Aus der Medizinischen Klinik 1 mit Poliklinik der
Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Markus F. Neurath

Evaluierung der anti-tumoralen Eigenschaften von Thymoquinon am hepatozellulären Karzinom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Anna Machleidt
aus
Hannover

Gedruckt mit der Erlaubnis der

Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität

Erlangen-Nürnberg

Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schüttler
Referent:	Prof. Dr. med. M. Ocker
Koreferent:	Prof. Dr. med. Eckhart G. Hahn
Tag der mündlichen Prüfung:	19.01.2011

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 6
1.1 Hintergrund 6
1.2 Methoden 6
1.3 Ergebnisse und Beobachtungen 6
1.4 Praktische Schlussfolgerungen 7
1.5 English abstract 7
1.5.1 Background 7
1.5.2 Methods 8
1.5.3 Results 8
1.5.4 Conclusion 8
2. Einleitung 9
2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren des hepatozellulären Karzinoms 9
2.2 Diagnostik und Staging des HCC 10
2.3 Therapie und Prognose 12
2.3.1 Leberteilresektion und Orthotope Lebertransplantation (OLT) 13
2.3.2 Transarterielle Interventionen 14
2.3.3 Lokal-ablative Verfahren 15
2.3.4 Radio- und Chemotherapie 15
2.3.6 Hormon-, Gen- und Immuntherapie 16
2.4 Thymoquinon 17
3. Material und Methoden 20
3.1 Material 20
3.1.1 Zelllinien 20
3.1.2 Nährmedien 20
3.1.3 Medikamente 20
3.1.4 Fertigkits 20
3.1.5 Antikörper 21
3.1.6 Lösungen und Puffer 21
3.1.7 Geräte 23
3.1.8 Chemikalien und Verbrauchsmittel 23
3.2. Methoden 25
3.2.1 Zellkultur und Passagierung 25

3.2.2 Auftauen von Zellen 25
3.2.3 Herstellen des Medikaments 26
3.2.4 Bestimmung der Zellzahl 26
3.2.5 FACS-Analyse 26
3.2.6 BrdU-Inkorporations-ELISA 27
3.2.7 Mitochondriales Membranpotential (JC-1) 28
3.2.8 Qualitativer Apoptosenachweis durch Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin-18-Fragmenten (M30-Antikörper) 29
3.2.9 Semiquantitativer Westernblot 29
3.2.10 Bestimmung der Caspase-3 Aktivität 31
4. Ergebnisse und Daten 32
4.1 Bestimmung der Zellzahl 32
4.2 Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels FACS- Analyse 34
4.3 Ergebnisse BrdU-Inkorporations-ELISA 37
4.4 Ergebnisse mitochondriales Membranpotential (JC-1) 38
4.5 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin-18-Fragmenten (M30-Antikörper) 40
4.6 Ergebnisse Caspase 3/7-Assay 42
4.7 Semiquantitativer Westernblot 43
5. Diskussion 47
5.1 Diskussion der Methoden 47
5.2 Diskussion der Ergebnisse 48
5.3 Zusammenfassung der Diskussion 52
6. Literaturverzeichnis 53
7. Abkürzungsverzeichnis 57
8. Anhang 58
8.1 Ergebnisse Zellzahl 59
8.1.1 Ergebnisse Hep3B 59
8.1.2 Ergebnisse HepG2 60
8.1.3 Ergebnisse HF 60
8.2 Ergebnisse FACS 61
8.2.1 Ergebnisse Hep3B 61
8.2.2 Ergebnisse HepG2 62
8.2.3 Ergebnisse HF 62
8.3. Ergebnisse BrdU 62

8.3.1 Ergebnisse Hep3B 62
8.3.2 Ergebnisse HepG2 62
8.3.3 Ergebnisse HF-Zellen 63
8.4 Ergebnisse Caspase-3/7-Assay 63
8.4.1 Ergebnisse Hep3B 63
8.4.2 Ergebnisse HepG2 63
8.4.3. Ergebnisse HF-Zellen 64
8.5 Ergebnisse JC-1 64
8.5.1 Ergebnisse HepG2 und Hep3B 64
9. Danksagung 65
10. Lebenslauf 66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: vorgeschlagener Alghorithmus zur Diagnostik des HCC bei Zirrhose (10) 10
Abbildung 2: BCLC-Therapieplan modifiziert nach (29, 42) 13
Abbildung 3: Struktur des Thymoquinons: 2-Isopropyl-5-Methyl-1,4-Benzoquinon (14) 17
Abbildung 4: Zellzahl der Hep3B-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon 32
Abbildung 5: Zellzahl der HepG2-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon 33
Abbildung 6: Zellzahl der HF-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon 33
Abbildung 7: HepG2 nach 96 h Inkubation 34
Abbildung 8: Apoptoserate in % der Hep3B-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon 35
Abbildung 9: Apoptoserate in % der Hep3B-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon 35
Abbildung 10: Apoptoserate in % der HepG2-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon 36
Abbildung 11: Apoptoserate in % der HF-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon 36
Abbildung 12: Relativer BrdU-Einbau bei HepG2- und HF-Zellen nach 24 h Inkubation mit Thymoquinon 37
Abbildung 13: Relativer BrdU-Einbau bei Hep3B-Zellen nach 24 h Inkubation mit Thymoquinon 38
Abbildung 14: Nachweis intakter Mitochondrien durch JC-1-Fluoreszenz bei HepG2- und Hep3B-Zellen 39
Abbildung 15: Apoptosewerte und JC-1-Fluoreszenz bei HepG2- und Hep3B-Zellen 39
Abbildung 16: M30, Hep3B unbehandelt nach 24 h, Vergrößerung 10fach 40
Abbildung 17: M30, Hep3B behandelt mit Thymoquinon 10 µM nach 24 h, Vergrößerung 20fach 40
Abbildung 18: M30, Hep3B behandelt mit Thymoquinon 10 µM nach 48 h, Vergrößerung 20fach 41
Abbildung 19: M30, Hep3B behandelt mit Thymoquinon 100 µM nach 24 h, Vergrößerung 5fach 41
Abbildung 20: M30, HF unbehandelt nach 24 h, Vergrößerung 20fach 41
Abbildung 21: M30, HF behandelt mit Thymoquinon 10 µM nach 24 h, Vergrößerung 20fach 41
Abbildung 22: M30, HF behandelt mit Thymoquinon 100 µM nach 24 h, Vergrößerung 10fach 42
Abbildung 23: M30, HF behandelt mit Thymoquinon 100 µM nach 24 h, Vergrößerung 20fach 42
Abbildung 24: M30, HepG2 behandelt mit Thymoquinon 10 µM nach 48 h, Vergrößerung 10fach 42
Abbildung 25: M30, HepG2 unbehandelt nach 24 h, Vergrößerung 10fach 42
Abbildung 26: Relative Caspaseaktivität nach Inkubation mit 50 µM Thymoquinon 43

Abbildung 27: Semiquantitativer Westernblot zum Nachweis von ß-Aktin und Bax. Abgebildet sind unbehandelte, mit 50 µM und 100 µM TQ behandelte HF-Zellen zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h. 44
Abbildung 28: Semiquantitativer Westernblot zum Nachweis von ß-Aktin und Bax. Abgebildet wurden unbehandelte, mit 50 µm und mit 100 µm TQ behandelte HepG2-Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 48 h..... 45
Abbildung 29: Semiquantitativer Westernblot zur Abbildung von ß-Aktin und Bax. Abgebildet sind unbehandelte, mit 50 µM und mit 100 µM TQ behandelte Hep3B-Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 48 h..... 46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC/AJCC 2002 11
Tabelle 2: Okuda Stadieneinteilung 11
Tabelle 3: RFA versus PEI (8) 15
Tabelle 4: Fertigkits 20
Tabelle 5: Primäre Antikörper 21
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper 21
Tabelle 7: Lösungen und Puffer 21
Tabelle 8: Geräte 23
Tabelle 9: Chemikalien und Verbrauchsmittel 23
Tabelle 10: Schweregradeinteilung der Leberzirrhose nach Child-Pugh 58
Tabelle 11: Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)-Klassifikation nach Llovet et al. (2) 58

1. Zusammenfassung

1.1 Hintergrund

Das hepatozelluläre Karzinom ist das sechsthäufigste Malignom der Welt und ist ursächlich für über 500.000 Todesfälle pro Jahr. Die Hauptrisikofaktoren der Erkrankung sind neben chronischer Hepatitis B und C Infektion vor allem auch in westlichen Ländern die Alkohol-induzierte Leberzirrhose. Die Inzidenz steigt in Europa und den USA und trotz der bekannten Risikofaktoren wird das HCC durch fehlende Frühsymptomatik oft erst spät diagnostiziert. So können nur wenige Patienten einer kurativen operativen Therapie zugeführt werden. In der palliativen Therapie kommen verschiedene Chemotherapeutika und Immunmodulatoren in lokal-ablativen und systemischen Therapieverfahren zum Einsatz. Dennoch ist die Prognose der Patienten weiterhin nicht zufriedenstellend und bedarf weiterer Forschung.

Thymoquinon, das Extrakt des schwarzen Kümmelöls, wird schon seit Jahrhunderten in der Naturmedizin des arabischen Raumes verwendet. Mehrere *in vitro* und *in vivo* Studien zeigen neben antiinflammatorischen auch antiproliferative und proapoptotische Effekte auf verschiedene Tumorzellen. In dieser Dissertation wurden die Effekte auf zwei Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms evaluiert.

1.2 Methoden

Die anti-tumoralen Eigenschaften Thymoquinons wurden *in vitro* an den Hepatomzelllinien Hep3B und HepG2, sowie den humanen Vorhautfibroblasten (HF-Zellen) als nicht-maligne Kontrollzellen getestet. Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 1000 µM wurden verwendet.

Das Wachstum und die Zellvitalität wurden durch Bestimmung der relativen Zellzahl und durch BrdU-Inkorporations-ELISA ermittelt. Die Beurteilung der Apoptoserate erfolgte durchflußzytometrisch nach Propidiumjodidfärbung, sowie durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials (JC-1) und durch immunzytochemische Analyse der Zytokeratinfragmentierung (M30 Cytodeath). Ein semiquantitativer Westernblot und ein Caspase-3/7-Assay verifizierten die Expression apoptoserelevanter Proteine.

1.3 Ergebnisse und Beobachtungen

Thymoquinon hemmt abhängig von Konzentration und Inkubationszeit das Wachstum der Hepatomzelllinien und humanen Vorhautfibroblasten.

Schon nach 24 Stunden Inkubationszeit zeigten sich die ersten Auswirkungen des Thymoquinons. So fiel die Anzahl der vitalen Zellen sowohl bei den Hepatomzellen, als

auch bei der nicht-malignen Kontrolle zu diesem Zeitpunkt bei einer Konzentration von 100 µM auf ≤ 10 % ab. Auch in der durchflußzytometrischen Apoptosemessung werden ab 100 µM Konzentration signifikant erhöhte Apoptoseraten gemessen, die sich mit zunehmender Inkubationszeit auf Maximalwerte zum Zeitpunkt 120 Stunden steigern.
Eine Konzentration von 50 µM beeinträchtigt die Zellen in geringerem Maße. Es zeigen sich aber für alle Zelllinien vereinzelt signifikante Werte und bei den HepG2-Zellen in der Zellzahlbestimmung kontinuierlich absinkende Zellzahlen.
Im qualitativen Apoptosenachweis M30 Cytodeath konnte eine beginnende TQ-Wirkung auch schon für 10 µm Konzentration gezeigt werden, so wie eine gewisse Resistenz der HF-Zellen im Vergleich zu den Tumorzelllinien. Der Caspase-3/7-Assay und der semiquantitative Westernblot konnten Hinweise auf die Beeinflussung apoptoserelevanter Signaltransduktionswege geben.

1.4 Praktische Schlussfolgerungen

Thymoquinon hat proapoptotische und wachstumshemmende Wirkung auf Zellen des hepatozellulären Karzinoms. Konzentrationen von 100 µM zeigen hierbei eindeutige Wirkung, geringere Konzentrationen sollten im Rahmen weiterer Forschung genauer evaluiert werden.

