

Aus der Abteilung für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie des
Universitätsklinikums Heidelberg

Eingereicht über das Institut für Veterinärphysiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Analyse der Autophagieaktivität in humanen Cholangiokarzinomzellen nach Behandlung mit Salinomycin

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Tina Trostel
Tierärztin
aus Ludwigsburg

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4125

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Martin A. Schneider
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, carcinoma, adenoma, bile duct (MeSH), salinomycin, inhibition, autophagy, western blotting, flow cytometry, polymerase chain reaction

Tag der Promotion: 17.03.2020

Für

meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Cholangiokarzinom beim Menschen	1
1.2 Das Cholangiokarzinom beim Tier	3
1.3 Autophagie	4
1.3.1 Definition und Funktion	4
1.3.2 Mechanismus	5
1.3.3 Regulation und Modifikationsmöglichkeiten	7
1.3.4 Die Rolle der Autophagie bei Tumorerkrankungen	8
1.3.5 Die Bedeutung der Autophagie im CCC	10
1.4 Salinomycin	11
1.4.1 Eigenschaften und Anwendung von SAL	11
1.4.2 Wirksamkeit von Salinomycin im CCC	13
1.4.3 Wirkungsweise von Salinomycin	14
2 Ziel der Dissertation	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Zellkultur und Stimulationslösungen	17
3.1.1 Zellkultur	17
3.1.2 Stimulationslösungen	17
3.2 Proliferationstest	18
3.2.1 Stimulation der Zellen	18
3.2.2 WST-1 Assay Protokoll	18
3.3 Migration und Invasion	18
3.3.1 Stimulation der Zellen	18
3.3.2 Migrations- und Invasionsassay	19
3.4 Apoptose	19
3.4.1 AnnexinV Analyse im FACS („fluorescence activated cell sorting“)	19
3.4.2 Quantitative Analyse der DNA-Fragmentierung	20
3.4.3 LDH Freisetzung	21

Inhaltsverzeichnis

3.5 Western Blot	21
3.5.1 Stimulation der Zellen	21
3.5.2 Proteinisolation und -messung	21
3.5.3 Western Blot Protokoll	22
3.5.4 Strippen einer Membran	22
3.6 Messung der Autophagieaktivität mittels Cyto-ID®	23
3.6.1 Messung im FACS	23
3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie	23
3.8 Färbung der Mitochondrien mittels MitoTracker®	24
3.8.1 Stimulation der Zellen	24
3.8.2 Messung im FACS	24
3.9 Messung der ROS-Produktion	24
3.9.1 Messung im FACS	25
3.9.2 Fluoreszenzmikroskopie	25
3.10 qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion)	25
3.10.1 Stimulation der Zellen	25
3.10.2 RNA-Isolation	25
3.10.3 Komplementäre DNA (cDNA)-Synthese	26
3.10.4 qPCR	26
3.11 Statistische Datenanalyse	26
4. Ergebnisse	27
4.1 Salinomycin inhibiert die Proliferation muriner CCC-Zellen	27
4.2 Salinomycin inhibiert die Migration und die Invasion muriner CCC-Zellen	28
4.3 Salinomycin induziert Apoptose in murinen CCC-Zellen	30
4.4 Salinomycin führt zu einer Akkumulation von LC3-II und p62 in humanen CCC-Zellen	32
4.4.1 LC3-II	32
4.4.2 p62	33
4.5 Salinomycin führt zu einer Reduktion der Autophagiekompartimente in humanen CCC-Zellen	34

Inhaltsverzeichnis

4.6 Salinomycin führt zu einer Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und einer gesteigerten ROS-Produktion in humanen CCC-Zellen	41
4.7 Die Vitalität der humanen CCC-Zellen verbessert sich durch eine Vorbehandlung mit dem Antioxidans NAC nicht	44
4.8 Der Einfluss von SAL auf das Transkriptionslevel der ATG in humanen CCC-Zellen	48
5. Diskussion	51
5.1 Veterinärmedizinischer Bezug	54
6. Zusammenfassung	55
7. Summary	57
8. Literaturverzeichnis	58
9. Anhang	73
9.1 Abkürzungsverzeichnis	73
9.2 Abbildungsverzeichnis	74
9.3 Materialliste	75
9.3.1 Verbrauchsmaterialien	75
9.3.2 Reagenzien	76
9.3.3 Geräte	77
9.3.4 Programme	78
9.3.5 Zellen	78
9.3.6 Antikörper	78
9.3.7 Primer	79
9.4 Publikationsverzeichnis	79
10 Danksagung	80
11 Selbständigkeitserklärung	81

1 Einleitung

1.1 Das Cholangiokarzinom beim Menschen

Das cholangiozelluläre Karzinom (CCC) des Menschen ist eine klinisch und genetisch heterogene epitheliale Neoplasie, die histologisch Merkmale von Cholangiozyten aufweist (Vogel *et al.*, 2014; Zhu, 2015). Die Ausbreitung erfolgt per continuitatem über die perineuralen Lymphscheiden in angrenzende Strukturen und Organe sowie durch lymphogene und selten durch hämatogene Metastasierung (Kornek und Schima, 2010). Das CCC befällt früh die lokoregionären Lymphknoten und es treten früh intra- und extrahepatische Metastasen auf (Zhu, 2015).

Das CCC wird eingeteilt in intrahepatische (intraparenchymatöse) CCC, perihiläre CCC (sogenannte Klatskin-Tumor) und distale CCC ab einer Lokalisation unterhalb des Zystikusabganges. Abgegrenzt davon werden das Gallenblasenkarzinom und Papillentumore (Vogel *et al.*, 2014). 20% der CCC sind intrahepatisch und 80% sind perihilär oder distal lokalisiert (Plentz und Malek, 2015).

Mit 0,5% aller Neoplasien und 3% aller gastrointestinalen Tumore ist das CCC eine seltene maligne Erkrankung (Kolligs *et al.*, 2008). Das CCC ist nach dem hepatozellulären Karzinom (HCC) der zweithäufigste primäre Lebertumor in Deutschland mit circa 3500 Neuerkrankungen jährlich (Vogel *et al.*, 2014). Weltweit erkranken jährlich 2-5/100.000 Menschen neu, wobei vor allem Menschen mit einem Alter über 70 Jahren erkranken (Kolligs *et al.*, 2008). Ein gehäuftes Auftreten kann in Südostasien beobachtet werden. Dieses steht in Zusammenhang mit dem endemischen Auftreten der Leberegelarten *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis* (Sithithaworn *et al.*, 2014). Die Inzidenz steigt aber auch in den westlichen Ländern an (Schweitzer und Vogel, 2014).

Zu den spezifischen Risikofaktoren für CCC gehören anatomische Abnormitäten des Gallengangsystems, Parasiteninfektionen, Lithiasis und Entzündungen der Leber und des Gallengangsystems, vor allem die primär sklerosierende Cholangitis. Zusätzlich gibt es noch unspezifische Risikofaktoren, die die Entstehung des CCC begünstigen (Kornek und Schima, 2010; Vogel *et al.*, 2014; Bergquist und von Seth, 2015; Plentz und Malek, 2015).

Patienten mit einem CCC leiden an unspezifischen Symptomen wie Erbrechen und Übelkeit, abdominalen Schmerzen und Gewichtsverlust (Plentz und Malek, 2015). 100% der Betroffenen mit perihilärem CCC haben einen Ikterus mit Pruritus, dunklem Urin und Steatorrhö (Kornek und Schima, 2010). Bei den Laborwerten kann sich ein Anstieg der Transaminasen und der Cholestase-Parameter zeigen (Plentz und Malek, 2015). Im weiter fortgeschrittenen Stadium kann es zum Leberversagen kommen (Kornek und Schima, 2010).

Einleitung

Eine Früherkennung des CCC gelingt bei 50% der Betroffenen mittels einer Sonographie (Cha *et al.*, 2006). Zur weiteren Diagnostik werden Multidetektor- oder Spiralcomputertomographie, Magnetresonanztomographie, Magnetresonanzcholangiopankreatikographie, endoskopisch retrograde Cholangiographie, perkutan transhepatische Cholangiographie und Laparoskopie eingesetzt, um die Ausdehnung und Resektabilität des Tumors beurteilen zu können (Tillich *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008).

Die mit einem CCC verbundene schlechte Prognose ist mit den limitierten Therapieoptionen zu erklären. Es gilt als wenig chemosensibel und weist eine hohe klinische und genetische Heterogenität auf (Schweitzer und Vogel, 2014; Zhu, 2015). Aufgrund der geringen Toleranz der Nachbarorgane für eine percutane Strahlentherapie stellen auch diese Behandlungen keinen wirksamen Therapieansatz dar (Kornek und Schima, 2010). Die einzige kurative Option bei einem CCC ist eine radikale chirurgische Resektion des Tumors. Die Rezidivrate nach R0-Resektion liegt allerdings bei 40-85% (Vogel *et al.*, 2014), wobei in verschiedenen retrospektiven Studien verschiedene Angaben gemacht werden (DeOliveira *et al.*, 2007; Nuzzo *et al.*, 2010; Ramacciato *et al.*, 2010). Das 5-Jahres Überleben nach R0-Resektion liegt, abhängig von der Lokalisation des CCCs, bei 27-63% (DeOliveira *et al.*, 2007). Durch die hauptsächlich unspezifischen Symptome werden cholangiozelluläre Karzinome meist in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, sodass nur 10% der Betroffenen einen resektablen Tumor aufweisen und für eine chirurgische Therapie in Frage kommen (Zhu, 2015). Trotz der Notwendigkeit gibt es derzeit keine etablierte adjuvante Therapie (Zhu, 2015). Die meisten Patienten werden einer palliativen Therapie zugeführt, die bei bestehender Gallengangsobstruktion die endoskopische oder perkutane Stentimplantation (Schima *et al.*, 1997) und die palliative Chemotherapie umfasst. Zur palliativen Chemotherapie wurde lange Zeit die Monotherapie mit Gemcitabin angewendet, ohne dass die Wirksamkeit nachgewiesen war (Schweitzer und Vogel, 2014). Seit 2005 ist eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin und Cisplatin das Mittel der Wahl (Thongprasert *et al.*, 2005). Zusätzlich werden verschiedene andere Chemotherapeutika auf ihre Wirksamkeit erforscht (Schweitzer und Vogel, 2014). Weitere Ansätze, die noch erforscht werden, sind die Lebertransplantation in Verbindung mit neoadjuvanter Chemoradiotherapie (Rosen *et al.*, 2008; Darwish Murad *et al.*, 2012) und der Einsatz neuer Therapien wie zum Beispiel zielgerichtete Substanzen (Vogel *et al.*, 2014). Bei nicht kurativer Behandlung ist die Prognose sehr schlecht, wobei eine frühere Diagnose die Überlebenschancen erhöhen kann (Bergquist und von Seth, 2015). Patienten mit irresektablem oder metastasierendem CCC haben nur eine mediane Überlebensrate von ungefähr einem Jahr (Zhu, 2015).

1.2 Das Cholangiokarzinom beim Tier

Bei den Haustierarten Hund, Katze, Rind, Pferd, Ziege und Schaf (Anderson und Sandison, 1968; Rehmtulla, 1974a; Dominguez *et al.*, 2001; Conti *et al.*, 2008; Aslan *et al.*, 2014; Azizi *et al.*, 2016) sowie bei anderen Tierarten (Plummer, 1956; Brunk, 1965; Mawdesley-Thomas, 1970) wird vom Vorkommen eines CCC berichtet.

Bei Tieren ist das intrahepatische CCC die häufigste Form (Ponomarkov und Mackey, 1976; Cullen, 2017) und entspricht dem intrahepatischen CCC beim Menschen (Rehmtulla, 1974b). Das CCC geht von den Epithelzellen der Gallengänge aus und zeigt beim Pferd ein kanalikuläres und invasives Wachstum, das zu einer schnellen Ausbreitung in große Teile der Leber führt (Durando *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1997; Müller und Niederhofer, 2010; Wong *et al.*, 2013). Bei der Katze und dem Rind wächst das CCC häufig multinodulär (Patnaik, 1992; Braun *et al.*, 2005; Ilhan *et al.*, 2008; Aslan *et al.*, 2014; Azizi *et al.*, 2016). Eine Metastasierung in die Lunge, die regionären Lymphknoten und das Peritoneum ist häufig (Anderson und Sandison, 1968; Mischke *et al.*, 2003; Müller und Niederhofer, 2010; Aslan *et al.*, 2014).

Primäre Lebertumore sind bei den Haustierarten Pferd, Rind, Hund und Katze selten und kommen vor allem bei älteren Tieren vor (Anderson und Sandison, 1968; Patnaik *et al.*, 1981; Lawrence *et al.*, 1994; Mischke *et al.*, 2003; Braun *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2008). Bei Katzen und Pferden kommt, im Gegensatz zu Hunden, häufiger das CCC als das HCC vor (Conti *et al.*, 2008; van Sprundel *et al.*, 2014).

Die Ätiologie des CCC beim Tier ist unbekannt (Ponomarkov und Mackey, 1976). Conti *et al.* (2008) vermutet chronische Krankheiten der Gallengänge beim Pferd, wie zum Beispiel in diesem Fall eine bakterielle Cholangitis als prädisponierend für die Entstehung des CCC. Beim Hund (Chang, 1965) und bei der Katze (Chang, 1964) wird, wie beim Menschen (Choi *et al.*, 2006), eine Verbindung des CCC mit einer Infektion mit dem chinesischen Leberegel (*Clonorchis sinensis*) vermutet. Als auslösende Faktoren werden beim Hund außerdem noch angeborene Leberzysten bei adulten Tieren (van Sprundel *et al.*, 2013) und chemische Karzinogene, wie zum Beispiel Nitrosamine (Hirao *et al.*, 1974) diskutiert. Als Risikofaktoren beim Rind werden chronische Fasciolose, Aflatoxine und Seneziose aufgeführt (Anderson und Sandison, 1968; Syring *et al.*, 2008). Bewiesen wurde, dass chemische Karzinogene, wie zum Beispiel Furan, bei Labornagern CCC auslösen können (Maronpot *et al.*, 1991).

Das CCC bleibt bei Tieren oft lange Zeit unbemerkt, da die betroffenen Tiere eine unspezifische Symptomatik mit Anorexie, Apathie und Abdominalschmerzen zeigen (Rehmtulla, 1974a; Braun *et al.*, 2005; Müller und Niederhofer, 2010; Aslan *et al.*, 2014). Beim Pferd können rekurrende Koliken ein Hinweis auf CCC sein (Conti *et al.*, 2008; Habershon-Butcher *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2013). Bei Katzen sollte man bei Veränderungen der Haut und des Haarkleids, im Sinne eines neoplastischen Syndroms, an CCC denken (Pascal-

Tenorio *et al.*, 1997). Beim Rind kann es durch ein CCC zur hepatogenen Photosensibilität kommen (Braun *et al.*, 2005). Die Laborwerte sind unspezifisch, zeigen aber meistens eine Erhöhung der Leberwerte (Post und Patnaik, 1992; Mischke *et al.*, 2003; Braun *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2008).

Bei Groß- sowie bei Kleintieren ist die Sonographie ein geeignetes Verfahren zur Diagnostik des CCC (Braun *et al.*, 2005; Jacobs und Snyder, 2007; Conti *et al.*, 2008; Balkman, 2009). Eine histologische Untersuchung einer transkutanen, ultraschallgestützten Leberbiopsie kann die Diagnose CCC bereits ante mortem bestätigen (Mueller *et al.*, 1992; Braun *et al.*, 2005). Röntgen und eine diagnostische Laparoskopie beziehungsweise Laparotomie können als weitere Diagnostika herangezogen werden (Rehmtulla, 1974a; Mischke *et al.*, 2003; Pizzigatti *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2013; Aslan *et al.*, 2014). Bei Kleintieren kann zusätzlich eine Magnetresonanztomographie oder Computertomographie durchgeführt werden (Balkman, 2009). Beim Rind sind Lebertumoren meist ein Zufallsbefund bei der Fleischschau am Schlachthof oder werden bei der Sektion entdeckt (Anderson und Sandison, 1968; Braun *et al.*, 2005; Azizi *et al.*, 2016).

Bei Großtieren sind keine Behandlungsversuche beschrieben (Braun *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2008; Müller und Niederhofer, 2010). Beim Kleintier ist eine operative Behandlung, bei solitären Tumoren eines Leberlappens ohne Lymphknotenbeteiligung und Fernmetastasen, beschrieben (Balkman, 2009). Bei Katzen schließt das multinoduläre Wachstum eine Resektion aber meistens aus (Jacobs und Snyder, 2007; Aslan *et al.*, 2014). Jacobs und Snyder (2007) berichten von einer palliativen Chemotherapie bei einer Katze mit Doxorubicin, die ohne Wirkung blieb und einer Zweitlinientherapie mit Carboplatin, die ebenfalls erfolglos blieb.

Das CCC beim Tier ist hochgradig invasiv wachsend, befällt die Lymphknoten und metastasiert häufig. Da die Prognose durch die wenigen, begrenzten Therapieansätze und den späten Zeitpunkt der Diagnosestellung sehr schlecht ist, bleibt oft nur der Rat zur Euthanasie.

1.3 Autophagie

1.3.1 Definition und Funktion

Der Begriff Autophagie stammt aus dem griechischen und steht für „sich selbst essen“ (Glick *et al.*, 2010). Er wurde 1963 von Christian de Duve geprägt (Ravikumar *et al.*, 2010b). Die Autophagie stellt das dynamische „Recyclingsystem“ der Zelle dar, das zelleigenes zytosolisches Material wie fehlgefaltete Proteine oder geschädigte Organellen, aber auch intrazelluläre Bakterien, abbaut (Mizushima und Komatsu, 2011). Es gibt verschiedene Arten

der Autophagie: man unterscheidet die Makro-, von der Mikro- und der Chaperon-vermittelten Autophagie (Glick *et al.*, 2010). Im Folgenden soll die Makroautophagie beschrieben werden, die gemeinhin als „Autophagie“ bezeichnet wird.

Unter nährstoffreichen Bedingungen kann eine basale Autophagieaktivität in Leberzellen beobachtet werden, die circa 1-1,5% der zellulären Proteine pro Stunde umsetzt (Mizushima und Komatsu, 2011). Diese dient als Qualitätskontrolle und wirkt zytoprotektiv durch den Abbau von Proteinaggregaten und beschädigten Organellen (Ravikumar *et al.*, 2010b). Außerdem ist die Autophagie in Umbauprozesse sowie in die Differenzierung und Entwicklung des Organismus, zum Beispiel während der Embryogenese, involviert. In Mangelsituationen wird die Autophagie stimuliert und stellt durch die Bereitstellung von Proteinen und Energie einen wichtigen Überlebensmechanismus dar (Mizushima und Komatsu, 2011). Eine Aktivierung der Autophagie zeigt sich auch als Reaktion auf anderen Umweltstress, zum Beispiel Hypoxie, oxidativer Stress, Bestrahlung und Chemotherapeutika. Ferner wird der Autophagie ein Mitwirken bei der Regulation der Selbsttoleranz des Immunsystems und ein „anti-aging“-Effekt zugesprochen. Eine Störung der Autophagie wird bei vielen verschiedenen Krankheitsbildern, etwa neurodegenerativen Erkrankungen, Infektionen und Krebsleiden beobachtet (Yang und Klionsky, 2010).

1.3.2 Mechanismus

Zu Beginn der Autophagie entsteht die Isolationsmembran, auch Phagophore genannt. Die Herkunft der Membranbestandteile der Phagophore ist unklar. Als Quellen werden das endoplasmatische Retikulum (ER) (Hayashi-Nishino *et al.*, 2009; Yla-Anttila *et al.*, 2009), der Golgi-Apparat (Ohashi und Munro, 2010), die Plasmamembran (Ravikumar *et al.*, 2010a), die äußere Mitochondrienmembran (Hailey *et al.*, 2010), die Kernhülle und eine de novo-Synthese diskutiert (Glick *et al.*, 2010). Die Isolationsmembran verlängert sich und schließt sich unter Einbezug einer kleinen Portion Zytoplasma inklusive Zytoplasmabestandteilen zum Autophagosom. Das Autophagosom hat eine Doppelmembran. Als nächster Schritt verschmilzt das Autophagosom mit einem Lysosom zum Autophagolysosom. Das enthaltene Material sowie die innere Membran werden abgebaut und die Abbauprodukte, wie zum Beispiel Aminosäuren, werden ins Zytoplasma entlassen und können dort wiederverwendet werden (Abbildung 1).

Ein wichtiger Teil des Autophagiemechanismus ist die Prozessierung eines Proteins, das als Mikrotubuli-assoziierte Protein Leichtkette-3 (LC3) bezeichnet wird. Es gibt drei Isoformen LC3A, LC3B und LC3C (Koukourakis *et al.*, 2015). Das im Zytosol vorkommende LC3B wird zu LC3B-I gespalten und danach zu LC3B-II verarbeitet. LC3B-II wird in die innere und äußere Membran der Phagophore eingebaut und hat dort eine Funktion bei der Hemifusion der Membranen und der Auswahl der Fracht (Glick *et al.*, 2010). Nach der Fusion mit dem

Einleitung

Lysosom wird LC3B-II von der äußeren Membran des Autophagosoms entfernt und die innere Membran wird inklusive LC3B-II abgebaut. Dadurch enthalten Autophagolysosomen einen geringen Teil LC3B. Das LC3 Monitoring gilt als wichtige Methode bei der Analyse der Autophagieaktivität (Mizushima *et al.*, 2010).

Neben dieser unspezifischen Autophagie gibt es auch eine selektive Autophagie. Darunter fällt der Abbau von p62, auch Sequestosome 1 (SQSTM1) genannt, welches ein multifunktionales Adaptermolekül und spezifisches Substrat der Autophagie darstellt. Es reagiert direkt mit LC3 an der Isolationsmembran und wird in das Autophagosom inkorporiert und abgebaut. Eine Beeinträchtigung der Autophagieaktivität führt zur Akkumulation von p62 (Mizushima und Komatsu, 2011). Der Abbau von p62 wird beim Monitoring der Autophagie verwendet (Mizushima *et al.*, 2010).

Ebenfalls zur selektiven Autophagie gehört der Abbau von dysfunktionalen Mitochondrien. Dieser Vorgang wird als Mitophagie bezeichnet. Da bereits bei einer intakten oxydativen Phosphorylierung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, kommt es bei einer inhibierten beziehungsweise gestörten Atmungskette zu einer vermehrten Produktion von ROS. Daher ist eine ungestörte Autophagieaktivität für die Funktion und die genetische Integrität der Mitochondrien essentiell. Durch eine gestörte Mitophagie kann es zur Akkumulation defekter Mitochondrien und in der Folge zur Akkumulation von ROS in der Zelle kommen. ROS können die Zelle durch ihre geno- und cytotoxischen Eigenschaften schädigen (Kim *et al.*, 2007).

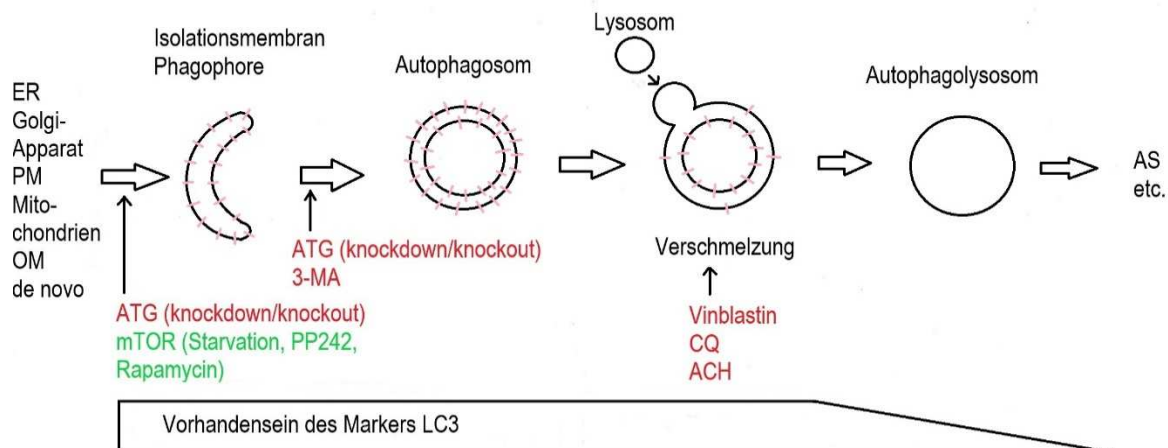


Abbildung 1: Ablauf der Autophagie nach Mizushima *et al.* (2010)

Bildung der Isolationsmembran beziehungsweise Phagophore aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Golgi-Apparat, der Plasmamembran (PM), der äußeren Mitochondrienmembran („outer membran“, OM) oder de novo. Durch Verlängerung und Schluss der Isolationsmembran entsteht das Autophagosom. Das Autophagosom verschmilzt mit einem Lysosom zum Autophagolysosom. Im Autophagolysosom werden die umschlossenen Zytoplasmabestandteile abgebaut (Aminosäuren (AS) etc.). Ausgewählte Regulationsmöglichkeiten: rot= Autophagieinhibitoren (autophagieassoziiertes Gen („autophagy related gene“, ATG), Chloroquin (CQ), Ammoniumchlorid (ACH), 3-Methyladenin (3-MA)), grün= Autophagieinduktoren („mechanistic target of rapamycin“ (mTOR), PP242 (Torkinib), „Starvation“ (Mangel an Nährstoffen)). rosa Striche= Mikrotubuli-assoziierte Protein Leichtkette-3B-II (LC3B-II)

1.3.3 Regulation und Modifikationsmöglichkeiten

Die Regulation der Autophagie ist komplex und noch nicht abschließend untersucht beziehungsweise verstanden. Die Autophagieregulation erfolgt über Transkriptionsfaktoren, epigenetisch über Histonmodifikationen, Mikroribonukleinsäure (miRNA), posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Acetylierung sowie Protein-Protein-Interaktionen (Feng *et al.*, 2015).

Es wurden 32 autophagieassoziierte Gene („autophagy related gene“, ATG) in Hefezellen gefunden; davon sind viele bis zu den Säugetieren konserviert (Tsukada und Ohsumi, 1993; Nakatogawa *et al.*, 2009). Die meisten ATG werden in Stresssituationen hochreguliert (Bernard *et al.*, 2015).

Experimentell kann eine Inhibition der Autophagie auf genomischer Ebene durch „knockdown/knockout“ der ATG mittels Ribonukleinsäure (RNA)-Interferenz oder durch den Einsatz von dominant negativen Autophagieproteinmutanten erreicht werden (Abbildung 1). Dabei ist aber zu beachten, dass die ATG-Proteine nicht völlig spezifisch für den Autophagiemechanismus zu sein scheinen, sondern auch autophagieunabhängige Funktionen haben (Mizushima *et al.*, 2010). Zum Beispiel ist Beclin1 bei der Autophagie und der Apoptose beteiligt (Swart *et al.*, 2016). Generell besteht ein enges Zusammenspiel zwischen Autophagie und Apoptoseinduktion. In den meisten Fällen inhibiert die Autophagie die Apoptose durch Abbau von Proteinaggregaten, Abbau von p62 und Mitophagie (Marino *et al.*, 2014). Die beiden Signalwege können aber auch synergistisch den Zelltod auslösen (Eisenberg-Lerner *et al.*, 2009). Dabei geht die Autophagie der Apoptose oft voran. Durch die

gleichen Regulatoren wird die Autophagie und die Apoptose dabei sequentiell aktiviert (Marino *et al.*, 2014).

Verschiedene chemische Verbindungen bewirken eine Inhibition oder Induktion der Autophagie und werden in der Forschung zu diesem Zweck eingesetzt (Abbildung 1). Das Medikament Chloroquin (CQ) aus der Malariatherapie und der Behandlung von Autoimmunkrankheiten bekannt, verhindert die Ansäuerung im Lysosom und hemmt somit die lysosomale katalytische Wirkung (Poole und Ohkuma, 1981; Cui *et al.*, 2013).

Der stärkste Induktor der Autophagie ist das Hungern der Zellen, im Englischen als „Starvation“ (Mangel an Nährstoffen) bezeichnet. Die Induktion der Autophagie durch „Starvation“ wird über die Inhibition von mTOR („mechanistic target of rapamycin“) vermittelt (Mizushima *et al.*, 2010). mTOR ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase, die eine zentrale Rolle in der Autophagieregulation spielt. mTOR ist aber auch an anderen Signalwegen beteiligt und reagiert auf Wachstumssignale, Nährstoffsignale und den Energiestatus (Yang und Klionsky, 2010). Weitere Induktoren der Autophagie, wie zum Beispiel Rapamycin und PP242 (Torkinib), wirken ebenfalls über eine Inhibition von mTOR und somit auch nicht spezifisch auf die Autophagie (Mizushima *et al.*, 2010).

Ein Hauptproblem in der Forschung und bei dem Einsatz von Autophagie-Inhibitoren/Induktoren in der Therapie ist, dass die zur Zeit verfügbaren Mittel und Methoden nicht ausschließlich auf die Autophagie wirken, sondern weitere, zum Teil unbekannte, Effekte in den Zellen auslösen (Mizushima *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013b).

1.3.4 Die Rolle der Autophagie bei Tumorerkrankungen

Die Rolle der Autophagie bei Tumorerkrankungen wird kontrovers diskutiert. Zum einen wirkt die Autophagie über die Inhibition von Entzündungen, einer Vermeidung von Tumorzellnekrosen, der Beseitigung von p62 und der Förderung der Genomstabilität als Tumorsuppressor. Zum anderen nutzen Tumorzellen die Autophagie als Überlebensmechanismus durch den Schutz vor Zellstress unterschiedlicher Genese, wie zum Beispiel Hypoxie, Nährstoffmangel, Verlust von Wachstumsfaktoren, Bestrahlung und Medikamente (Cui *et al.*, 2013).

