pure trans-capsaicin. *Mutat Res*, 2004. 557(1): p. 85-97.
58. Bode, A.M. and Dong, Z., The two faces of capsaicin. *Cancer Res*, 2011. 71(8): p. 2809-14.
59. Peppin, J.F., Albrecht, P.J., Argoff, C., Gustorff, B., Pappagallo, M., Rice, F.L., and Wallace, M.S., Skin Matters: A Review of Topical Treatments for Chronic Pain. Part Two: Treatments and Applications. *Pain Ther*, 2015. 4(1): p. 33-50.
60. Caterina, M.J. and Julius, D., The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*, 2001. 24: p. 487-517.
61. Jancso, N., Jancso-Gabor, A., and Szolcsanyi, J., Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother*, 1967. 31(1): p. 138-51.
62. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 1997. 389(6653): p. 816-24.
63. Robbins, W., Clinical applications of capsaicinoids. *Clin J Pain*, 2000. 16(2 Suppl): p. S86-9.
64. Wood, J.N., Winter, J., James, I.F., Rang, H.P., Yeats, J., and Bevan, S., Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J Neurosci*, 1988. 8(9): p. 3208-20.
65. Oh, U., Hwang, S.W., and Kim, D., Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, 1996. 16(5): p. 1659-67.
66. Bley, K.R., Recent developments in transient receptor potential vanilloid receptor 1 agonist-based therapies. *Expert Opin Investig Drugs*, 2004. 13(11): p. 1445-56.

67. Yaksh, T.L., Farb, D.H., Leeman, S.E., and Jessell, T.M., Intrathecal capsaicin depletes substance P in the rat spinal cord and produces prolonged thermal analgesia. *Science*, 1979. 206(4417): p. 481-3.
68. Anand, P. and Bley, K., Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth*, 2011. 107(4): p. 490-502.
69. Katz, N.P., Mou, J., Paillard, F.C., Turnbull, B., Trudeau, J., and Stoker, M., Predictors of Response in Patients with Post-herpetic Neuralgia and HIV-associated Neuropathy Treated with the 8% Capsaicin Patch (Qutenza(R)). *Clin J Pain*, 2014.
70. Ellison, N., Loprinzi, C.L., Kugler, J., Hatfield, A.K., Miser, A., Sloan, J.A., Wender, D.B., Rowland, K.M., Molina, R., Cascino, T.L., Vukov, A.M., Dhaliwal, H.S., and Ghosh, C., Phase III placebo-controlled trial of capsaicin cream in the management of surgical neuropathic pain in cancer patients. *J Clin Oncol*, 1997. 15(8): p. 2974-80.
71. Hwang, S.J. and Valtschanoff, J.G., Vanilloid receptor VR1-positive afferents are distributed differently at different levels of the rat lumbar spinal cord. *Neurosci Lett*, 2003. 349(1): p. 41-4.
72. Ward, S.M., Bayguinov, J., Won, K.J., Grundy, D., and Berthoud, H.R., Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol*, 2003. 465(1): p. 121-35.
73. Stander, S., Moormann, C., Schumacher, M., Buddenkotte, J., Artuc, M., Shpacovitch, V., Brzoska, T., Lippert, U., Henz, B.M., Luger, T.A., Metze, D., and Steinhoff, M., Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol*, 2004. 13(3): p. 129-39.
74. Bodo, E., Biro, T., Telek, A., Czifra, G., Griger, Z., Toth, B.I., Mescalchin, A., Ito, T., Bettermann, A., Kovacs, L., and Paus, R., A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am J Pathol*, 2005. 166(4): p. 985-98.