1.5 English abstract

1.5.1 Background

Hepatocellular carcinoma is the sixth most common malignancy in the world and it is estimated to cause about 500.000 deaths annually. The major risk factors are chronic Hepatitis B and C infection and especially in western countries chronic alcohol abuse.
The incidence increases in Europe and the United States. Although risk factors are known, hepatocelluar carcinoma is frequently diagnosed at late stages because of the absence of pathognomonic symptoms. This is why most of the patients fall out of the criteria for curative therapy. For palliative therapy there are several other treatment modalities available, such as systemic chemotherapy, molecularly targeted therapy and local ablative therapies.
With a median survival of approximately 6 to 20 months the prognosis is still poor and more research is needed.
Black seed oil and its active compound Thymoquinone have been used for the treatment of diseases for centuries in the Arabic countries. Thymoquinone is known to have antiinflammatory and antineoplastic effects on tumor cells *in vitro* and *in vivo*.

In this dissertation project two cell types of hepatocllular carcinoma were exposed to TQ treatment.

1.5.2 Methods

The anti-cancer properties of TQ were examined in HepG2 and Hep3B hepatoma cells and non-neoplastic human fibroblastic cells. Concentrations between 0.1 and 1000 µM were used.

Growth and cell vitality were determined by cell count and BrdU-incorporation ELISA. The rate of apoptosis was measured using flow cytometry after propidium jodide staining, M30-antibody immunofluorescence and analysis of the mitochondrial membrane potential. Semiquantitative Westernblot and a Caspase-3/7-activity-assay were performed to evaluate the expression of proapoptotic proteins.

1.5.3 Results

TQ inhibits the growth of hepatoma cells and fibroblast cells in a concentration- and time-dependent manner beginning after 24 hours. The rate of vital cells decreased to less than 10 % at a TQ-concentration of 100 µM. Also in the flow cytometric measurement of apoptosis, significant higher values were found for 100 µM concentration. These values increased to a maximum after 120 hours.

Treatment with 50 µM TQ showed less effect. Only the cell count of the HepG2 cells showed a continous decrease of vital cells. The M30-antibody immunofluorescence demonstrated an initiating effect of TQ at 10 µM concentration and a resistance of the fibroblasts compared to hepatoma cells. The Westernblot and Caspase-3/7-activity-assay provided an indication of TQ´s influence on apoptotic pathways.

1.5.4 Conclusion

Thymoquinone has proapoptotic and growth-inhibiting effects on cells of hepatocellular carcinoma. 100 µM TQ shows definite results, lower concentrations should be evaluated more precisely in the future.

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren des hepatozellulären Karzinoms

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist das sechsthäufigste Malignom weltweit und die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache (56).

Die Inzidenz des HCC variiert stark in verschiedenen Regionen der Welt (33). So zeigen sich in Teilen Afrikas und Südostasiens hohe Inzidenzen mit 15-140 Fällen/100.000 Einwohner/Jahr (39), in Teilen Nord- und Südamerikas, Westeuropas und Australiens niedrige Fallzahlen von weniger als 3 Fällen/100.000 Einwohner/Jahr (49), allerdings mit steigender Inzidenz in den letzten 20-30 Jahren (13,16,17).

Dies lässt sich vor allem durch die unterschiedliche Ätiologie der HCCs erklären. In Entwicklungsländern mit hohen Fallzahlen ist die Durchseuchung mit Hepatitis B (HBV) und Hepatitis C (HCV) Viren hoch. Das HCC entsteht hier auf dem Boden einer viralen Hepatitis oft schon um das 30. Lebensjahr (44, 49). In westlichen Ländern mit niedrigeren Infektionsraten entsteht das HCC meist um das 50-60. Lebensjahr auf dem Boden einer Leberzirrhose unterschiedlicher Genese (44), zum Beispiel langjähriger Alkoholkonsum. Der Trend zur steigenden Inzidenz in den Industriestaaten wird auf das Hepatitis C Virus zurückgeführt (47).

Insgesamt sind Männer zwei- bis dreifach häufiger betroffen als Frauen (39).

Das HCC entsteht zumeist in vorgeschädigtem Lebergewebe, das ständigen, oft langjährigen entzündlichen Umbauvorgängen unterliegt. In histologischen Untersuchungen der Leber von Patienten mit HCC wurde in 80 % der Fälle eine Zirrhose gefunden, weshalb sie auch als Präkanzerose gilt (11,51).

Infektionen durch HBV, HCV und auch HDV sind entscheidende Risikofaktoren bei der Entwicklung des HCC. In Teilen Asiens und Afrikas dominieren hierbei die HBV-assoziierten chronischen Hepatitiden, die für ein 100fach erhöhtes relatives Erkrankungsrisiko verantwortlich sind.

In den westlichen Industrienationen und Japan ist dagegen die chronische HCV-Infektion der entscheidende Risikofaktor bei der Entstehung des HCC (30) und auch verantwortlich für zunehmende Häufigkeit (17,47).

Genauso sind auch hereditäre Lebererkrankung, wie die Hämochromatose oder der alpha1-Antitrypsin-Mangel, chemische Karzinogene, wie das Aflatoxin B1, und in westlichen Ländern vor allem auch die Alkohol-induzierte chronische Hepatopathie Ursachen für das HCC (33,54). Als protektiver Faktor für die Leber ist der Konsum von Kaffee zu nennen (9,28).

2.2 Diagnostik und Staging des HCC

Die Diagnostik des HCC setzt sich zusammen aus klinischen, laborchemischen, bildgebenden und histologischen Untersuchungen (55). Weltweit der gebräuchlichste Tumormarker ist das Alpha-Fetoprotein (AFP). Werte > 400 ng/ml gelten als hochverdächtig bzw. mit positiver Bildgebung als diagnostisch für ein HCC (23), allerdings sind Sensitivität und Spezifität des AFP limitiert (23).

Im Mittelpunkt der bildgebenden Techniken stehen Ultraschall, Spiral-CT und MRT, jeweils mit Kontrastmittelapplikation. Je nach Größe der Läsion werden eine oder auch zwei komplementäre bildgebende Verfahren genutzt. Zeigen sich hier typische Gefäßzeichnungen, die auf ein HCC hindeuten, oder ist zusätzlich der AFP-Wert > 400 ng/ml kann die Diagnose auch ohne Biopsie gestellt werden.

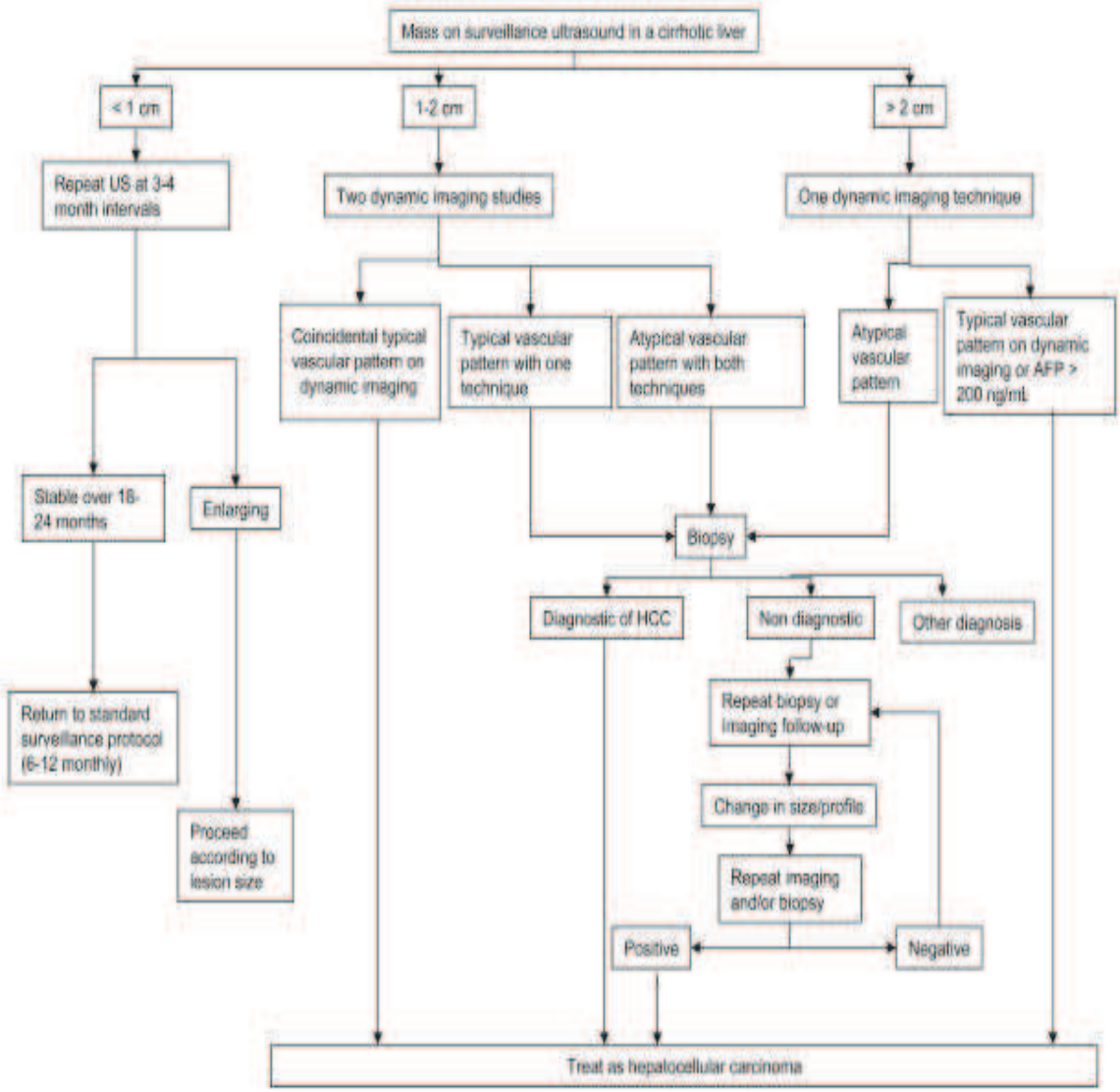


Abbildung 1: vorgeschlagener Alghorithmus zur Diagnostik des HCC bei Zirrhose (10)

Bei kleinen Läsionen ohne typische Gefäßzeichnung oder fokalen Läsionen ohne zugrunde liegende Leberzirrhose wird eine histologische Sicherung empfohlen (52).

Einige wichtige Faktoren, die die Therapieentscheidung und Prognose des HCC beeinflussen, sind neben der Größe des Tumors, der Ausbreitung in angrenzende Strukturen und der Metastasierung, vor allem auch die zugrunde liegende Leberfunktion (2). Die zur Verfügung stehenden Stagingsysteme berücksichtigen diese und weitere Faktoren in unterschiedlicher Kombination und Schwerpunktsetzung. Die klassischerweise bei Tumorentitäten genutzte TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1) bzw. die hieraus hervorgehende UICC-Stadieneinteilung zeigen neben anderen Stagingsystemen weniger klinische Relevanz (52).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation nach UICC/AJCC 2002

Primärtumor (T)	
TX	Keine Aussage über den Primärtumor möglich
T0	Kein Primärtumor vorhanden
T1	Solitärer Tumor ohne Gefäßinvasion
T2	Solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder mehrere Herde < 5 cm
T3	Multiple Tumore > 5 cm oder Tumor mit Infiltration eines großen Pfortader- oder Lebervenenastes
T4	Tumor(en) mit Invasion benachbarter Organe (ohne Gallenblase) oder mit Durchbruch durch das viszerales Peritoneum
Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknoten-Metastasen
N1	Regionäre Lymphknoten-Metastasen
Fernmetastasen (M)	
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden

Okuda et al. führten 1985 ein Stagingsystem ein, das neben der Tumorausdehnung auch Leberfunktionsparameter berücksichtigt und somit eher klinisch ausgerichtet ist (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Okuda Stadieneinteilung

	0 Punkte	**1 Punkt**
Tumorgröße (Durchmesser)	< 50 % des Lebervolumens	> 50 % des Lebervolumens
Aszites	klinisch nicht nachweisbar	klinisch nachweisbar
Bilirubin	< 3 mg/dl	> 3 mg/dl
Albumin	> 3 mg/dl	< 3 g/dl

	Stadium I	**Stadium II**	**Stadium III**
Punkte	0	1-2	3-4

Eine weitere Alternative ist die klinische Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)-Klassifikation (siehe Tabelle 11 im Anhang). Sie bezieht das Okuda-Stagingsystem mit ein und zusätzlich den sogenannten performance status nach ECOG-Klassifikation (Eastern Cooperative Oncology Group), der, ähnlich dem Karnofsky Index, den körperlichen Gesamtzustand des Patienten beschreibt.