Die Rolle der Autophagie scheint abhängig von den zellulären und den extrazellulären Bedingungen, dem Tumorstadium, dem Zelltyp und dem genetischen Hintergrund zu variieren. In der frühen Onkogenese scheint die Autophagie als Tumorsuppressor zu wirken und bei bestehenden Tumoren schützt die Autophagie die Tumorzellen (White, 2012).

Durch ein deletiertes ATG, zum Beispiel Beclin1, und der dadurch resultierenden Inhibition der Autophagie in der frühen Embryogenese, entsteht ein erhöhtes Risiko Tumoren zu entwickeln. Mäuse mit einem homozygoten „knockout“ im Beclin1 Gen sind embryonal letal. Bei einem heterozygoten Ausfall besteht bei den Mäusen eine hohe Inzidenz, spontan Tumore zu

Einleitung

entwickeln. Beclin1, ein wichtiges ATG, wirkt also als Tumorsupressor während der Embryogenese der Mäuse (Yue *et al.*, 2003). Auch bei humanen Tumoren findet sich oft eine monoallele Deletion im Beclin1 Gen (Liang *et al.*, 1999).

Bei der RAS-(Rat sarcoma) gesteuerten Onkogenese sind die Tumorzellen auf eine gesteigerte basale Autophagieaktivität angewiesen. Eine Deletion von ATG 5 oder ATG 7 kann eine solche Onkogenese unterdrücken. Somit wirkt eine Inhibition der Autophagie in diesem Fall der Onkogenese entgegen (Guo *et al.*, 2011). Aber auch bei Tumorzellen, die unabhängig von RAS entstanden sind, wird eine erhöhte basale Autophagie beobachtet. Die Tumorzellen sind aufgrund eines erhöhten Bedarfs an Nährstoffen und schlechter Bedingungen, zum Beispiel Hypoxie durch schnelles Wachstum, stark auf die Autophagie angewiesen (Yang *et al.*, 2011).

In Tumorzellen ist der Metabolismus oft verändert, verbunden mit einer Apoptoseresistenz (Devarajan *et al.*, 2002). Apoptosedefiziente Tumorzellen können einen caspaseunabhängigen Zelltod sterben. Dieser caspaseunabhängige Zelltod wird zum Teil über ROS aus geschädigten Mitochondrien vermittelt. Eine Induktion der Autophagie wird von diesen Tumorzellen als Überlebensmechanismus eingesetzt (Jain *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu kann eine Induktion der Autophagie in apoptosedefizienten Tumorzellen aber auch zum Zelltod durch eine übermäßige Autophagie („autophagic cell death“, ACD) führen (Hrzenjak *et al.*, 2008). Jedoch ist die Existenz des ACD umstritten (Ravikumar *et al.*, 2010b; Marino *et al.*, 2014; Swart *et al.*, 2016). Da die Akkumulation der Autophagosomen, die vor dem Untergang der Zelle beschrieben wird, Ausdruck einer induzierten oder einer blockierten Autophagie sein kann, kann dies zu Interpretationsfehlern führen (Marino *et al.*, 2014). Außerdem könnten die autophagieunabhängigen Funktionen der Autophagieeffektormoleküle beziehungsweise der ATG auslösend für den Zelltod sein (Ravikumar *et al.*, 2010b).

Da die Autophagie komplex reguliert wird, sie eng mit anderen Signalwegen, zum Beispiel den Zelltod, über gleiche Effektormoleküle verbunden ist, die verfügbaren Medikamente zur Beeinflussung der Autophagie ebenfalls nicht spezifisch sind und die Experimente zum Teil unterschiedlich aufgebaut sind, kommt es zu kontroversen Ergebnissen bei dem Versuch der Beeinflussung der Autophagie in der onkologischen Therapie (Ravikumar *et al.*, 2010b; Maycotte *et al.*, 2012). Einige Arbeitsgruppen unterstützen die These, dass durch eine Inhibition der Autophagie der Schutzmechanismus der Tumorzellen blockiert wird und damit die Resistenz einiger Tumorarten gegen Chemotherapeutika und Bestrahlung durchbrochen werden kann (Sotelo *et al.*, 2006; Amaravadi *et al.*, 2007). Zusätzlich kann die Inhibition der Autophagie zum Zelltod mancher Tumorzellen führen (Wu *et al.*, 2009).

Andere Studien zeigen wiederum, dass über eine Induktion der Autophagie die Onkogenese unterdrückt werden kann, ACD ausgelöst werden kann und die Tumorzellen besser auf Chemotherapeutika und Bestrahlung reagieren (Liang *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2006; Treeck *et*

al., 2006; Crazzolara *et al.*, 2009). Durch diese kontroversen Ergebnisse wäre eine Selektion der Tumore, zum Beispiel nach ihrer Onkogenese, vor der Behandlung ratsam, um die beste Behandlung zu erzielen. Ungeklärt ist noch, welche Nebenwirkungen durch eine Inhibition der Autophagie auftreten könnten, da die Autophagie auch in den restlichen Körperzellen ein wichtiger Mechanismus ist (White, 2012).

1.3.5 Die Bedeutung der Autophagie im CCC

Die Rolle der Autophagie ist unter anderem durch die klinische und genetische Heterogenität im CCC wenig verstanden. Es konnte bislang gezeigt werden, dass eine hohe Expression von „Autophagy and Beclin1 Regulator1“ (Ambra1), ein Indikator für die Autophagie, in humanen perihilären und distalen CCC-Gewebe, mit dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen und einer geringeren Überlebensrate für die CCC-Patienten korreliert. Die Expression von Ambra1 korreliert dabei positiv mit der Expression von SNAIL, einem Haupttranskriptionsfaktor der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Außerdem konnte in den CCC-Zelllinien CCKS1 und HuCCT1 während „Starvation“ eine Zunahme von LC3, eine gesteigerte Expression von Ambra1 und eine induzierte Invasion der CCC-Zellen gezeigt werden. Wurden diese Zellen zusätzlich mit CQ behandelt, wurde die Invasionsfähigkeit der Zellen inhibiert. Diese Ergebnisse lassen eine Verbindung der Autophagieaktivität mit der Malignität des CCC und der Prognose vermuten. Zusätzlich könnte die Autophagie eine Verbindung zur EMT-vermittelten Invasion von CCC-Zellen haben (Nitta *et al.*, 2014).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass primäre Tumorzellen, isoliert aus intrahepatischen CCC, eine höhere Expression von Autophagiegenen sowie Autophagieproteinen und konsekutiv eine gesteigerte Autophagieaktivität aufweisen als normale Cholangiozyten. Eine pharmakologische Inhibition der Autophagie inhibiert das Wachstum etablierter Tumoren in Nacktmäusen und führt in den CCC-Zelllinien QBC939 (perihilär), RBE (intrahepatisch) und HCCC9810 (intrahepatisch) während „Starvation“ zu einer gesteigerten Apoptoserate, einer Inhibition der Proliferation und Zellzyklusarrest. Außerdem verbessert die Inhibition der Autophagie die Chemosensitivität von CCC-Zellen (Hou *et al.*, 2011).

In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Pflanzeninhaltsstoff Oblongifolin C durch eine Inhibition der Autophagie und Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion Apoptose in der CCC-Zelllinie QBC939 induziert. Wird die Autophagie noch zusätzlich mit 3-Methyladenin (3-MA) inhibiert, werden die Effekte noch verstärkt. Eine Induktion der Autophagie mit Rapamycin in den mit Oblongifolin C behandelten CCC-Zellen führt wiederum dazu, dass die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und die Apoptoserate abnimmt (Zhang *et al.*, 2016).

Zusammenfassen scheint eine gesteigerte Aktivität der Autophagie im CCC einen protektiven Effekt auf das Tumorwachstum auszulösen und eine Inhibition dieser Autophagieaktivität ein möglicher therapeutischer Ansatz für die Behandlung betroffener Patienten zu sein.

1.4 Salinomycin

1.4.1 Eigenschaften und Anwendung von SAL

Salinomycin (SAL) ist ein Polyether Antibiotikum, das 1974 vom *Streptomyces albus* Stamm Nummer 80614 isoliert wurde (Miyazaki *et al.*, 1974). Die chemische Strukturformel von SAL ist in Abbildung 2 dargestellt. SAL hat ein Molekulargewicht von 751 Dalton und ist eine schwache Säure. SAL ist lipidlöslich, der Schmelzpunkt liegt bei 113°C und die Ultraviolett (UV)-Absorption bei 285 Nanometern (Miyazaki *et al.*, 1974).

Seine Wirksamkeit als Antibiotikum entfaltet SAL als Ionenaustauscher mit einer Präferenz für Alkaliionen, vor allem Kaliumionen. Das bedeutet, es wirkt als mobiler Träger und erleichtert somit den Ionentransport durch biologische Membranen (Mitani *et al.*, 1975).

SAL wirkt antibiotisch gegen Gram-positive Bakterien inklusive vieler antibiotikaresistenter *Streptomyces*arten, Mykobakterien und *Staphylococcus aureus*. Außerdem wirkt es gegen einige fadenförmige Pilze, ist antiparasitisch, antiviral und entzündungshemmend (Miyazaki *et al.*, 1974; Dewangan *et al.*, 2017). SAL ist auch wirksam gegen Malaria (Mehlhorn *et al.*, 1984; D'Alessandro *et al.*, 2015). Bei Hunden bewirkt SAL einen gesteigerten Herzauswurf, einen Anstieg des Blutdrucks, eine verbesserte Kontraktion des linken Ventrikels, eine Verbesserung der myokardialen Durchblutung und der mechanischen Effizienz des Herzens (Fahim *et al.*, 1986).

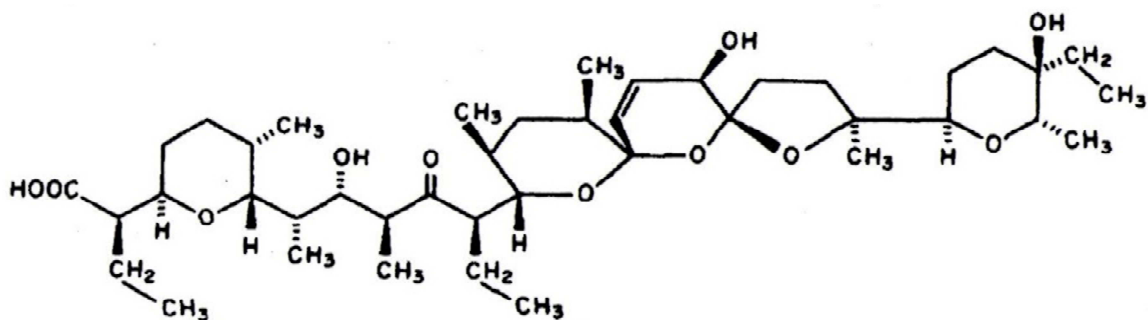


Abbildung 2: Strukturformel von Salinomycin (Kinashi *et al.*, 1973)

SAL wird nach oraler Aufnahme im Gastrointestinaltrakt absorbiert und zeigt eine gute Verteilung im Gewebe, beginnend im Fettgewebe, danach in der Leber und Muskulatur (Henri *et al.*, 2012). SAL überwindet, im Gegensatz zu anderen Antibiotika, wie zum Beispiel

Einleitung

Clindamycin, die Blut-Hirn-Schranke (Zhou *et al.*, 2013). Die schnelle Elimination, beim Huhn innerhalb von 24 Stunden, findet hauptsächlich über die Leber statt (Dimenna *et al.*, 1990; Henri *et al.*, 2012).

SAL wird eine geringe therapeutische Breite zugeschrieben (Zhou *et al.*, 2013). Dies zeigt sich anhand zahlreicher Publikationen über akzidentelle SAL-Intoxikationen. Mit einer mittleren letalen Dosis (LD50) von 0,6 µg/kg Körpergewicht sind Pferde am sensibelsten für SAL. Die häufigsten klinischen Symptome einer SAL-Intoxikation beim Pferd sind Gangataxie und Schwäche bis hin zum Festliegen. Bei überlebenden Pferden persistieren die Schwäche und die Gangataxie, zusätzlich entwickeln die Tiere eine Muskelatrophie. Histologisch wurden Schäden an den neuronalen Zellen der dorsalen Nervenwurzel gefunden (Aleman *et al.*, 2007). Bei Katzen ist das Krankheitsbild von einer distalen Polyneuropathie und einer Muskeldegeneration geprägt (van der Linde-Sipman *et al.*, 1999; Pakozdy *et al.*, 2010). Auch Boehmerle und Endres (2011) konnten die Neurotoxizität von SAL an Neuronen aus den Spinalganglien von Ratten zeigen. Bei Schweinen ist die Muskeldegeneration mit dunkel verfärbten Urin ein typisches Symptom für eine SAL-Intoxikation (Plumlee *et al.*, 1995). Bei Wiederkäuern kommt es zum kongestiven Herzversagen, ausgelöst durch eine Kardiomyolyse (Omidi *et al.*, 2010; Ashrafihelan *et al.*, 2014). Mit einer LD50 von 108 beziehungsweise 104 mg/kg Körpergewicht sind Broiler beziehungsweise Legehennen vergleichsweise unempfindlich gegenüber SAL (Rajaiian *et al.*, 2009). Die vorrangigen Symptome einer SAL-Intoxikation bei Masthähnchen und Puten sind Ataxie, Paralysen, Bewegungsunlust, Fressunlust und Wachstumsrückgang bis hin zum Tod der Tiere (Konstantinos *et al.*, 2013). Bei Mäusen wird eine dosisabhängige Toxizität auf die männlichen Geschlechtsorgane beobachtet (Ojo *et al.*, 2013). Beim Menschen gibt es einen Fallbericht über eine akzidentelle SAL-Intoxikation. Der betroffene männliche Patient, der in der Futtermittelindustrie gearbeitet hat, litt anfangs unter Tachykardie, Schwitzen und Schmerzen und im späteren Verlauf unter einer Rhabdomyolyse (Story und Doube, 2004). Klinisch zeigte sich ein Anstieg der Retentionsparameter und der Kreatininkinase.

Nach seiner Entdeckung durch Mijazaki *et al.* (1974) wurde SAL als Antikokzidium in der Geflügelindustrie (Danforth *et al.*, 1977) und zur Mastleistungssteigerung bei Wiederkäuern und Schweinen (Lindemann *et al.*, 1985; Callaway *et al.*, 2003) eingesetzt. Da die Antibiotika zur Mastleistungssteigerung in einer Dosierung unter der therapeutischen Dosis eingesetzt wurden, trug dies zur Resistenzentwicklung bei den Bakterien bei. Deswegen wurde als Maßnahme zur Bekämpfung der Resistenzbildung in Mikroorganismen der Einsatz von SAL und anderen Antibiotika zur Mastleistungssteigerung 2006 mit der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung europaweit verboten.

In der Humanmedizin fand SAL bislang keine therapeutischen Anwendungen. Der Durchbruch in der onkologischen Grundlagenforschung gelang SAL 2009, als Gupta *et al.* zeigen konnten, dass SAL selektiv Mammakarzinomstammzellen abtötet. Im Rahmen eines Screeningprogramms zur Identifikation von neuen Stammzellinhibitoren stellte sich SAL als die potenteste Substanz dar. Die selektive Wirksamkeit gegen Mammakarzinomstammzellen konnte sowohl *in vitro* als auch in einem Tiermodell gezeigt werden. SAL ist dabei über einhundertfach effektiver als Paclitaxel, das bei Patienten mit Mammakarzinom klinisch zum Einsatz kommt. Die Fähigkeit, Tumorstammzellen abtöten zu können ist von Bedeutung, da dieser Tumorzellsubpopulation besondere Eigenschaften zugeschrieben werden. Sie sind definiert als eine Population von Zellen innerhalb eines Tumors, die resistent gegen gängige Chemo- und Radiotherapien sind und durch ihr selbsterneuerndes Potential in der Lage sind, neue Tumoren auszubilden beziehungsweise für die Metastasierung der Tumoren verantwortlich zu sein (Liu *et al.*, 2007; Naujokat und Steinhart, 2012). Seit der Erstbeschreibung von SAL als Stammzellinhibitor (Gupta *et al.*, 2009) wurde die Wirksamkeit des Präparats in vielen verschiedenen soliden und nicht soliden Tumorentitäten erforscht. SAL ist unter anderem wirksam im Prostatakarzinom (Kim *et al.*, 2011), Magenkarzinom (Li *et al.*, 2016), Glioblastom (Xipell *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017a), Osteosarkom (Kim *et al.*, 2016) und in Leukämiezellen (Fuchs *et al.*, 2009).

SAL induziert in verschiedenen Tumorentitäten unterschiedliche Arten des Zelltods. In Kolonkarzinom- und Mammakarzinomzellen wird ein durch Beeinflussung der Autophagieaktivität vermittelter Zelltod diskutiert (Verdoodt *et al.*, 2012), in Ovarialkarzinomzellen kommt es zu einer caspaseabhängigen Induktion der Apoptose (Kaplan und Teksen, 2016) und in Glioblastomzellen zur programmierten Nekrose (Xipell *et al.*, 2016). Jangamreddy *et al.* (2013) vermuten, dass es abhängig von der SAL-Dosis zur Apoptose- oder Nekroseinduktion kommt. Initial wurde der Wirksamkeitsnachweis von SAL überwiegend in Zellkulturversuchen gezeigt. Zuletzt erschienen aber immer mehr Publikationen, in denen die Wirksamkeit von SAL in einem entsprechenden Tiermodell bestätigt werden konnte (Wang *et al.*, 2012).

1.4.2 Wirksamkeit von Salinomycin im CCC

Über den Einsatz von Salinomycin im CCC sind bislang 2 Veröffentlichungen erschienen. Neben morphologischen Veränderungen inhibiert SAL die Migrations- und Proliferationsfähigkeit humaner CCC Zellen dosis- und zeitabhängig. Darüber hinaus induziert SAL in diesen apoptoseresistenten Zellen den programmierten Zelltod über einen bislang unbekanntem Mechanismus. (Lieke *et al.*, 2012). In einer neueren Arbeit konnte gezeigt werden, dass SAL die Doxorubicinsensitivität humaner CCC-Zellen durch Inhibition der EMT erhöht (Yu *et al.*, 2017b).

1.4.3 Wirkungsweise von Salinomycin

Trotz intensiver Forschung konnte der molekulare Wirkmechanismus von SAL bis heute nicht eindeutig geklärt werden. In den verschiedenen Tumorentitäten, in denen SAL wirksam ist, wurden verschiedene Mechanismen gefunden, die die Wirkungsweise von SAL erklären könnten. Am Häufigsten konnten eine Inhibition des „wingless-type-1“ (Wnt)-Signalwegs und eine Interferenz mit der Autophagieaktivität durch SAL beobachtet werden. Zusätzlich gibt es Publikationen zur Wirkung von SAL durch die Hemmung des „Adenosintriphosphat binding cassette“ (ABC)-Transporters P-Glycoprotein (Riccioni *et al.*, 2010), durch eine direkte Beeinflussung der Mitochondrien durch die Eigenschaft als Ionophore (Mitani *et al.*, 1976; Jangamreddy *et al.*, 2013; Manago *et al.*, 2015), durch die EMT-Inhibition (Yu *et al.*, 2017b), durch die Hemmung des „hedgehog“-Signalwegs (He *et al.*, 2015) und durch Histonmodifikation (Al Dhaheri *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2015).

Eine Inhibition des Wnt-Signalwegs durch SAL konnte zum Beispiel im kolorektalem Karzinom (Klose *et al.*, 2016), im epithelialen Ovarialkarzinom (Li *et al.*, 2017), in lymphatischen Leukämiezellen (Lu *et al.*, 2011), im Mammakarzinom sowie im Prostatakarzinom (Lu und Li, 2014) gezeigt werden.

Die Ergebnisse zur Beeinflussung der Autophagieaktivität durch SAL variieren in verschiedenen Untersuchungen und Tumorentitäten. Die Autophagie kann durch SAL induziert werden und als Zellschutzmechanismus wirken. Dabei ist die Autophagieinduktion ein Nebeneffekt, der den durch SAL ausgelösten Zelltod hemmt. In Mammakarzinomstammzellen löst SAL durch eine gesteigerte Produktion von ROS oxidativen Stress aus. Dies führt zur mitochondrialen Dysfunktion. Zusätzlich wird die Autophagie in diesen Zellen induziert und wirkt als Zellschutzmechanismus. Eine Inhibition der Autophagie in diesen Zellen führt zu einer gesteigerten Apoptoserate. Die Behandlung mit dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) schwächt die SAL-vermittelte Apoptose- und Autophagieinduktion ab (Kim *et al.*, 2017a). Dieser Effekt konnte auch in Prostatakarzinomzellen und Osteosarkomzellen beobachtet werden (Kim *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017b). Zudem induziert SAL Apoptose und Autophagie in Gliomzellen über ER-Stress vermittelt durch eine Akkumulation von ROS. Der ER-Stress führt zum einen zum Zelltod durch die Induktion der Apoptose und zum anderen wird der Zelltod gehemmt durch die Induktion der Autophagie (Yu *et al.*, 2017a). In Bronchialkarzinomzellen induziert SAL ER-Stress und dadurch die Autophagie, die einen positiven Effekt auf das Überleben der Tumorzellen hat (Li *et al.*, 2013a).

In Kolonkarzinom- und Mammakarzinomzellen konnte nach der Behandlung mit SAL eine starke Zunahme der Autophagiekompartimente beobachtet werden, sodass die übermäßige

Einleitung

Autophagieaktivierung als alternativer Zelltod (ACD) unabhängig vom caspasevermittelten Zelltod diskutiert wird (Verdoodt *et al.*, 2012).

Eine Untersuchung von Jangamreddy *et al.* (2015) postuliert, dass SAL in niedrigen Konzentrationen zu einer Induktion der Autophagie führt. Die Definition der niedrigen Dosis ist dabei vom Zelltyp abhängig. In hohen Dosen inhibiert SAL dann die Autophagie, wobei nicht die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen gestört wird. Die Wirksamkeit von SAL ist konzentrations-, zeit- und zelltypabhängig (Jangamreddy *et al.*, 2015).

In Verbindung mit anderen Effekten wird auch über eine Inhibition der Autophagie durch SAL berichtet. In Mammakarzinomzellen und Mammakarzinomstammzellen/Progenitorzellen inhibiert SAL die Autophagie und lysosomale proteolytische Aktivität. Eine zusätzliche Inhibition durch „knockdown“ essentieller ATG unterstützt die SAL-vermittelte Hemmung der Proliferation von Mammakarzinomstammzellen (Yue *et al.*, 2013).

In Glioblastom(stamm)zellen wirkt SAL durch Induktion von ER-Stress zytotoxisch. Dabei blockiert SAL den Autophagiefluss, stört das mitochondriale Membranpotential und führt dadurch zur Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran. Intermembranproteine gelangen aus den Mitochondrien in das Zytosol und die Produktion von ROS steigt an. Eine Zugabe von NAC verbessert die Überlebenschancen der Zellen nicht (Xipell *et al.*, 2016).

Im HCC konnte der direkte Zusammenhang zwischen der durch SAL ausgelösten Apoptose und einer Inhibition der Autophagie gezeigt werden. Es kommt zur zeit- und dosisabhängigen Akkumulation von Autophagiesubstraten, einer Akkumulation von dysfunktionalen Mitochondrien und einer Akkumulation von ROS (Klose *et al.*, 2014). Dass SAL in CCC-Zellen wirksam ist konnte bereits gezeigt werden (Lieke *et al.*, 2012). Aufbauend auf die Studie von Klose *et al.* (2014), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob in CCC-Zellen ebenfalls eine Beeinflussung der Autophagieaktivität Teil des Wirkmechanismus sein könnte.

2 Ziel der Dissertation

Das CCC gehört beim Menschen und beim Tier zu den Tumorerkrankungen mit der schlechtesten Prognose. Das liegt insbesondere an der späten Diagnosestellung in einem bereits fortgeschrittenen Stadium und den konsekutiv eingeschränkten Therapieoptionen. Einzig die vollständige chirurgische Resektion stellt einen kurativen Therapieansatz dar. Eine nachhaltig wirksame Chemotherapie steht gegenwärtig nicht zur Verfügung. Daher sind innovative Therapien von fundamentaler Bedeutung. Lieke *et al.* (2012) haben zeigen können, dass die Exposition von humanen CCC-Zellen mit SAL zur Inhibition der Tumorzellproliferation und -migration führt. Darüber hinaus überwindet SAL die Apoptoseresistenz der Zellen und bewirkt eine Akkumulation des Zellzyklus. Basierend auf diesen Daten scheint SAL ein potentieller Kandidat für die Therapie des CCC zu sein. Der zu Grunde liegende molekulare Wirkmechanismus ist jedoch bisher nicht untersucht worden.

Klose *et al.* (2014) konnten im HCC zeigen, dass die Apoptoseinduktion durch SAL in HCC-Zellen mit der Inhibition der Autophagie, einer Akkumulation von dysfunktionalen Mitochondrien und gesteigerter ROS-Produktion einhergeht. Hou *et al.* (2011) und Zhang *et al.* (2016) haben gezeigt, dass eine Inhibition der Autophagie auch in CCC-Zellen zur Apoptoseinduktion führt. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen der Autophagieinhibition und der Apoptoseinduktion durch SAL in CCC-Zellen bestehen.

Ferner liegen keine Daten zur Wirksamkeit von SAL in einem Tiermodell vor, was die Voraussetzung für einen potentiellen klinischen Einsatz der Substanz ist.

Die Ziele dieser Dissertation umfassten daher einerseits, den Wirkmechanismus von SAL im humanen CCC zu untersuchen. Dabei wurde die Hypothese überprüft, ob SAL einen Einfluss auf die Autophagieaktivität der Tumorzellen hat. Andererseits sollte ein Mausmodell etabliert werden, um in weiterführenden Experimenten die Wirksamkeit von SAL im CCC in einem Tiermodell untersuchen zu können. Die Ergebnisse der Dissertation sind die Voraussetzung für die Evaluation eines potentiellen klinischen Einsatzes von SAL in der Therapie des CCC.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur und Stimulationslösungen

3.1.1 Zellkultur

Die beiden murinen CCC-Zelllinien p246 und p254 wurden isoliert aus einem murinen intrahepatischen CCC-Modell (Gurlevik *et al.*, 2013). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen T175 in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) kultiviert. Das Zellkulturmedium bestand aus RPMI 1640(1X)+Glutamax™-I, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml fetalem Kälberserum („fetal bovine serum“, FBS).

Die beiden humanen CCC-Zelllinien EGI-1 und TFK-1 entstammen humanen extrahepatischen CCC (Scherdin *et al.*, 1987; Saijyo *et al.*, 1995). Sie wurden in Zellkulturflaschen T175 in CCC Zellkultur-Medium bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Das Zellkultur-Medium bestand aus RPMI 1640(1X)+Glutamax™-I, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 50 ml FBS, 5 ml Natrium Pyruvat und 5 ml MEM NEAA (100x).

Die humanen und die murinen CCC-Zellen wurden 1-2 Mal die Woche gesplittet und in frischem Medium weiter kultiviert. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung („phosphat buffered saline“, PBS) gewaschen. Um die adhärenen Zellen abzulösen, wurden sie mit Accutase bei 37°C und 5% CO₂ abhängig vom Zelltyp für 10-30 Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen in ein Falcon überführt und abzentrifugiert (5 Minuten, 300 rcf). Das Zellpellet wurde mit Zellkulturmedium resuspendiert und es wurden 2-4 x 10⁶ Zellen in Zellkulturflaschen T175 rekultiviert.

Die Zellkulturmedien wurden bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

3.1.2 Stimulationslösungen

Salinomycin wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) zu einer 10 mM Stocklösung gelöst. PP242 wurde in DMSO zu einer 10 mM Stocklösung gelöst. CQ wurde für die Versuche am FACS und die Fluoreszenzmikroskopie in Aqua injectabilia und für die Western Blot und qPCR Versuche in PBS zu einer 1 mM Stocklösung gelöst. Die Stocklösungen wurden bei -20°C lichtgeschützt gelagert. Das „Starvation“-Medium bestand aus 500 ml RPMI-1640 Medium und 5 ml Penicillin/Streptomycin. Das „Starvation“-Medium versetzt die Zellen in eine Mangelsituation durch das Fehlen von Proteinen, Aminosäuren, Lipiden und Wachstumsfaktoren. Dadurch soll die Autophagie induziert werden. Das „Starvation“-Medium wurde bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

3.2 Proliferationstest

Das Maß der Vitalität der Zellen wurde über die metabolische Aktivität der Zellen mittels WST-1 Assay bestimmt. Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird durch metabolisch aktive Zellen zu Formazan gespalten. Die Menge an Formazan korreliert direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen und wurde mit dem Spektrometer bestimmt.

3.2.1 Stimulation der Zellen

Es wurden je 5×10^3 murine CCC-Zellen pro Ansatz in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend für 48 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM) stimuliert.

Für die Versuche mit N-Acetylcystein (NAC)-Präinkubation wurden je 5×10^3 humane CCC-Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend für 1 Stunde mit ansteigenden NAC-Konzentrationen (1-10 mM) vorbehandelt. Nach Abnahme des NAC, wurden die Zellen für 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM) stimuliert. Außerdem wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 µM DMSO für 24 Stunden stimuliert.

3.2.2 WST-1 Assay Protokoll

Die Wells wurden vorsichtig abgesaugt. Das WST-1 Reagenz wurde 1:10 mit humanem beziehungsweise murinem CCC-Zellkultur Medium verdünnt und jeweils 100 µl davon in jedes Well pipettiert. Die Proben wurden für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Absorption wurde im Infinite F200 PRO (microplate Reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Das Ausmaß der Fluoreszenz korreliert dabei mit der Proliferationsrate der Zellen.

3.3 Migration und Invasion

Um die Migrationsfähigkeit muriner CCC-Zellen nach Behandlung mit SAL zu analysieren, wurde ein Boydenkammer-Modell verwendet (Boyden, 1962). Die Invasionsfähigkeit der murinen CCC-Zellen nach Behandlung mit SAL wurde nach Repesh (1989) analysiert.