75. Knotkova, H., Pappagallo, M., and Szallasi, A., Capsaicin (TRPV1 Agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *Clin J Pain*, 2008. 24(2): p. 142-54.
76. Yao, X. and Garland, C.J., Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circ Res*, 2005. 97(9): p. 853-63.
77. Schwarz, E.C., Wolfs, M.J., Tonner, S., Wenning, A.S., Quintana, A., Griesemer, D., and Hoth, M., TRP channels in lymphocytes. *Handb Exp Pharmacol*, 2007(179): p. 445-56.
78. Biro, T., Maurer, M., Modarres, S., Lewin, N.E., Brodie, C., Acs, G., Acs, P., Paus, R., and Blumberg, P.M., Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells. *Blood*, 1998. 91(4): p. 1332-40.
79. Szallasi, A., Conte, B., Goso, C., Blumberg, P.M., and Manzini, S., Characterization of a peripheral vanilloid (capsaicin) receptor in the urinary bladder of the rat. *Life Sci*, 1993. 52(20): p. PL221-6.
80. Ost, D., Roskams, T., Van Der Aa, F., and De Ridder, D., Topography of the vanilloid receptor in the human bladder: more than just the nerve fibers. *J Urol*, 2002. 168(1): p. 293-7.
81. Chen, D., Yang, Z., Wang, Y., Zhu, G., and Wang, X., Capsaicin induces cycle arrest by inhibiting cyclin-dependent-kinase in bladder carcinoma cells. *Int J Urol*, 2012. 19(7): p. 662-8.
82. Vriens, J., Janssens, A., Prenen, J., Nilius, B., and Wondergem, R., TRPV channels and modulation by hepatocyte growth factor/scatter factor in human hepatoblastoma (HepG2) cells. *Cell Calcium*, 2004. 36(1): p. 19-28.
83. Chen, C. and Kong, A.N., Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharmacol Sci*, 2005. 26(6): p. 318-26.
84. Aggarwal, B.B., Takada, Y., and Oommen, O.V., From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. *Expert Opin Investig Drugs*, 2004. 13(10): p. 1327-38.

85. Huang, S.P., Chen, J.C., Wu, C.C., Chen, C.T., Tang, N.Y., Ho, Y.T., Lo, C., Lin, J.P., Chung, J.G., and Lin, J.G., Capsaicin-induced apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Anticancer Res*, 2009. 29(1): p. 165-74.
86. Jung, M.Y., Kang, H.J., and Moon, A., Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-3 activation. *Cancer Lett*, 2001. 165(2): p. 139-45.
87. Kim, J.D., Kim, J.M., Pyo, J.O., Kim, S.Y., Kim, B.S., Yu, R., and Han, I.S., Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett*, 1997. 120(2): p. 235-41.
88. Lu, H.F., Chen, Y.L., Yang, J.S., Yang, Y.Y., Liu, J.Y., Hsu, S.C., Lai, K.C., and Chung, J.G., Antitumor activity of capsaicin on human colon cancer cells in vitro and colo 205 tumor xenografts in vivo. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(24): p. 12999-3005.
89. Zhang, J.H., Lai, F.J., Chen, H., Luo, J., Zhang, R.Y., Bu, H.Q., Wang, Z.H., Lin, H.H., and Lin, S.Z., Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in apoptosis induced by capsaicin in the human pancreatic cancer cell line PANC-1. *Oncol Lett*, 2013. 5(1): p. 43-48.
90. Pramanik, K.C., Boreddy, S.R., and Srivastava, S.K., Role of mitochondrial electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 2011. 6(5): p. e20151.
91. Mori, A., Lehmann, S., O'Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J.C., Pervan, M., McBride, W.H., Kizaki, M., and Koeffler, H.P., Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2006. 66(6): p. 3222-9.
92. Anandakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Asokkumar, S., Naveenkumar, C., Raghunandhakumar, S., and Devaki, T., Capsaicin inhibits benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in an in vivo mouse model. *Inflamm Res*, 2012. 61(11): p. 1169-75.
93. Brown, K.C., Witte, T.R., Hardman, W.E., Luo, H., Chen, Y.C., Carpenter, A.B., Lau, J.K., and Dasgupta, P., Capsaicin displays anti-

- proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway. *PLoS One*, 2010. 5(4): p. e10243.
94. Chou, C.C., Wu, Y.C., Wang, Y.F., Chou, M.J., Kuo, S.J., and Chen, D.R., Capsaicin-induced apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through caspase-independent pathway. *Oncol Rep*, 2009. 21(3): p. 665-71.
95. Thoennissen, N.H., O'Kelly, J., Lu, D., Iwanski, G.B., La, D.T., Abbassi, S., Leiter, A., Karlan, B., Mehta, R., and Koeffler, H.P., Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and -negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene*, 2010. 29(2): p. 285-96.
96. Ito, K., Nakazato, T., Yamato, K., Miyakawa, Y., Yamada, T., Hozumi, N., Segawa, K., Ikeda, Y., and Kizaki, M., Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res*, 2004. 64(3): p. 1071-8.
97. Kim, S.R., Kim, S.U., Oh, U., and Jin, B.K., Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca²⁺-mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. *J Immunol*, 2006. 177(7): p. 4322-9.
98. Hail, N., Jr. and Lotan, R., Examining the role of mitochondrial respiration in vanilloid-induced apoptosis. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(17): p. 1281-92.
99. Lee, Y.S., Kang, Y.S., Lee, J.S., Nicolova, S., and Kim, J.A., Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic Res*, 2004. 38(4): p. 405-12.
100. Lin, C.H., Lu, W.C., Wang, C.W., Chan, Y.C., and Chen, M.K., Capsaicin induces cell cycle arrest and apoptosis in human KB cancer cells. *BMC Complement Altern Med*, 2013. 13: p. 46.

101. Maity, R., Sharma, J., and Jana, N.R., Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin-proteasome system dysfunction. *J Cell Biochem*, 2010. 109(5): p. 933-42.
102. Singh, S., Natarajan, K., and Aggarwal, B.B., Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) is a potent inhibitor of nuclear transcription factor-kappa B activation by diverse agents. *J Immunol*, 1996. 157(10): p. 4412-20.
103. Patel, P.S., Varney, M.L., Dave, B.J., and Singh, R.K., Regulation of constitutive and induced NF-kappaB activation in malignant melanoma cells by capsaicin modulates interleukin-8 production and cell proliferation. *J Interferon Cytokine Res*, 2002. 22(4): p. 427-35.
104. Bai, H., Li, H., Zhang, W., Matkowskyj, K.A., Liao, J., Srivastava, S.K., and Yang, G.Y., Inhibition of chronic pancreatitis and pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) by capsaicin in LSL-KrasG12D/Pdx1-Cre mice. *Carcinogenesis*, 2011. 32(11): p. 1689-96.
105. Agrawal, R.C., Wiessler, M., Hecker, E., and Bhide, S.V., Tumour-promoting effect of chilli extract in BALB/c mice. *Int J Cancer*, 1986. 38(5): p. 689-95.
106. Proudlock, R., Thompson, C., and Longstaff, E., Examination of the potential genotoxicity of pure capsaicin in bacterial mutation, chromosome aberration, and rodent micronucleus tests. *Environ Mol Mutagen*, 2004. 44(5): p. 441-7.
107. Tsuchiya, Y., Terao, M., Okano, K., Nakamura, K., Oyama, M., Ikegami, K., and Yamamoto, M., Mutagenicity and mutagens of the red chili pepper as gallbladder cancer risk factor in Chilean women. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011. 12(2): p. 471-6.
108. De, A.K., Agarwal, K., Mukherjee, A., and Sengupta, D., Inhibition by capsaicin against cyclophosphamide-induced clastogenicity and DNA damage in mice. *Mutat Res*, 1995. 335(3): p. 253-8.
109. Toth, B. and Gannett, P., Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice. *In Vivo*, 1992. 6(1): p. 59-63.