Bei der Konferenz des American Joint Commitee on Cancer und der American Hepatico-Pancreatico-Biliary Association 2002 wurde die Empfehlung ausgesprochen primär ein klinisches Stagingsystem zu verwenden. Das TNM-Staging kann sekundär und vor allem bei chirurgisch zu therapierenden Patienten hinzugezogen werden (24).

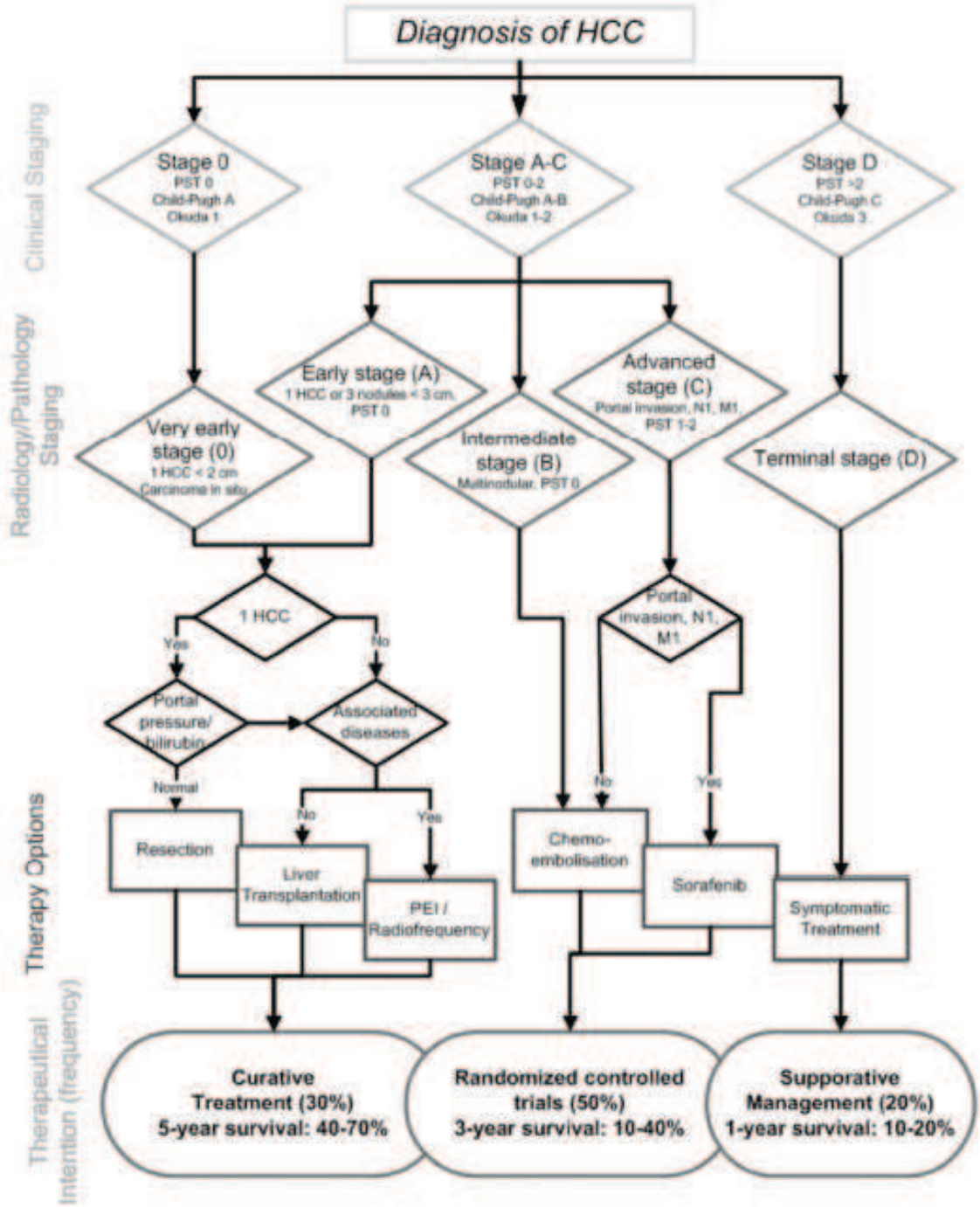
2.3 Therapie und Prognose

Bei der Therapie stehen chirurgische und nicht-chirurgische Methoden zur Verfügung. Chirurgisch und mit potentiell kurativem Ansatz sind die Leberteilresektion und die orthotope Lebertransplantation (OLT) zu nennen. Palliative Behandlungsmethoden sind die Alkoholinjektion (PEI), die Radiofrequenzablation (RFA), die transarterielle Chemoembolisation (TACE) und die Kombination aus PEI und TACE. Außerdem die Strahlen-, Chemo-, Immun-, Gen- und Hormontherapie.

Da bei Diagnosestellung ca. 80 % der Patienten aufgrund der Tumorausdehnung, Leberfunktionsstörung oder anderer Komorbiditäten nicht operabel sind, kommt den nicht-chirurgischen Therapieoptionen eine große Bedeutung zu (7).

Angelehnt an die BCLC-Klassifikation modifiziert nach Llovet et al. (29) wurde von Okamoto et. al (42) folgender Therapiealgorithmus entworfen (siehe Abb.2).

Abbildung 2: BCLC-Therapieplan modifiziert nach (29, 42)



2.3.1 Leberteilresektion und Orthotope Lebertransplantation (OLT)

Als kurativer Ansatz ist die Leberteilresektion die optimale Therapie des HCC. Hierfür kommen vornehmlich Patienten mit solitärem Tumor in Frage, wobei über die maximale Größe kein eindeutiger Konsensus besteht (3). Vor einer Operation muss Klarheit über die Leberfunktion bestehen. Fünf Jahre nach Resektion liegt die

Rezidivrate zwischen 50-70 % (55), die Überlebensrate schwankt stark je nach Ausmaß der Leberfunktionsstörung zwischen 25 % und ca. 75 % (31).

Patienten mit solitärem Befund < 5 cm oder weniger als 3 Läsionen < 3 cm, aber dekompensierter Zirrhose sollten laut den Mazzaferro-Kriterien (Mailand-Kriterien) möglichst einer Lebertransplantation zugeführt werden.

Hier zeigte sich eine Überlebensrate von 75 % und ein rezidivfreies Überleben von 83 % nach vier Jahren (38). Die Lebertransplantation führt nicht nur zur Entfernung des malignen Gewebes, sondern kann auch die Leberfunktion wieder komplett herstellen.

Ein großes Problem besteht natürlich in der unzureichenden Verfügbarkeit von Spenderorganen und der damit verbundenen Verschlechterung der Befunde im Verlauf der Wartezeit.

2.3.2 Transarterielle Interventionen

Bei den transarteriellen Interventionen macht man sich die Tatsache zu nutze, dass die Leber zwar über eine doppelte Gefäßversorgung verfügt, das HCC aber größtenteils über Äste der Leberarterie versorgt wird (10). So kann bei der transarteriellen Chemoembolisation (TACE) bzw. bei der arteriellen Embolisation (TAE) der Katheter je nach Tumorlokalisation und Größe in die entsprechende Segmentarterie oder Subsegmentarterie vorgeschoben werden.

Das Prinzip der TAE besteht darin, durch Gefäßembolisation eine Tumornekrose hervorzurufen. Bei der TACE werden zusätzlich ein oder mehrere Chemotherapeutika über den Katheter injiziert.

Als Chemotherapeutika werden hauptsächlich Mitomycin C, Doxorubicin oder Epirubicin genutzt. Als embolisierend wirkende Substanzen werden Gelatineschaumpuder, Polyvinyl-Alkohol (PVA)-Partikel oder Mikrosphären verwendet (46).

Für transarterielle Interventionen kommen Patienten mit großen oder auch multinodulären unresektablen Tumoren infrage, deren Leberfunktion gut ist (Child-Pugh-A, siehe Tabelle 10 im Anhang)(10).

Bei Patienten auf der Warteliste für eine OLT kann TACE eine Tumorausbreitung kontrollieren und die Patienten so innerhalb der Indikationskriterien halten (37).

2.3.3 Lokal-ablative Verfahren

Zu den lokal-ablativen Verfahren gehören neben der PEI (perkutane Alkoholinjektion) auch die RFA (Radiofrequenzablation), die Hochfrequenz-induzierte Thermotherapie (HiTT), sowie die Laser-induzierte Thermotherapie (LiTT).

Alle diese Verfahren sind perkutan anwendbar, kostengünstig und komplikationsarm.

Bei ausgewählten Patienten mit maximal 3 HCC-Herden, jeweils < 3 cm wird durch PEI in 80 % der Fälle eine komplette Ablation erreicht. Bei Herden zwischen 3-5 cm immerhin noch in 50 % der Fälle (19). Die Überlebensraten nach PEI sind auch abhängig von der vorbestehenden Leberfunktion (43).

Bei der RFA werden Radiofrequenzwellen über ein nadelähnliches Gerät in das Tumorgewebe emittiert, was eine fokale Erhitzung bewirkt. Um eine exakte Positionierung des Applikators zu erreichen, werden als bildgebende Verfahren die Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) angewandt. Die RFA kann als Monotherapie durchgeführt werden oder aber auch in Kombination mit Embolisation (46).

Mit der RFA wird in 90-98 % eine komplette Ablation von Herden < 3 cm erreicht und es werden weniger Therapiesitzungen als bei der PEI benötigt (19). Mehrere Metaanalysen beweisen eine Überlegenheit der RFA gegenüber PEI bezüglich Überlebensraten und tumorfreiem Überleben (8,45).

Tabelle 3: RFA versus PEI (8)

	RFA	**PEI**
Lokalrezidivrate	7 %	22 %
1-Jahresüberleben	96 %	91 %
3-Jahresüberleben	73 %	58 %
Tumorfreies Überleben nach 3 Jahren	40 %	19 %

Die bereits oben erwähnten ablativen Methoden, die Laser-induzierte und die Hochfrequenz-induzierte Thermotherapie, zeigen ebenfalls gute Ergebnisse, sind komplikationsarm und perkutan in Lokalanästhesie durchzuführen. Jedoch ist der technische Aufwand vergleichsweise hoch.

2.3.4 Radio- und Chemotherapie

Das HCC ist im Prinzip ein strahlensensibler Tumor, so dass eine Radiatio als Therapieoption in Frage kommt. Limitierender Faktor ist hierbei allerdings das

umgebende Lebergewebe, das sehr strahlensensibel ist. Schon etwa 30 Gy reichen aus um eine Hepatitis auszulösen, Tumoren sprechen erst auf höhere Dosen an.

Technische Weiterentwicklungen, wie die image-guided radiation therapy (IGRT), intensity-modulated radiation therapy oder die stereotaktische Bestrahlung werden derzeit in Studien evaluiert (18).

Da die Diagnose des HCC oft erst spät gestellt wird, können nur ca. 20 % der Patienten einer kurativen Therapie zugeführt werden. Umso wichtiger ist die Forschung und Weiterentwicklung palliativer Therapieoptionen, zu der auch die systemische Chemotherapie gehört. Eine Reihe von Chemotherapeutika wurde in den letzten Jahrzehnten am HCC evaluiert.

Hierzu gehören Doxorubicin, Cisplatin, Fluorouracil, Mixantrone und Interferone, die in Monotherapie aber auch in verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten eingesetzt wurden (40). Das Anthrazyklin Doxorubicin scheint in seiner Wirkung als Monotherapeutikum am vielversprechensten zu sein (Ansprechrate bis zu 20 %), aber auch Epirubicin kann mit 17 % Ansprechrate in Studien vergleichbare Ergebnisse liefern (25). Ansprechen wird in den meisten Studien definiert als Tumormassenreduktion von mindestens 50 %.

Kombinationstherapien zeigten in Studien zwar bessere Überlebens- und Ansprechraten, diese waren jedoch nicht signifikant. Auch waren die Nebenwirkungsraten höher (57).