3.3.1 Stimulation der Zellen

Es wurden je 1×10^5 murine CCC-Zellen in die obere Kammer, bestückt mit einer Polycarbonatmembran mit 8 µm großen Poren, ausgesät. Für den Invasionsassay wurden die Membranen vorher mit Matrigel beschichtet. Die obere Etage enthielt murines CCC-Medium

ohne FBS und die untere Etage enthielt murines CCC-Medium mit 20% FBS. Dies dient als Migrationsreiz für die Zellen (Lieke *et al.*, 2012). Nach 24stündiger Inkubation, wurden die Zellen für 48 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) kultiviert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert. Außerdem wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 μM DMSO für 24 Stunden stimuliert.

3.3.2 Migrations- und Invasionsassay

Nach Abschluss der Inkubation wurden die auf der Oberseite der Membran adhären Zellen mit einem Wattestäbchen entfernt und die Membran wurde mit Kristallviolett gefärbt. Dann wurden mit dem Mikroskop Leica DM IL LED und der digitalen Farbkamera Leica EC3 Bilder von den einzelnen Membranen angefertigt. Anschließend wurden die migrierten Zellen an der Unterseite der Membran isoliert und im Fotometer (Infinite F200 PRO (microplate Reader)) die Absorption bei 540 nm gemessen.

3.4 Apoptose

Apoptotische Zellen sind durch mehrere morphologische Veränderungen gekennzeichnet. Dazu gehören der Verlust der Integrität der Plasmamembran, die Kondensation von Zytoplasma und Zellkern und die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmentierung (Kerr *et al.*, 1972). Um die Apoptoserate der murinen CCC-Zellen nach der Behandlung mit SAL zu analysieren wurden das AnnexinV apoptosis detection kit, das HT Titer TACS™ Assay Kit und das LDH Cytotoxicity Assay Kit verwendet.

3.4.1 AnnexinV Analyse im FACS („fluorescence activated cell sorting“)

In apoptotischen Zellen wird durch den Verlust der Membranintegrität das membranständige Phospholipid Phosphatidylserin vom inneren auf das äußere Blatt der Plasmamembran verlagert, so dass das phospholipidbindende Protein AnnexinV daran binden kann. Diese Bindung von AnnexinV ist ein sensibler Marker für apoptotische Zellen. Dieser Marker wird mit der Vitalfärbung PI (Propidiumiodid) kombiniert. Nur die Plasmamembran von toten beziehungsweise geschädigten Zellen ist permeabel für PI. Somit kann unterschieden werden zwischen intakten Zellen (AnnexinV-/PI-), einem frühen Stadium der Apoptose (AnnexinV+/PI-) und einem späten Stadium der Apoptose beziehungsweise bereits toten Zellen (AnnexinV+/PI+) (Koopman *et al.*, 1994; Vermes *et al.*, 1995). Für die AnnexinV Analyse im FACS wurde das AnnexinV apoptosis detection kit verwendet.

Es wurden je 5×10^5 murine CCC-Zellen pro Ansatz in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Zellen für je 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) stimuliert. Außerdem wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 μM DMSO für 24 Stunden stimuliert. Die Zellen wurden mit Accutase abgelöst und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 400 μL 1xBinding Puffer aufgenommen und in vier Portionen je 100 μL aufgeteilt. Daraus entstand ein Kontrollansatz, zu einem Ansatz wurden 5 μL AnnexinV, zu einem Ansatz 5 μL PI und zu einem Ansatz je 5 μL AnnexinV und PI hinzugegeben. Die Proben wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden je 400 μL 1xBinding Puffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben im FACS gemessen.

3.4.2 Quantitative Analyse der DNA-Fragmentierung

Für die Analyse der DNA-Fragmentierung wurde das HT Titer TACS™ Assay Kit verwendet. Das verwendete Kit beruht auf der „terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling“ (TUNEL)-Methode. Die durch die DNA Fragmentierung bei der Apoptose frei werdenden 3' Enden der DNA, werden mit markierten Nukleotiden versehen und diese werden dann sichtbar gemacht (Gavrieli *et al.*, 1992).

Es wurden je 1×10^4 murine CCC-Zellen pro Ansatz in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend für 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) stimuliert. Außerdem wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 μM DMSO für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurden je 50 μL Proteinkinase K pro Well pipettiert und für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben einmal mit Aqua injectabilia gewaschen. Als Positivkontrolle diente die Zugabe von 50 μL TACS-Nuclease™ und eine Inkubation von 30 Minuten bei 37°C . Währenddessen wurden die anderen Proben mit PBS bedeckt. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden pro Well 50 μL Peroxidlösung hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Aqua injectabilia gewaschen und je 150 μL pro Well 1xTdT Labeling Puffer für 5 Minuten dazugegeben. Danach wurde pro Well je 50 μL Labeling Reaktionspuffer pipettiert. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Dann wurde je 150 μL pro Well 1xTdT Stop Puffer dazugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Darauf folgte ein zweimaliger Waschschriff mit PBS. Anschließend wurden je 50 μL pro Well Strep-HRP Lösung pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte ein viermaliger Waschschriff mit PBS und Tween20. Danach wurden pro Well je 100 μL TACS-Sapphire hinzugegeben und bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 100 μL 2M HCL pro Well gestoppt. Die Absorption der Proben wurde im Fotometer (Infinite F200 PRO microplate Reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.4.3 LDH Freisetzung

Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein zytosolisches Enzym, das in vielen Zellen vorkommt. Verliert die Plasmamembran ihre Integrität bei der Apoptose, wird das Enzym in das Zellkulturmedium freigesetzt (Decker und Lohmann-Matthes, 1988). Zur Detektion der LDH im Zellkulturmedium wurde das LDH Cytotoxicity Assay Kit verwendet.

Es wurden pro Ansatz je 2×10^4 murine CCC-Zellen in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend für 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM) stimuliert. Außerdem wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit 0,1 µM DMSO für 24 Stunden stimuliert. Dann wurden 50 µL von jeder Probe in eine neue 96-Well-Platte überführt. Anschließend wurden 50 µL Reaktionsgemisch in jedes Well pipettiert und die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Das Reaktionsgemisch bestand aus 11,4 ml in Aqua injectabilia gelösten Substratgemisch und 0,6 ml Assay Puffer. Darauf folgend wurden 50 µL Stopplösung je Well pipettiert und die Absorption der Proben wurde im Fotometer (Infinite F200 PRO (microplate Reader)) bei 490 nm gemessen.

3.5 Western Blot

Um die Autophagieaktivität humaner CCC-Zellen nach der Stimulation mit SAL zu analysieren, wurde die LC3B- und p62-Proteinexpression mittels Western Blot semiquantitativ untersucht.

3.5.1 Stimulation der Zellen

Es wurden pro Ansatz je 2×10^6 humane CCC-Zellen in Zellkulturflaschen T25 ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 µM, 0,5µM, 2 µM, 10 µM), CQ (5µM, 20 µM) und PP242 (5µM) für unterschiedliche Zeiträume (24 Stunden, 1 Stunde) stimuliert. Bei aufeinanderfolgenden Stimulationen mit verschiedenen Reagenzien wurde das erste Reagenz abgenommen, bevor das zweite dazugegeben wurde.

3.5.2 Proteinisolation und -messung

Nach der gewünschten Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Accutase abgelöst und nochmal mit PBS gewaschen. Dann wurde Ripa Puffer (4,5 ml Aqua injectabilia, 500 µl Ripa buffer 10x, 1 Tablette Complete) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden gevortext und zehnmal durch eine U40 Insulin 1ml Spritze mit BD Microlance™3 (Kanüle 0,4mm x 19mm) gezogen. Die Proben wurden bei 11000 rpm abzentrifugiert. Der

Proteingehalt im Überstand wurde mit Hilfe eines BCA Kits und dem ELISA Reader gemäß den Angaben des Herstellers gemessen.

3.5.3 Western Blot Protokoll

Zuerst wurden die Proben wie folgt vorbereitet. Es wurden 60 µg Protein mit 6xLämmli sample buffer für 10 Minuten bei 95°C auf einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben und eine PageRuler™ Prestained Protein Ladder auf ein Fertiggel geladen und in einem Puffer aus 900 ml deionisiertes Wasser und 100 ml 10xTGS Puffer 1-2 Stunden bei 100 Volt entwickelt. Danach wurde das Gel auf eine Membran geblottet. Dabei wurde ein Puffer aus 700 ml deionisiertem Wasser, 100 ml 10xTGS Puffer und 200 ml Methanol verwendet. Der Stromgeber wurde für eine Stunde bei 100 Volt angeschaltet. Darauffolgend wurde die Membran für eine Stunde in 15 ml Milch auf dem Falcon Roller geblockt. Die Milch bestand aus 500 ml PBS, 37,5 g Skim milk powder und 500 µl Tween. Nach dem Blocken wurde die Membran über Nacht im Kühlraum bei 4°C auf dem Falcon Roller mit dem ersten Antikörper in 10 ml Milch inkubiert. Die Antikörper wurden in folgenden Konzentrationen verwendet: Beta-Aktin, Vinculin und LC3B 1:1000, p62 1:500. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal mit Milch gewaschen und dann eine Stunde mit dem zweiten Antikörper in 10 ml Milch auf dem Falcon Roller inkubiert. Diese wurden in einer Konzentration von 1:1000 benutzt. Anschließend wurde die Membran noch dreimal mit einer Lösung aus 500 ml PBS und 500 µl Tween gewaschen.

Die Membran wurde mit der Entwicklerlösung SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate beziehungsweise SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate beziehungsweise WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius (für CCD Systeme) entwickelt und mit Hilfe der Western Blot Chemilumineszenzkamera fotografiert.

3.5.4 Strippen einer Membran

Um dieselbe Membran mit einem weiteren Antikörper entwickeln zu können, muss diese vorher gestrippt werden. Dazu wurde die Membran dreimal mit Tween in PBS gewaschen und anschließend 5-15 Minuten in Restore™ Western Blot Stripping Buffer inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit Tween in PBS gewaschen. Nachdem die Membran 30-60 Minuten in Milch geblottet wurde, kann sie wie oben beschrieben mit dem gewünschten Antikörper entwickelt werden.

3.6 Messung der Autophagieaktivität mittels Cyto-ID®

Um die Autophagieaktivität humaner CCC-Zellen nach der Stimulation mit SAL zu analysieren, wurden die Autophagiekompartimente mittels Cyto-ID Detection Kit im Durchflusszytometer gemessen und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Dieser Assay beruht auf einer spezifischen Sonde, die Autophagiekompartimente färbt. Die Autophagieaktivität kann daher durch Quantifizierung der Akkumulation der Autophagiekompartimente unter basalen oder aktivierten Zellkulturbedingungen („Starvation“ oder PP242- Stimulation) nach Blockade der autophagolysosomalen Degradierung durch CQ oder ACH analysiert werden. Die Autophagieaktivität kann kalkuliert werden, indem die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Cyto-ID der Probe ohne CQ/ACH mit der MFI der Probe mit CQ/ACH unter jeder Zellkulturbedingung verglichen wird. Dafür wurde die Formel: $\Delta\text{MFI Cyto-ID} = \text{MFI Cyto-ID (+CQ/ACH)} - \text{MFI Cyto-ID (-CQ/ACH)}$ verwendet (Klose *et al.*, 2014).

3.6.1 Messung im FACS

Das CYTO-ID® Autophagy detection kit wurde zur Analyse der Autophagiekompartimente im FACS benutzt. Es wurden pro Ansatz je 1×10^6 humane CCC-Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen für je 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 µM, 0,5 µM, 2 µM, 10 µM), DMSO (0,1 µM), „Starvation“-Medium, CQ (5 µM) und PP242 (5 µM) stimuliert. Bei aufeinanderfolgenden Stimulationen mit verschiedenen Reagenzien wurde das erste Reagenz abgenommen, bevor das zweite dazugegeben wurde. Nach dem Ablösen der Zellen wurden die Zellen in 250 µl 1xAssay Puffer und 250 µl Cyto-ID staining solution aufgenommen. Die ungefärbte Kontrolle wurde nur in 500 µl 1xAssay Puffer aufgenommen. Die Proben wurden 30 Minuten lichtgeschützt bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Proben bei 1000 rpm abzentrifugiert und in 500 µl 1xAssay Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben im FACS gemessen.

3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zusätzlich zu den Messungen der Autophagiekompartimente im FACS wurden Fluoreszenzbilder angefertigt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ebenfalls das CYTO-ID® Autophagy detection kit verwendet. Es wurden pro Kammer je 3×10^4 humane CCC-Zellen in einer „Chamber Slide“ ausgesät. Die Zellen wurden bis zum konfluierenden Wachstum inkubiert (48-72 Stunden). Danach wurden die Zellen für je 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,5 µM, 2 µM, 10 µM), „Starvation“-Medium, PP242 (5 µM) und CQ (5 µM) stimuliert. Bei aufeinanderfolgenden Stimulationen mit verschiedenen Reagenzien wurde das erste Reagenz abgenommen, bevor das zweite dazugegeben wurde. Die Zellen wurden

zweimal mit 1xAssay Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer Lösung aus 2 µl CytolDGreen Detektion Reagent, 0,5 µl Hoechst 33342 Nuclear Stain und 1 ml 1xAssay Puffer für 30 Minuten lichtgeschützt bei 37°C und 5% CO₂ gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1xAssay Puffer gewaschen. Darauffolgend wurden die Zellen mit Moviol eingedeckelt und mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiostar Plus mikroskopiert.

3.8 Färbung der Mitochondrien mittels MitoTracker®

Um die mitochondriale Masse in humanen CCC-Zellen nach der Stimulation mit SAL zu analysieren, wurden die Mitochondrien mittels MitoTracker® gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

3.8.1 Stimulation der Zellen

Es wurden pro Ansatz je 1x10⁶ humane CCC-Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend für 24 Stunden jeweils mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM), DMSO (0,1 µM), PP242 (5 µM) und CQ (5 µM) stimuliert.

3.8.2 Messung im FACS

Für die Färbung der Mitochondrien wurde MitoTracker® Green FM verwendet. 2 µl der 100 µM MitoTracker-Lösung wurden auf die Zellen gegeben, sodass eine Wirkkonzentration von 100 nM entstand. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden sie mit Accutase abgelöst und zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen lichtgeschützt in PBS erst für 10 Minuten bei 37° und 5% CO₂ inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Darauffolgend wurden die Zellen im FACS gemessen.

3.9 Messung der ROS-Produktion

Um die ROS-Produktion in humanen CCC-Zellen nach der Stimulation mit SAL zu messen, wurden die ROS mittels CM-H2DCFDA gefärbt und im Durchflusszytometer bestimmt sowie mit dem MitoTracker™ Red CM-H2Xros gefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop Bilder angefertigt.

3.9.1 Messung im FACS

Es wurden pro Ansatz je 1×10^6 humane CCC-Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend für 24 Stunden jeweils mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM), DMSO (0,1 μM), PP242 (5 μM) und CQ (5 μM) stimuliert.

Nach dem Ablösen der Zellen wurden die Zellen in 2 μM CM-H2DCFDA-Reagenz in 100 μl PBS aufgenommen und lichtgeschützt für 45 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 300 g für eine Minute abzentrifugiert und das Zellpellet wurde in 400 μl PBS aufgenommen. Die ROS-Produktion wurde im FACS gemessen.

3.9.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zusätzlich zu den Messungen der ROS im FACS wurden Fluoreszenzbilder angefertigt. Es wurden pro Kammer je 3×10^4 humane CCC-Zellen in einer „Chamber Slide“ ausgesät. Die Zellen wurden bis zum konfluierenden Wachstum inkubiert (48-72 Stunden). Danach wurden die Zellen für 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) stimuliert. Die Zellen wurden zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer 37°C warmen Färbelösung aus 250 nM MitoTracker™ Red CM-H2Xros in CCC-Medium für 20 Minuten lichtgeschützt bei 37°C und 5% CO_2 gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen. Darauf folgend wurden die Zellen mit ProLong®Gold mit DAPI eingedeckelt und mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiostar Plus mikroskopiert.

3.10 qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion)

Mit Hilfe der qPCR wurde eine quantitative Analyse der Autophagiegene ATG 3, ATG 7, ATG 10, ATG 12 und ATG 13 in humanen CCC-Zellen nach der Stimulation mit SAL durchgeführt.

3.10.1 Stimulation der Zellen

Es wurden pro Ansatz je 3×10^5 humane CCC-Zellen in eine 12-Well-Platte ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden mit aufsteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM), DMSO (0,1 μM), PP242 (5 μM) und CQ (5 μM) stimuliert.

3.10.2 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy® Mini Kit (250) verwendet. Das Medium wurde aus den Wells abgesaugt und je 350 μl Betamercaptoethanol/RLT (1:100) und je 350 μl 70% Ethanol

wurden in ein Well gegeben. Um die Zellen vollständig zu lösen, wurde zehn Mal hoch- und runterpipettiert und das Lysat dann auf eine Säule gegeben. Als nächstes wurde einmal mit RW1-Puffer gewaschen, bevor 80 µl DNase/RDD-Mix direkt auf die jeweilige Membran gegeben wurde. Die Proben wurden 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgten ein einfacher Waschschrift mit RW1-Puffer und ein zweifacher Waschschrift mit RPE/EtOH Puffer. Die Säulen wurden auf Safe-Lock-Tubes 2,0 ml gesetzt und 25 µl RNase freies Wasser auf die Membran gegeben. Die Proben wurden für eine Minute inkubiert und dann 30 Sekunden bei 8 g abzentrifugiert. Das wurde mit dem gewonnenen Durchfluss nochmals wiederholt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration der Proben im NanoDrop gemessen.

3.10.3 Komplementäre DNA (cDNA)-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Es wurde je 500 ng RNA in 22 µl H₂O mit 2 µl Oligo(dT) in PCR Tube Strips 0,2 ml pipettiert. Die Proben kamen für fünf Minuten bei 65°C in den ThermoCycler. Anschließend wurde 16 µl MasterMix pro Probe dazugegeben. Der MasterMix bestand aus 8 µl 5xReaction buffer, 2 µl RiboLock, 4 µl dNTP-Mix und 2 µl RevertAid Reverse Transcriptase. Die Proben wurden im Thermocycler 60 Minuten bei 42°C und dann 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt.

3.10.4 qPCR

Die cDNA wurde 1:10 verdünnt und dann wurden je 2 µl pro Well einer LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 vorgelegt. Danach wurde in jedes Well 18 µl Master Mix pipettiert. Der MasterMix setzte sich aus 6 µl H₂O, 10 µl SybrGreen, 1 µl Forward Primer (1:10 verdünnter Stock) und 1 µl Reverse Primer (1:10 verdünnter Stock) zusammen. Anschließend wurde die Platte mit einer LightCycler® 480 Sealing Foil abgedeckt und in den LightCycler verbracht. Es wurden 55 Amplifikationszyklen eingestellt.

3.11 Statistische Datenanalyse

Für die statistische Datenanalyse der erhobenen Daten wurde das Programm GraphPad Prism 5 verwendet. Die Graphiken zeigen den arithmetischen Mittelwert +/- der Standardabweichung („standard deviation“, SD), wobei zur besseren Übersicht nur der positive Ausschlag abgebildet ist. Zur statistischen Analyse der Daten wurden der t-Test oder die Varianzanalyse ANOVA entsprechend den Daten angewendet. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Salinomycin inhibiert die Proliferation muriner CCC-Zellen

Zur Etablierung eines Mausmodells wurden im ersten Abschnitt dieser Dissertationsarbeit *in vitro* Versuche mit den murinen CCC-Zelllinien p246 und p254 durchgeführt, um die Aktivität von SAL in murinen CCC-Zellen nachweisen zu können. Dafür wurde zunächst die Proliferation der Zellen nach Exposition mit SAL untersucht. Die Behandlung von p246 und p254 Zellen mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M) für 48 Stunden führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation. Dieser Effekt war dosisabhängig (Abbildung 3).

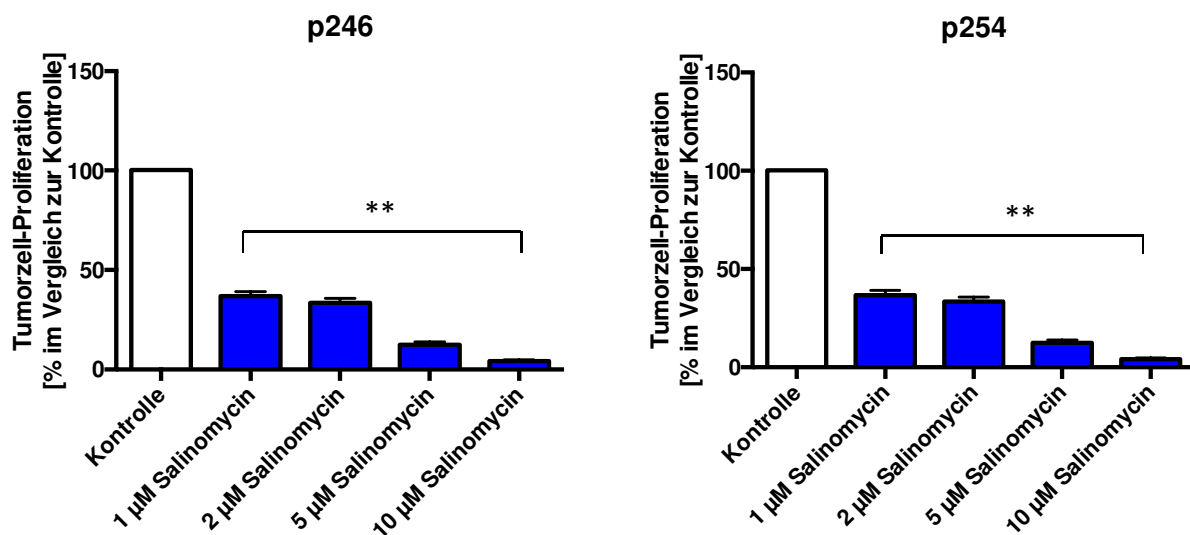


Abbildung 3: Inhibition der Proliferation muriner CCC-Zellen nach der Behandlung mit Salinomycin.

Die murinen CCC-Zelllinien p246 und p254 wurden für 48 Stunden mit ansteigende SAL-Konzentrationen (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M) in 96-Well-Platten inkubiert und anschließend die Proliferation mit Hilfe des WST-1 Assays analysiert. Nach Exposition mit SAL zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Proliferation der beiden murinen CCC-Zelllinien p246 und p254. Die Ergebnisse sind als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts \pm Standardabweichung, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.2 Salinomycin inhibiert die Migration und die Invasion muriner CCC-Zellen

Nachdem eine Inhibition der Proliferation der beiden murinen CCC-Zelllinien nach der Behandlung mit SAL nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend der Einfluss von SAL auf die Migration und Invasion der Zellen untersucht.

Dafür wurden p246 und p254 Zellen für 48 Stunden mit und für weitere 48 Stunden ohne ansteigende SAL-Konzentrationen (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M) in Transwell-Kammern inkubiert. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, hatte die Behandlung von p246 und p254 Zellen mit SAL eine dosisabhängige Reduktion der Migration zur Folge.

Durch zusätzliche Matrigel-Beschichtung der Membranen wurde die Invasivität der Zellen analysiert. Eine 48stündige Behandlung mit SAL inhibierte die Invasion der beiden murinen CCC-Zelllinien dosisabhängig (Abbildung 5).

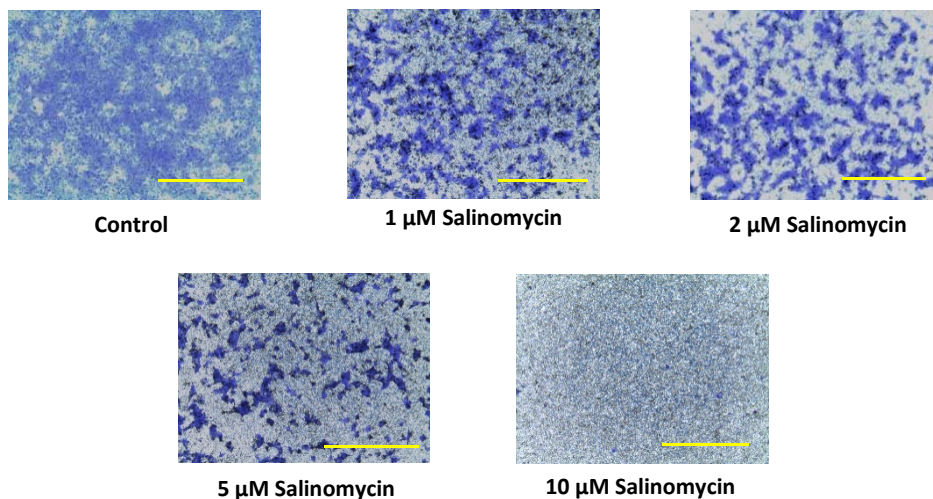
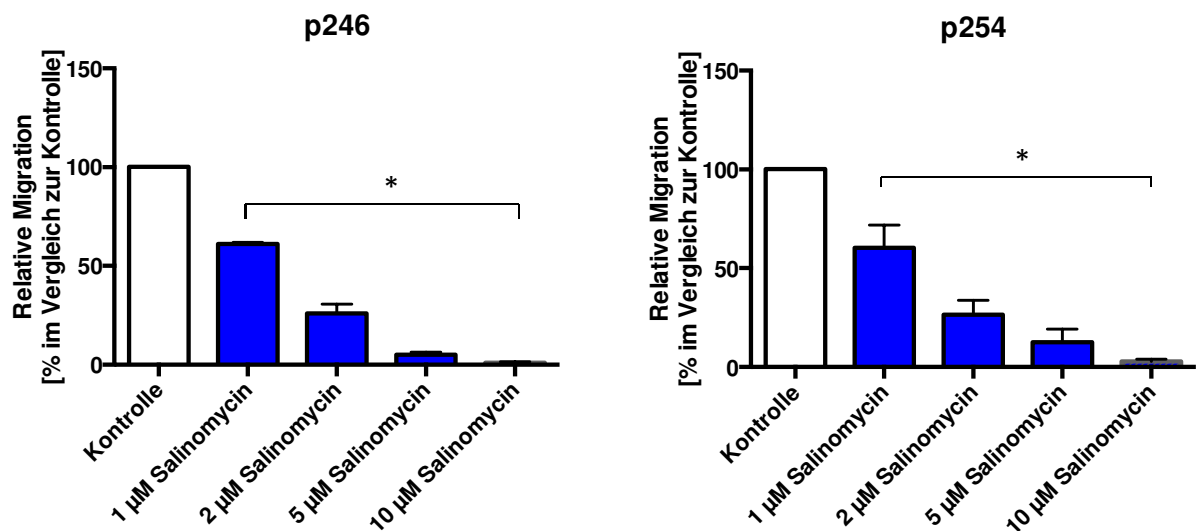


Abbildung 4: Inhibition der Migration muriner CCC-Zellen nach der Behandlung mit Salinomycin.