110. Akagi, A., Sano, N., Uehara, H., Minami, T., Otsuka, H., and Izumi, K., Non-carcinogenicity of capsaicinoids in B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol*, 1998. 36(12): p. 1065-71.
111. Muralidhara and Narasimhamurthy, K., Non-mutagenicity of capsaicin in albino mice. *Food Chem Toxicol*, 1988. 26(11-12): p. 955-8.
112. Surh, Y.J., Lee, R.C., Park, K.K., Mayne, S.T., Liem, A., and Miller, J.A., Chemoprotective effects of capsaicin and diallyl sulfide against mutagenesis or tumorigenesis by vinyl carbamate and N-nitrosodimethylamine. *Carcinogenesis*, 1995. 16(10): p. 2467-71.
113. Park, K.K. and Surh, Y.J., Effects of capsaicin on chemically-induced two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, 1997. 114(1-2): p. 183-4.
114. Hwang, M.K., Bode, A.M., Byun, S., Song, N.R., Lee, H.J., Lee, K.W., and Dong, Z., Cocarcinogenic effect of capsaicin involves activation of EGFR signaling but not TRPV1. *Cancer Res*, 2010. 70(17): p. 6859-69.
115. Jang, J.J., Cho, K.J., Lee, Y.S., and Bae, J.H., Different modifying responses of capsaicin in a wide-spectrum initiation model of F344 rat. *J Korean Med Sci*, 1991. 6(1): p. 31-6.
116. Jang, J.J., Kim, S.H., and Yun, T.K., Inhibitory effect of capsaicin on mouse lung tumor development. *In Vivo*, 1989. 3(1): p. 49-53.
117. Hooper, J.E. and Scott, M.P., Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(4): p. 306-17.
118. Lin, T.L. and Matsui, W., Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. *Onco Targets Ther*, 2012. 5: p. 47-58.
119. Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E., Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 1980. 287(5785): p. 795-801.
120. Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D.P., Garber, E.A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., Tabin, C.J., Blake Pepinsky, R., and Williams, K.P., Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev*, 2001. 106(1-2): p. 107-17.

121. Ingham, P.W. and McMahon, A.P., Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 2001. 15(23): p. 3059-87.
122. Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M.P., Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 2007. 317(5836): p. 372-6.
123. Zhu, A.J., Zheng, L., Suyama, K., and Scott, M.P., Altered localization of Drosophila Smoothed protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes Dev*, 2003. 17(10): p. 1240-52.
124. Beachy, P.A., Karhadkar, S.S., and Berman, D.M., Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 2004. 432(7015): p. 324-31.
125. Pasca di Magliano, M. and Hebrok, M., Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(12): p. 903-11.
126. El Khatib, M., Kalnytska, A., Palagani, V., Kossatz, U., Manns, M.P., Malek, N.P., Wilkens, L., and Plentz, R.R., Inhibition of hedgehog signaling attenuates carcinogenesis in vitro and increases necrosis of cholangiocellular carcinoma. *Hepatology*, 2013. 57(3): p. 1035-45.
127. Ngamwongsatit, P., Banada, P.P., Panbangred, W., and Bhunia, A.K., WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *J Microbiol Methods*, 2008. 73(3): p. 211-5.
128. Araki, K., Shimura, T., Suzuki, H., Tsutsumi, S., Wada, W., Yajima, T., Kobayahi, T., Kubo, N., and Kuwano, H., E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*, 2011. 105(12): p. 1885-93.
129. Sato, Y., Harada, K., Itatsu, K., Ikeda, H., Kakuda, Y., Shimomura, S., Shan Ren, X., Yoneda, N., Sasaki, M., and Nakanuma, Y., Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β 1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma. *Am J Pathol*, 2010. 177(1): p. 141-52.

130. Hwang, Y.P., Yun, H.J., Choi, J.H., Han, E.H., Kim, H.G., Song, G.Y., Kwon, K.I., Jeong, T.C., and Jeong, H.G., Suppression of EGF-induced tumor cell migration and matrix metalloproteinase-9 expression by capsaicin via the inhibition of EGFR-mediated FAK/Akt, PKC/Raf/ERK, p38 MAPK, and AP-1 signaling. *Mol Nutr Food Res*, 2011. 55(4): p. 594-605.
131. Sancho, R., Lucena, C., Macho, A., Calzado, M.A., Blanco-Molina, M., Minassi, A., Appendino, G., and Munoz, E., Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappaB activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo. *Eur J Immunol*, 2002. 32(6): p. 1753-63.
132. Berger, A., Henderson, M., Nadoolman, W., Duffy, V., Cooper, D., Saberski, L., and Bartoshuk, L., Oral capsaicin provides temporary relief for oral mucositis pain secondary to chemotherapy/radiation therapy. *J Pain Symptom Manage*, 1995. 10(3): p. 243-8.
133. Zhang, R., Humphreys, I., Sahu, R.P., Shi, Y., and Srivastava, S.K., In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*, 2008. 13(12): p. 1465-78.
134. Kim, C.S., Park, W.H., Park, J.Y., Kang, J.H., Kim, M.O., Kawada, T., Yoo, H., Han, I.S., and Yu, R., Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in HT-29 human colon cancer cells. *J Med Food*, 2004. 7(3): p. 267-73.
135. Drozd, E., Krzyszton-Russjan, J., and Gruber, B., Doxorubicin Treatment of Cancer Cells Impairs Reverse Transcription and Affects the Interpretation of RT-qPCR Results. *Cancer Genomics Proteomics*, 2016. 13(2): p. 161-70.
136. Kalluri, R. and Weinberg, R.A., The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 2009. 119(6): p. 1420-8.
137. Thiery, J.P., Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. 2(6): p. 442-54.