Ein weiterer Hoffnungsträger ist der Wirkstoff Sorafenib, der als Pharmakon Nexavar nicht nur beim HCC, sondern auch beim Nierenzellkarzinom zugelassen ist. Sorafenib ist ein Inhibitor der Raf-Kinase mit gleichzeitiger VEGF-Inhibition und greift somit in typische Signaltransduktionswege der Zellproliferation und Zellzykluskontrolle ein. In einer Phase-III-Studie von Llovet et. al wurde ein Überlebensvorteil der Sorafenib-Gruppe gegenüber der Placebo-Gruppe von 3 Monaten festgestellt (32), was im Rahmen der bisherigen palliativen systemische Therapien ein großer Durchbruch ist. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Phase-III-Studie im asiatischen Raum (12). Die Ergebnisse sind dennoch insgesamt nicht zufrieden stellend, die Prognose der Patienten bleibt schlecht.

2.3.6 Hormon-, Gen- und Immuntherapie

Da in ca. einem Drittel der hepatozellulären Karzinome Östrogenrezeptoren gefunden werden, wurde in verschiedenen Studien die Wirksamkeit des Antiöstrogens Tamoxifen evaluiert. Eine Metaanalyse von 10 randomisierten Studien konnte jedoch keinen Vorteil im Hinblick auf medianes Überleben und Tumorregression zeigen (41).

Immunmodulatoren, wie das Interferon-α konnten sowohl in Mono-, als auch in Kombinationstherapien vergleichsweise gute Erfolge erzielen (27).

Die Gentherapie versucht z.B. die Expression von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen zu beeinflussen (52). Sie ist derzeit Gegenstand präklinischer Studien.

2.4 Thymoquinon

Thymoquinon (TQ) ist Bestandteil des schwarzen Kümmels (Nigella sativa Linne) aus der Familie der Ranunculaceae. In arabischen Ländern, rund um das Mittelmeer und in Regionen Afrikas wird schwarzer Kümmel schon seit Jahrhunderten angebaut und bei einer Vielzahl von Erkrankungen, vor allem des Verdauungstraktes, aber auch des Respirations-, Immun- und Kreislaufsystems angewandt. Thymoquinon ist das bioaktive Extrakt des Öls des schwarzen Kümmels und wurde zum ersten Mal 1963 von El-Dhakhakany beschrieben.

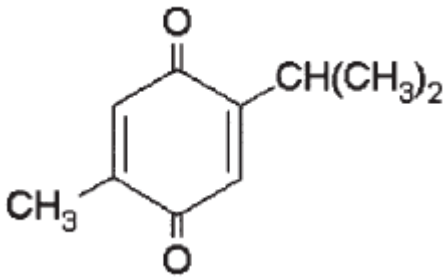


Abbildung 3: Struktur des Thymoquinons: 2-Isopropyl-5-Methyl-1,4-Benzoquinon (14)

In *in vitro* Studien und Tierversuchen wurden verschiedene Effekte des Thymoquinons bereits in Ansätzen evaluiert. So werden der Substanz neben antioxidativen und antiinflammmatorischen auch proapoptotische und antineoplastische Wirkungsweisen zugeschrieben.

Badary et. al untersuchten die antioxidative Wirkung von TQ und einer synthetisch hergestellten verwandten Substanz, dem tertiären Butylhydroquinon (THBQ). Beide Substanzen fungieren als Radikalfänger für Superoxidanionen und Hydroxy (OH)-Radikale (5). Auch Mansour et. al bewiesen, dass TQ und sein Metabolit Dihydrothymoquinon (DHTQ) spezifische Radikalfänger für Superoxidanionen aber auch für freie Radikale sind (35,36).

Mansour et. al untersuchten die antiinflammatorische Wirkung von TQ. Sie beschrieben eine verminderte Bildung von den Entzündungsmediatoren Leukotrienen an humanen Blutzellen, u.a. in Granulozytensuspensionen. Der Effekt scheint auf eine Inhibition der

5-Lipoxygenase und Leukotrien-C4-Synthase zurückzuführen zu sein, beides entscheidende Enzyme bei der Synthese der Entzündungsmediatoren aus dem Eicosanoid Arachidonsäure.

Für verschiedene Krebszelllinien konnten TQ antineoplastische und proapoptotische Effekte in *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden. Shoieb et. al untersuchten u.a. Krebszelllinien des humanen Mammakarzinoms und Ovarialkarzinoms (50), Gali-Muhtasib et. al evaluierten die antineoplastischen Effekte an neoplastischen Keratinozyten und Zellen des Kolonkarzinoms (HCT116)(20,21). Nicht-maligne Zellen waren hierbei resistenter gegen die TQ-vermittelte Apoptose.

Zellzyklusarrest und Apoptose werden laut Studienergebnissen p53-abhängig und -unabhängig durch TQ getriggert. p53 ist ein Tumorsuppressorgen, das als Transkriptionsfaktor bei Schäden an der DNA die Expression von bestimmten Genen der Apoptose und des Zellzyklus reguliert. So ist beispielsweise p21Waf1 ein Zielgen, welches im folgenden an Cdk/Cyclin-Komplexe bindet und zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt. Ein Verlust an p53 erhöht die Wahrscheinlichkeit Malignome zu entwickeln (48).

In der bereits erwähnten *in vitro* Studie an den HCT116 Zellen wurde die p53-abhängige, Apoptose steigernde Eigenschaft von TQ nachgewiesen. Hier kam es nach der Behandlung mit der Substanz zu einem vermehrten G1-Phase Arrest und einer 2,4-4,5-fach erhöhten p53-mRNA-Expression (20).

Thymoquinon scheint seine proapoptotische Wirkung aber nicht nur über p53-abhängige Mechanismen zu entfalten, sondern auch über die Veränderung von Caspaseaktivitäten. Sogenannte Initiator- und Effektorcaspasen sind Enzyme, die sich kaskadenartig aktivieren, weitere Reaktionen katalysieren, wie z.B. die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien, und so den programmierten Zelltod einleiten können.

El-Mahdy et. al zeigten an myeloblastischen Leukämiezellen (p53 negativen HL-60-Zellen), dass TQ über einer Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8 antiproliferativ wirkt und zudem Apoptose induziert (14). Auch konnte bei den pro- und antiapoptotischen Proteinen ein Anstieg des Bax/Bcl-2 Quotienten nachgewiesen werden.

Chemoprotektive Wirkung konnte in einer Studie am Tiermodell gezeigt werden. Hierbei wurde Mäusen zusätzlich zu der karzinogenen Substanz Benzopyren Thymoquinon als Trinkwasserzusatz appliziert. Benzopyren (1,2-Benzpyren) ist ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, der u.a. auch in Zigarettenrauch

enthalten ist. In den Versuchen konnte die Inzidenz der durch Benzopyren induzierten Vormagentumoren deutlich gesenkt werden (4).

In den letzten Jahren rücken immer mehr auch pflanzliche Substanzen und Naturextrakte in den Blickwinkel der Arzneimittelforschung. Zum einen wegen der meist geringeren Nebenwirkungen, zum anderen wegen der oft kostengünstigen Verfügbarkeit.

Thymoquinon spielt nun bereits seit Jahrhunderten eine Rolle in der Medizin des arabischen Raumes. Seine antiinflammatorische und antineoplastische Wirkung ist mittlerweise sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen. Die ansteigende Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms und die vor allem bei inoperablen Tumoren weiterhin unzufrieden stellende Prognose stellen ein großes Problem dar. Das mediane Überleben nach Diagnosestellung beträgt derzeit nur zwischen 6 und 20 Monaten (1). Da TQ schon bei unterschiedlichen Krebszelllinien Erfolge gezeigt hat, soll diese Doktorarbeit nun die Wirkung auf Zellen des HCC evaluieren. Dies könnte vor allem deshalb interessant sein, weil das HCC ein Tumor ist, der in den meisten Fällen aus einer chronischen Entzündung hervorgeht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

HepG2: adhärent wachsende humane Hepatomzellen ohne integriertes Hepatitis B-Virus-Genom (ATCC HB-8065, Rockville, Maryland)

Hep3B: adhärent wachsende Hepatomzellen mit integriertem Hepatitis B-Virus-Genom (ATCC HB-8064, Rockville, Maryland)

HF: primäre humane Vorhautfibroblasten als nicht-maligne Kontrollzellen

3.1.2 Nährmedien

Die Reagenzien für die von uns genutzten Nährmedien stammen allesamt von der Firma Biochrom aus Berlin.

Für die HepG2-Zelllinie diente als Nährmedium das RPMI 1640. In der Zellkultur der Hep3B- und HF-Zellen nutzten wir das Dulbecco´s modified Eagle´s Medium.

Diese Grundmedien wurden jeweils mit einem 10 %igen Anteil von fetal bovinem Serum aufgestockt. Zugesetzt wurden außerdem Penicillin (10 mg/ml) und Streptomycin (10 mg/ml) in einer Konzentration von je 1 %, sowie Gentamycin (10 mg/ml) in einer Konzentration von 0,5 %.

Die Reagenzien wurden unter sterilen Bedingungen den Grundmedien zugesetzt und entstammten sterilen Stammlösungen.

3.1.3 Medikamente

Thymoquinon wird hergestellt von der Sigma Aldrich Chemie GmbH in München.

3.1.4 Fertigkits

Tabelle 4: Fertigkits

M30 Cyto Death	Roche, Mannheim, Deutschland
Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (JC-1)	MobiTec, Göttingen, Deutschland
Caspase-Glo 3/7 Assay Kit	Promega Corporation, Madison, WI, USA

3.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
ß-Aktin	mouse	1: 5000	Sigma, Deisen-hofen, Deutschland
Bax	rabbit	1: 500	Abcam, Cambridge, UK
Bcl-2	rabbit	1: 750	Abcam, Cambridge, UK
Caspase-3	rabbit	1: 750	BD, Biosciences, San Jose, CA, USA
M30-Antikörper	mouse	1: 50	Roche , Mannheim, Deutschland

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Anti-mouse	1: 1000	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-rabbit	1: 1000	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-mouse-FITC	1: 40	DAKO, Glostrup, Dänemark

3.1.6 Lösungen und Puffer

Tabelle 7: Lösungen und Puffer

0,1 M Glycin (zum Strippen)	3,75 g Glycin 500 ml H_2 O; Einstellen auf pH 2,0
Blockierpuffer für Westernblot	5 mg Magermilchpulver 100 ml 1x PBS 0,1 % Twen 20
Propidiumjodidlösung	2,5 mg Propidiumjodid 50 mg Natriumcitrat 50 µl Triton X-100 auf 50 ml 1x PBS
Transferpuffer Westernblot	84,9 ml dest. Wasser 5 ml 20x Transferpuffer (Invitrogen) 100 µl Antioxidant NuPAGE 10 ml Methanol
Running Buffer Westernblot	200 ml MOPS-Puffer

	500µl Antioxidans (nupage invitrogen)
MOPS-Puffer	475 ml dest. Wasser 25 ml 20x MOPS-Stammlösung
Waschpuffer M30-Antiköper	100 ml 10x PBS 900 ml destilliertes Wasser 1000 µl Twen 20
10x PBS	87,7 g Nacl 22,7 g Na_2HPO_4 5,52 g NaH_2PO_4 auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen und auf pH 7,3 einstellen
Blockierpuffer M30 Antikörper	1x PBS 0,1 % Twen 20 0,3 % BSA
Inkubationspuffer M30 Anitkörper	1x PBS 0,1 % Twen 20 1 % BSA
Entwicklerflüssigkeit ECL für Westernblot	20 ml Solution A 4 ml Solution B 12 µl H_2O_2
Solution A für ECL	200 ml 0,1 M Tris HCl (pH 8,6) 50 mg Luminol
Solution B für ECL	11mg para-Hydroxycoumarinsäure 10 ml DMSO
Jie´s-Lyse-Puffer	200 µl NaCl 250 µl NP4O 200 µl Tris-HCl pH 7,4 50 µl $MgCl_2$ 1 Tablette Complete, Prot-I 100 µl PMSF 9200 µl destilliertes Wasser
Minimalmedium	Nährmedium 0,125 % FCS 1 % Penicillin 1 % Streptomycin 0,5 % Gentamycin