Die murinen CCC-Zelllinien p246 und p254 wurden für 48 Stunden mit und für weitere 48 Stunden ohne ansteigende SAL-Konzentrationen (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M) in Transwell-Kammern inkubiert. Anschließend wurden die Membranen entfernt, die an der Unterseite der Membranen adhären Zellen gefärbt und im Photometer die migrierten Zellen quantifiziert. SAL reduzierte die Migration beider muriner CCC-Zelllinien dosisabhängig. Die Ergebnisse sind als repräsentative Mikroskopiebilder der gefärbten Membranen oder als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts +/- Standardabweichung, * p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle. Blau= Zellen. Maßstabsbalken= 100 μ m

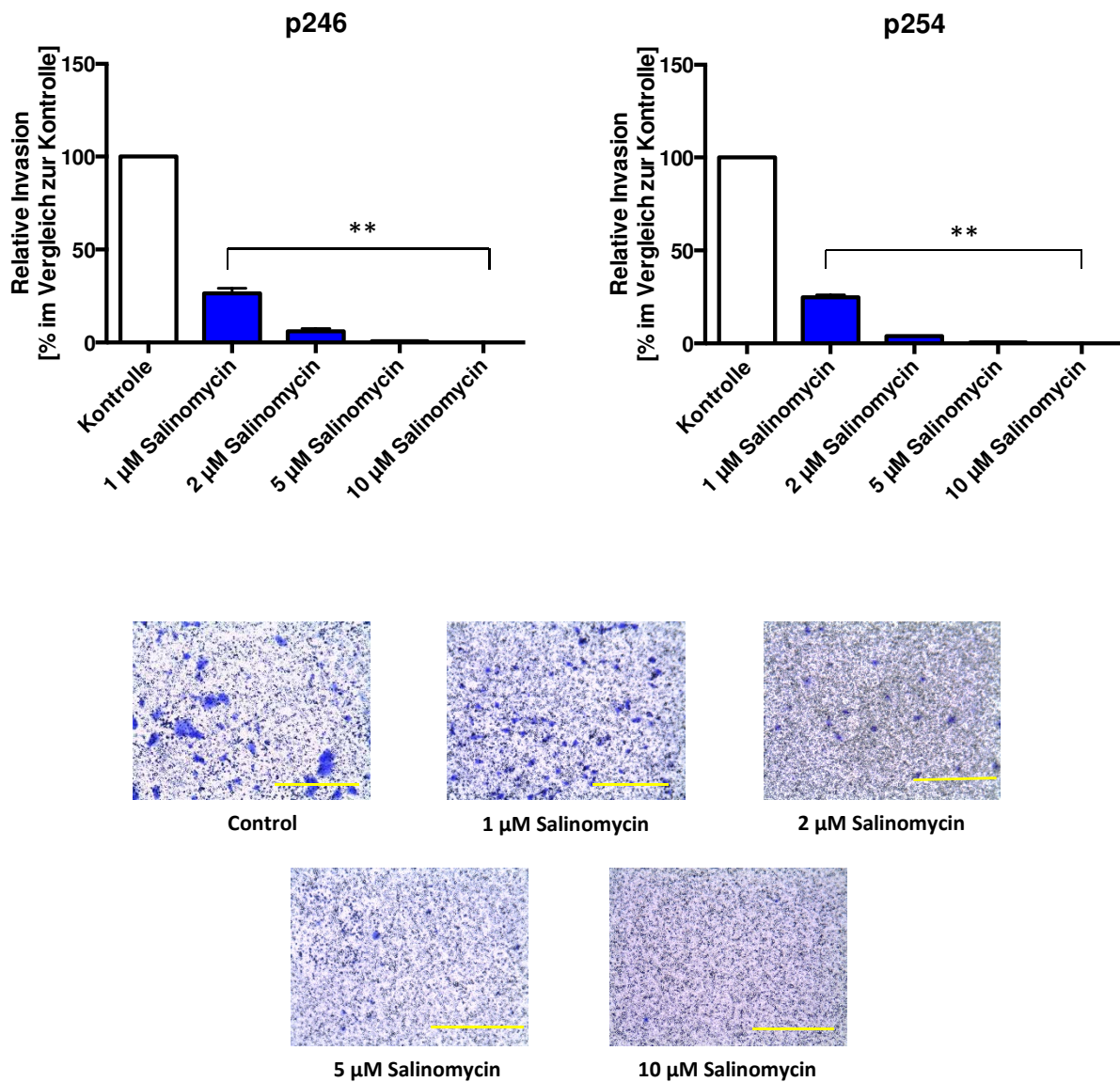


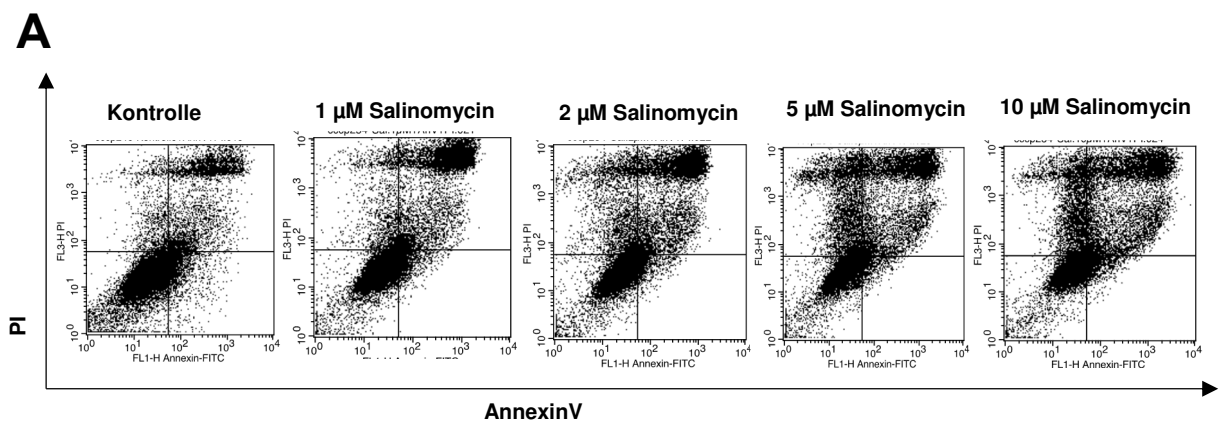
Abbildung 5: Inhibition der Invasion muriner CCC-Zellen nach der Behandlung mit Salinomycin.

Die murinen CCC-Zelllinien p246 und p254 wurden für 48 Stunden mit und für weitere 48 Stunden ohne ansteigende SAL-Konzentrationen (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) in Transwell-Kammern inkubiert. Anschließend wurden die zuvor mit Matrigel beschichteten Membranen entfernt, die an der Unterseite der Membranen adhären Zellen gefärbt und im Photometer die durch die zusätzliche beschichtete Membran migrierten Zellen quantifiziert. Sal inhibierte die Invasion beider muriner CCC-Zelllinien dosisabhängig. Die Ergebnisse sind als repräsentative Mikroskopiebilder der gefärbten Membranen oder als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts +/- Standardabweichung, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. Blau= Zellen. Maßstabsbalken= 100 μm

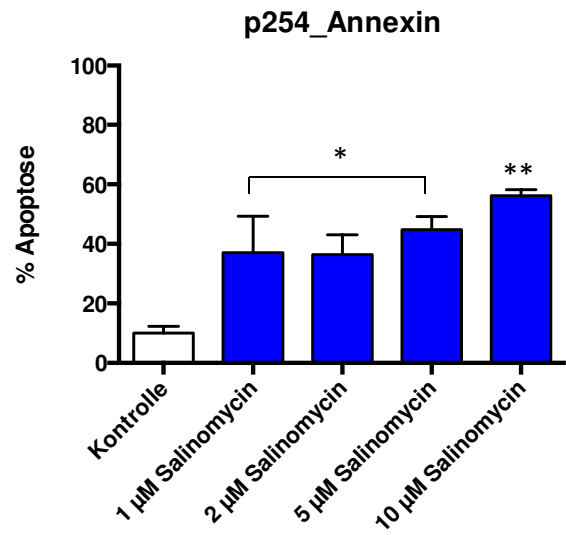
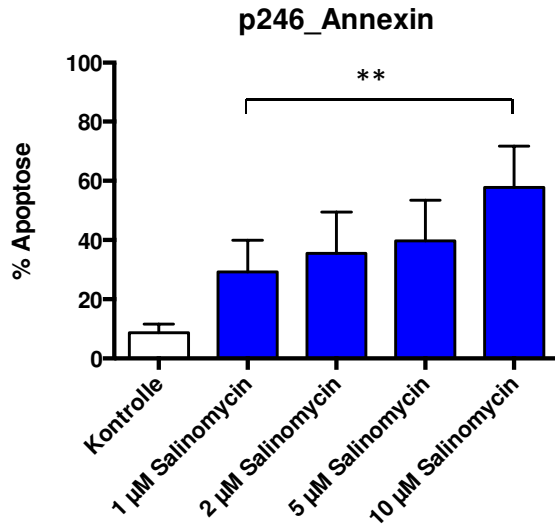
4.3 Salinomycin induziert Apoptose in murinen CCC-Zellen

In den folgenden Experimenten wurde der Effekt von SAL auf die Apoptoserate der murinen CCC-Zellen p246 und p254 untersucht. Dafür wurden drei verschiedene Assays verwendet. Die Zellen wurden dafür jeweils für 24 Stunden ansteigenden SAL-Konzentrationen (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) ausgesetzt.

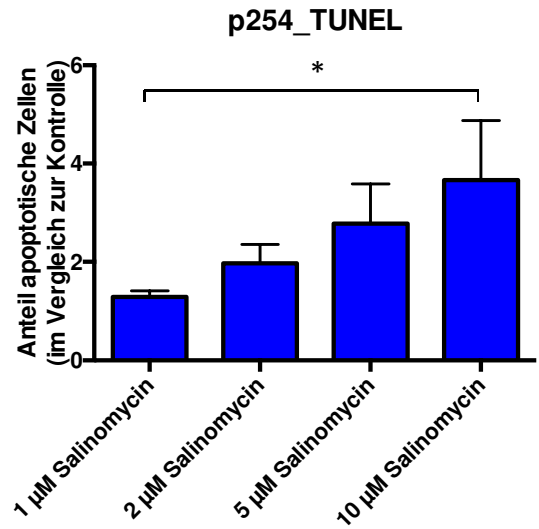
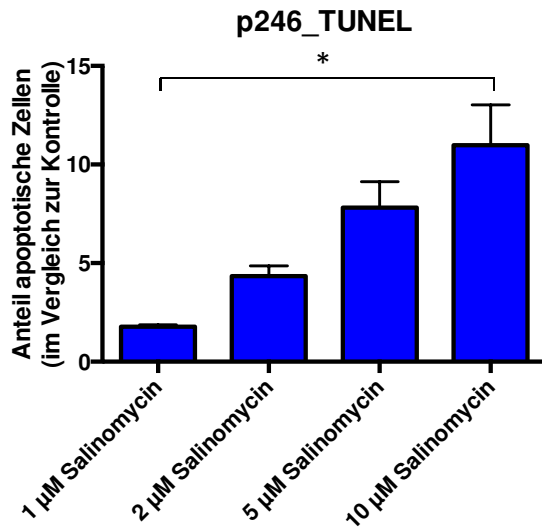
Wie in Abbildung 6A dargestellt, führt die Exposition mit SAL zu einer dosisabhängigen Zunahme AnnexinV/PI-positiver Zellen. Die dosisabhängige Apoptoseinduktion wurde ferner durch Analyse der DNA-Fragmentierung nach 24stündiger Exposition mit SAL bestätigt (Abbildung 6B). Abschließend wurde die Freisetzung von LDH, als Maß für die Zellschädigung, analysiert. Es zeigt sich ebenfalls eine dosisabhängige Zunahme der LDH-Freisetzung in beiden murinen CCC-Zelllinien nach der Behandlung mit SAL für 24 Stunden (Abbildung 6C).



Ergebnisse



B



C

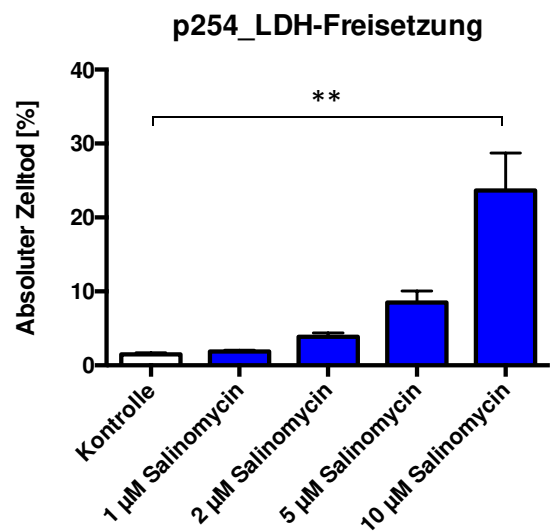
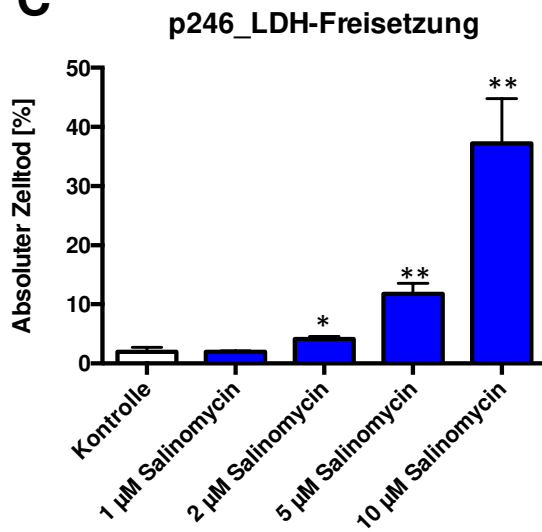


Abbildung 6: Salinomycin induziert Apoptose in murinen CCC-Zellen.

Die beiden murinen CCC-Zelllinien p246 und p254 wurden für 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M) inkubiert und das Ausmaß der Apoptoseinduktion mittels AnnexinV Analyse, TUNEL-Assay und der LDH-Freisetzung quantifiziert. (A) AnnexinV Analyse im FACS: Dosisabhängiger Anstieg apoptotischer Zellen nach Behandlung mit SAL in beiden murinen CCC-Zelllinien. (B) Quantitative Analyse der DNA-Fragmentierung mittels TUNEL-Assay: Dosisabhängiger Anstieg der Menge fragmentierter DNA in beiden murinen CCC-Zelllinien nach der Behandlung mit SAL. (C) LDH-Freisetzung: Dosisabhängiger Anstieg der LDH-Freisetzung in beiden murinen CCC-Zellen nach der Behandlung mit SAL. Die Ergebnisse sind als repräsentative „Dot Plots“ (Punktdarstellungen) oder als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts +/- Standardabweichung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.4 Salinomycin führt zu einer Akkumulation von LC3-II und p62 in humanen CCC-Zellen

4.4.1 LC3-II

In dem zweiten Abschnitt dieser Dissertationsarbeit sollte durch Analyse der Autophagieaktivität der molekulare Wirkmechanismus von SAL in humanen CCC-Zellen untersucht werden. Um die Wirkung von SAL auf die Autophagie von humanen CCC-Zellen zu untersuchen, wurden die beiden CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1 pharmakologischen Autophagieinduktoren (PP242), -inhibitoren (CQ) oder ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M, 2 μ M, 10 μ M) ausgesetzt. Mit Hilfe semiquantitativer Western Blot-Analysen wurde die Expression von LC3B-II nach Exposition analysiert. LC3 wird während des Autophagieprozesses prozessiert; dabei korreliert die LC3-II-Expression mit der Menge an Autophagosomen (Abbildung 1). Eine Akkumulation von LC3-II kann Ausdruck einer Inhibition oder einer Induktion der Autophagie sein. Durch eine Inhibition der Autophagie akkumulieren die Autophagiekompartimente, die vor der Inhibitionsstelle liegen. Bei einer Induktion der Autophagie steigt die Gesamtzahl der Autophagiekompartimente an (Mizushima *et al.*, 2010). Wie in Abbildung 7 dargestellt, akkumuliert LC3B-II in TFK-1 Zellen nach Stimulation mit PP242 (5 μ M) und CQ (5 μ M, 20 μ M). Die Stimulation mit SAL führt zu einer vermehrten Akkumulation von LC3B-II nach Stimulation mit niedrigeren SAL-Konzentrationen (0,1 und 0,5 μ M; Abbildung 7). Höhere SAL-Dosierungen resultieren in einer Abnahme der LC3B-II Expression.

Ergebnisse

In EGI-1 Zellen kommt es nach Exposition mit PP242 (5 μ M) zu einer Abnahme der LC3B-II Expression (Abbildung 7). Nach Stimulation mit CQ (5 μ M, 20 μ M) kann analog zu den Beobachtungen in TFK-1-Zellen ebenfalls zu einer Akkumulation von LC3B-II detektiert werden. Nach der Stimulation mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M, 2 μ M, 10 μ M) lässt sich ebenfalls eine dosisunabhängige LC3B-II Akkumulation beobachten (Abbildung 7).

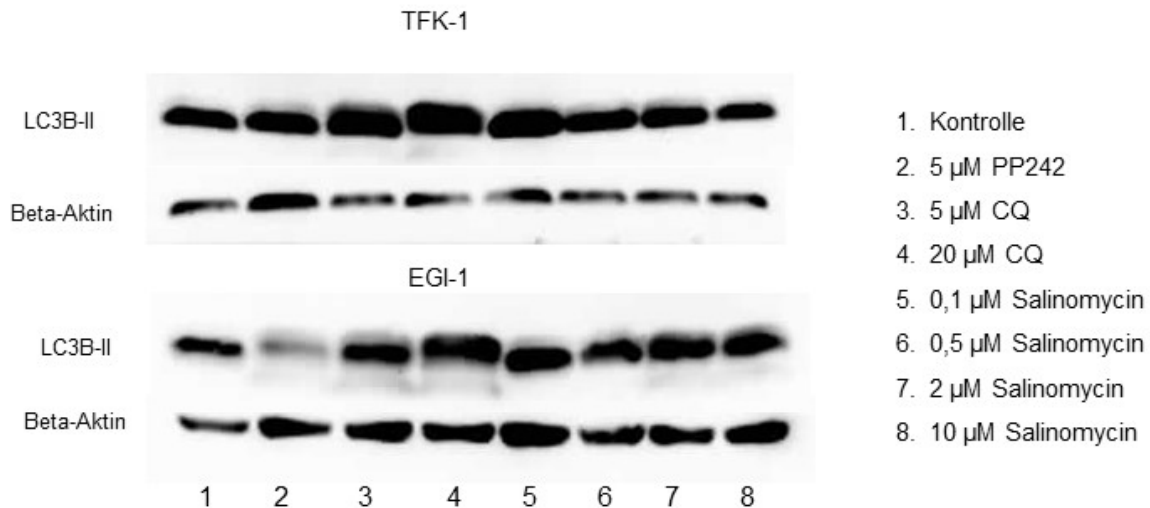


Abbildung 7: Vergleich der LC3B-II-Expression nach Exposition humaner CCC-Zellen mit PP242, CQ und Salinomycin.

Semiquantitative Analyse der LC3B-II-Expression mittels Western Blot. TFK-1 (oben) und EGI-1 Zellen (unten) wurden mit dem Autophagieinduktor PP242 (5 μ M), dem Autophagieinhibitor CQ (5 μ M, 20 μ M) und ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M, 2 μ M, 10 μ M) für 24 Stunden stimuliert. Die Exposition mit SAL resultiert in einer Akkumulation von LC3B-II.

4.4.2 p62

Durch den Nachweis der LC3B-II-Akkumulation konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von TFK-1 und EGI-1 Zellen mit SAL einen Einfluss auf die Autophagieaktivität der Zellen zu haben scheint. Um zu unterscheiden, ob SAL ein Induktor oder ein Inhibitor der Autophagie ist, wurde p62 als weiteres autophagieassoziiertes Protein untersucht. p62 wird in der Zelle während des Autophagieprozesses abgebaut. Wird die Autophagie inhibiert, akkumuliert p62 in der Zelle (Mizushima und Komatsu, 2011).

Ergebnisse

In Abbildung 8 ist dargestellt, dass die Exposition humaner CCC-Zellen mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 10 μM) zu einer dosisabhängigen Akkumulation von p62 führt. Eine Akkumulation von p62 ist auch nach Exposition mit dem etablierten Autophagieinhibitor CQ (20 μM) zu beobachten. Die kombinierte Exposition von TFK-1 und EGI-1 Zellen mit CQ und SAL führt insbesondere in EGI-1 Zellen zu einer partiellen Verstärkung der p62 Akkumulation (Abbildung 8).

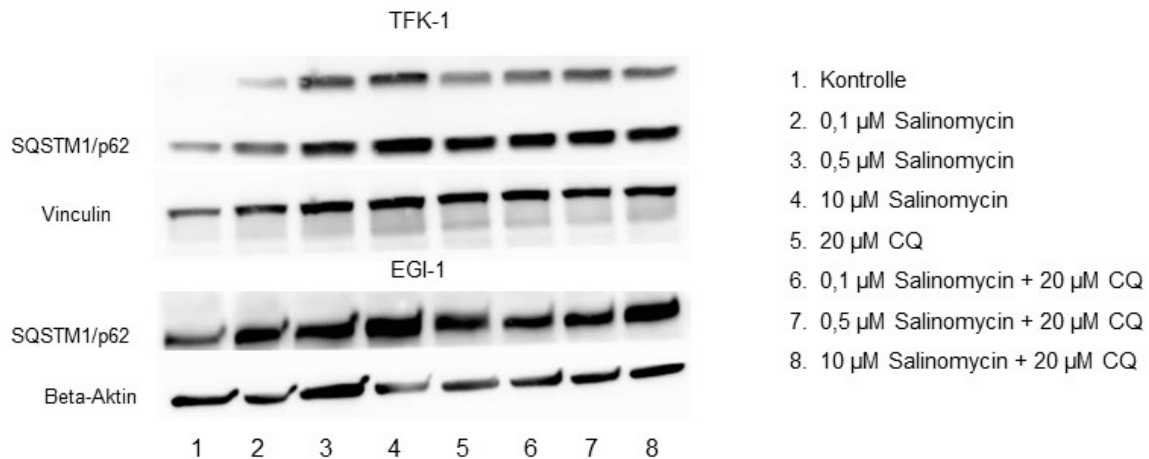


Abbildung 8: Vergleich der p62-Expression nach Stimulation humaner CCC-Zellen mit Salinomycin, CQ und einer Kombination aus Salinomycin und CQ.

Semiquantitative Analyse der p62-Expression mittels Western Blot. TFK-1 (oben) und EGI-1 Zellen (unten) wurden jeweils mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 10 μM) und CQ (20 μM) für 24 Stunden oder einer Kombination beider Präparate (SAL 24 Stunden, CQ 1 Stunde) exponiert. Die Behandlung von TFK-1 Zellen mit SAL führt, ebenso wie CQ, zu einer Akkumulation von p62. In EGI-1 Zellen wird die Akkumulation von p62 durch die Kombination von SAL und CQ dosisabhängig verstärkt.

4.5 Salinomycin führt zu einer Reduktion der Autophagiekompartimente in humanen CCC-Zellen

Um die Wirkung von SAL auf den Autophagieprozess humaner CCC-Zellen genauer zu charakterisieren, wurde die Autophagieaktivität durch Quantifizierung der Autophagiekompartimente analysiert.

Eine Induktion der Autophagie nach Exposition mit „Starvation“-Medium und PP242 (5 μM) für 24 Stunden resultiert in einer Akkumulation der Autophagiekompartimente in TFK-1 und EGI-

Ergebnisse

1 Zellen. Die Akkumulation konnte durch Zugabe des Autophagieinhibitors CQ (5 μM) für weitere 24 Stunden erniedrigt werden. Die Analyse der Autophagiekompartimente in humanen CCC-Zellen zeigt nach Exposition mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 2 μM , 10 μM) für 24 Stunden eine diskrete Abnahme derselbigen. Die durch PP242 vermittelte Akkumulation der Autophagiekompartimente in TFK-1 und EGI-1 Zellen wird durch SAL inhibiert; dieser Effekt ist in EGI-1 Zellen ausgeprägter als in TFK-1 Zellen (Abbildung 9A-C). Um den genauen Effekt von SAL auf die Autophagieaktivität in den Zellen zu untersuchen, wurde die Akkumulation der Autophagiekompartimente unter mit PP242 stimulierten Bedingungen nach der Blockade der autophagolysosomalen Degradierung durch CQ analysiert. Dafür wurden TFK-1 und EGI-1 Zellen für 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 2 μM , 10 μM) stimuliert und die Akkumulation der Autophagiekompartimente mit unstimulierten Zellen verglichen. Dabei reduziert SAL die Autophagieaktivität in humanen CCC-Zellen dosisabhängig. Dieser Effekt war auch nach Autophagieinduktion mit PP242 zu beobachten (Abbildung 9D). Die inhibitorischen Effekte von SAL auf die Autophagieaktivität der CCC-Zellen wurde sowohl in der Durchflusszytometrie (Abbildung 9) als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (Abbildung 10 und 11).

Ergebnisse

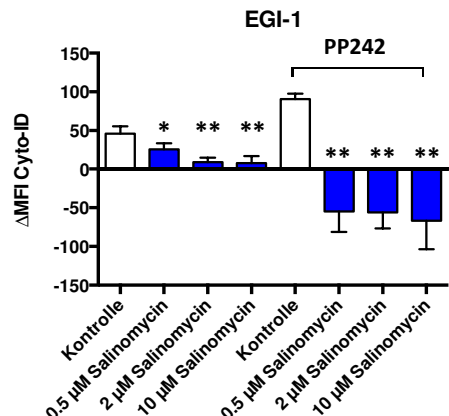
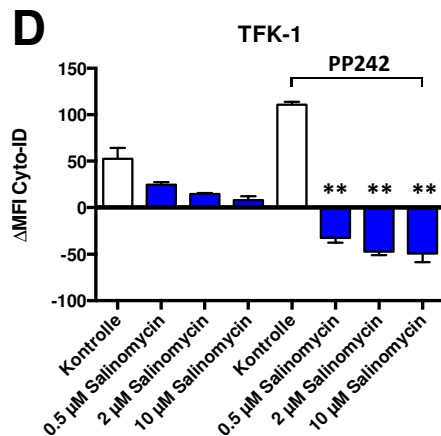
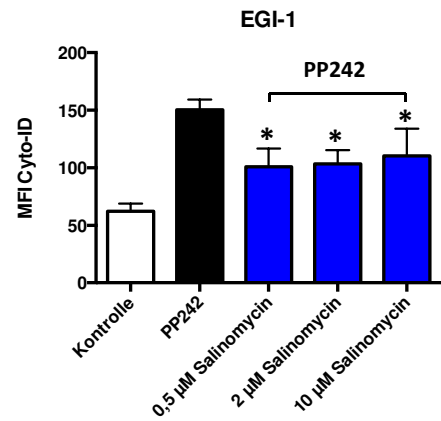
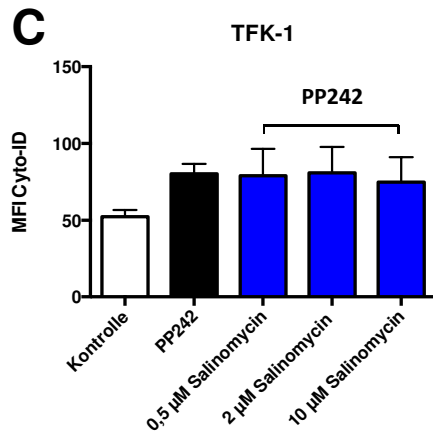
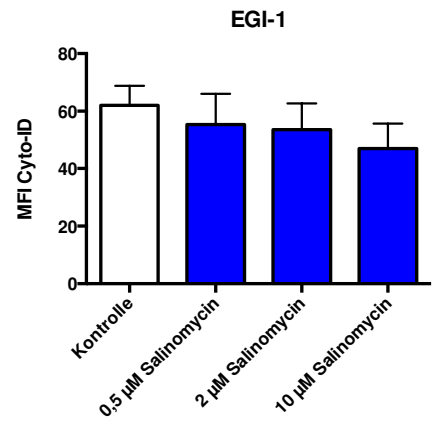
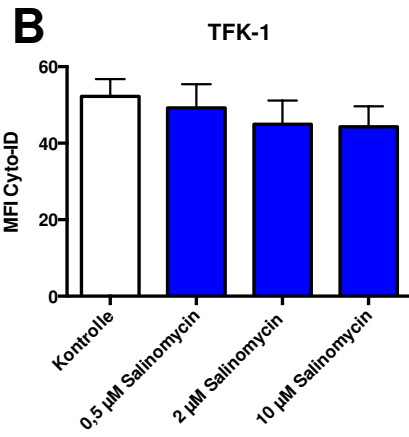
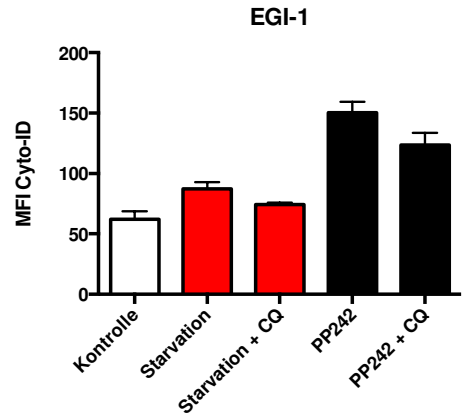
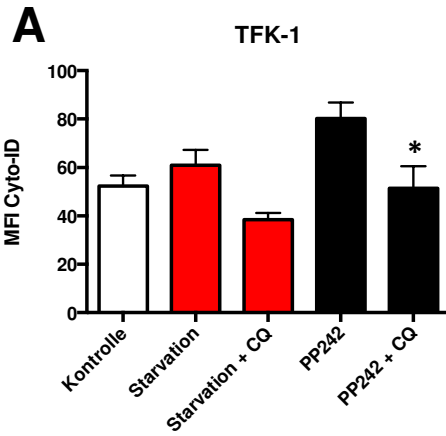


Abbildung 9: Reduktion der Autophagiekompartimente nach Stimulation mit Salinomycin.

Behandlung der beiden humanen CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1 mit den Autophagieinduktoren PP242 (5 μ M) und „Starvation“, dem Autophagieinhibitor CQ (5 μ M) und ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M, 2 μ M, 10 μ M) für jeweils 24 Stunden und anschließender Messung der Autophagiekompartimente im FACS. (A) Akkumulation der Autophagiekompartimente durch Stimulation mit PP242 und „Starvation“. Reduktion der Autophagiekompartimente durch CQ nach Stimulation mit PP242 oder „Starvation“. (B) Diskrete Abnahme der Autophagiekompartimente nach Behandlung mit SAL. (C) Inhibition der Akkumulation der Autophagiekompartimente nach Behandlung mit PP242 durch SAL. (D) Die Behandlung mit SAL wirkt der Stimulation der Autophagie mit PP242 entgegen und ist mit einer verminderten Akkumulation der Autophagiekompartimente nach Inhibition der autophagolysosomalen Degradierung verbunden. Die Ergebnisse sind als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts +/- Standardabweichung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. MFI („mean fluorescence intensity“ = mittlere Fluoreszenzintensität)

TFK-1

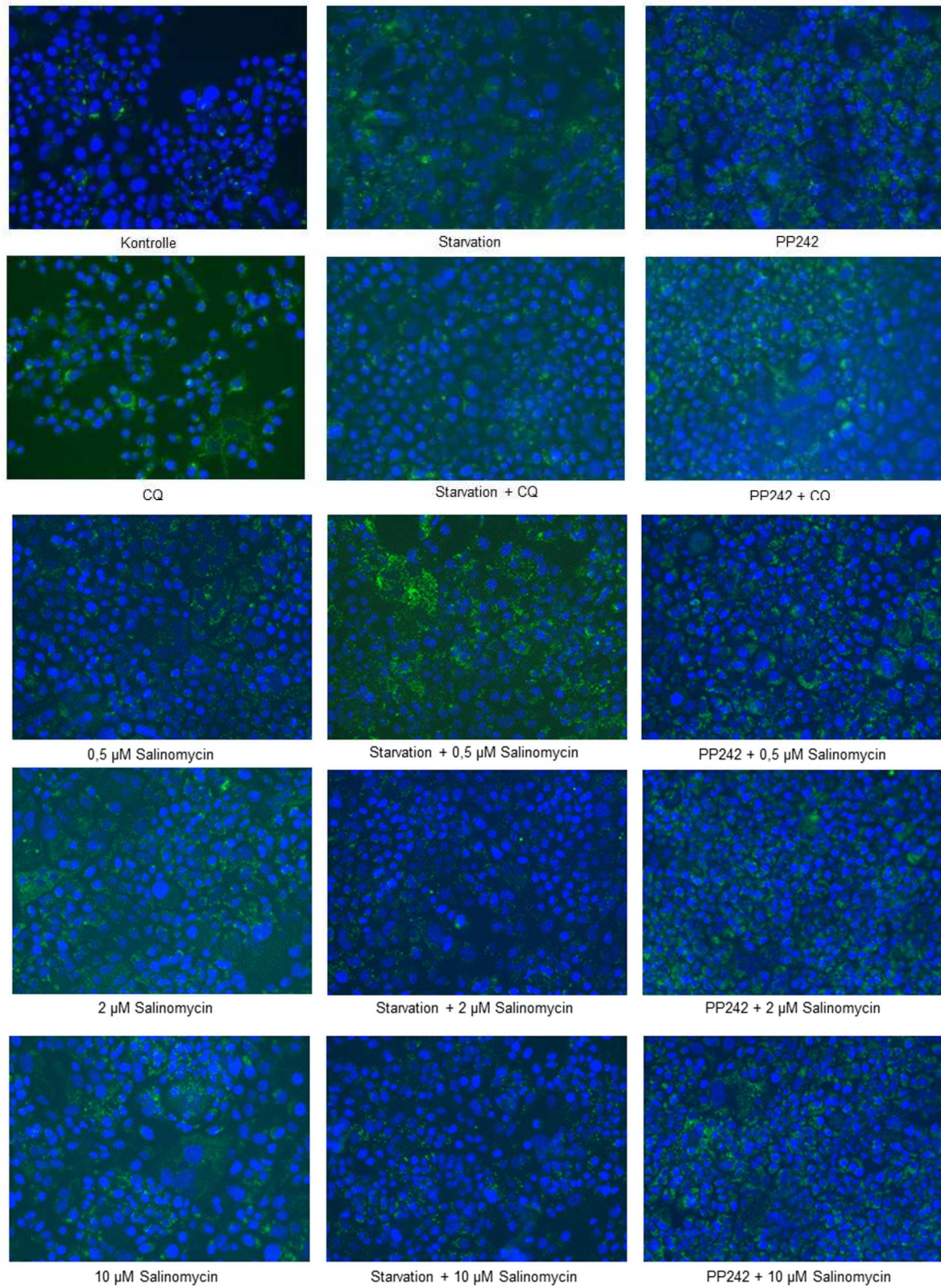


Abbildung 10: Fluoreszenzbilder der Autophagiekompartimente in TFK-1 Zellen.