138. Omenetti, A., Porrello, A., Jung, Y., Yang, L., Popov, Y., Choi, S.S., Witek, R.P., Alpini, G., Venter, J., Vandongen, H.M., Syn, W.K., Baroni, G.S., Benedetti, A., Schuppan, D., and Diehl, A.M., Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest*, 2008. 118(10): p. 3331-42.
139. Ashida, K., Terada, T., Kitamura, Y., and Kaibara, N., Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and CD44 (standard and variant isoforms) in human cholangiocarcinoma: an immunohistochemical study. *Hepatology*, 1998. 27(4): p. 974-82.
140. Yang, J., Li, T.Z., Xu, G.H., Luo, B.B., Chen, Y.X., and Zhang, T., Low-concentration capsaicin promotes colorectal cancer metastasis by triggering ROS production and modulating Akt/mTOR and STAT-3 pathways. *Neoplasma*, 2013. 60(4): p. 364-72.
141. Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M.K., Tauler, J., Bikkavilli, R.K., and Winn, R.A., The soft agar colony formation assay. *J Vis Exp*, 2014(92): p. e51998.
142. Xie, J., Murone, M., Luoh, S.M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lam, C.W., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Epstein, E.H., Jr., and de Sauvage, F.J., Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*, 1998. 391(6662): p. 90-2.
143. Taylor, M.D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C.C., Mainprize, T.G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., Hao, A., Goldstein, A.M., Stavrou, T., Scherer, S.W., Dura, W.T., Wainwright, B., Squire, J.A., Rutka, J.T., and Hogg, D., Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*, 2002. 31(3): p. 306-10.
144. Watkins, D.N., Berman, D.M., Burkholder, S.G., Wang, B., Beachy, P.A., and Baylin, S.B., Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 2003. 422(6929): p. 313-7.
145. Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs, K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N., and Beachy, P.A., Widespread requirement for

- Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 2003. 425(6960): p. 846-51.
146. Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A.L., and Hebrok, M., Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, 2003. 425(6960): p. 851-6.
147. Sicklick, J.K., Li, Y.X., Jayaraman, A., Kannangai, R., Qi, Y., Vivekanandan, P., Ludlow, J.W., Owzar, K., Chen, W., Torbenson, M.S., and Diehl, A.M., Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2006. 27(4): p. 748-57.
148. Dormoy, V., Danilin, S., Lindner, V., Thomas, L., Rothhut, S., Coquard, C., Helwig, J.J., Jacqmin, D., Lang, H., and Massfelder, T., The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol Cancer*, 2009. 8: p. 123.
149. Fendrich, V., Rehm, J., Waldmann, J., Buchholz, M., Christofori, G., Lauth, M., Slater, E.P., and Bartsch, D.K., Hedgehog inhibition with cyclopamine represses tumor growth and prolongs survival in a transgenic mouse model of islet cell tumors. *Ann Surg*, 2011. 253(3): p. 546-52.
150. Varnat, F., Duquet, A., Malerba, M., Zbinden, M., Mas, C., Gervaz, P., and Ruiz i Altaba, A., Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*, 2009. 1(6-7): p. 338-51.
151. Sarkar, F.H. and Li, Y., Using chemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy. *Cancer Res*, 2006. 66(7): p. 3347-50.
152. Li, Y., Ahmed, F., Ali, S., Philip, P.A., Kucuk, O., and Sarkar, F.H., Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Res*, 2005. 65(15): p. 6934-42.