3.1.7 Geräte

Tabelle 8: Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Deutsch & Neumann, Berlin, Deutschland
Biofuge	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Brutschrank Hera Cell	Heraeus Christ, Osterode , Deutschland
ELISA-READER	BIO-TEK Instrument, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
FACS-Durchflusszytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophorese-Apparatur	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
Heizblock	Behr Labortechnik, Düsseldorf, Deutschland
Herafreeze (-80 °C Schrank)	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Labofuge 400 R	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Megafuge 1.0R (Tischzentrifuge)	Heraeus Christ, Osterode, Deutschland
Mikroliterpipetten (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Mikroskop Axiostar	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler, Toledo, Schweiz
Photoanlage Intelligent Dark Box	Fuji Foto Film, Düsseldorf, Deutschland
Picofuge	Tomy, Japan
Pipettierhilfe	Integra Biosiences, Brand, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus classic	Hirschmann, Heilbronn, Deutschland
Schüttler	Stone und Shaker, Deutschland
Spannungsgerät LNG 350-03	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Sterilbank	Nuair, Plymouth, USA
Vortexer Genie 2TM	Bender + Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Braun, Melsungen, Deutschland

3.1.8 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Tabelle 9: Chemikalien und Verbrauchsmittel

12 % bis-Tris Gele	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma, Steinheim, Deutschland
6-Amonium-n-Hexanonsäure	Sigma, Steinheim, Deutschland
6-Well-Platten	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
96-Well-Platten	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Albumin, Bovine (BSA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Antifading-Eindeckmedium	DAKO, Glostrup, Dänemark
Antioxidant NuPAGE	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Caspase-Glo 3/7 Buffer	Promega, Madison, WI, USA
Caspase-Glo 3/7 Substrate	Promega, Madison, WI, USA

Chamber Slide	Nalge Nunc International, New York, USA
Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethyl-Pyrocarbonat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's Medium DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
ECL ,Western Blot Detection Reagent	Amersham Pharmacia, San Francisco,USA
Eppendorf Reaktionsgefäße (2 ml; 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, München, Deutschland
FACS-Röhrchen (5 ml)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, San Jose, USA
Falcon® Tubes (15 ml und 50 ml)	BD Biosciences, San Jose, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Brentford, UK
Gentamycin (10 mg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kryoröhrchen (2 ml)	Nalge Nunc International, New York, USA
Kunststoffpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kunststoffspritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
LDS Sample Buffer NuPAGE	Invitrogen, CArlsbad, CA, USA
M30-Cytodeath	Roche, Mannheim, Deutschland
Magermilch	Heirler, Radolfzell, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MultiMark (Multi-Colored Standard)	Novex, San Diego, USA
Natrium-EDTA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NEM (N-Ethylmaleimide)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher und Schüll, Dassal, Deutschland
Panceaurot	Sigma, Steinheim, Deutschland
PBS Dulbecco's	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin (10 mg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Nürtingen, Deutschland
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Propidium Iodid (PI)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Protein Assay Reagent (BCA)	Pebro Science, Bonn, Deutschland
Reagenzgläser (10 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
RPMI 1640	Biochrom, Berlin, Deutschland
Sample Reducing Agent NuPAGE	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS (Sodiumdodecylsulfat=Laurylsulfat)	Serva, Heidelberg, Deutschland

Sterilpipetten (Stripetten; 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning, Lindfield, Australien
Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tribase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypsin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween® 20	Sigma, Steinheim, Deutschland
Western-Blot Paper	Schleicher und Schüll, Dassal, Deutschland
Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm^2)	Nalge Nunc International, New York, USA
Zellzahl-Röhrchen (5 ml)	Greiner, Nürtingen, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1 Zellkultur und Passagierung

Die Kultivierung der adhärenten Zellen fand im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 in 175 cm² großen Kulturflaschen statt. Das vorbereitete Nährmedium wurde hinzugefügt. Alle 2-3 Tage erfolgte unter dem Mikroskop die Kontrolle des Zellwachstums, sowie unter sterilen Bedingungen der Austausch des verbrauchten gegen ca. 30 ml frischen Nährmediums.

Bei einer Konfluenz von etwa 70 % wurde eine neue Passage angesetzt. Hierzu wurde das Nährmedium abpipettiert und die Zellen wurden mit 10 ml Dulbecco´s PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10 ml Trypsin-EDTA-Lösung für, je nach Zellreihe, 3-7 Minuten bei 37 °C inkubiert. Hierbei lösten sich die Zellen von der Kulturflasche und wurden mit der Trypsinlösung in eine Pipette aufgenommen.

1 ml dieser Resuspension wurde als fortlaufende Passage in einer neuen 175 cm² Zellkulturflasche mit 30 ml sterilem Nährmedium weiterkultiviert.

3.2.2 Auftauen von Zellen

Die bei -80 °C im Gefrierschrank gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Es wurden 10 ml Nährmedium in ein 15 ml Falcon Tube vorgelegt und die aufgetaute Zellsuspension hinzugefügt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 10 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet mit 10 ml frischem Medium resuspendiert, wobei die Suspension mehrfach auf- und abpipettiert wurde. Die im Medium resuspendierten Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen pipettiert und im Brutschrank bei 37 °C nach Standardprotokoll kultiviert.

3.2.3 Herstellen des Medikaments

Thymoquinon in pulverisierter Form wurde auf eine Konzentration von 10000 µM berechnet und abgewogen. Auf 82,1 mg Thymoquinon wurden 2,5 ml DMSO gegeben. Dies wurde mit weiteren 47,5 ml Nährmedium aufgefüllt. Das Medikament konnte so bei -20 °C für 6 Monate aufbewahrt werden.

Für die Durchführung der Experimente wurde die 10000 µM Stocklösung mit sterilem Nährmedium auf 1000 µM, 100 µM, 10 µM, 1 µM und 0,1 µM verdünnt.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Um das Wachstum der Zelllinien unter Einfluss von Thymoquinon beurteilen zu können wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde in der Neubauer Zählkammer zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h ausgezählt. Bei den Versuchszeiten 24 h, 48 h, 72 h wurden die Vertiefungen der 6-Well-Zellkulturplatten mit einer Anfangszellzahl von 150.000 bestückt, bei den Stundenwerten 96 h und 120 h mit einer Anzahl von 50.000. 24 h nach Kultivierung der Zellen in den 6-Well-Zellkulturplatten wurden die Zellen mit den jeweiligen Medikamentenkonzentrationen behandelt. Es wurde eine unbehandelte Kontrolle, sowie die Konzentrationen 1000 µM, 100 µM, 50 µM, 10 µM, 1 µM und 0,1 µM in dem Versuch mitgeführt.

Das überstehende Nährmedium wurde von den Vertiefungen abpipettiert und verworfen. Die Zellen wurden mit 1 ml Dulbecco´s PBS gewaschen, auch der Puffer wird verworfen. Zum Ablösen wurden die Zellen in 500 µl Trypsin bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die Zellsuspension wird mit 1 ml Nährmedium in ein 5 ml Zellzahl-Röhrchen gegeben. Nach Durchmischen der Suspension mittels Vortex wurden 10 µl in die Neubauerzählkammer pipettiert, unter dem Mikroskop ausgezählt und auf Zellzahl/ml umgerechnet. Der Versuch wird je Konzentration und Zeitpunkt dreifach durchgeführt.

3.2.5 FACS-Analyse

Die Apoptoserate wurde durchlaufzytometrisch nach Propidiumjodidfärbung bestimmt (FACS= fluorescence activated cell sorting). Die Messungen erfolgten zu den gleichen Zeitpunkten und mit den gleichen Medikamentenkonzentrationen wie auch bei der Zellzahlbestimmung.

Nach entsprechender Inkubation der Zellen mit dem Medikament wurde das Nährmedium abgenommen und in ein FACS-Tube pipettiert. Die Zellen wurden standardmäßig mit Dulbecco´s PBS gewaschen und mit Trypsin gelöst. Die in Trypsin

gelösten Zellen wurden ebenfalls in das Tube gegeben. Die befüllten Tubes wurden für 10 min mit 10.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde mit 200 µl hypotoner Propidiumjodidlösung resuspendiert, auf Eis gelagert und inkubierte für mindestens 1 h bei 4 °C unter Lichtabschluss.

Propidiumjodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht wird von den Photodetektoren des FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. PI emittiert bei 612 nm eine rötliche Fluoreszenz, die durch den Fluoreszenzdetektor FL-2H erfasst wird.

Bei jeder Probe erfolgte die Messung von 10.000 Ereignissen, bei denen der DNA-Gehalt durch die Cell Quest Software BD, Heidelberg ermittelt wurde. Durch den DNA-Gehalt konnten die Phasen des Zellzyklus und somit auch die apoptotischen Zellen erkannt werden. In der G0-Phase und in der präsynthetischen G1-Phase besitzen die Zellen einen diploiden Chromosomensatz (2n). Auf die G1-Phase folgt die S-Phase, in der die DNA verdoppelt wird. So liegt anschließend in der G2-Phase der replizierte Chromosomensatz (4n) vor. Bei der Mitose (M-Phase) werden die Chromosomen gleichmäßig auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt. Die Tochterzellen befinden sich nun in der G1-/G0-Phase mit 2n.

In Apoptose befindliche Zellen haben fragmentierte DNA, so dass alle Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt als apoptotische Ereignisse gewertet wurden.

3.2.6 BrdU-Inkorporations-ELISA

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein Pyrimidinanalogon, das bei der DNA-Replikation anstelle des Thymidins in die neu entstehende DNA eingebaut wird. Durch Bindung eines sekundären BrdU-Antikörpers kann das BrdU im ELISA-Reader nachgewiesen werden. So ermöglicht diese Methode es, die in der Synthesephase des Zellzyklus befindlichen bzw. neu entstandenen Zellen einer Zellpopulation zu erkennen.

Zunächst wurden die Zellen für 24 h in Minimalmedium inkubiert, um eine Synchronisation des Zellzyklus herzustellen. Dann wurden pro Vertiefung der 96-well-Mikrotiterplatte 5000 Zellen ausgesetzt und mit 225 µl Medikament in entsprechender Konzentration behandelt. Eine Menge von 25 µl BrdU-Labeling-Solution wurde hinzupipettiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch 200 µl der ethanolhaltigen Fixdenat Lösung für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 100 µl monoklonalem Maus-anti-BrdU-Antikörper (1:100 mit

Antibody-labeling-solution versetzt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Stunde folgte dreimaliges Waschen mit PBS und schließlich wurden 100 µl Tetramethylbenzidin-Substratlösung hinzugegeben. Nach fünf Minuten Inkubation wurde diese Reaktion durch 1 M H_2SO_2 (25 µl/Vertiefung) gestoppt, was durch einen Farbumschlag von blau nach gelb sichtbar wurde. Weitere fünf Minuten später konnte die Farbintensität bei 650 nm photometrisch im ELISA-Reader gemessen werden.

3.2.7 Mitochondriales Membranpotential (JC-1)

Das Absinken des mitochondrialen Membranpotentials ist ein wichtiger Vorgang beim Ablauf des intrinsischen Weges der Apoptose. Der Fluoreszenzfarbstoff JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetrabenzimidazolo-carbocyaninjodid) kann zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials genutzt werden, da er in Abhängigkeit vom Membranpotential aggregiert und dabei seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. Als Monomer emittiert JC-1 bei 525 nm grüne Fluoreszenz. Nach der Aggregation entstehen Dimere, die bei 590 nm rot-orangefarbenes Licht emittieren. Mittels Durchflusszytometrie kann diese Fluoreszenzänderung gemessen werden.

Nach der Inkubationszeit mit Thymoquinon wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und bei Raumtemperatur für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde weiterbehandelt.

Auf fertige, tiefgekühlte JC-1 Lösung wurde 990 µl warmes Nährmedium gegeben und für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Cup pipettiert und hiervon jeweils 500 µl auf die Zellpellets gegeben. Diese Lösung inkubierte für 15 min bei 37 °C und wurde daraufhin bei Raumtemperatur für 5 min bei 400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Diese Arbeitsschritte erfolgten nach Möglichkeit unter Lichtabschluss.

Hierauf folgten zwei Waschgänge mit 1x Assay Puffer, bei denen jeweils für 5 min bei 400 rpm zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen wurde. Zuletzt wurden die Pellets in 200 µl 1x Assay Puffer resuspendiert und am Durchflußzytometer mittels FSC-SSC Diagramm gemessen. Für jede Probe wurden drei unabhängige Experimente mit je 10.000 gemessenen Ereignissen durchgeführt.

Die Versuche wurden nicht für alle Konzentrationen durchgeführt, sondern nur für aussagekräftige Konzentrationen zu bestimmten Zeitpunkten.