Fluoreszenzmikroskopie nach Behandlung der TFK-1 Zellen mit dem Autophagieinduktoren PP242 (5 μ M) und „Starvation“, dem Autophagieinhibitor CQ (5 μ M) und ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,5 μ M, 2 μ M, 10 μ M) für je 24 Stunden. Die Autophagieinduktoren PP242 und „Starvation“ führen zu einer Akkumulation der Autophagiekompartimente. Reduktion der Autophagiekompartimente durch CQ und SAL nach Stimulation mit PP242 oder „Starvation“. Repräsentative Fluoreszenzbilder in 20 facher Vergrößerung. blau= Zellkerne; grün= Autophagiekompartimente.

EGI-1

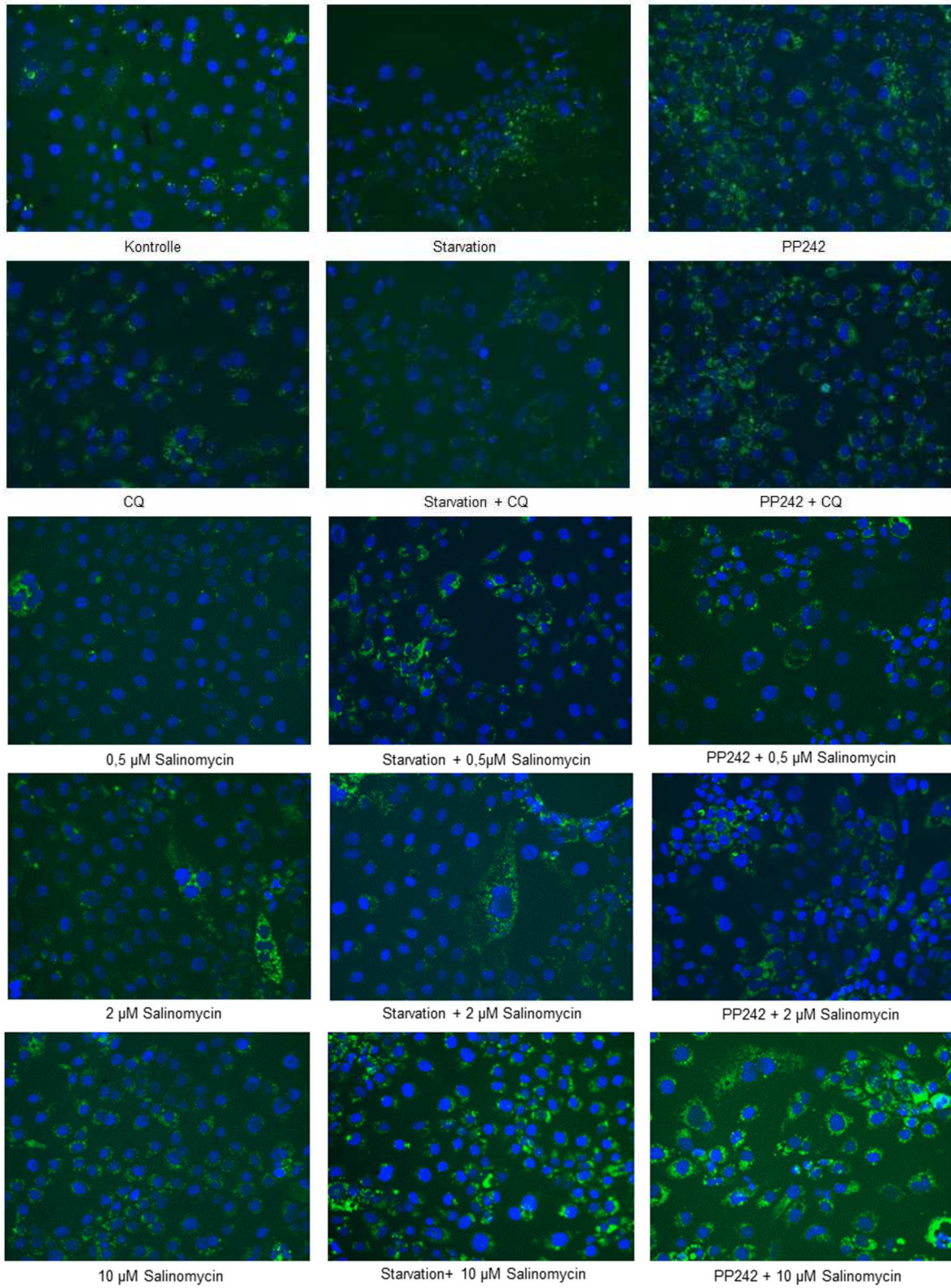


Abbildung 11: Fluoreszenzbilder der Autophagiekompartimente in EGI-1 Zellen.

Fluoreszenzmikroskopie nach Behandlung der EGI-1 Zellen mit dem Autophagieinduktoren PP242 (5 μM) und „Starvation“, dem Autophagieinhibitor CQ (5 μM) und ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,5 μM , 2 μM , 10 μM) für je 24 Stunden. Die Autophagieinduktoren PP242 und „Starvation“ führen zu einer Akkumulation der Autophagiekompartimente. Reduktion der Autophagiekompartimente durch CQ und SAL nach Stimulation mit PP242 oder „Starvation“. Repräsentative Fluoreszenzbilder in 20 facher Vergrößerung. blau= Zellkerne; grün= Autophagiekompartimente.

4.6 Salinomycin führt zu einer Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und einer gesteigerten ROS-Produktion in humanen CCC-Zellen

Es ist bekannt, dass eine Autophagieinhibition mit SAL mit der Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und konsekutiv gesteigerter Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen („reactive oxygen species“, ROS) assoziiert ist (Klose *et al.*, 2014). Es wurde daher die Mitochondrienfunktion nach Exposition mit SAL in den humanen CCC-Zellen untersucht. Wie in Abbildung 12 dargestellt, führt eine 24stündige Inkubation mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) von TFK-1 und EGI-1 Zellen zu einer Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien. In TFK-1 Zellen zeigte sich eine Zunahme der mitochondrialen Masse bereits nach Exposition mit niedrigen SAL-Konzentrationen; in EGI-1 Zellen zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt und eine zunehmende Akkumulation der Mitochondrien mit steigender SAL-Konzentration. Da die Akkumulation der Mitochondrien ein Marker für deren Schädigung ist, wurde die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen nach 24stündiger Exposition mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) untersucht. Dabei zeigt sich sowohl in TFK-1 wie auch in EGI-1 Zellen eine Akkumulation reaktiver Sauerstoffverbindungen. Dieser Effekt zeigt sich bereits nach Behandlung mit niedrigen SAL-Konzentrationen (Abbildung 13). Eine Stimulation der Zellen mit PP242 (5 μM) oder CQ (5 μM) führte zu keiner Veränderung der mitochondrialen Masse beziehungsweise Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen (Abbildung 12 und 13).

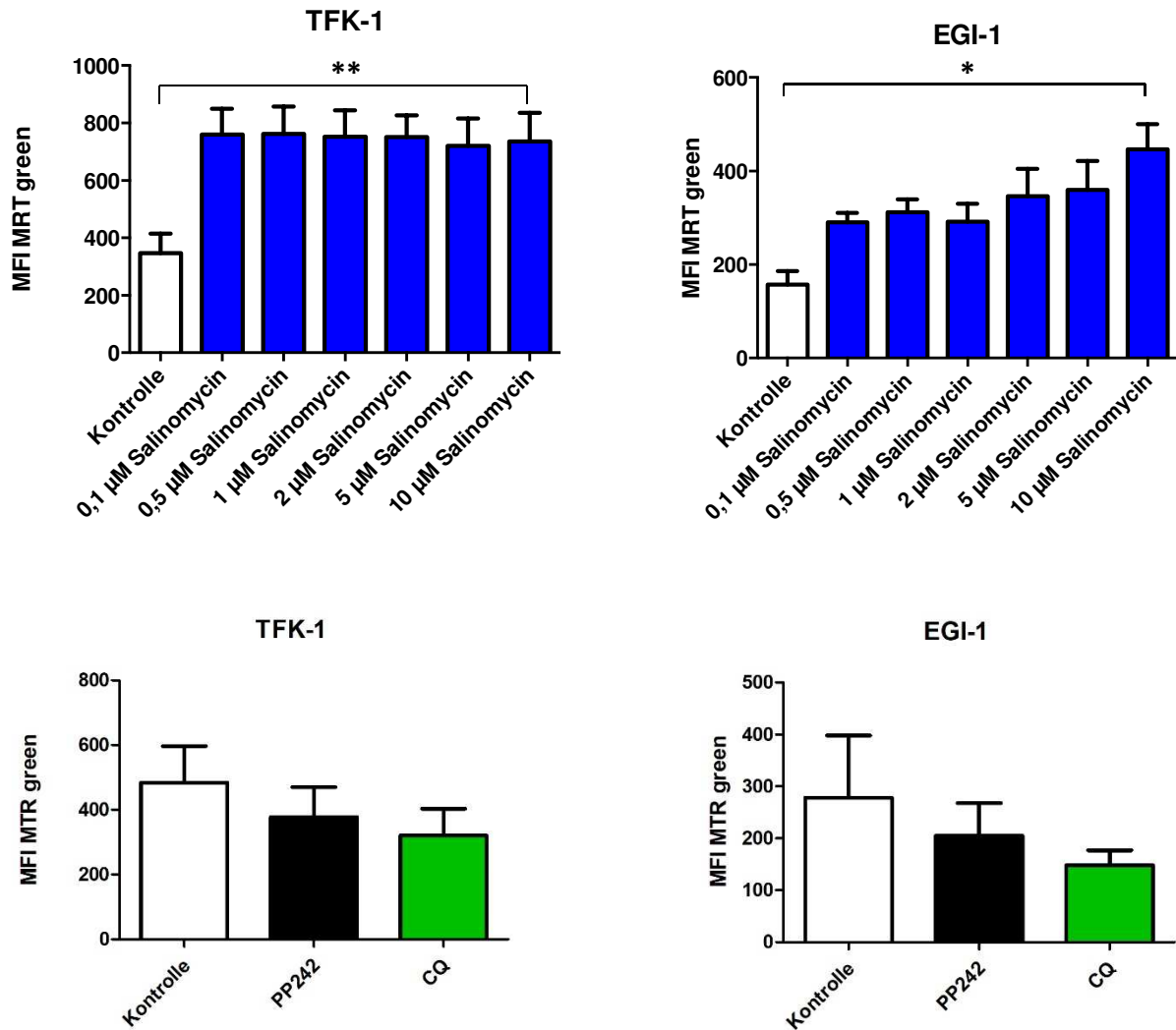
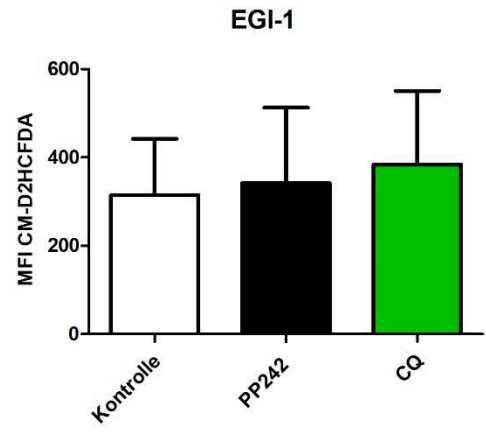
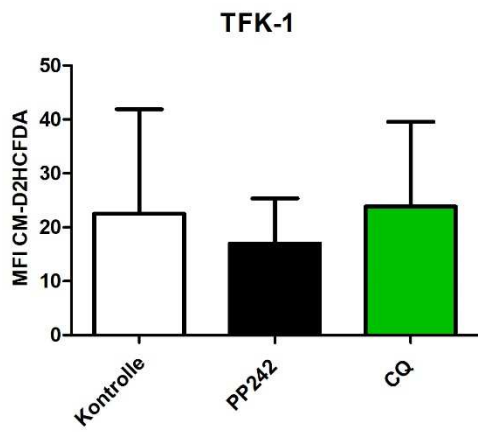
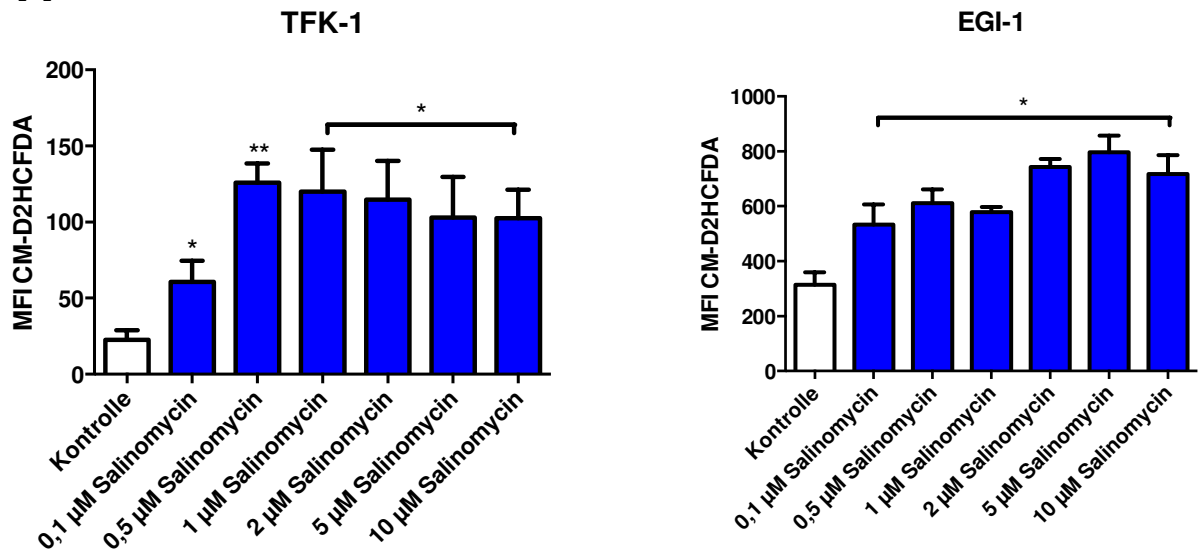


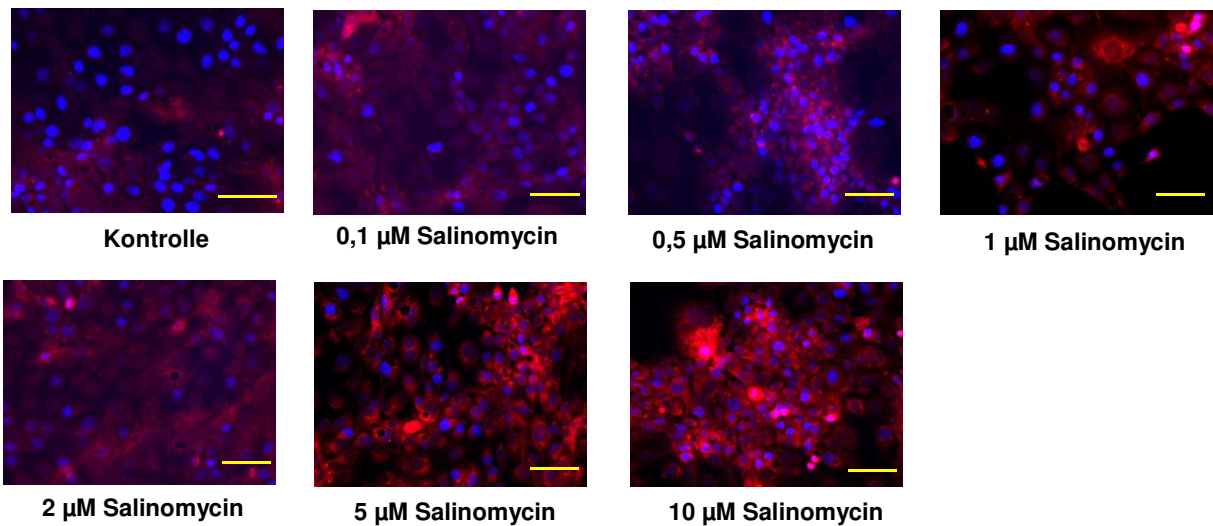
Abbildung 12: Akkumulation der Mitochondrien nach Stimulation mit Salinomycin in TFK-1 und EGI-1 Zellen.

Stimulation der Zellen mit PP242 (5 µM), CQ (5µM) und ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM) für 24 Stunden und anschließender Messung der mitochondrialen Masse mittels MitoTracker® Green FM-Färbung in der Durchflusszytometrie. Nach der Stimulation mit SAL akkumulieren die Mitochondrien in beiden Zelllinien. Nach Behandlung der Zellen mit einem Autophagieinduktor (PP242) und einem Autophagieinhibitor (CQ) zeigen sich, im Vergleich zur Kontrolle, keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts +/- Standardabweichung, *p< 0,05, **p< 0,01 im Vergleich zur Kontrolle.

A



B



C

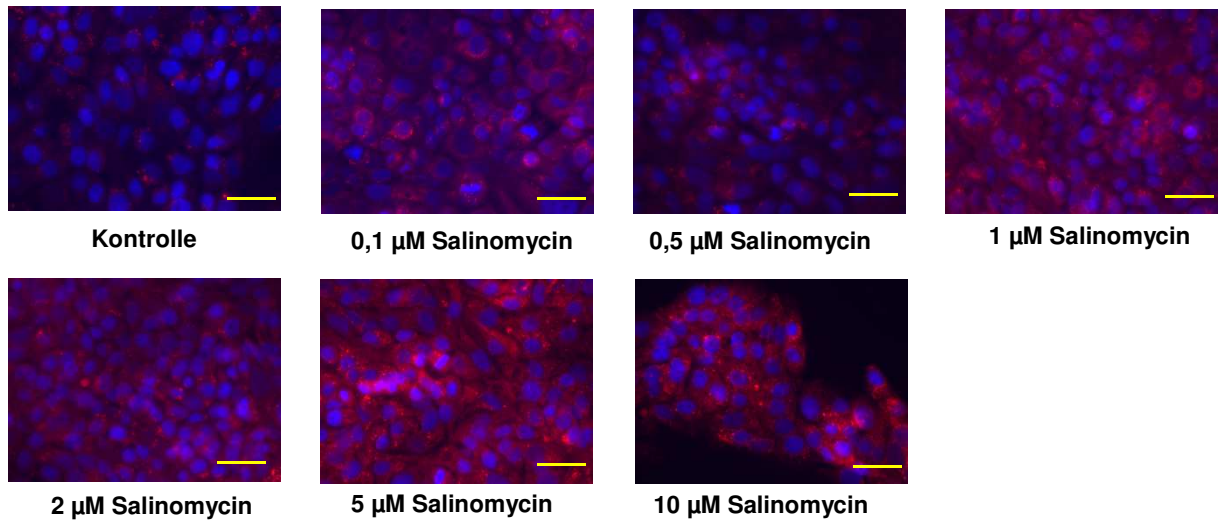


Abbildung 13: Akkumulation von ROS nach Behandlung mit Salinomycin in TFK-1 und EGI-1 Zellen.

(A) Stimulation der Zellen mit PP242 (5 µM), CQ (5µM) und ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM) für 24 Stunden und anschließender quantitativer Messung der ROS mittels CM-H2DCFDA-(ROS Detection) Färbung in der Durchflusszytometrie. Nach der Stimulation mit SAL akkumulieren ROS in beiden Zelllinien. Nach Behandlung der Zellen mit einem Autophagieinduktor (PP242) und einem Autophagieinhibitor (CQ) zeigen sich, im Vergleich zur Kontrolle, keine signifikanten Unterschiede. (B+C) Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie von TFK-1 (B) und EGI-1 Zellen (C) nach Behandlung mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM) und Färbung mit MitoTracker™ Red CM-H2Xros bestätigen die Akkumulation von ROS. Die Ergebnisse sind als repräsentative Fluoreszenzbilder oder als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts +/- Standardabweichung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle. blau= Zellkerne, rot= ROS. Maßstabsbalken= 50 µm

4.7 Die Vitalität der humanen CCC-Zellen verbessert sich durch eine Vorbehandlung mit dem Antioxidans NAC nicht

Die Behandlung humaner CCC-Zellen mit SAL führt zur Inhibition der Autophagie und dadurch zur Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und ROS. Im folgenden Experiment wurde

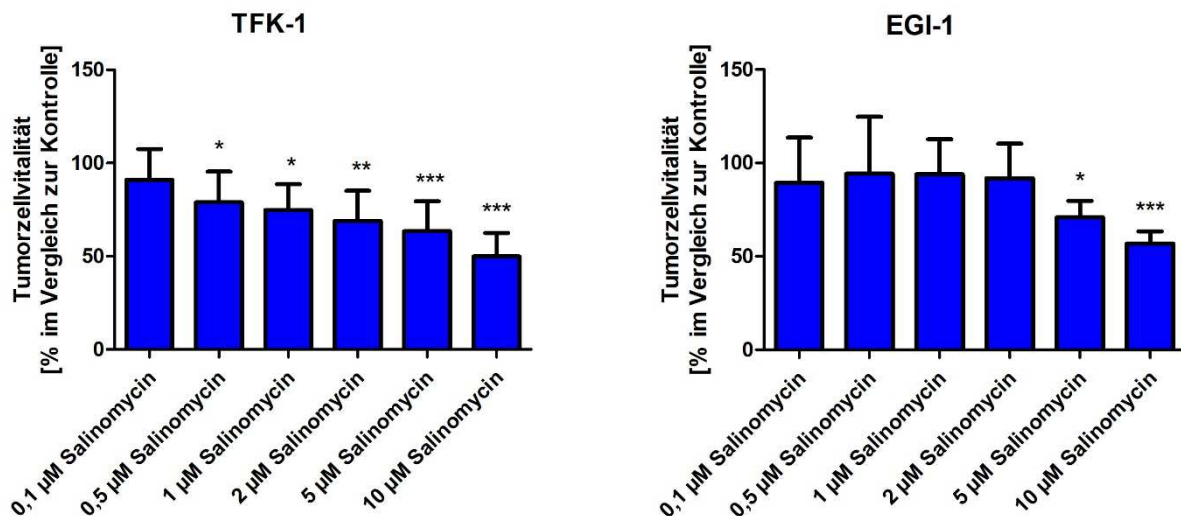
Ergebnisse

überprüft, ob eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC), das als Radikalfänger fungiert, die Vitalität der mit SAL stimulierten Zellen verbessern kann.

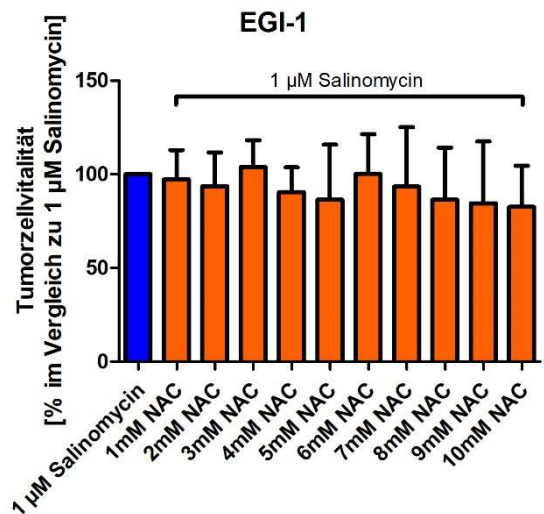
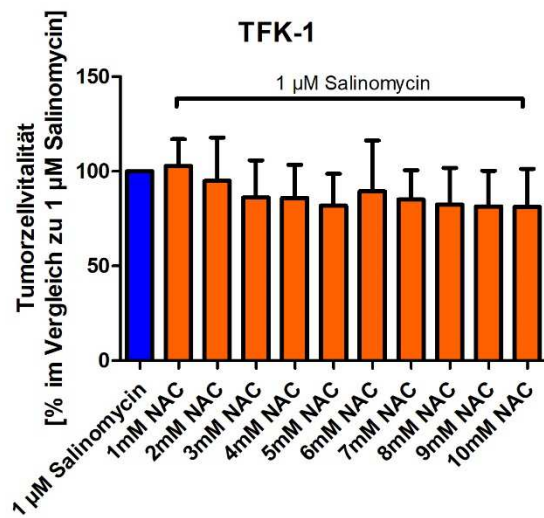
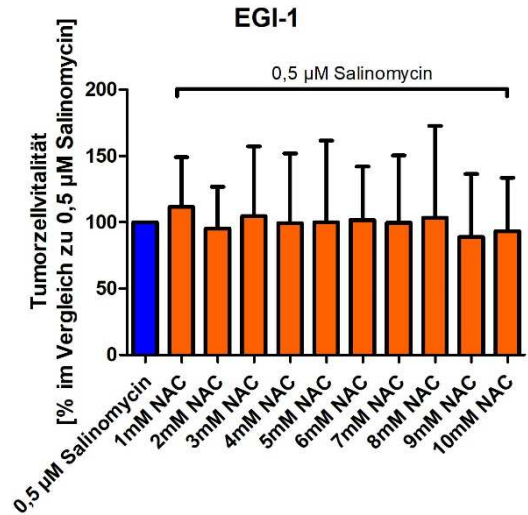
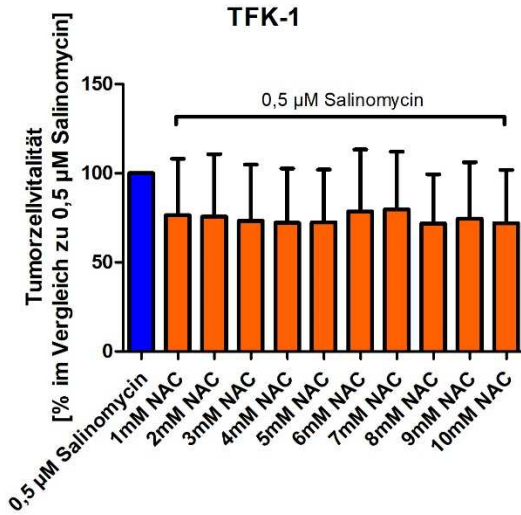
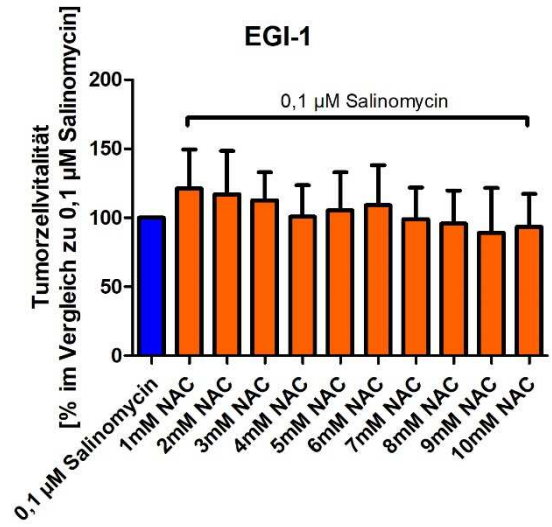
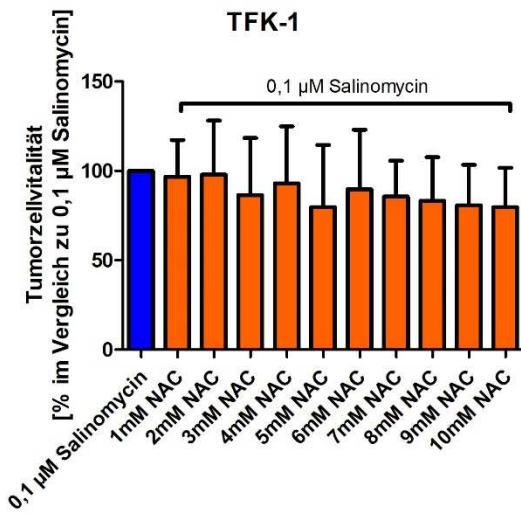
Dafür wurde ein WST-1 Assay durchgeführt und die beiden humanen CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1 mit ansteigenden NAC-Konzentrationen (1-10 mM) für eine Stunde vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 Stunden mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M) für 24 Stunden stimuliert.