153. Banerjee, S., Zhang, Y., Ali, S., Bhuiyan, M., Wang, Z., Chiao, P.J., Philip, P.A., Abbruzzese, J., and Sarkar, F.H., Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine by genistein in vitro and in vivo using an orthotopic model of pancreatic cancer. *Cancer Res*, 2005. 65(19): p. 9064-72.
154. Li, Y., Ellis, K.L., Ali, S., El-Rayes, B.F., Nedeljkovic-Kurepa, A., Kucuk, O., Philip, P.A., and Sarkar, F.H., Apoptosis-inducing effect of chemotherapeutic agents is potentiated by soy isoflavone genistein, a natural inhibitor of NF-kappaB in BxPC-3 pancreatic cancer cell line. *Pancreas*, 2004. 28(4): p. e90-5.
155. Schwartz, L., Guais, A., Israel, M., Junod, B., Steyaert, J.M., Crespi, E., Baronzio, G., and Abolhassani, M., Tumor regression with a combination of drugs interfering with the tumor metabolism: efficacy of hydroxycitrate, lipoic acid and capsaicin. *Invest New Drugs*, 2013. 31(2): p. 256-64.
156. Hwang, J.T., Ha, J., and Park, O.J., Combination of 5-fluorouracil and genistein induces apoptosis synergistically in chemo-resistant cancer cells through the modulation of AMPK and COX-2 signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 332(2): p. 433-40.
157. Anandakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., and Devaki, T., Capsaicin provokes apoptosis and restricts benzo(a)pyrene induced lung tumorigenesis in Swiss albino mice. *Int Immunopharmacol*, 2013. 17(2): p. 254-9.
158. Anandakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Vinodhkumar, R., and Devaki, T., Capsaicin modulates pulmonary antioxidant defense system during benzo(a)pyrene-induced lung cancer in Swiss albino mice. *Phytother Res*, 2008. 22(4): p. 529-33.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Doktorarbeit wurde durch Herrn Prof. Dr. R. Plentz konzipiert und betreut. Nach Einarbeitung durch Mona El Khatib und Vindhya Palagani wurden die Experimente von mir selbstständig durchgeführt. Die Durchführung des Softgars fand in Zusammenarbeit mit Vindhya Palagani statt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Die in der Arbeit dargestellten Graphiken und Tabellen wurden von mir erstellt. Übernommene Graphiken wurden von mir als solche gekennzeichnet. Ich versichere, das Manuskript nach Korrektur durch Prof. Dr. Plentz selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebene Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Unterschrift

.....

.....

8. Veröffentlichungen

Manuskript:

Wutka A, Palagani V, Barat S, Chen X, El Khatib M, Götze J, Belhamer H, Zender S, Bozko P, Malek NP, Plentz RR. Capsaicin treatment attenuates cholangiocarcinoma carcinogenesis. **PLoS One. 2014. 2014 Apr 18;9(4):e95605. doi: 10.1371/journal.pone.0095605. eCollection 2014.**

Posterbeiträge:

Wutka A, Palagani V, El Khatib M, Belhamer H, Zender S, Bozko P, Malek NP, Plentz RR. Capsaicin treatment targets Hedgehog signaling and attenuates human cholangiocarcinoma carcinogenesis. **EASL, London, UK, April 2014.**

Wutka A, Palagani V, El Khatib M, Belhamer H, Bozko P, Malek N, Plentz R. Capsaicin impairs carcinogenesis of human intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma cells. **GASL, Tübingen, Deutschland, Januar 2014.**

Wutka A, Palagani V, Bozko P, El Khatib M, Belhamer H, Malek N, Plentz R. Capsaicin impairs carcinogenesis of human cholangiocarcinoma cells. **UEGW Berlin, Deutschland, October 2013.**

9. Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Ruben Plentz für die Möglichkeit meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Ich bedanke mich für die Überlassung des interessanten und spannenden Themas, für die hervorragende Betreuung sowie das offene Ohr für aufkommende Fragen. Danke, dass ich einen Blick in die Welt der Wissenschaft werfen konnte.

Ich möchte mich auch herzlich bei Mona El Khatib und Vindhya Palagani für die perfekte Einarbeitung und Hilfe im Labor bedanken sowie für die Geduld, die mir entgegengebracht wurde.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der AG Malek, die mir bei Fragen immer hilfreich zur Seite standen.

Pia Luippold danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken. Ich danke auch meiner lieben Patentante und ärztlichem Vorbild, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.