3.2.8 Qualitativer Apoptosenachweis durch Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin-18-Fragmenten (M30-Antikörper)

Das Zytokeratin-18 hat im nativen Zustand keine Bindungsstelle für M30-Cytodeath-Antikörper. Wird das Zytokeratin-18 in einem frühen Stadium der Apoptose durch Caspasen fragmentiert, entstehen Bindungsstellen für den Antikörper.

Durch Immunfluoreszenz mittels sekundärem anti-Maus Antikörper wird die Bindung des M30-Antikörpers an die in Apoptose befindlichen Zellen nachgewiesen und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

Die Messungen erfolgten bei allen 3 Zelllinien zum Zeitpunkt 24 h mit den Konzentrationen 100 µM, 10 µM und einer Negativkontrolle, sowie zum Zeitpunkt 48 h mit der Konzentration 10 µM.

Die Zellen wurden auf Chamber-Slides ausgesetzt und laut Protokoll mit Medikament behandelt.

Das Nährmedium wurde entfernt und die Zellen in -20 °C kaltem Methanol für 30 min fixiert. Danach wurden sie zwei Mal für 10 min in Waschpuffer gewaschen und ein Mal für 10 min in Blockierpuffer inkubiert. Nach erneutem 10-minütigem Waschen wurden die Objektträger mit 100 µl M30-Primärantikörper (bei 1:50 Verdünnung mit Inkubationspuffer, siehe 3.1.6 Lösungen und Puffer) beschichtet und für 60 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert.

Nach weiterem 2-maligem Waschen werden die Objektträger 30 min lang bei Raumtemperatur unter Alufolienabdeckung mit sekundärem Antikörper (Anti-mouse-FITC 1: 40 gelöst in 1x PBS mit 0,5 % BSA) bedeckt.

Danach folgte kurzes Ausschwenken der Objektträger in Waschpuffer, Benetzten mit Antifading-Eindeckmedium der Firma Dako Cytomatics und Abdecken der Objektträger mit Deckgläschen.

Mit einem Zeiss Axioplan-Mikroskop bei 519 nm und 400 bis 1000facher Vergrößerung wurden die Präparate begutachtet. Die Nachbearbeitung und Herstellung digitaler Bilder erfolgte mittels Openlab Software (Improvision, Heidelberg, Deutschland).

3.2.9 Semiquantitativer Westernblot

Mittels semiquantitativem Westernblot wurde die Änderung der Expression von apoptoserelevanten Proteinen unter dem Einfluss von Thymoquinon gemessen.

Zunächst erfolgte die Proteinisolation aus den Zellen. Hierzu wurden die Zellen in üblicher Weise von den Zellkulturflaschen abgelöst. Sowohl die in Trypsin/EDTA

gelösten Zellen, als auch das verbrauchte Nährmedium und der PBS Dulbecco`s Puffer wurden in 15 ml Falcon Tubes gesammelt und für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl Jie´s-Lyse Puffer in einem Eppendorf Cup resuspendiert, so das eine Durchmischung und Zelllyse erfolgte. Die Eppendorf Cups wurden für 30 min auf Eis gestellt und zwischendurch 2-3 Mal mittels Vortex durchmischt. Zuletzt wird die Lösung für 30 min und 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthält, wird bei -80 °C tiefgefroren, die Pellets werden verworfen.

Die Bestimmung des Proteinanteils der Proben erfolgte nach Behandlung mit BCA (protein assay reagent) und photometrischer Messung mittels ELISA Reader bei 490 nm. Dazu wurden die zur Verfügung gestellten Lösungen nach Angabe des Herstellers gemischt und mit 15 µl Zelllysat für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Proteinkonzentration konnte anhand einer Standardkurve bestimmt werden.

Vor der Elektrophorese mussten den Proteinen verschiedene Gebrauchslösungen der Firma Invitrogen zugesetzt werden. Um eine Lösungsmenge von 20 µl zu erhalten, wurde auf 13 µl Proteinprobe jeweils 2 µl Sample Reducing Agent und 5 µl LDS Sample Buffer pipettiert. Die Lösung wurde dann für 10 min auf 70 °C erhitzt.

Die fertigen Proteingebrauchslösungen wurden in äquivalenten Proteinmengen in die Gelkammern der 12 % Bis-Tris Gele der Firma Invitrogen pipettiert. In die jeweils erste Kammer des Gels wurden 10 µl Größenstandard gegeben. Elektrophoretisch getrennt wurden die Proteine über einen Zeitraum von 50 min mit dem Programm 200 V, 125 mA.

Zum Blotten der Proteine wurde das Gel auf eine Schicht mit Transferpuffer getränkter Nitrocellulosemembran gelegt. Sowohl unter der Nitrocellulosemembran, als auch auf das Gel wurden 2 Schichten Filterpapier gelegt, welche auch mit Transferpuffer getränkt wurden. Geblottet wurden die Proteine für 30 min bei 100 V und 125 mA.

Zum Nachweis der Proteine auf der Nitrocellulosemembran wurde die Membran nach dem Blotvorgang kurz in 1x PBS 0,1 % Twen 20 geschwenkt und dann für 2-3 min in Pancaeu-Rot-Lösung gelegt.

Nach weiteren 10 min Waschen in 1x PBS 0,1 % Twen 20 wurden die Blots in 50 ml Falcon Tubes mit Blockierpuffer gelegt. Vor dem Hinzufügen der Primärantikörper mussten die Blots entweder für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C im Kühlraum gelagert werden. Nach dem Lagern in Blockierpuffer wurde ein dreimaliger Waschvorgang mit 1x PBS 0,1% Twen 20 für jeweils 10 min bei Raumtemperatur vorgenommen. Darauf folgte ein 30-minütiges Inkubieren mit

primärem Antikörper bei Raumtemperatur. Vor und auch nach dem Inkubieren mit sekundärem Antikörper für 90 min, wurden die Blots erneut dreimaligen Waschvorgängen mit 1x PBS 0,1 % Twen 20 unterzogen.
Entwickelt wurden die Blots mit selbst hergestelltem ECL-Chemilumineszenz-Reagenz in der Dunkelkammer.

3.2.10 Bestimmung der Caspase-3 Aktivität

Die Caspase-3 ist ein zentrales Enzym in der Signaltransduktion der Apoptose. Die Caspase-3 ist eine sogenannte Effektorcaspase. Das Enzym liegt inaktiv vor und wird selbst erst während der Apoptose durch sogenannte Initiatorcaspasen aktiviert, um dann weitere Reaktionen der Signaltransduktion zu katalysieren.
Zur Caspase-3 Bestimmung wurden equivalente Proteinmengen in 96-well Platten pipettiert. Caspase-Glo 3/7 Substrat und Caspase-Glo 3/7 Buffer wurden in den vom Hersteller vorgegebenen Mengen miteinander vermischt und 100 µl dieser Lösung wurde jeweils auf die Proben pipettiert.
Die Lumineszenzmessung erfolgte über 3 h in Abständen von 30 min im Luminometer bei einer Temperatur von 37 °C.

4. Ergebnisse und Daten

4.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte bei allen 3 Zelllinien nach einer Inkubation mit Thymoquinon zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Es wurden Medikamentenkonzentrationen zwischen 0,1 µM und 1000 µM gewählt.

Bei der Zelllinie Hep3B zeigte sich ab einer Medikamentenkonzentration von 100 µM ein Abfall der Zellzahl. Nach 24 Stunden betrug dieser Abfall 95,4 % gemessen am Wachstum der unbehandelten Kultur und steigerte sich kontinuierlich auf 99,3 % nach 120 Stunden.

Bei einer höheren Konzentration von 1000 µM sank die Zellzahl nach 24 Stunden bereits um 93,1 %, um nach 120 Stunden um weitere ca. 5 % auf 99,8 % zu sinken. Nach einem Absinken der Zellzahl auf 53,8 % im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 50 µM nach 72 h, erholte sich die Zellkultur und es kam zu einem Wiederanstieg der Zellzahl auf 105,3 % nach 96 h und 82,2 % nach 120 h. Konzentrationen von 10 µM führten 2 Mal zu signifikantem Absinken der Zellzahl. Zum Zeitpunkt 24 h auf 69,8 % und zum Zeitpunkt 96 h auf 69,9 %.

Bei Inkubation von Zellen mit 1 µmolarer Thymoquinonlösung sank nach 72 Stunden die Zellzahl auf 71,3 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, stieg dann aber wieder an und erreichte bei 120 h ein Maximum von 106 %. Die Schwankungen der Zellzahlmenge bei 0,1 µM sind im Bereich der Kontrolle und unsignifikant.

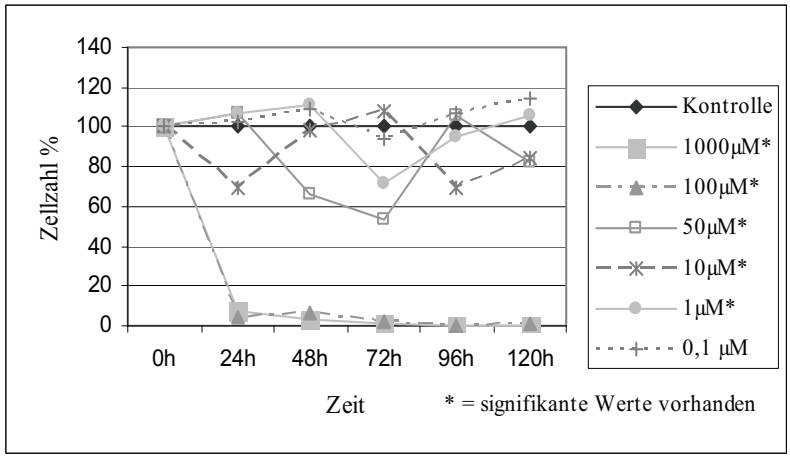


Abbildung 4: Zellzahl der Hep3B-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon

Bei Zellen der HepG2-Kultur zeigte sich bei Konzentrationen von 50 µM, 100 µM und 1000 µM ein kontinuierliches Absinken der Zellzahl. Sowohl bei der 100 µM, als auch bei der 1000 µM-Lösung lag der Abfall der Zellzahl nach 24 h bereits bei über 99 % und blieb bei den späteren Zeitwerten konstant auf diesem Niveau. Die Zellzahl fiel bei

der 50 µM-Lösung nach 24 h auf 40,7 % und schließlich nach 120 h auf 9,9 % vitale Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Bei Konzentrationen ≤ 50 µM zeigten sich nur jeweils zu einzelnen Zeitpunkten signifikante Abfälle der Zellzahl, die sich wieder erholten.