Die Exposition der Zellen mit SAL führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der Vitalität von TFK-1 Zellen. Eine Reduktion der Vitalität von EGI-1 Zellen wird erst nach Exposition mit hohen SAL-Konzentrationen (5 μ M, 10 μ M) sichtbar (Abbildung 14A). Eine Vorbehandlung mit ansteigenden NAC-Konzentrationen (1-10 mM) verbessert die Vitalität der mit SAL stimulierten TFK-1 und der EGI-1 Zellen nicht. Bei den TFK-1 Zellen scheint die Vorbehandlung sogar zu einer weiteren Reduktion der Vitalität der Zellen zu führen (Abbildung 14B).

A



B



Ergebnisse

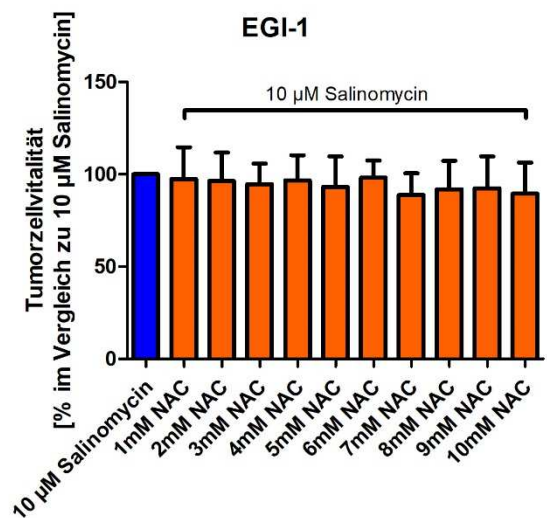
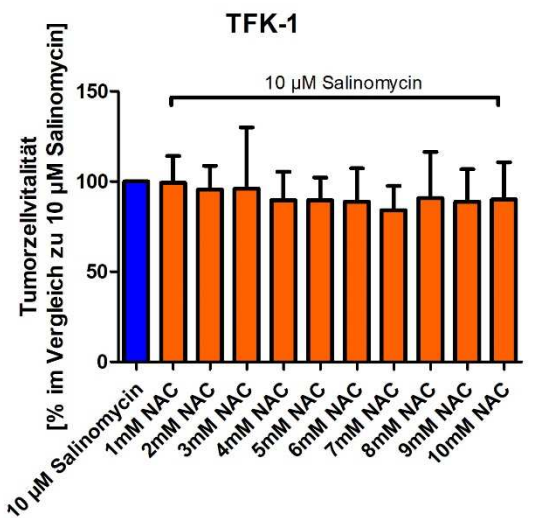
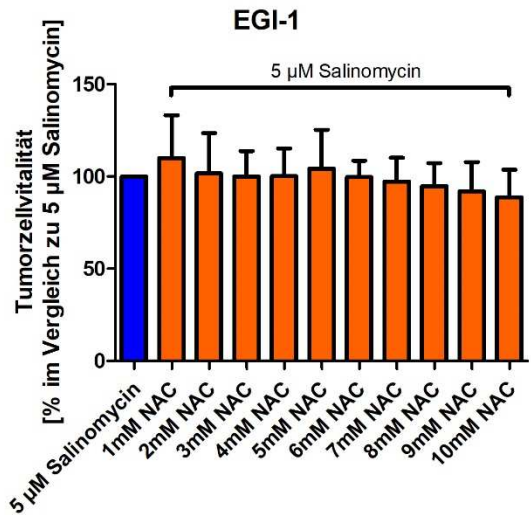
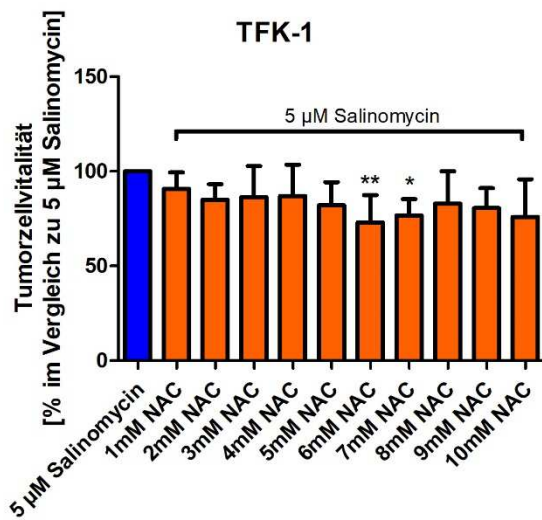
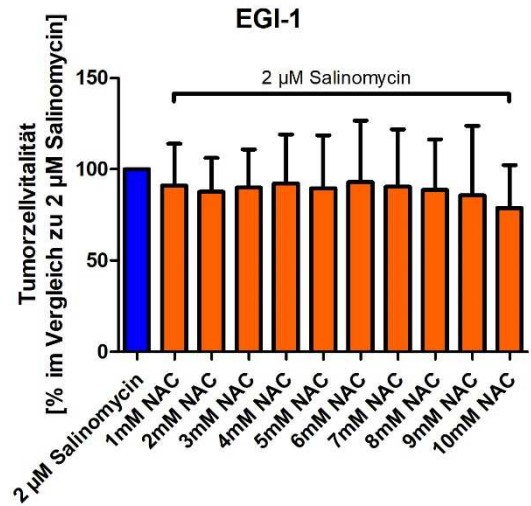
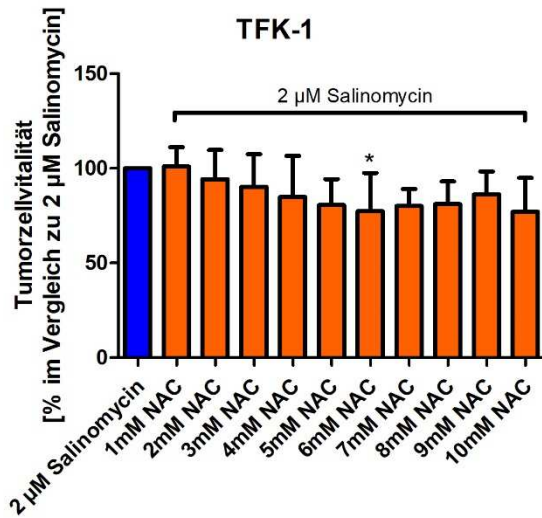


Abbildung 14: Analyse der Vitalität der humanen CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1 mit und ohne NAC-Vorbehandlung.

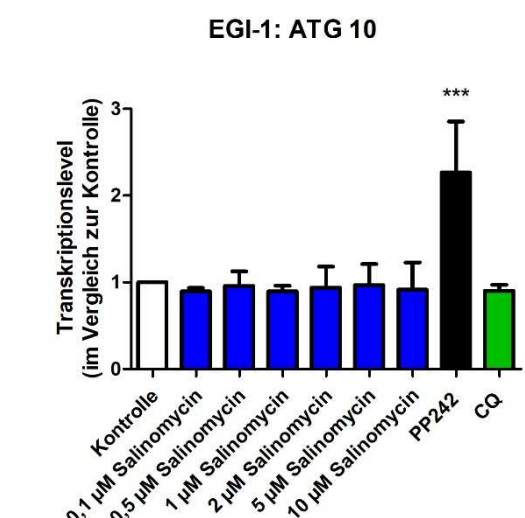
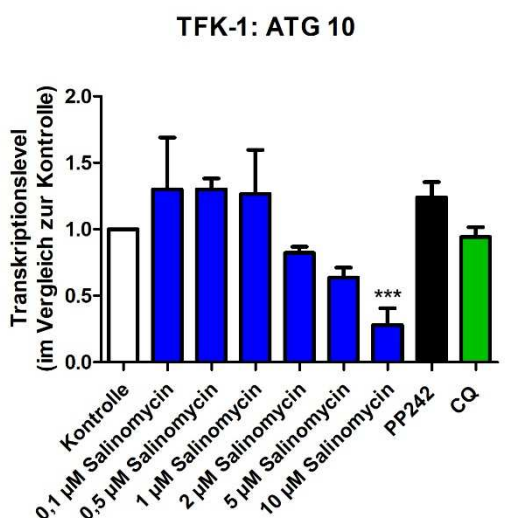
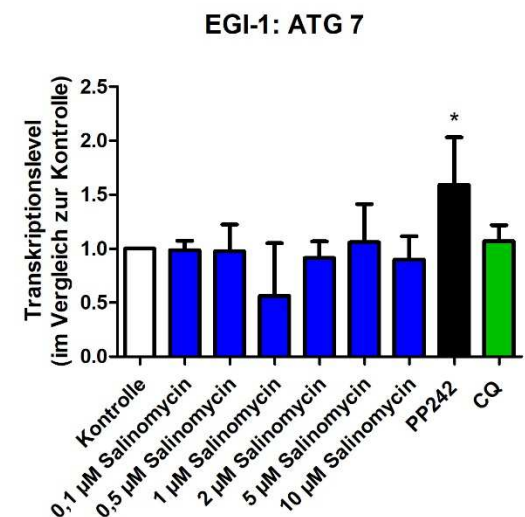
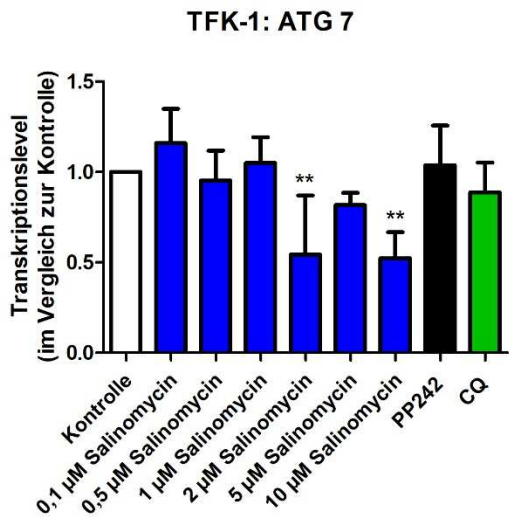
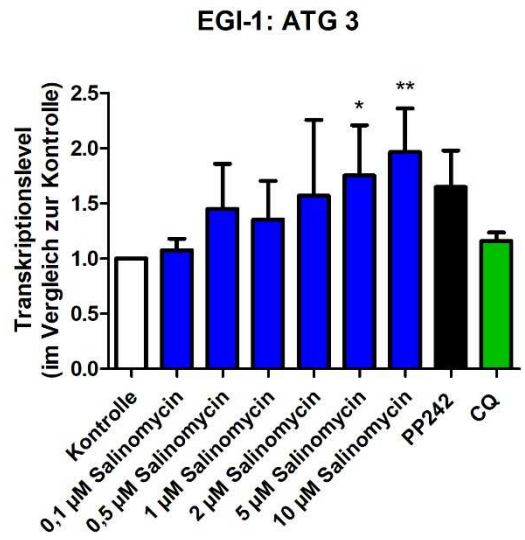
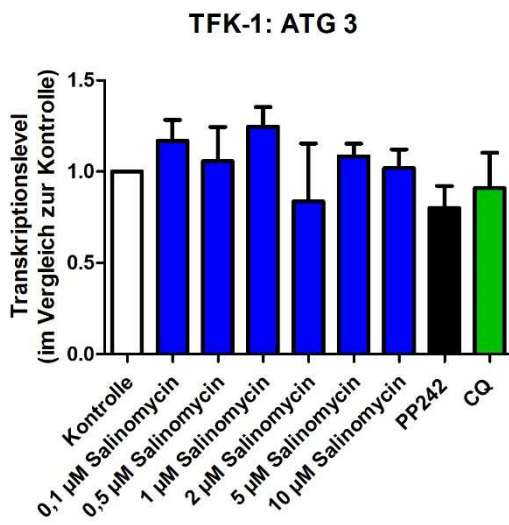
WST-1 Assay mit und ohne Vorbehandlung mit ansteigenden NAC-Konzentrationen (1 Stunde; 1-10 mM) und anschließender Behandlung mit SAL (24 Stunden; 0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M). (A) Reduktion der Zellvitalität durch SAL. Der Effekt ist in TFK-1 Zellen dosisabhängig. EGI-1 Zellen weisen erst in hohen SAL-Konzentrationen eine signifikante Inhibition der Vitalität auf. (B) Durch NAC-Vorbehandlung kann die Vitalität der mit SAL stimulierten Zellen nicht verbessert werden. Die Ergebnisse sind als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts +/- Standardabweichung, $p^* < 0,05$, $**p < 0,01$, $p^{***} < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle.

4.8 Der Einfluss von SAL auf das Transkriptionslevel der ATG in humanen CCC-Zellen

Basierend auf den Ergebnissen der durchgeführten Experimente fungiert SAL als Inhibitor der Autophagieaktivität von TFK-1 und EGI-1 Zellen. Abschließend sollte die Expression der Autophagie assoziierten Gene (autophagy related genes, ATG) in humanen CCC-Zellen nach Exposition mit SAL untersucht werden. Dafür wurden TFK-1 und EGI-1 Zellen mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M), PP242 (5 μ M) und CQ (5 μ M) für 24 Stunden exponiert und anschließend die Expression der fünf ATG (3, 7, 10, 12, 13) mittels qPCR analysiert.

Die Stimulation mit SAL führt bei den beiden humanen CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1 zu unterschiedlichen Ergebnissen der Transkriptionslevel der ATG. Bei den TFK-1 Zellen zeigt sich eine verminderte „messenger“ (Boten-)Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression bei ATG 7, ATG 10 und ATG 13. Bei ATG 10 und ATG 13 ist diese dosisabhängig. Zusätzlich bewirkt die SAL-Stimulation in niedrigen Dosen bei ATG 13 zuerst eine vermehrte mRNA-Expression. Bei der Behandlung mit dem Autophagieinduktor PP242 und dem Autophagieinhibitor CQ der TFK-1 Zellen ist kein signifikanter Einfluss auf das Transkriptionslevel der ATG festzustellen (Abbildung 15). Bei den EGI-1 Zellen zeigt sich eine dosisabhängige vermehrte mRNA-Expression bei ATG 3 und ATG 12. Außerdem ist das Transkriptionslevel der ATG 7, 10, 12 und 13 signifikant erhöht nach der Stimulation mit PP242. Eine Stimulation mit CQ hat keinen signifikanten Einfluss auf das Transkriptionslevel der ATG in EGI-1 Zellen (Abbildung 15).

Ergebnisse



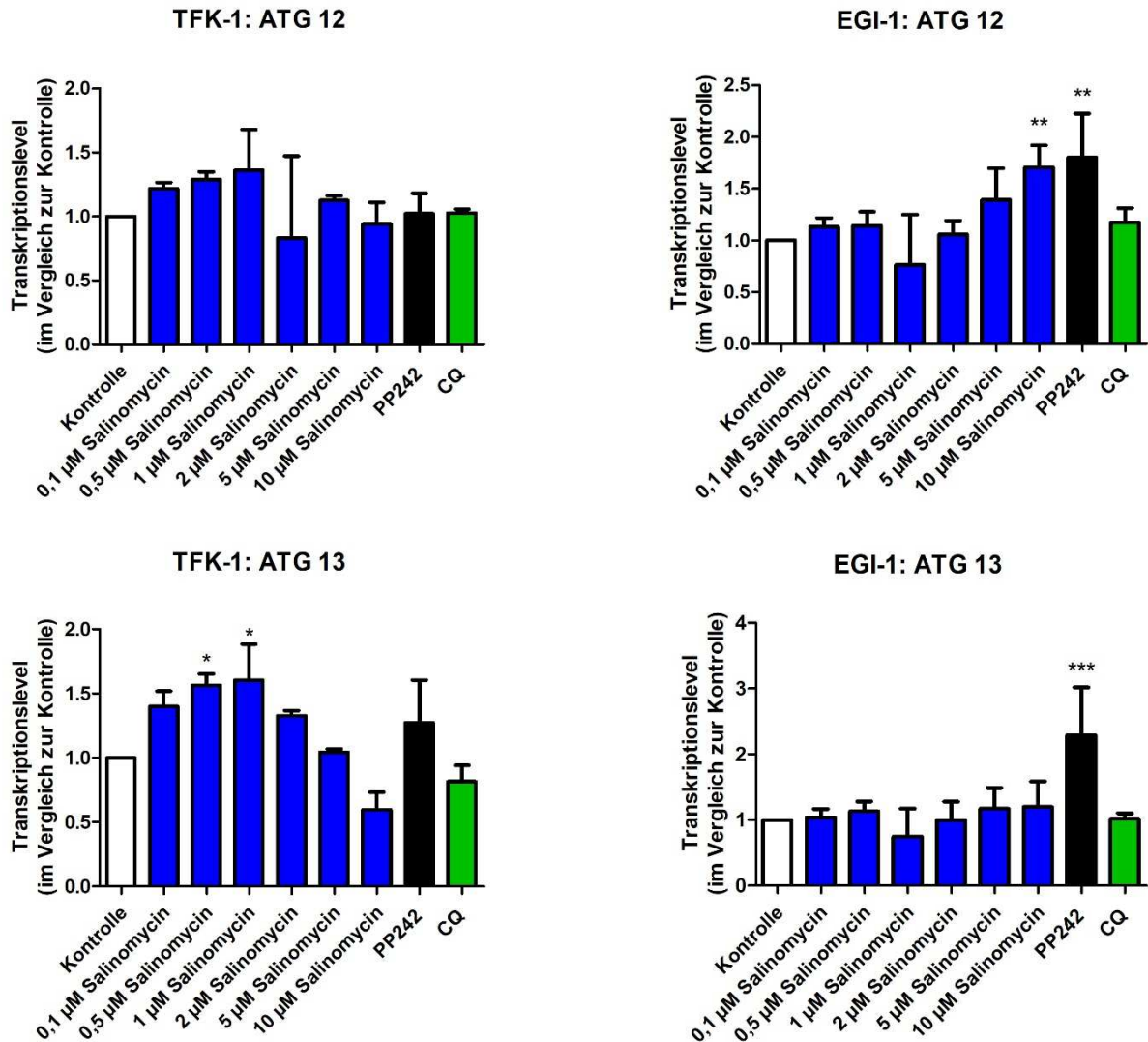


Abbildung 15: Der Einfluss von Salinomycin auf das Transkriptionslevel der ATG 3, 7, 10, 12 und 13.

qPCR der ATG 3, 7, 10, 12 und 13 und Analyse des Transkriptionslevels relativ zum Kontrollgen GAPDH nach Stimulation mit ansteigenden SAL-Konzentrationen (0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 μM), PP242 (5 μM) und CQ (5μM) für 24 Stunden. TFK-1 Zellen zeigen eine verminderte mRNA-Expression bei ATG 7 und 10 nach Stimulation mit SAL. Bei ATG 13 zeigt sich in niedrigen SAL-Dosen eine vermehrte mRNA-Expression und in hohen SAL-Dosen eine verminderte mRNA-Expression. Die Stimulation mit CQ und PP242 beeinflussen das Transkriptionslevel der ATG nicht. EGI-1 Zellen zeigen eine vermehrte mRNA-Expression bei ATG 3 und 12 nach Stimulation mit SAL. Nach Stimulation mit PP242 ist das Transkriptionslevel von ATG 7, 10, 12 und 13 signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Zusammenfassung von mindestens 3 unabhängigen Experimenten dargestellt in Form des Mittelwerts +/- Standardabweichung, *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001 im Vergleich zur Kontrolle.

5. Diskussion

Das Cholangiokarzinom (CCC) ist beim Menschen eine Tumorerkrankung mit sehr schlechter Prognose. Die einzige kurative Therapiemöglichkeit ist die vollständige Resektion, die durch das aggressive Wachstum, die frühe Metastasierung und eine oft späte Diagnose häufig nicht möglich ist (Vogel *et al.*, 2014; Zhu, 2015). Daher ist es von großem Interesse, neue Therapiemöglichkeiten zu finden. Das Antibiotikum Salinomycin (SAL) weist eine zytostatische Wirksamkeit gegen verschiedene solide und nicht solide Tumorentitäten (Fuchs *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016; Xipell *et al.*, 2016) auf. Diese Effekte wurde bereits in humanen CCC-Zellen beschrieben; neben morphologischen Veränderungen führt die Exposition mit SAL zu einer Inhibition der Migration und Proliferation und zur Apoptose der CCC-Zellen (Lieke *et al.*, 2012).

Das arbeitsleitende Ziel dieser Dissertation war die Etablierung eines CCC-Mausmodells, um die Wirksamkeit von SAL *in vivo* zu untersuchen. Der Nachweis der Wirksamkeit von SAL in einem Tiermodell ist die Voraussetzung für einen potentiellen klinischen Einsatz. Darüber hinaus sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Wirksamkeit von SAL durch eine Interferenz mit der Autophagieaktivität der Tumorzellen vermittelt wird.

Die Exposition von murinen CCC-Zellen mit SAL führt zu einer dosisabhängigen Inhibition der Proliferation, Migration und Invasion und induziert Apoptose in den murinen CCC-Zellen. Basierend auf diesen Vorarbeiten konnten Klose *et al.* (2018) die Wirksamkeit von SAL *in vivo* in einem CCC-Mausmodell zeigen. SAL inhibiert das subkutane und das intrahepatische Tumorwachstum und reduziert die intrahepatische Lebermetastasierung.

Obwohl die Wirksamkeit von SAL bereits in vielen verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte, ist der Wirkmechanismus von SAL noch nicht vollständig verstanden. Ein potentieller Mechanismus beruht auf der Beeinflussung der Autophagieaktivität der CCC-Zellen. Da Tumorzellen vermehrt mit Stress, zum Beispiel vermittelt durch Hypoxie, Medikamente und Bestrahlung umgehen müssen, sind sie mehr auf einen störungsfreien Ablauf der Autophagie angewiesen (Cui *et al.*, 2013). Klose *et al.* (2014) konnten zeigen, dass SAL die Autophagie in Zellen des hepatozellulären Karzinoms inhibiert. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die Autophagie in CCC-Zellen, die aus Patienten isoliert wurden, aktiviert ist und dies zu einer vermehrten Zellinvasion führt. Eine Inhibition dieser aktivierten Autophagie hemmt das Tumorwachstum und steigert die Chemosensibilität der CCC-Zellen (Hou *et al.*, 2011; Nitta *et al.*, 2014).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Autophagieaktivität in humanen CCC-Zellen zeigen, dass die Behandlung mit SAL zu einer Inhibition der Autophagie führt. Dies ist verbunden mit einer Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und ROS. Dabei wirkt SAL

als Inhibitor der basalen und der pharmakologisch aktivierten Autophagie. Da eine funktionelle Autophagie essentiell für die Zelle ist, um dysfunktionale Mitochondrien abzubauen und eine Akkumulation von ROS zu verhindern (Kim *et al.*, 2007), ist es anzunehmen, dass die Inhibition der Autophagie zur Wirksamkeit von SAL in humanen CCC-Zellen beiträgt. Vermutlich wird der Antitumoreffekt von SAL durch die aus der Inhibition der Autophagie resultierenden Akkumulation von ROS über verschiedene molekulare Wege vermittelt. Über solch eine durch ROS vermittelte Apoptose wurde auch bereits in anderen Tumorentitäten berichtet (Klose *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017b). Jedoch verbessert eine Vorbehandlung der humanen CCC-Zellen mit dem Antioxidans N-Acetylcystein die Vitalität der CCC-Zellen nicht. Somit könnte es sein, dass die Akkumulation von ROS nicht der ausschlaggebende Mechanismus für den zytotoxischen Effekt von SAL ist, wie es auch bereits Xipell *et al.* (2016) vermuteten, sondern verschiedene Signalwege auf dem Weg zum Zelltod durch ROS beeinflusst werden. Um diese These zu festigen bedarf es aber weiteren Untersuchungen.

An welchem Punkt SAL in die komplexe Regulation der Autophagie eingreift bleibt unklar. Die Genexpression kann durch äußere Einflüsse stimuliert (vermehrte mRNA-Expression) oder inhibiert (verminderte mRNA-Expression) werden. Dadurch wird reguliert zu welcher Zeit und in welchem Ausmaß das von einem Gen codierte Protein produziert wird. Die Genregulation kann auf DNA-, RNA- und Proteinebene stattfinden. Die Analyse der ATG mit Hilfe der quantitativen Polymerasekettenreaktion zeigt eine Beeinflussung der Expression der ATG nach der Behandlung mit ansteigenden SAL-Konzentrationen. Die Veränderung in den Expressionsmustern der ATG 3, 7, 10, 12 und 13 sind in den beiden humanen CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1 aber unterschiedlich. Diese heterogene Auswirkung von SAL auf die Expressionsmuster der ATG könnte auf die unterschiedliche Herkunft der humanen CCC-Zellen zurückzuführen sein (Scherdin *et al.*, 1987; Saijyo *et al.*, 1995). Bereits White *et al.* (2012) vermutet einen Zusammenhang zwischen dem Zelltyp und der genetischen Herkunft der Zellen und einer unterschiedlichen Rolle der Autophagie in den jeweiligen Zellen. Die dosisabhängige verminderte mRNA-Expression der ATG 7, 10 und 13 in den TFK-1 Zellen lässt eine direkte Inhibition der Autophagie vermuten, die über ATG 10 und 13 vor allem die Autophagosomenformation betrifft (NCBI, 2017a; NCBI, 2017b). Die vermehrte mRNA-Expression bei niedrigen SAL-Dosen bei ATG 13 unterstützt die These von Jangamreddy *et al.* (2015), dass SAL in niedrigen Dosen zu einer Induktion der Autophagie führt. Bei den EGI-1 Zellen kommt es zu einer vermehrten mRNA-Expression bei ATG 3 und 12 nach Exposition mit hohen Dosen von SAL. Da die ATG nicht spezifisch für die Autophagie sind, könnte diese vermehrte Expression auf eine ihrer anderen Funktionen zurückzuführen sein. In adhärennten Darmepithelzellen konnte gezeigt werden, dass die artifizielle Erhöhung des Expressionsmusters von ATG 3 in Verbindung mit äußeren Umständen, die die Autophagie nicht begünstigen, zur Apoptose der Zellen führen kann. Diese Apoptoseinduktion ist

unabhängig von ATG 12 (Yoo *et al.*, 2015). Zudem wird die mitochondriale Homöostase und der Zelltod über eine kovalente Bindung von ATG 3 und ATG 12 reguliert. Zellen mit keinem ATG 3/ATG 12-Konjugat zeigen eine Expansion der mitochondrialen Masse und eine Inhibition des Zelltods über den mitochondrialen Signalweg (Radoshevich *et al.*, 2010). Zusätzlich agiert ATG 12 als positiver Vermittler bei der durch Mitochondrien vermittelten Apoptose und wirkt dadurch proapoptotisch (Rubinstein *et al.*, 2011). Die vermehrte Expression dieser beiden ATG könnte also hinweisend für eine Induktion des Zelltods in den EGI-1 Zellen sein.

Die Wirkung von SAL auf die Autophagieaktivität in verschiedenen Tumorentitäten wird kontrovers diskutiert. Zum einen inhibiert SAL die Autophagie und führt dadurch zu einer Beeinträchtigung des Tumorüberlebens (Yue *et al.*, 2013; Kloese *et al.*, 2014; Xipell *et al.*, 2016). Zum anderen wird die Autophagieaktivität durch SAL induziert und diese Autophagieinduktion wirkt entweder als Nebeneffekt von SAL schützend für die Tumorzellen (Li *et al.*, 2013a; Kim *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017a; Kim *et al.*, 2017b; Yu *et al.*, 2017a) oder als Auslöser für den Zelltod (Yu *et al.*, 2004). Diese kontroversen Ergebnisse könnten auf die These zurückzuführen sein, dass verschiedene Tumorentitäten verschiedene molekulare Mechanismen haben und die Autophagie eng mit anderen Signalwegen zum Beispiel der Apoptose verbunden ist (Ravikumar *et al.*, 2010b). Allen gemeinsam ist aber, dass die Behandlung mit SAL zum Abtöten der Tumorzellen führt. Zusätzlich scheint die in verschiedenen Tumorentitäten beobachtete Akkumulation von ROS eine wichtige Rolle im Wirkmechanismus von SAL zu spielen (Kloese *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016; Xipell *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017a; Kim *et al.*, 2017b; Yu *et al.*, 2017a).

Um schlussendlich den Wirkmechanismus von SAL in CCC-Zellen abschließend zu verstehen, werden weitere Untersuchungen nötig sein. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Akkumulation von ROS nach SAL Behandlung weiterführend untersucht werden. Dabei wäre vor allem die Auswirkung der Vorbehandlung mit NAC auf die Autophagie und die Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und ROS interessant. Für die Bedeutung der Wirkung von SAL auf die Expression der ATG bedarf es ebenfalls weiteren Untersuchungen.

Mit den experimentellen Arbeiten zur Wirksamkeit von SAL in murinen CCC-Zellen wurde die Grundlage für ein Mausmodell geschaffen. Mit diesem Modell können nun weitere Versuche zur Wirkung von SAL *in vivo* unternommen werden, die vor einem potentiellen klinischen Einsatz von SAL unabdingbar sind.

5.1 Veterinärmedizinischer Bezug

SAL stellt auch in der Veterinärmedizin eine neue Möglichkeit zur onkologischen Behandlung des CCC dar. Das CCC ist bei Tieren ebenfalls eine Tumorerkrankung mit sehr schlechter Prognose, da die Behandlungsmöglichkeiten beim Kleintier sehr begrenzt (Balkman, 2009) und beim Großtier nicht vorhanden sind (Braun *et al.*, 2005; Conti *et al.*, 2008; Müller und Niederhofer, 2010). Da SAL bereits in der Veterinärmedizin als Antikokzidium in der Geflügelindustrie eingesetzt wird (Danforth *et al.*, 1977), müsste es nicht neu eingeführt werden. Es ist aber auf die heterogene Verträglichkeit (LD50) bei den verschiedenen Tierarten zu achten (Aleman *et al.*, 2007; Rajaian *et al.*, 2009).

Der Fachbereich Onkologie ist ein stetig wachsender Bereich in der modernen Veterinärmedizin und es besteht ein hohes Interesse an neuen Behandlungsmöglichkeiten. Zusätzlich hat das Haustier heutzutage einen höheren Stellenwert und nimmt oft den Platz eines vollwertigen Familienmitglieds ein, für das die Besitzer die bestmögliche Behandlung wollen (Blage, 2018). Um jedoch SAL für den Zweck der onkologischen Behandlung des CCC und gegebenenfalls auch anderen Tumoren in der Veterinärmedizin einsetzen zu können, bedarf es spezifischer Studien, um die Wirksamkeit von SAL im CCC beziehungsweise anderen Tumorentitäten beim Tier zu analysieren. Die in dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse ermutigen jedoch dazu, den potentiellen Einsatz von SAL in der veterinärmedizinischen Onkologie stärker gezielt zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Analyse der Autophagieaktivität in humanen Cholangiokarzinomzellen nach Behandlung mit Salinomycin

Das Cholangiokarzinom beim Menschen zeigt ein aggressives Wachstum und ist weitgehend resistent gegen Chemotherapie und Bestrahlung. Die einzige kurative Therapiemöglichkeit ist die Resektion, wobei die Rezidivrate sehr hoch ist. Salinomycin ist ein Polyether-Antibiotikum, das in der Geflügelindustrie als Antikokzidium eingesetzt wird und eine Wirksamkeit gegen diverse solide und nicht-solide Tumorentitäten aufweist. Der zu Grunde liegende molekulare Wirkmechanismus ist noch weitestgehend unverstanden; eine Interferenz mit der Autophagie der Tumorzellen wird vermutet. Die Autophagie ist das dynamische Recyclingsystem der Zelle, das vor allem intrazelluläres Material abbaut.

Das arbeitsleitende Ziel dieser Dissertation war es zum einen, Grundlagen zur Etablierung eines Cholangiokarzinom-Mausmodell zu schaffen, um die Wirksamkeit von Salinomycin *in vivo* analysieren zu können. Dafür wurden Versuche zur Proliferation, Migration, Invasion und Apoptoseinduktion nach Behandlung mit Salinomycin in den beiden murinen Cholangiokarzinomzelllinien p246 und p254 durchgeführt. Zum anderen sollte der Wirkmechanismus von Salinomycin in den humanen Cholangiokarzinomzelllinien TFK-1 und EGI-1 untersucht und dabei die Hypothese überprüft werden, ob Salinomycin einen Einfluss auf die Autophagieaktivität der Zellen hat. Dafür wurden die Methoden Western Blot, Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie, Polymerasekettenreaktion und WST-1 Assay verwendet.

Salinomycin hemmte dosisabhängig die Proliferation, Migration, Invasion und induzierte die Apoptose in murinen Cholangiokarzinomzellen. In den humanen Cholangiokarzinomzellen hemmte Salinomycin die basale und die pharmakologisch aktivierte Autophagie. Dabei kam es in den Zellen zu einer Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und reaktiver Sauerstoffverbindungen. Eine Vorbehandlung mit dem Antioxidans N-Acetylcystein verbesserte die Vitalität der Zellen nicht. Die Beeinflussung selektiver Autophagiegene (ATG) nach Behandlung mit Salinomycin war in den beiden humanen Cholangiokarzinomzelllinien unterschiedlich. In TFK-1 Zellen war die Expression einzelner ATG vermindert während bei EGI-1 Zellen eine erhöhte Expression einzelner Autophagiegene gemessen wurde.

Diese Arbeit liefert Ergebnisse für die Etablierung eines Cholangiokarzinom-Mausmodells. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von humanen Cholangiokarzinomzellen mit Salinomycin zu einer Inhibition der Autophagie mit konsekutiver

Zusammenfassung

Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien und reaktiven Sauerstoffspezies und einer Beeinflussung der Autophagiegene führt.

7. Summary

Analysis of the autophagic activity in human cholangiocarcinoma cells after treatment with salinomycin

Human cholangiocarcinoma is characterized by aggressive tumor growth and resistance against common chemotherapy and radiation. The only curative therapy option is complete resection of the tumor. However, tumor recurrence rates are very high. Salinomycin is a polyether antibiotic, which is used as an anticoccidium in poultry. Additionally, salinomycin exerts antitumoral activity in various tumor entities. The underlying mode of action is poorly understood; interference with autophagy of the tumor cells is assumed. Autophagy is the dynamic recycling system of the cell, which especially degrades intracellular material.

The aim of this work was to investigate the effectiveness of salinomycin in murine cholangiocarcinoma cells to establish a mouse model investigating the activity of salinomycin against cholangiocarcinoma *in vivo*. Therefore, proliferation, migration, invasion and induction of apoptosis after treatment with salinomycin were analyzed in the two murine cholangiocarcinoma cell lines p246 and p254. Furthermore, the human cholangiocarcinoma cell lines TFK-1 and EGI-1 were exposed to salinomycin to analyze its impact on autophagic activity. In order to do so the methods western blot, flow cytometry, fluorescence microscopy, polymerase chain reaction and WST-1 assay were used.

Salinomycin inhibited dose-dependently proliferation, migration and invasion in murine cholangiocarcinoma cells. This was accompanied by induction of apoptotic cell death. In human cholangiocarcinoma cells salinomycin inhibited the basal and pharmacologically induced autophagy, resulting in accumulation of dysfunctional mitochondria and reactive oxygen species. Pretreatment with N-acetylcystein did not improve the vitality of the cells. Interference of autophagy-related genes after treatment with salinomycin differed among both human cholangiocarcinoma cell lines, resulting in a heterogeneous expression pattern.

This work provides the results to establish a cholangiocarcinoma mouse model *in vivo*.

Additionally it shows that the treatment with salinomycin in human cholangiocarcinoma cells is combined with an inhibition of autophagy, an accumulation of dysfunctional mitochondria, an accumulation of reactive oxygen species and an influence on autophagy genes.

8. Literaturverzeichnis

Al Dhaheer, Y., Attoub, S., Arafat, K., Abuqamar, S., Eid, A., Al Faresi, N. und Iratni, R. (2013):

Salinomycin induces apoptosis and senescence in breast cancer: upregulation of p21, downregulation of survivin and histone H3 and H4 hyperacetylation
Biochim Biophys Acta. **1830** (4), 3121-3135

Aleman, M., Magdesian, K. G., Peterson, T. S. und Galey, F. D. (2007):

Salinomycin toxicosis in horses
J Am Vet Med Assoc. **230** (12), 1822-1826

Amaravadi, R. K., Yu, D., Lum, J. J., Bui, T., Christophorou, M. A., Evan, G. I., Thomas-Tikhonenko, A. und Thompson, C. B. (2007):

Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma
J Clin Invest. **117** (2), 326-336

Anderson, L. J. und Sandison, A. T. (1968):

Tumors of the liver in cattle, sheep and pigs
Cancer. **21** (2), 289-301

Ashrafihelan, J., Eisapour, H., Erfani, A. M., Kalantary, A. A., Amoli, J. S. und Mozafari, M. (2014):

High mortality due to accidental salinomycin intoxication in sheep
Interdiscip Toxicol. **7** (3), 173-176

Aslan, O., Cakir, L., Bekdik, I., Dogan, Z. und Tunc, A. (2014):

Cholangiocarcinoma of intrahepatic bile ducts with disseminated metastases in a Siamese cat: a case report
Veterinarni Medicina. **59** (7), 359-367

Azizi, S., Kheirandiah, R. und Sami, M. (2016):

Slaughterhouse report of intrahepatic cholangiocarcinoma in a Holstein cow
Comparative Clinical Pathology. **25** (6), 1321-1324

Balkman, C. (2009):

Hepatobiliary Neoplasia in Dogs and Cats
Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. **39** (3), 617-625

Bergquist, A. und von Seth, E. (2015):

Epidemiology of cholangiocarcinoma
Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. **29** (2), 221-232

Bernard, A., Jin, M., Xu, Z. und Klionsky, D. J. (2015):

A large-scale analysis of autophagy-related gene expression identifies new regulators of autophagy
Autophagy. **11** (11), 2114-2122

Blage, J. (2018):

Operation Tierliebe.

URL: <http://www.sueddeutsche.de/wissen/veterinaermedizin-operation-tierliebe-1.3850951>
[Stand: 27.02.2018 13.00 Uhr].

Literaturverzeichnis

- Boyden, S. (1962):
The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes
J Exp Med. **115**, 453-466
- Braun, U., Nuss, K., Soldati, G. und Ossent, P. (2005):
Clinical and ultrasonographic findings in four cows with liver tumours
Vet Rec. **157** (16), 482-484
- Brunk, R. (1965):
Leberzell- und Gallengangskarzinom beim Reh
Zeitschrift für Jagdwissenschaft. **11** (3), 145-150
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Rychlik, J. L., Genovese, K. J., Poole, T. L., Jung, Y. S., Bischoff, K. M., Anderson, R. C. und Nisbet, D. J. (2003):
Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety
Curr Issues Intest Microbiol. **4** (2), 43-51
- Cao, C., Subhawong, T., Albert, J. M., Kim, K. W., Geng, L., Sekhar, K. R., Gi, Y. J. und Lu, B. (2006):
Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells
Cancer Res. **66** (20), 10040-10047
- Cha, J. M., Kim, M. H., Lee, S. K., Seo, D. W., Lee, S. S., Lee, J. H., Lee, S. G. und Jang, S. J. (2006):
Clinicopathological Review of 61 Patients with Early Bile Duct Cancer
Clinical Oncology. **18** (9), 669-677
- Chang, H. P. (1964):
Primary carcinoma of bile duct of the liver of the cat (*Felis catus*) infested with *Clonorchis sinensis*
J Pathol Bacteriol. **87** (2), 239-244
- Chang, H. P. (1965):
Hepatic Clonorchiasis and Carcinoma of the bile duct in a dog
J Pathol Bacteriol. **89**, 365-367
- Choi, D., Lim, J. H., Lee, K. T., Lee, J. K., Choi, S. H., Heo, J. S., Jang, K. T., Lee, N. Y., Kim, S. und Hong, S. T. (2006):
Cholangiocarcinoma and *Clonorchis sinensis* infection: a case-control study in Korea
J Hepatol. **44** (6), 1066-1073
- Conti, M. B., Marchesi, M. C., Zappulla, F., Buttarelli, D., Lepri, E., Passamonti, F., Galletti, S., Rucco, G. und Rueca, F. (2008):
Clinical findings and diagnosis in a case of cholangiocellular carcinoma in a horse
Vet Res Commun. **32** (Suppl 1), 271-273
- Crazzolara, R., Bradstock, K. F. und Bendall, L. J. (2009):
RAD001 (Everolimus) induces autophagy in acute lymphoblastic leukemia
Autophagy. **5** (5), 727-728
- Cui, J., Gong, Z. und Shen, H. M. (2013):
The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets
Biochim Biophys Acta. **1836** (1), 15-26

Literaturverzeichnis

Cullen, J. M. (2017):

Tumors of the liver and gallbladder

In: Tumors in Domestic Animals. Meuten, D. J.-

Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. -ISBN: 0-8138-2179-7. 617-622

D'Alessandro, S., Corbett, Y., Ilboudo, D. P., Misiano, P., Dahiya, N., Abay, S. M., Habluetzel, A., Grande, R., Gismondo, M. R., Dechering, K. J., Koolen, K. M., Sauerwein, R. W., Taramelli, D., Basilico, N. und Parapini, S. (2015):

Salinomycin and other ionophores as a new class of antimalarial drugs with transmission-blocking activity

Antimicrob Agents Chemother. **59** (9), 5135-5144

Danforth, H. D., Ruff, M. D., Reid, W. M. und Miller, R. L. (1977):

Anticoccidial activity of salinomycin in battery raised broiler chickens

Poult Sci. **56** (3), 926-932

Darwish Murad, S., Kim, W. R., Harnois, D. M., Douglas, D. D., Burton, J., Kulik, L. M., Botha, J. F., Mezrich, J. D., Chapman, W. C., Schwartz, J. J., Hong, J. C., Emond, J. C., Jeon, H., Rosen, C. B., Gores, G. J. und Heimbach, J. K. (2012):

Efficacy of neoadjuvant chemoradiation, followed by liver transplantation, for perihilar cholangiocarcinoma at 12 US centers

Gastroenterology. **143** (1), 88-98.e83; quiz e14

Decker, T. und Lohmann-Matthes, M. L. (1988):

A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity

J Immunol Methods. **115** (1), 61-69

DeOliveira, M. L., Cunningham, S. C., Cameron, J. L., Kamangar, F., Winter, J. M., Lillemoe, K. D., Choti, M. A., Yeo, C. J. und Schulick, R. D. (2007):

Cholangiocarcinoma: thirty-one-year experience with 564 patients at a single institution

Ann Surg. **245** (5), 755-762

Devarajan, E., Sahin, A. A., Chen, J. S., Krishnamurthy, R. R., Aggarwal, N., Brun, A. M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X. H., Tora, A. D. und Mehta, K. (2002):

Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance

Oncogene. **21** (57), 8843-8851

Dewangan, J., Srivastava, S. und Rath, S. K. (2017):

Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy

Tumour biol. **39** (3), 1010428317695035

Dimenna, G. P., Lyon, F. S., Creegan, J. A., Wright, G. J., Wilkes, L. C., Johnson, D. E. und Szymanski, T. (1990):

Salinomycin residues and their ionophoricity in pig tissues

Journal of Agricultural and Food Chemistry. **38**, 1029-1032

Dominguez, M. C., Chavez, G., Trigo, F. J. und Rosales, M. L. (2001):

Concurrent cholangiocarcinoma, peritonitis, paratuberculosis, and aspergillosis in a goat

Can Vet J. **42** (11), 884-885

Durando, M. M., MacKay, R. J., Staller, G. S., Cooper, B. J., Ginn, P. E. und Meneghetti, N. (1995):

Septic cholangiohepatitis and cholangiocarcinoma in a horse

J Am Vet Med Assoc. **206** (7), 1018-1021

Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. U. und Kimchi, A. (2009):
Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them
Cell Death Differ. **16** (7), 966-975

Europäisches Parlament und Rat der europäischen Union (2003):
Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22.
September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung: Verordnung (EG)
Nr. 1831/2003 (Futtermittelzusatzstoff-Verordnung).-
Amtsblatt der europäischen Union, 268/229-243

Fahim, M., del Valle, G. und Pressman, B. C. (1986):
Comparison of the effects of the ionophore salinomycin and adrenaline on the
haemodynamics and work efficiency of the dog heart
Cardiovasc Res. **20** (2), 145-152

Feng, Y., Yao, Z. und Klionsky, D. J. (2015):
How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational
regulation of autophagy
Trends Cell Biol. **25** (6), 354-363

Fuchs, D., Heinold, A., Opelz, G., Daniel, V. und Naujokat, C. (2009):
Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells
Biochem Biophys Res Commun. **390** (3), 743-749

Gavrieli, Y., Sherman, Y. und Ben-Sasson, S. A. (1992):
Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA
fragmentation
J Cell Biol. **119** (3), 493-501

Glick, D., Barth, S. und Macleod, K. F. (2010):
Autophagy: cellular and molecular mechanisms
J Pathol. **221** (1), 3-12

Guo, J. Y., Chen, H. Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G.,
Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M., Karantza, V., Coller, H. A., Dipaola, R. S.,
Gelinis, C., Rabinowitz, J. D. und White, E. (2011):
Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis
Genes Dev. **25** (5), 460-470

Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A. und Lander,
E. S. (2009):
Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening
Cell. **138** (4), 645-659

Gurlevik, E., Fleischmann-Mundt, B., Armbrrecht, N., Longerich, T., Woller, N., Kloos, A.,
Hoffmann, D., Schambach, A., Wirth, T. C., Manns, M. P., Zender, L., Kubicka, S. und
Kuhnel, F. (2013):
Adjuvant gemcitabine therapy improves survival in a locally induced, R0-resectable model of
metastatic intrahepatic cholangiocarcinoma
Hepatology. **58** (3), 1031-1041

Habershon-Butcher, J. L., Smyth, J. B. und Hallowell, G. D. (2008):
Bile duct carcinoma in a gelding

Vet Rec. **162** (9), 281-282

Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K. und Lippincott-Schwartz, J. (2010):
Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation
Cell. **141** (4), 656-667

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. und Yamamoto, A. (2009):
A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation
Nat Cell Biol. **11** (12), 1433-1437

He, M., Fu, Y., Yan, Y., Xiao, Q., Wu, H., Yao, W., Zhao, H., Zhao, L., Jiang, Q., Yu, Z., Jin, F., Mi, X., Wang, E., Cui, Z., Fu, L., Chen, J. und Wei, M. (2015):
The Hedgehog signalling pathway mediates drug response of MCF-7 mammosphere cells in breast cancer patients
Clin Sci (Lond). **129** (9), 809-822

Henri, J., Maurice, R., Postollec, G., Dubreil-Cheneau, E., Roudaut, B., Laurentie, M. und Sanders, P. (2012):
Comparison of the oral bioavailability and tissue disposition of monensin and salinomycin in chickens and turkeys
J Vet Pharmacol Ther. **35** (1), 73-81

Hirao, K., Matsumura, K., Imagawa, A., Enomoto, Y. und Hosogi, Y. (1974):
Primary neoplasms in dog liver induced by diethylnitrosamine
Cancer Res. **34** (8), 1870-1882

Hou, Y. J., Dong, L. W., Tan, Y. X., Yang, G. Z., Pan, Y. F., Li, Z., Tang, L., Wang, M., Wang, Q. und Wang, H. Y. (2011):
Inhibition of active autophagy induces apoptosis and increases chemosensitivity in cholangiocarcinoma
Lab Invest. **91** (8), 1146-1157

Hrzenjak, A., Kremser, M. L., Strohmeier, B., Moinfar, F., Zatloukal, K. und Denk, H. (2008):
SAHA induces caspase-independent, autophagic cell death of endometrial stromal sarcoma cells by influencing the mTOR pathway
J Pathol. **216** (4), 495-504

Ilhan, F., Yener, Z., Vural, S. A. und Haligur, M. (2008):
Mucinous cholangiocarcinoma with metastases in a Turkish Van cat - A case report
Bulletin Of The Veterinary Institute In Pulawy. **52** (1), 131-134

Jacobs, T. M. und Snyder, P. W. (2007):
Mucinous cholangiocarcinoma in a cat
J Am Anim Hosp Assoc. **43** (3), 168-172

Jain, M. V., Paczulla, A. M., Klonisch, T., Dimgba, F. N., Rao, S. B., Roberg, K., Schweizer, F., Lengerke, C., Davoodpour, P., Palicharla, V. R., Maddika, S. und Los, M. (2013):
Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development
J Cell Mol Med. **17** (1), 12-29

Jangamreddy, J. R., Ghavami, S., Grabarek, J., Kratz, G., Wiechec, E., Fredriksson, B. A., Rao Pariti, R. K., Cieslar-Pobuda, A., Panigrahi, S. und Los, M. J. (2013):

Literaturverzeichnis

- Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells
Biochim Biophys Acta. **1833** (9), 2057-2069
- Jangamreddy, J. R., Panigrahi, S. und Los, M. J. (2015):
Monitoring of autophagy is complicated--salinomycin as an example
Biochim Biophys Acta. **1853** (3), 604-610
- Kaplan, F. und Teksen, F. (2016):
Apoptotic effects of salinomycin on human ovarian cancer cell line (OVCAR-3)
Tumour Biol. **37** (3), 3897-3903
- Kato, M., Higuchi, T., Orita, Y., Ishikawa, Y. und Kadota, K. (1997):
Combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma in a mare
J Comp Pathol. **116** (4), 409-413
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972):
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics
Br J Cancer. **26** (4), 239-257
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. und Lemasters, J. J. (2007):
Selective degradation of mitochondria by mitophagy
Arch Biochem Biophys. **462** (2), 245-253
- Kim, K. Y., Park, K. I., Kim, S. H., Yu, S. N., Lee, D., Kim, Y. W., Noh, K. T., Ma, J. Y., Seo, Y. K. und Ahn, S. C. (2017a):
Salinomycin Induces Reactive Oxygen Species and Apoptosis in Aggressive Breast Cancer Cells as Mediated with Regulation of Autophagy
Anticancer Res. **37** (4), 1747-1758
- Kim, K. Y., Park, K. I., Kim, S. H., Yu, S. N., Park, S. G., Kim, Y. W., Seo, Y. K., Ma, J. Y. und Ahn, S. C. (2017b):
Inhibition of Autophagy Promotes Salinomycin-Induced Apoptosis via Reactive Oxygen Species-Mediated PI3K/AKT/mTOR and ERK/p38 MAPK-Dependent Signaling in Human Prostate Cancer Cells
Int J Mol Sci. **18** (5), 1088
- Kim, K. Y., Yu, S. N., Lee, S. Y., Chun, S. S., Choi, Y. L., Park, Y. M., Song, C. S., Chatterjee, B. und Ahn, S. C. (2011):
Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization
Biochem Biophys Res Commun. **413** (1), 80-86
- Kim, S. H., Choi, Y. J., Kim, K. Y., Yu, S. N., Seo, Y. K., Chun, S. S., Noh, K. T., Suh, J. T. und Ahn, S. C. (2016):
Salinomycin simultaneously induces apoptosis and autophagy through generation of reactive oxygen species in osteosarcoma U2OS cells
Biochem Biophys Res Commun. **473** (2), 607-613
- Kinashi, H., Ōtake, N., Yonehara, H., Sato, S. und Saito, Y. (1973):
The structure of salinomycin, a new member of the polyether antibiotics
Tetrahedron Letters. **14** (49), 4955-4958
- Klose, J., Eissele, J., Volz, C., Schmitt, S., Ritter, A., Ying, S., Schmidt, T., Heger, U., Schneider, M. und Ulrich, A. (2016):

Salinomycin inhibits metastatic colorectal cancer growth and interferes with Wnt/beta-catenin signaling in CD133(+) human colorectal cancer cells
BMC Cancer. **16** (1), 896

Klose, J., Guerlevik, E., Trostel, T., Kuhnel, F., Schmidt, T., Schneider, M. und Ulrich, A. (2018):

Salinomycin inhibits cholangiocarcinoma growth by inhibition of autophagic flux
Oncotarget. **9** (3), 3619-3630

Klose, J., V. Stankov, M., Kleine, M., Ramackers, W., Panayotova-Dimitrova, D., D. Jäger, M., Klempnauer, J., Winkler, M., Bektas, H., M. N. Behrens, G. und W. R. Vondran, F. (2014):

Inhibition of autophagic flux by salinomycin results in anti-cancer effect in hepatocellular carcinoma cells
PloS one. **9** (5), e95970

Kolligs, F. T., Zech, C. J., Schonberg, S. O., Schirra, J., Thasler, W., Graeb, C., Beuers, U., Wilkowski, R., Jacobs, T., Bock, S., Berster, J., Heinemann, V. und Schafer, C. (2008):
Interdisciplinary diagnosis of and therapy for cholangiocarcinoma
Z Gastroenterol. **46** (1), 58-68

Konstantinos, C. K., George, K. und Evangelos, M. (2013):
Salinomycin toxicosis in broiler breeders and turkeys: Report of the first case
American Journal of Animal and Veterinary Sciences. **8** (4), 190-196

Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. und van Oers, M. H. (1994):

Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis
Blood. **84** (5), 1415-1420

Kornek, G. und Schima, W. (2010):

Gallenblasen- und Gallengangkarzinom

In: Die Onkologie. Hiddemann, W. und Bartram, C.-

Berlin ; Heidelberg [u.a.]: Springer. -ISBN: 3-540-64648-5, 978-3-540-79724-1, 978-3-540-64648-8. 918-929

Koukourakis, M. I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C. E., Sivridis, E., Pouliliou, S., Mitrakas, A., Gatter, K. C. und Harris, A. L. (2015):

Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines
PloS one. **10** (9), e0137675

Lawrence, H. J., Erb, H. N. und Harvey, H. J. (1994):

Nonlymphomatous hepatobiliary masses in cats: 41 cases (1972 to 1991)
Vet Surg. **23** (5), 365-368

Li, R., Dong, T., Hu, C., Lu, J., Dai, J. und Liu, P. (2017):

Salinomycin repressed the epithelial-mesenchymal transition of epithelial ovarian cancer cells via downregulating Wnt/beta-catenin pathway
Onco Targets Ther. **10**, 1317-1325

Li, T., Liu, X., Shen, Q., Yang, W., Huo, Z., Liu, Q., Jiao, H. und Chen, J. (2016):

Salinomycin exerts anti-angiogenic and anti-tumorigenic activities by inhibiting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis

Oncotarget. **7** (18), 26580-26592

Li, T., Su, L., Zhong, N., Hao, X., Zhong, D., Singhal, S. und Liu, X. (2013a):
Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells
Autophagy. **9** (7), 1057-1068

Li, X., Xu, H. L., Liu, Y. X., An, N., Zhao, S. und Bao, J. K. (2013b):
Autophagy modulation as a target for anticancer drug discovery
Acta Pharmacol Sin. **34** (5), 612-624

Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H. und Levine, B. (1999):
Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1
Nature. **402** (6762), 672-676

Lieke, T., Ramackers, W., Bergmann, S., Klempnauer, J., Winkler, M. und Klose, J. (2012):
Impact of Salinomycin on human cholangiocarcinoma: induction of apoptosis and impairment of tumor cell proliferation in vitro
BMC Cancer. **12**, 466

Lim, J. H., Jang, K. T., Choi, D., Lee, W. J. und Lim, H. K. (2006):
Early bile duct carcinoma: comparison of imaging features with pathologic findings
Radiology. **238** (2), 542-548

Lindemann, M. D., Kornegay, E. T., Stahly, T. S., Cromwell, G. L., Easter, R. A., Kerr, B. J. und Lucas, D. M. (1985):
The efficacy of salinomycin as a growth promotant for swine from 9 to 97 kg
J Anim Sci. **61** (4), 782-788

Liu, R., Wang, X., Chen, G. Y., Dalerba, P., Gurney, A., Hoey, T., Sherlock, G., Lewicki, J., Shedden, K. und Clarke, M. F. (2007):
The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells
N Engl J Med. **356** (3), 217-226

Lu, D., Choi, M. Y., Yu, J., Castro, J. E., Kipps, T. J. und Carson, D. A. (2011):
Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells
Proc Natl Acad Sci U S A. **108** (32), 13253-13257

Lu, W. und Li, Y. (2014):
Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells
J Cell Biochem. **115** (10), 1799-1807

Manago, A., Leanza, L., Carraretto, L., Sassi, N., Grancara, S., Quintana-Cabrera, R., Trimarco, V., Toninello, A., Scorrano, L., Trentin, L., Semenzato, G., Gulbins, E., Zoratti, M. und Szabo, I. (2015):
Early effects of the antineoplastic agent salinomycin on mitochondrial function
Cell Death Dis. **6**, e1930

Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. und Kroemer, G. (2014):
Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis
Nat Rev Mol Cell Biol. **15** (2), 81-94

Literaturverzeichnis

- Maronpot, R. R., Giles, H. D., Dykes, D. J. und Irwin, R. D. (1991):
Furan-induced hepatic cholangiocarcinomas in Fischer 344 rats
Toxicol Pathol. **19** (4 Pt 2), 561-570
- Mawdesley-Thomas, L. E. (1970):
Significance of Liver Tumour Induction in Animals
In: *Metabolic Aspects of Food Safety*. Roe, F.-
Elsevier. -ISBN: 978-0-12-592550-1. 481-531
- Maycotte, P., Aryal, S., Cummings, C. T., Thorburn, J., Morgan, M. J. und Thorburn, A. (2012):
Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy
Autophagy. **8** (2), 200-212
- Mehlhorn, H., Ganster, H. J. und Raether, W. (1984):
Effect of salinomycin-Na on malaria parasites (*Plasmodium falciparum* and *P. berghei*)
Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. **256** (3), 305-313
- Mischke, R., Hoinghaus, R., Lutkefels, E., Buhl, K., Gerhardt, A. und Hewicker-Trautwein, M. (2003):
Immunocytological confirmation of bone marrow metastases in a dog with cholangiocarcinoma
J Small Anim Pract. **44** (9), 411-414
- Mitani, M., Yamanishi, T. und Miyazaki, Y. (1975):
Salinomycin: A new monovalent cation ionophore
Biochem Biophys Res Commun. **66** (4), 1231-1236
- Mitani, M., Yamanishi, T., Miyazaki, Y. und Otake, N. (1976):
Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration
Antimicrob Agents Chemother. **9** (4), 655-660
- Miyazaki, Y., Shibuya, M., Sugawara, H., Kawaguchi, O. und Hirsoe, C. (1974):
Salinomycin, a new polyether antibiotic
J Antibiot (Tokyo). **27** (11), 814-821
- Mizushima, N. und Komatsu, M. (2011):
Autophagy: renovation of cells and tissues
Cell. **147** (4), 728-741
- Mizushima, N., Yoshimori, T. und Levine, B. (2010):
Methods in mammalian autophagy research
Cell. **140** (3), 313-326
- Mueller, P. O., Morris, D. D., Carmichael, K. P., Henry, M. M. und Baker, J. J. (1992):
Antemortem diagnosis of cholangiocellular carcinoma in a horse
J Am Vet Med Assoc. **201** (6), 899-901
- Müller, A. und Niederhofer, M. (2010):
Diagnostik eines Gallengangkarzinoms bei einem Pferd Fallbericht
Praktischer Tierarzt. **91** (5), 412- 416
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. und Ohsumi, Y. (2009):
Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast
Nat Rev Mol Cell Biol. **10** (7), 458-467