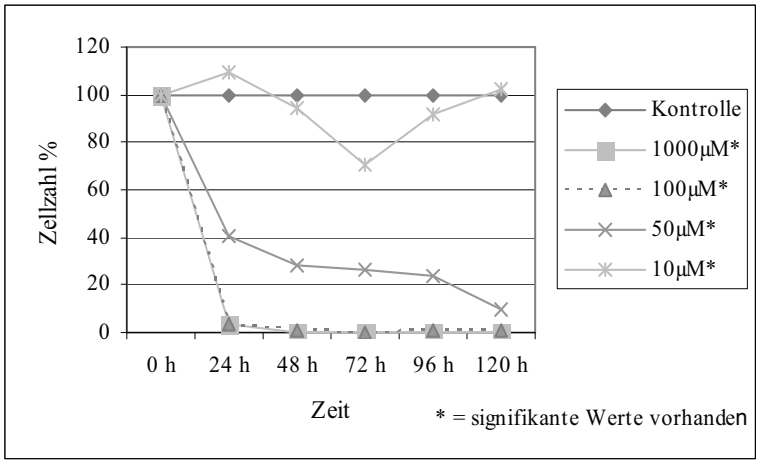


Abbildung 5: Zellzahl der HepG2-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon

Bei einer Konzentration von 1000 µM waren bei den HF-Zellen bereits nach 24 h keine vitalen Zellen mehr nachweisbar. Bei einer Medikamentenkonzentration von 100 µM zeigte sich ein Abfall der Zellzahl um 98,3 % schon nach 24 h, nach 120 h wurden 98,7 % erreicht. Die HF-Zellen zeigten bei 50 µM-Lösung zunächst einen signifikanten Anstieg der Zellzahl auf 164,2 % nach 24 Stunden und 217,6 % nach 96 Stunden, um dann nach 120 h auf einen unsignifikanten Wert von 133,1 % abzufallen. Die humanen Fibroblasten zeigten bei Konzentrationen ≤ 10 µM keine signifikanten Wachstumsveränderungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

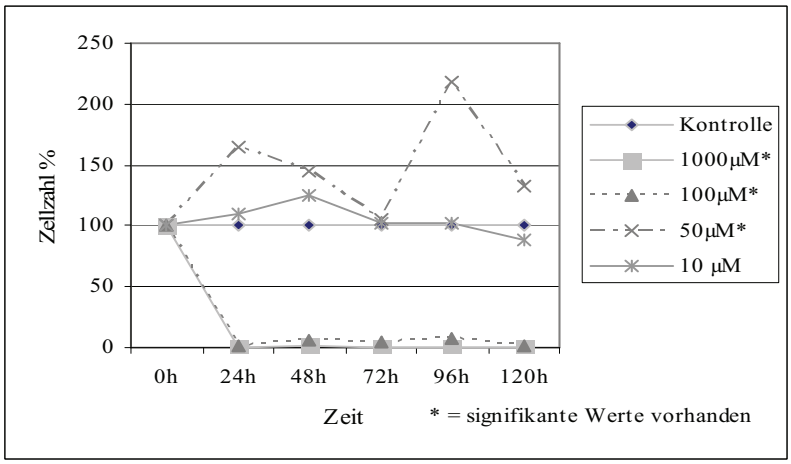


Abbildung 6: Zellzahl der HF-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon

4.2 Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels FACS-Analyse

Mittels Durchflußzytometer (FACS) wurde die Apoptoserate nach Applikation von Thymoquinon quantifiziert. Alle 3 Zelllinien wurden hierbei zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h zusätzlich zu einer Kontrolle mit Medikamenten-konzentrationen zwischen 0,1 µM und 1000 µM behandelt.

Bei allen drei Zelllinien zeigten sich bei den ersten Messungen wider Erwarten relativ gleich hohe Apoptoseraten für alle Konzentrationen inklusive der Probe ohne TQ-Zusatz. Beispielhaft in Abbildung 7 gezeigt.

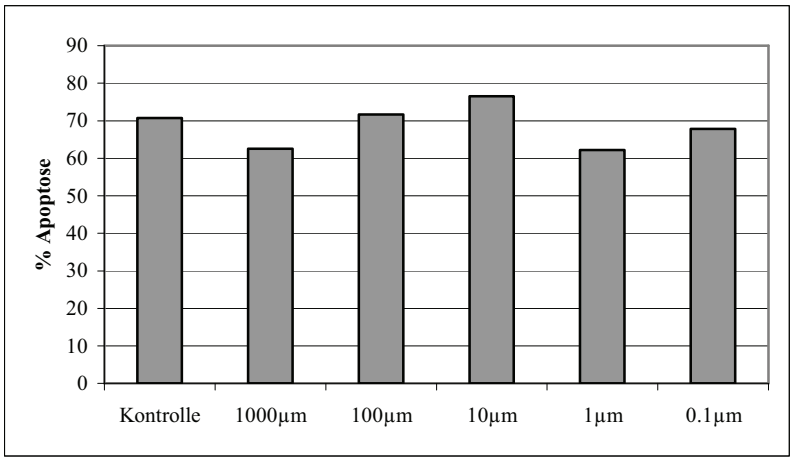


Abbildung 7: HepG2 nach 96 h TQ-Inkubation

Dies ließ auf einen Fehler bei den Materialien oder der Durchführung der Versuche schließen. Daraufhin wurden sowohl Nährmedien und Thymoquinonlösungen, als auch die Brutschränke auf mögliche Kontamination untersucht. Die Versuchsabläufe und Handlungen wurden erneut evaluiert und als fehlerfrei befunden. Schließlich wurde vermutet, dass TQ bei Brutschranktemperatur teilweise verdampft und dann in benachbarten wells der 6-well-Platten wieder kondensiert. So ließen sich die hohen Apoptoseraten in der Negativkontrolle und den niedrigen Konzentrationen erklären. Um diese Vermutung zu verifizieren wurden daraufhin immer nur Proben mit gleichen TQ-Konzentrationen in einer 6-well-Platte angesetzt. Mit diesem Versuchsaufbau zeigten sich erwartungsgemäß niedrige Apoptoseraten in den Negativkontrollen. Die Ergebnisse der verschiedenen Konzentrationsansätze korrelierten mit den Ergebnissen der relativen Zellzahlbestimmung, bei der von vornherein die Konzentrationen getrennt voneinander angesetzt waren. Im weiteren wurden die Versuche unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis durchgeführt.

Auf die Zellen der Hep3B-Linie begann die Wirkung von Thymoquinon bereits nach 24 h einzusetzen. Bei einer Konzentration von 1000 µM betrug die Apoptoserate 45,97 % nach 24 h, nach 48 h wurde ein Maximum von 84,81 % erreicht.

Auch bei der 100 µM-Lösung wurde nach 24 h mit einer Apoptoserate von 41,24 % ein erster Effekt erreicht, der mit 91,01 % Apoptosrate nach 48 h nochmals mehr als verdoppelt wurde. Die 120-stündige Inkubation erbrachte mit 61,02 % keinen Vorteil mehr gegenüber dem 96 h Wert.

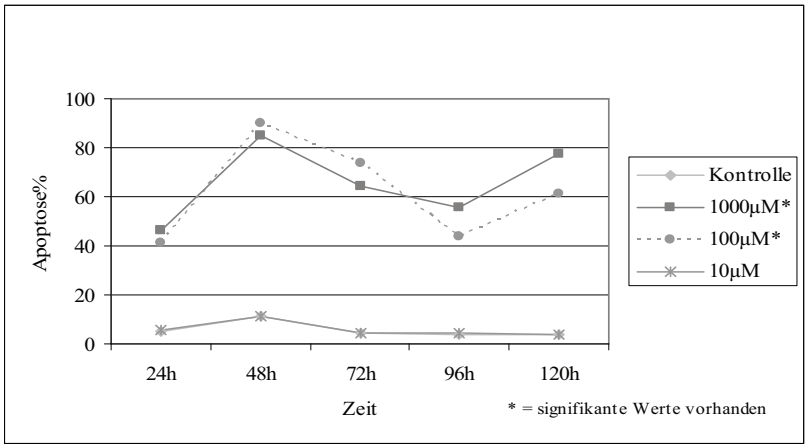


Abbildung 8: Apoptoserate in % der Hep3B-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon

Um besser eingrenzen zu können, ab welcher Konzentration signifikante Wirkung eintritt, wurde bei einer späteren Passage der Kultur eine weitere Messung mit 50 µmolarer Lösung zusätzlich vorgenommen. Hier zeigte sich neben vergleichsweise hohen Apoptoserate in der Kontrolle erstmals nach 120 h ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate auf 13,15 % bei 50 µM.

Konzentrationen ≤ 50 µM zeigten keine Signifikanz.

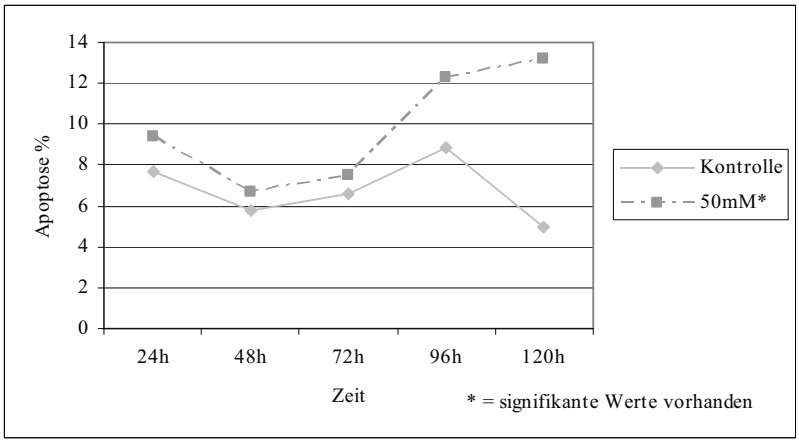


Abbildung 9: Apoptoserate in % der Hep3B-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon

Das Wachstum der HepG2-Zellen zeigte bei 100 µM und 1000 µM ebenfalls nach 24 h erste Veränderungen. Bei Inkubation mit der 1000 µM-Lösung ergab sich eine Apoptoserate von 15,65 %, bei 100 µM sogar von 30,9 %. Nach längerer Inkubationszeit konnte eine weitere Steigerung der Apoptoserate gezeigt werden. Bei

Inkubation mit 1000 µM wurde nach 48 h ein Anstieg auf 26,9 % und nach 72 h auf 31,5 % erreicht.

Bei der 100 µM-Lösung stieg die Rate von 30,9 % bei der ersten Messung nach 24 h Inkubationszeit auf 52,7 % nach 48 h und nach 120 h auf ein Maximum von 57, 8 %.

Auch bei der HepG2-Zelllinie wurde die 50 µm Konzentration bei einer fortgeschrittenen Passage nachgemessen. Lediglich der 24-Stunden-Wert mit 13,23 % Apoptose war signifikant, zu späteren Zeitpunkten war die Rate im Bereich der Kontrolle. Konzentrationen ≤ 50 µM zeigten keine Signifikanz.

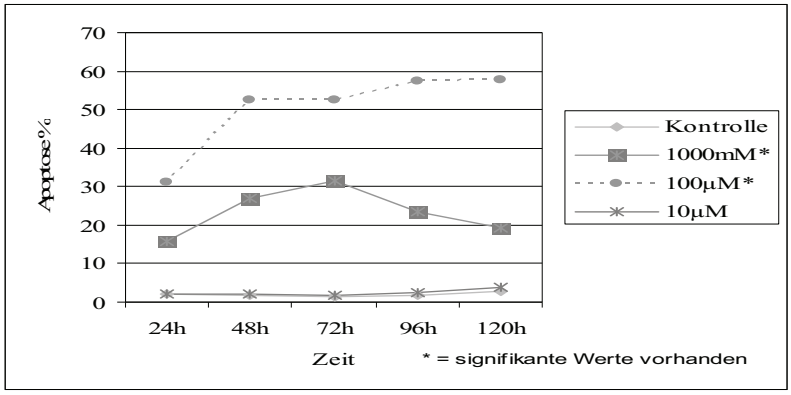


Abbildung 10: Apoptoserate in % der HepG2-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon

Das Wachstum der HF-Zellen zeigte im Vergleich zur Kontrolle bei Konzentrationen ≤ 10 µM keine signifikanten Veränderungen. Bei der 50 µM Lösung dagegen stieg die Apoptoserate abrupt nach 96 h auf 93,44 % und nach 120 h auf 81,23 % an.

Bei der 100 µM Konzentration stieg die Apoptoserate bereits nach 24 h auf 77,98 % an. Sie stieg dann mit Ausnahme eines Ausreißers zum Zeitpunkt 48 h kontinuierlich bis schließlich 99,31 % an.

Bei Inkubation mit 1000 µmolarer Lösung kam es zu einem stetigen Ansteigen der Apoptoserate von 18,67 % nach 24 h über 36,96 % nach 72 h bis auf 79,29 % zum Zeitpunkt 120 h.

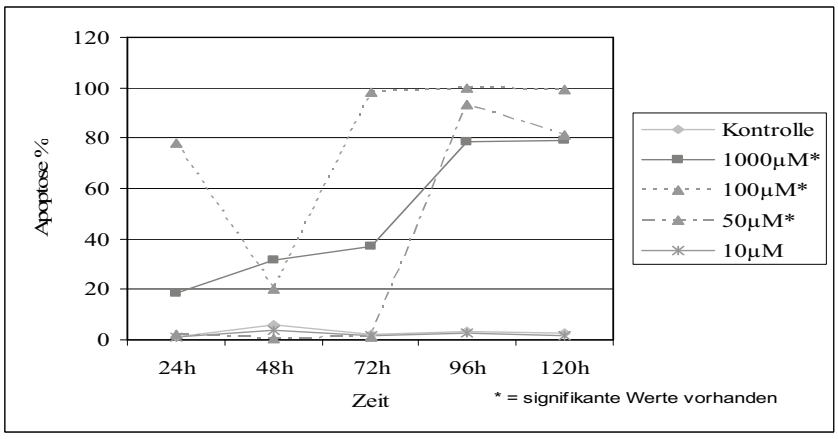


Abbildung 11: Apoptoserate in % der HF-Zellen nach Inkubation mit Thymoquinon

4.3 Ergebnisse BrdU-Inkorporations-ELISA

Mit Hilfe des BrdU-Inkorporations-Elisas können durch Einbau von Pyrimidinanaloga neu entstandene bzw. in der Synthesephase des Zellzyklus befindliche Zellen nachgewiesen werden.