Literaturverzeichnis

- Naujokat, C. und Steinhart, R. (2012):
Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells
J Biomed Biotechnol. **2012**, 950658
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2017a):
ATG10 autophagy related 10 [Homo sapiens (human)] Abgerufen am: 19.12.2017 11.50
Uhr, von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83734>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2017b):
ATG13 autophagy related 13 [Homo sapiens (human)] Abgerufen am: 19.12.2017 12.20
Uhr, von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9776>
- Nitta, T., Sato, Y., Ren, X. S., Harada, K., Sasaki, M., Hirano, S. und Nakanuma, Y. (2014):
Autophagy may promote carcinoma cell invasion and correlate with poor prognosis in
cholangiocarcinoma
Int J Clin Exp Pathol. **7** (8), 4913-4921
- Nuzzo, G., Giuliani, F., Ardito, F., De Rose, A. M., Vellone, M., Clemente, G., Chiarla, C.
und Giovannini, I. (2010):
Intrahepatic cholangiocarcinoma: prognostic factors after liver resection
Updates Surg. **62** (1), 11-19
- Ohashi, Y. und Munro, S. (2010):
Membrane delivery to the yeast autophagosome from the Golgi-endosomal system
Mol Biol Cell. **21** (22), 3998-4008
- Ojo, O. O., Bhaduria, S. und Rath, S. K. (2013):
Dose-Dependent Adverse Effects of Salinomycin on Male Reproductive Organs and Fertility
in Mice
PloS one. **8** (7), e69086
- Omidi, A., Aslani, M. R., Movassaghi, A. R., Mohri, M. und Dadfar, M. (2010):
Accidental salinomycin intoxication in calves
Can Vet J. **51** (10), 1143-1145
- Pakozdy, A., Challande-Kathman, I., Doherr, M., Cizinauskas, S., Wheeler, S. J.,
Oevermann, A. und Jaggy, A. (2010):
Retrospective study of salinomycin toxicosis in 66 cats
Vet Med Int. **2010**, 147142
- Park, H. S., Lee, J. M., Choi, J. Y., Lee, M. W., Kim, H. J., Han, J. K. und Choi, B. I. (2008):
Preoperative evaluation of bile duct cancer: MRI combined with MR
cholangiopancreatography versus MDCT with direct cholangiography
AJR Am J Roentgenol. **190** (2), 396-405
- Pascal-Tenorio, A., Olivry, T., Gross, T. L., Atlee, B. A. und Ihrke, P. J. (1997):
Paraneoplastic alopecia associated with internal malignancies in the cat
Veterinary Dermatology. **8** (1), 47-52
- Patnaik, A. K. (1992):
A morphologic and immunocytochemical study of hepatic neoplasms in cats
Vet Pathol. **29** (5), 405-415
- Patnaik, A. K., Hurvitz, A. I., Lieberman, P. H. und Johnson, G. F. (1981):

Literaturverzeichnis

Canine bile duct carcinoma
Vet Pathol. **18** (4), 439-444

Pizzigatti, D., Batista, F. A., Martins, C. F., Ribeiro, O. C., Nunes, M. M. und Müller, T. R. (2011):
Cholangiocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Stratified Epithelial Portion of the Stomach in a Horse: A Case Report
Journal of Equine Veterinary Science. **31** (1), 3-7

Plentz, R. R. und Malek, N. P. (2015):
Clinical presentation, risk factors and staging systems of cholangiocarcinoma
Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. **29** (2), 245-252

Plumlee, K. H., Johnson, B. und Galey, F. D. (1995):
Acute salinomycin toxicosis of pigs
J Vet Diagn Invest. **7** (3), 419-420

Plummer, P. J. (1956):
A Survey Of Six Hundred And Thirty-Six Tumours From Domesticated Animals
Can J Comp Med Vet Sci. **20** (7), 239-251

Ponomarkov, V. und Mackey, L. J. (1976):
Tumours of the liver and biliary system
Bull World Health Organ. **53** (2-3), 187-194

Poole, B. und Ohkuma, S. (1981):
Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages
J Cell Biol. **90** (3), 665-669

Post, G. und Patnaik, A. K. (1992):
Nonhematopoietic hepatic neoplasms in cats: 21 cases (1983-1988)
J Am Vet Med Assoc. **201** (7), 1080-1082

Radoshevich, L., Murrow, L., Chen, N., Fernandez, E., Roy, S., Fung, C. und Debnath, J. (2010):
ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death
Cell. **142** (4), 590-600

Rajaian, H. N., Aberumandi, M. und Jalaei, J. (2009):
LD50 of salinomycin in laying and broiler chickens with or without oral phenobarbital and chloramphenicol
Online. J. Vet. Res. **13**, 26-31

Ramacciato, G., Nigri, G., Bellagamba, R., Petrucciani, N., Ravaioli, M., Cescon, M., Del Gaudio, M., Ercolani, G., Di Benedetto, F., Cautero, N., Quintini, C., Cucchetti, A., Lauro, A., Miller, C. und Pinna, A. D. (2010):
Univariate and multivariate analysis of prognostic factors in the surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma
Am Surg. **76** (11), 1260-1268

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. und Rubinsztein, D. C. (2010a):
Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures
Nat Cell Biol. **12** (8), 747-757

Literaturverzeichnis

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J. E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z. W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V. I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D. C., Menzies, F. M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F. H., Underwood, B. R., Winslow, A. R. und Rubinsztein, D. C. (2010b):
Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology
Physiol Rev. **90** (4), 1383-1435

Rehmtulla, A. J. (1974a):
Bile duct carcinoma in a dog
Can Vet J. **15** (11), 331-334

Rehmtulla, A. J. (1974b):
Occurrence of carcinoma of the bile ducts: a brief review
Can Vet J. **15** (10), 289-292

Repesh, L. A. (1989):
A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion
Invasion Metastasis. **9** (3), 192-208

Riccioni, R., Dupuis, M. L., Bernabei, M., Petrucci, E., Pasquini, L., Mariani, G., Cianfriglia, M. und Testa, U. (2010):
The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor
Blood Cells Mol Dis. **45** (1), 86-92

Rosen, C. B., Heimbach, J. K. und Gores, G. J. (2008):
Surgery for cholangiocarcinoma: the role of liver transplantation
HPB (Oxford). **10** (3), 186-189

Rubinstein, A. D., Eisenstein, M., Ber, Y., Bialik, S. und Kimchi, A. (2011):
The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis
Mol Cell. **44** (5), 698-709

Saijyo, S., Kudo, T., Suzuki, M., Katayose, Y., Shinoda, M., Muto, T., Fukuhara, K., Suzuki, T. und Matsuno, S. (1995):
Establishment of a new extrahepatic bile duct carcinoma cell line, TFK-1
Tohoku J Exp Med. **177** (1), 61-71

Scherdin, G., Garbrecht, M. und Klouche, M. (1987):
In vitro interaction of α -difluoromethylornithine (DFMO) and human recombinant interferon- α (rIFN- α) on human cancer cell lines
Immunobiology. **175**, 1-143

Schima, W., Prokesch, R., Osterreicher, C., Thurnher, S., Fugger, R., Schofl, R., Havelec, L. und Lammer, J. (1997):
Biliary Wallstent endoprosthesis in malignant hilar obstruction: long-term results with regard to the type of obstruction
Clin Radiol. **52** (3), 213-219

Schweitzer, N. und Vogel, A. (2014):
Medikamentöse Standardtherapie des Cholangiokarzinoms und aktuelle Arzneimittelstudien
Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen. **12** (1), 11-17

Singh, A. K., Maheshwari, S., Arya, R. K. und Datta, D.

- Salinomycin targets EZH2 driven epigenetic repression of death receptors in colon cancer stem cells
In: NCRI cancer conferences, 2015.
<http://abstracts.ncri.org.uk/abstract/salinomycin-targets-ezh2-driven-epigenetic-repression-of-death-receptors-in-colon-cancer-stem-cells-2/>
- Sithithaworn, P., Yongvanit, P., Duengngai, K., Kiatsopit, N. und Pairojkul, C. (2014):
Roles of liver fluke infection as risk factor for cholangiocarcinoma
Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences. **21** (5), 301-308
- Sotelo, J., Briceno, E. und Lopez-Gonzalez, M. A. (2006):
Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial
Ann Intern Med. **144** (5), 337-343
- Story, P. und Doube, A. (2004):
A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic
N Z Med J. **117** (1190), U799
- Swart, C., Du Toit, A. und Loos, B. (2016):
Autophagy and the invisible line between life and death
Eur J Cell Biol. **95** (12), 598-610
- Syring, Zweifel und Bleul (2008):
Gallengangskarzinom bei einer Kuh
Schweizer Archiv für Tierheilkunde. **150** (11), 559- 563
- Thongprasert, S., Napapan, S., Charoentum, C. und Moonprakan, S. (2005):
Phase II study of gemcitabine and cisplatin as first-line chemotherapy in inoperable biliary tract carcinoma
Ann Oncol. **16** (2), 279-281
- Tillich, M., Mischinger, H. J., Preisegger, K. H., Rabl, H. und Szolar, D. H. (1998):
Multiphasic helical CT in diagnosis and staging of hilar cholangiocarcinoma
AJR Am J Roentgenol. **171** (3), 651-658
- Treeck, O., Wackwitz, B., Haus, U. und Ortmann, O. (2006):
Effects of a combined treatment with mTOR inhibitor RAD001 and tamoxifen in vitro on growth and apoptosis of human cancer cells
Gynecol Oncol. **102** (2), 292-299
- Tsukada, M. und Ohsumi, Y. (1993):
Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*
FEBS Lett. **333** (1-2), 169-174
- van der Linde-Sipman, J. S., van den Ingh, T. S., van nes, J. J., Verhagen, H., Kersten, J. G., Beynen, A. C. und Plekkringa, R. (1999):
Salinomycin-induced polyneuropathy in cats: morphologic and epidemiologic data
Vet Pathol. **36** (2), 152-156
- van Sprundel, R. G. H. M., van den Ingh, T. S. G. A. M., Guscetti, F., Kershaw, O., Kanemoto, H., van Gils, H. M., Rothuizen, J., Roskams, T. und Spee, B. (2013):
Classification of primary hepatic tumours in the dog
The Veterinary Journal. **197** (3), 596-606

Literaturverzeichnis

- van Sprundel, R. G. H. M., van den Ingh, T. S. G. A. M., Guscetti, F., Kershaw, O., van Wolferen, M. E., Rothuizen, J. und Spee, B. (2014):
Classification of primary hepatic tumours in the cat
The Veterinary Journal. **202** (2), 255-266
- Verdoodt, B., Vogt, M., Schmitz, I., Liffers, S.-T., Tannapfel, A. und Mirmohammadsadegh, A. (2012):
Salinomycin Induces Autophagy in Colon and Breast Cancer Cells with Concomitant Generation of Reactive Oxygen Species
PloS one. **7** (9), e44132
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995):
A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V
J Immunol Methods. **184** (1), 39-51
- Vogel, A., Wege, H., Caca, K., Nashan, B. und Neumann, U. (2014):
Diagnostik und Therapie von Cholangiokarzinomen
Dtsch Arztebl International. **111** (44), 748-754
- Wang, F., He, L., Dai, W. Q., Xu, Y. P., Wu, D., Lin, C. L., Wu, S. M., Cheng, P., Zhang, Y., Shen, M., Wang, C. F., Lu, J., Zhou, Y. Q., Xu, X. F., Xu, L. und Guo, C. Y. (2012):
Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo
PloS one. **7** (12), e50638
- White, E. (2012):
Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer
Nat Rev Cancer. **12** (6), 401-410
- Wong, D., Hepworth, K., Yaeger, M., Miles, K. und Wilgenbusch, C. (2013):
Imaging diagnosis-hypoglycemia associated with cholangiocarcinoma and peritoneal carcinomatosis in a horse
Vet Radiol Ultrasound. **56** (1), E9-12
- Wu, Y. C., Wu, W. K., Li, Y., Yu, L., Li, Z. J., Wong, C. C., Li, H. T., Sung, J. J. und Cho, C. H. (2009):
Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells
Biochem Biophys Res Commun. **382** (2), 451-456
- Xipell, E., Gonzalez-Huarriz, M., Martinez de Irujo, J. J., García-Garzón, A., Lang, F. F., Jiang, H., Fueyo, J., Gomez-Manzano, C. und Alonso, M. M. (2016):
Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma
Oncotarget. **7** (21), 30626-30641
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell'antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N. und Kimmelman, A. C. (2011):
Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth
Genes Dev. **25** (7), 717-729
- Yang, Z. und Klionsky, D. J. (2010):
Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation

Curr Opin Cell Biol. **22** (2), 124-131

Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E. und Eskelinen, E. L. (2009):
3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum
Autophagy. **5** (8), 1180-1185

Yoo, B. H., Zagryazhskaya, A., Li, Y., Koomson, A., Khan, I. A., Sasazuki, T., Shirasawa, S.
und Rosen, K. V. (2015):
Upregulation of ATG3 contributes to autophagy induced by the detachment of intestinal
epithelial cells from the extracellular matrix, but promotes autophagy-independent apoptosis
of the attached cells
Autophagy. **11** (8), 1230-1246

Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H. und Lenardo, M. J.
(2004):
Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8
Science. **304** (5676), 1500-1502

Yu, S. N., Kim, S. H., Kim, K. Y., Ji, J. H., Seo, Y. K., Yu, H. S. und Ahn, S. C. (2017a):
Salinomycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis
through generation of reactive oxygen species in human glioma U87MG cells
Oncol Rep. **37** (6), 3321-3328

Yu, Z., Cheng, H., Zhu, H., Cao, M., Lu, C., Bao, S., Pan, Y. und Li, Y. (2017b):
Salinomycin enhances doxorubicin sensitivity through reversing the epithelial-mesenchymal
transition of cholangiocarcinoma cells by regulating ARK5
Braz J Med Biol Res. **50** (10), e6147

Yue, W., Hamai, A., Tonelli, G., Bauvy, C., Nicolas, V., Tharinger, H., Codogno, P. und
Mehrpour, M. (2013):
Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells
interferes with their maintenance
Autophagy. **9** (5), 714-729

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. und Heintz, N. (2003):
Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a
haploinsufficient tumor suppressor
Proc Natl Acad Sci U S A. **100** (25), 15077-15082

Zhang, A., He, W., Shi, H., Huang, X. und Ji, G. (2016):
Natural compound oblongifolin C inhibits autophagic flux, and induces apoptosis and
mitochondrial dysfunction in human cholangiocarcinoma QBC939 cells
Mol Med Rep. **14** (4), 3179-3183

Zhou, S., Wang, F., Wong, E. T., Fonkem, E., Hsieh, T.-C., Wu, J. M. und Wu, E. (2013):
Salinomycin: a novel anti-cancer agent with known anti-coccidial activities
Current medicinal chemistry. **20** (33), 4095-4101

Zhu, A. X. (2015):
Future directions in the treatment of cholangiocarcinoma
Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. **29** (2), 355-361

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	: „Adenosintri-phosphat-binding cassette“-Transporter
ACD	: „autophagic cell death“, durch Autophagie vermittelter Zelltod
ACH	: Ammoniumchlorid
Ambra1	: Autophagie und Beclin1 Regulator1
ATG	: „Autophagy related gene“, autophagieassoziiertes Gen
CCC	: cholangiozelluläres Karzinom
cDNA	: komplementäre DNA
CO ₂	: Kohlenstoffdioxid
CQ	: Chloroquin
DMSO	: Dimethylsulfoxid
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
EMT	: epitheliale-mesenchymale Transition
ER	: endoplasmatisches Retikulum
FACS	: „fluorescence-activated cell sorting“, Durchflusszytometrie
FBS	: „fetal bovine serum“, fetales Kälberserum
HCC	: hepatozelluläres Karzinom
LC3	: Mikrotubulie assoziierte Protein Leichtkette 3
LDH	: Laktatdehydrogenase
LD50	: mittlere letale Dosis
MFI	: „mean fluorescence intensity“, mittlere Fluoreszenzintensität
miRNA	: mikro Ribonukleinsäure
mRNA	: „messenger“ (Boten-)Ribonukleinsäure
mTOR	: „mechanistic target of rapamycin“
NAC	: N-Acetylcystein
OM	: „outer membrane“, äußere Membran
PBS	: „phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PI	: Propidiumiodid
PM	: Plasmamembran
PP242	: Torkinib
p62/SQSTM1	: Sequestosome1, multifunktionales Adapterprotein
qPCR	: quantitative Polymerasekettenreaktion
Ras	: „rat sarcoma“

Anhang

RNA	: Ribonukleinsäure
ROS	: „reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffspezies
SAL	: Salinomycin
SD	: „standard deviation“, Standardabweichung
TUNEL	: „terminal desoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling“
UV	: ultraviolett
Wnt- Signalweg	: „wingless-type-1“-Signalweg
3-MA	: 3-Methyladenin

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf der Autophagie nach Mizushima et al. (2010).....	6
Abbildung 2: Strukturformel von Salinomycin (Kinashi <i>et al.</i> , 1973).....	11
Abbildung 3: Inhibition der Proliferation muriner CCC-Zellen nach der Behandlung mit Salinomycin.....	27
Abbildung 4: Inhibition der Migration muriner CCC-Zellen nach der Behandlung mit Salinomycin.....	28
Abbildung 5: Inhibition der Invasion muriner CCC-Zellen nach der Behandlung mit Salinomycin.....	29
Abbildung 6: Salinomycin induziert Apoptose in murinen CCC-Zellen.....	30
Abbildung 7: Vergleich der LC3B-II Expression nach Exposition humaner CCC-Zellen mit PP242, CQ und Salinomycin.....	33
Abbildung 8: Vergleich der p62 Expression nach Stimulation humaner CCC-Zellen mit Salinomycin, CQ und einer Kombination aus Salinomycin und CQ.....	34
Abbildung 9: Reduktion der Autophagiekompartimente nach Stimulation mit Salinomycin...36	
Abbildung 10: Fluoreszenzbilder der Autophagiekompartimente in TFK-1 Zellen.....	38
Abbildung 11: Fluoreszenzbilder der Autophagiekompartimente in EGI-1 Zellen.....	40
Abbildung 12: Akkumulation der Mitochondrien nach Stimulation mit Salinomycin in TFK-1 und EGI-1 Zellen.....	42
Abbildung 13: Akkumulation von ROS nach Behandlung mit Salinomycin in TFK-1 und EGI-1 Zellen.....	43
Abbildung 14: Analyse der Vitalität der humanen CCC-Zelllinien TFK-1 und EGI-1 mit und ohne NAC- Vorbehandlung.....	45
Abbildung 15: Der Einfluss von Salinomycin auf das Transkriptionslevel der ATG 3, 7, 10, 12 und 13.....	49

9.3 Materialliste

9.3.1 Verbrauchsmaterialien

BD Microlance™3 (Kanüle 0,4mmx19mm)	BD Biosciences (USA)
Cryogenic Vial	Corning Inc. (USA)
Deckgläser Mikroskop 24x50mm	Marienfeld-Superior (Deutschland)
Disposable Scalpel	FEATHER Safety Razor Co., Ltd. (Japan)
Einmal-Pipettenspitzen SafeSeal SurPhob® (10 µl, 20µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Biozym Scientific GmbH (Deutschland)
Gel Loading Tips (Round)	Novex®/ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Handschuhe TouchNTuff	Ansell (Australien)
Lab-Tek® Chamber Slide™ System	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics International AG (Schweiz)
LightCycler® 480 Sealing Foil	Roche Diagnostics International AG (Schweiz)
Millex® Syringe driven Filter unit	Merck/ MILLIPORE (Deutschland)
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels 4-15%, 10-well comb, 50 µl/well	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels 10%, 10-well comb, 50 µl/well	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels 12%, 10-well comb, 50 µl/well	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
Nitrocellulose/Filter Paper Sandwiches, 0,45 µm	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
Pasteur Capillary Pipettes 230 mm	NeoLab (Deutschland)
PCR Tube Strips 0,2 ml	Eppendorf (Deutschland)
Prospekthüllen Nr. 455/4P Polyphan®P Folie	Langheck+Co KG (Deutschland)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Deutschland)
Safe-Lock Tubes 2,0ml	Eppendorf (Deutschland)
Spritze Bd Plastipak 20 ml	BD Biosciences (USA)
Stripette 5 ml	Corning Inc. (USA)
Stripette 10 ml	Corning Inc. (USA)
Stripette 25 ml	Corning Inc. (USA)
Stripette 50 ml	Sarstedt AG & Co. (Deutschland)
Transwell chambers	Cell Biolabs (USA)
U-40 Insulin 1ml Spritzen	BD Biosciences (USA)
Wattestäbchen	dm-drogerie markt GmbH + Co. KG (Deutschland)
Zellkulturflasche T25	Sarstedt AG & Co. (Deutschland)
Zellkulturflasche T175	Sarstedt AG & Co. (Deutschland)
5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Corning Inc. (USA)
6 Well Zellkultur Platte	Corning Inc. (USA)
12 Well Zellkultur Platte	Greiner Bio-One International GmbH (Österreich/Deutschland)
15 ml Falcon	Sarstedt AG & Co. (Deutschland)
24 Well Zellkultur Platte	Corning Inc. (USA)
50 ml Falcon	Sarstedt AG & Co. (Deutschland)
50 ml Reagent Reservoir	Corning Inc. (USA)
96 Well Zellkultur Platte	Corning Inc. (USA)

Anhang

9.3.2 Reagenzien

Accutase® solution	Sigma-Aldrich (USA)
AnnexinV apoptosis detection kit	BD Biosciences (USA)
Aqua injectabilia 10 ml	B.Braun Melsungen AG (Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (USA)
Cell Proliferation Reagent WST-1 (water soluble tetrazolium)	Roche Diagnostics International AG (Schweiz)
Chloroquin disphosphate salt	Sigma-Aldrich (USA)
CM-H2DCFDA (ROS Detection) (5-(and-6)-Chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat Acetylester)	Molecular probes®/ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Complete Tabletten	Roche Diagnostics International AG (Schweiz)
CO ₂ (Kohlenstoffdioxid)	Sauerstoffwerk Friedrich Gutoff GmbH (Deutschland)
CYTO-ID® Autophagy detection kit	Enzo life Sciences LTD. (UK)
Dimethyl sulfoxide Hybri-Max™ (DMSO)	Sigma-Aldrich (USA)
DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE (PBS)	Sigma-Aldrich (USA)
Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH+Co.KG (Deutschland)
FACS Clean	BD Biosciences (USA)
FACS Flow	BD Biosciences (USA)
FACS Rinse	BD Biosciences (USA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	gibco®/ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Flüssigstickstoff	Bierther GmbH (Deutschland)
HT Titer TACS Assay Kit	Trevigen (USA)
Lämmle sample buffer	Eigenherstellung Labor HD (Deutschland)
LDH Cytotoxicity Assay Kit	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics International AG (Schweiz)
Matrigel	BD Biosciences (USA)
MEM NEAA (100X) (minimum essential medium non essential amino acid)	gibco®/ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Methanol ≥ 99%, zur Synthese 2,5 l	Carl Roth GmbH+Co.KG (Deutschland)
MitoTracker® Green FM	Molecular probes®/ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
MitoTracker™ Red CM-H2Xros	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Moviol	Eigenherstellung Labor HD (Deutschland)
NaCl (Natriumchlorid)	B.Braun Melsungen AG (Deutschland)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (USA)
Pierce® BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
PP242 100MG	Active Biochem (Hong Kong)
ProLong™Gold with DAPI	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
RIPA Lysis Buffer, 10X	Merck/ MILLIPORE (Deutschland)
RNase-Free DNase Set (50)	QIAGEN (Niederlande)
RNeasy® Mini Kit (250)	QIAGEN (Niederlande)
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 Medium 500 ml	Sigma-Aldrich (USA)

Anhang

RPMI Medium 1640 (1X)+GlutaMAX™-I 500ml	gibco®/ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Salinomycin 25MG	Sigma-Aldrich (USA)
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich (USA)
SODIUM PYRUVATE	Sigma-Aldrich (USA)
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Trypan Blau	Biochrom GmbH (Deutschland)
Tween20 (Polyoxyethylene sorbitan monolaurate Polysorbate 20)	GERBU Biotechnik GmbH (Deutschland)
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius (für CCD Systeme)	Biozym Scientific GmbH (Deutschland)
10xTGS (Tris/Glycine/SDS Buffer, 10x, 5l)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)

9.3.3 Geräte

Analysewaage 0,01g- 120g	Kern&Sohn GmbH (Deutschland)
Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Deutschland)
Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Deutschland)
Cryo200 (Stickstofftank)	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY 300V-1000mA E831	Consort bvba (Belgien)
FACS Calibur	BD Biosciences (USA)
Falconroller RM5-30V	Ingenieurbüro CAT M.Zipperer GmbH (Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop Axiostar Plus	Zeiss (Deutschland)
Haemocytometer Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Deutschland)
Handzähler	Baumer IVO GmbH & Co. KG (Deutschland)
Infinite F200 PRO (microplate Reader)	Tecan Group AG (Schweiz)
Inkubator	Fa. BINDER GmbH (Deutschland)
Kühlschrank MEDline (4°C)	Liebherr-International Deutschland GmbH (Deutschland)
Lightcycler	Roche Diagnostics International AG (Schweiz)
Mastercycler (personal, gradient)	Eppendorf (Deutschland)
Mediumabsauger Motor	KNF Lab Laboport Neuberger (Deutschland)
Flasche Nalgene	Nalge Nunc International/ ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Mikroskopkamera EC3	Leica microsystems (Deutschland)
Mikroskop Leica DM IL	Leica microsystems (Deutschland)
Mikroskop Leica DM IL LED	Leica microsystems (Deutschland)
Mini Protean® Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)
NANODrop2000 Spectrophotometer	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
PCR Platten Kühlblock	Eppendorf (Deutschland)
PIPETBOY2	INTEGRA Biosciences AG (Schweiz)
Premium NoFrost (-20°C Gefrierschrank)	Liebherr-International Deutschland GmbH (Deutschland)
SAFE2020 (Hood)	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Deutschland)

Anhang

Transferpette® -8 20-200µL	Gilson, Inc. (USA)
Verstellbare Pipetten Reasearch plus	Eppendorf (Deutschland)
Vorschaltgerät HBO50 zum Fluoreszenzmikroskop	Leistungselektronik Jena GmbH (Deutschland)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc. (USA)
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Deutschland)
Western Blot Chemilumineszenz Kamera	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH (Deutschland)
Zählkammer Neubauer Improved	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Deutschland)

9.3.4 Programme

AxioVs40V 4.8.2.0	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Deutschland)
Cell Quest Pro Version 5.2	BD Biosciences (USA)
Exel	Microsoft (USA)
Fusion	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH (Deutschland)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc. (USA)
ImageJ	Wayne Rasband (USA)
LAS EZ Version 2.0.0 (Mikroskop Software)	Leica microsystems (Deutschland)
LightCycler®480 Software release 1.5.0 SP4	Roche Diagnostics International AG (Schweiz)
Magellan 7.2	Tecan Group AG (Schweiz)
NANODrop 2000/200c	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
Power Point	Microsoft (USA)
Word	Microsoft (USA)

9.3.5 Zellen

EGI-1	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Deutschland)
TFK-1	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Deutschland)
p246	Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der medizinischen Hochschule Hannover (Deutschland)
p254	Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der medizinischen Hochschule Hannover (Deutschland)

9.3.6 Antikörper

Anti-LC3B antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich (USA)
Beta-Actin Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Inc. (USA)
goat anti-mouse IgG-HRP (horseradish peroxidase)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA)
Goat anti-rabbit IgG-HRP (horseradish peroxidase)	Santa CruzBiotechnology, Inc. (USA)

Anhang

SQSTM1/p62 Rabbit Ab	Cell Signaling Technology, Inc. (USA)
Vinculin	Cell Signaling Technology, Inc. (USA)

9.3.7 Primer

ATG3_hu	Forward 5' AGC AAC GGC AGC CTT TAA C 3' Reverse 5' AAG TTC TCC CCC TCC TTC TG 3'	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
ATG7_hu	Forward 5' GAT CCG GGG ATT TCT TTC AC 3' Reverse 5' CAG CTT GGG TTT CTT GAT GC 3'	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
ATG10_hu	Forward 5' CAT CCC TGC AAG ACG AAT G 3' Reverse 5' AAC AAC TGG CCC TAC AAT GC 3'	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
ATG12_hu	Forward 5' AAC ACG AAC CAT CCA AGG AC 3' Reverse 5' CCA TCA CTG CCA AAA CAC TC 3'	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
ATG13_hu	Forward 5' AGT GGC AAT ACC CAT GAT GAC 3' Reverse 5' AGC CAG CTT CTC TGG TAA TGA G 3'	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)
GAPDH_hu	Forward 5' TGT TCG TCA TGG GTG TGA AC 3' Reverse 5' TGA TGG CAT GGA CTG TGG 3'	ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)

9.4 Publikationsverzeichnis

Klose, J., Guerlevik, E., Trostel, T., Kuhnel, F., Schmidt, T., Schneider, M. und Ulrich, A. (2018):

Salinomycin inhibits cholangiocarcinoma growth by inhibition of autophagic flux
Oncotarget. **9** (3), 3619-3630

10 Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. med. Martin Schneider für die Chance eine Doktorarbeit innerhalb der klinischen Forschergruppe KFO 227 anfertigen zu können.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Univ.- Prof. Dr. Salah Amasheh für die Übernahme der Erstkorrektur bedanken.

Ein großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Johannes Klose, der immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Außerdem möchte ich mich bei Marzena Knyssok- Sypniewski für ihre große Unterstützung im Labor und für die Beantwortung meiner vielen Fragen bedanken. Ebenso möchte ich mich für die konstruktive Zusammenarbeit bei allen Mitarbeitern des Labors bedanken.

Dann möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung und Geduld bedanken. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt!

Ein besonderer Dank geht an meinen Bruder. Du hast mich nicht nur grammatikalisch, sondern auch emotional „auf Spur“ gehalten.

Ich danke meinem Partner für seine Geduld und stetige Unterstützung. Du hast mich des Öfteren vorm Durchdrehen bewahrt.

Meiner Schwägerin danke ich für die Unterstützung und das Korrekturlesen der Arbeit.

Zuletzt möchte ich meiner besten Freundin für die Unterstützung und das Korrekturlesen der englischen Zusammenfassung danken.

11 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 17.03.2020

Tina Trostel