Die Messung erfolgte bei allen drei Zelllinien zum Zeitpunkt 24 Stunden bei Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 1000 µM.

Bei der HF-Zelllinie konnten bei 1000 µM und 100 µM signifikant weniger BrdU-Pyrimidinanaloga nachgewiesen werden als bei der Kontrolle. Bei der höheren Konzentration lag der relative Wert bei 54,8 %, bei 100 µM sogar nur bei 44 %. Konzentrationen ≤ 10 µM blieben ohne Signifikanz.

Die Zellen der HepG2-Kultur zeigten nur bei einer Konzentration von 1000 µM einen signifikant geringeren Einbau des Pyrimidinanalogons nach 24 Stunden. So lag der Wert 18,2 % unter dem der Kontrolle. Bei 100 µmolarer Lösung war ein Mindereinbau von 14,7 % zu verzeichnen, dieser war jedoch wie auch die Werte der niedrigeren Konzentrationen nicht signifikant.

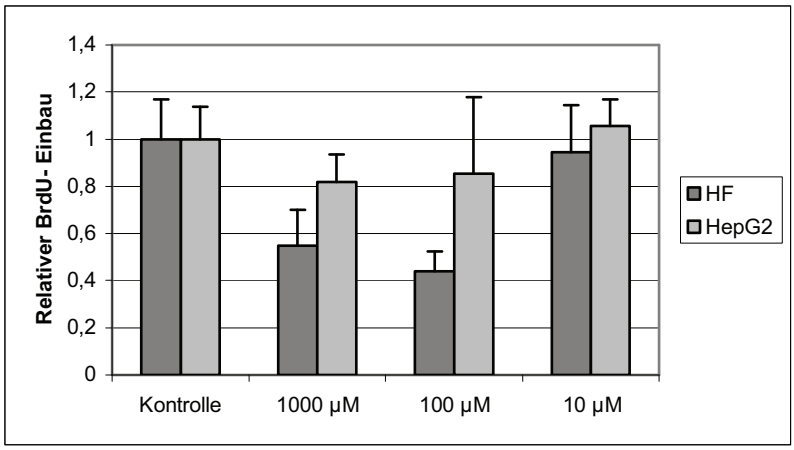


Abbildung 12: Relativer BrdU-Einbau bei HepG2- und HF-Zellen nach 24 h Inkubation mit Thymoquinon

Die Messungen der Hep3B-Zelllinie zeigten überraschend bei allen Konzentrationen signifikante Ergebnisse. Hier lassen sich jedoch vor allem bei Betrachtung der Grafik beträchtliche Unterschiede ausmachen. So liegt der BrdU-Einbau bei 1000 µM und 100 µM mit 49 % bzw. 46,9 % im Vergleich zur Kontrolle weitaus geringer als bei Konzentrationen ≤ 10 µM. Hier zeigt sich immerhin noch ein Einbau von 82,7 % bis hin zu 90,4 % im relativen Vergleich zu unbehandelten Kontrolle.

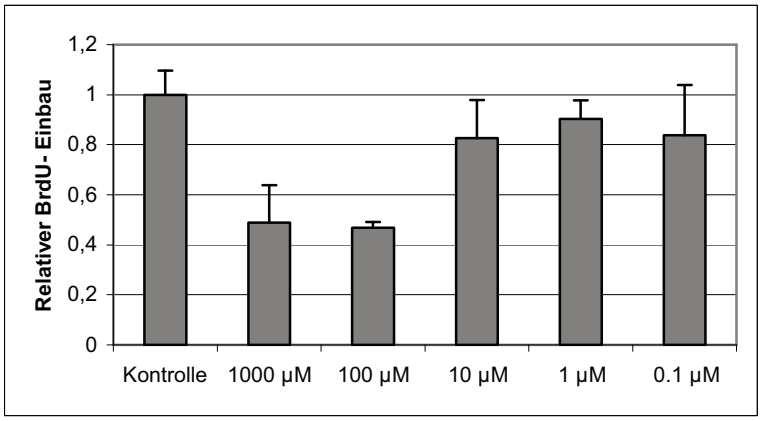


Abbildung 13: Relativer BrdU-Einbau bei Hep3B-Zellen nach 24 h Inkubation mit Thymoquinon

4.4 Ergebnisse mitochondriales Membranpotential (JC-1)

Beim Ablauf der Apoptose kommt es zum Absinken und schließlich zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$).

Dieser Vorgang kann mittels des Fluoreszenzfarbstoffes JC-1 nachgewiesen werden, der durch Aggregation seine Fluoreszenzeigenschaften verändert. Mit Hilfe des Durchflusszytometers wurden diese Veränderungen der Fluoreszenz zum Zeitpunkt 24 h bei der HepG2- und Hep3B-Zelllinie für je eine Kontrolle, sowie 100 µM und 10 µM bestimmt.

Bei 525 nm emittiert JC-1 als Monomer grüne Fluoreszenz. Nach Aggregation abhängig vom Membranpotential entstehen Dimere, die bei 590 nm rot-orangefarbenes Licht emittieren, was als Maß intakter Mitochondrien gilt.

Nach 24 Stunden Inkubation wurde bei der unbehandelten Hep3B-Zelllinie eine rote Fluoreszenz als Maß an intakten Mitochondrien von 44,23 % nachgewiesen. Die mit 100 µmolarer Lösung behandelten Zellen zeigten ein massives Absinken der roten Fluoreszenz auf 2,57 %. Diese Werte korrelierten mit den ebenfalls gemessenen Apoptosewerten, die bei der Kontrolle bei 1,99 % lagen und bei 100 µM auf 31 % anstiegen. Bei 10 µM Konzentration war die Apoptoserate mit 2,18 % im Bereich der Kontrolle und passend hierzu war auch die Anzahl intakter Mitochondrien mit 62,23 % sehr hoch.

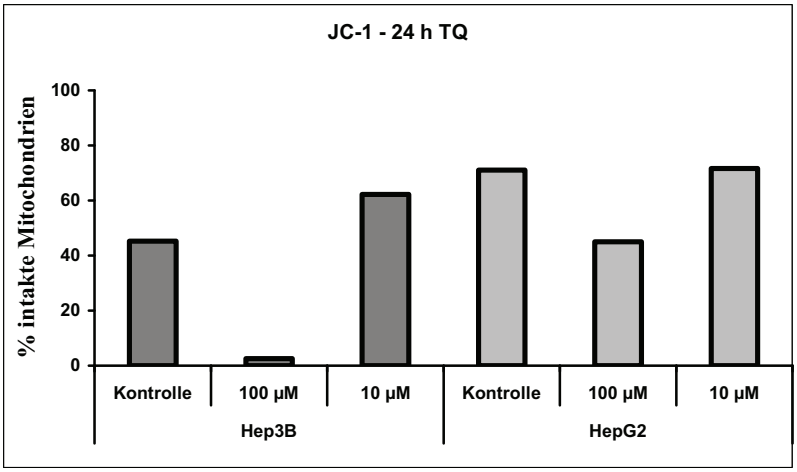


Abbildung 14: Nachweis intakter Mitochondrien durch JC-1-Fluoreszenz bei HepG2- und Hep3B-Zellen

Ähnlich verhielt es sich bei den HepG2-Zellen. Die unbehandelte Kontrolle zeigte eine rote Fluoreszenz von 71,05 %, ebenso wie die Zellen der 10 µmolaren Lösung mit einem Wert von 71,67 %. Bei 100 µM Konzentration war auch hier mit 45 % eine deutliche Abnahme roter Fluoreszenz nachweisbar.

Die Apoptosewerte zeigten passend zum Abfall roter Fluoreszenz einen Anstieg der Rate von ca. 1 % bei Kontroll- und 10 µM-Lösungspopulation auf 77,98 % bei 100 µM Lösung.

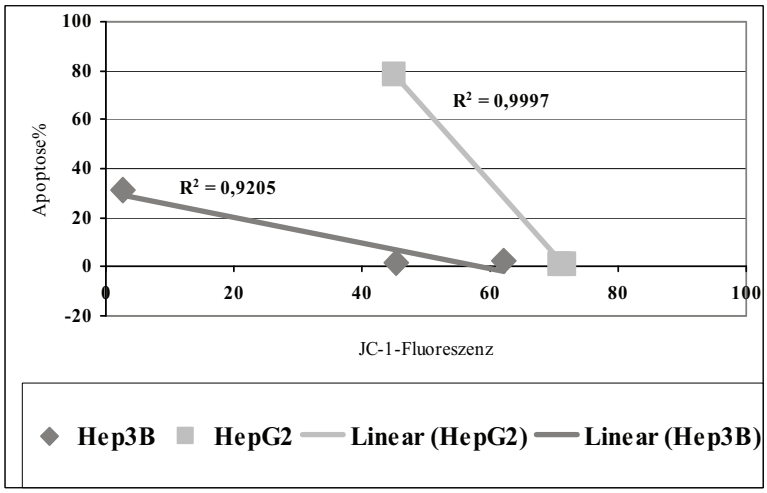


Abbildung 15: Apoptosewerte und JC-1-Fluoreszenz bei HepG2- und Hep3B-Zellen

Wie Abbildung 15 zeigt, fanden sich hohe Korrelationskoeffizienten von R^2= 0,9205 bei den HepB3-Zellen und R^2= 0,9997 bei den HepG2-Zellen in Bezug auf die Parameter Apoptose und JC-1-Fluoreszenz.

4.5 Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin-18-Fragmenten (M30-Antikörper)

Zytokeratin-18 wird im frühen Stadium der Apoptose durch die Effektorcaspasen 3 und 7 gespalten. An die hierbei entstehenden Fragmente können die M30-Cytodeath-Antikörper und in einem zweiten Schritt Fluoreszein-gekoppelte sekundäre Antikörper binden.

Die Präparate wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Zeiss Axioplan bei einer Filterung von 519 nm beurteilt.

Bei allen drei Zelllinien wurde zum Zeitpunkt 24 h eine unbehandelte Kontrolle, eine Konzentration von 100 µm und eine 10 µmolare Zellkultur betrachtet. Zusätzlich erfolgte nach 48 h bei allen verwendeten Zelllinien eine Auswertung von Präparaten mit 10 µmolarer Konzentration.

Die mikroskopische Untersuchung der Hep3B-Zellen zeigte in der unbehandelten Kontrolle zum Zeitpunkten 24 Stunden einen dichten Zellrasen ohne signifikante M30-Signale. Bei Behandlung der Zellen mit 10 µM Thymoquinon lässt sich nach 24 h neben einer Reduktion der Zelldichte, eine Abkugelung der Zellen mit angehobenem M30-Signal erkennen. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei gleicher Konzentration nach 48 Stunden Inkubationszeit. Eine hohe Konzentration von 100 µM führt praktisch zu einem kompletten Fehlen vitaler Zellen.

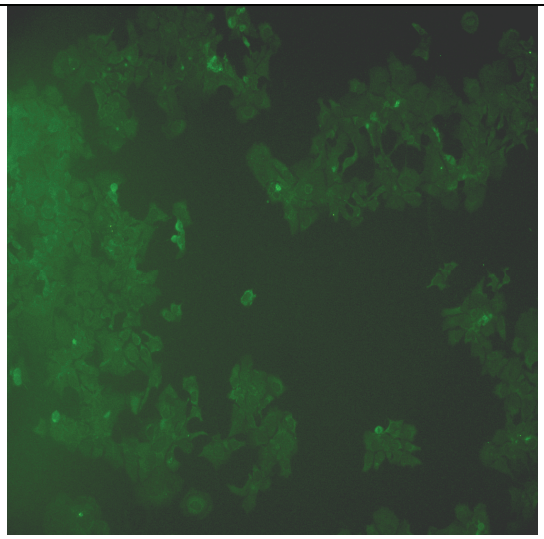


Abbildung 16: M30, Hep3B unbehandelt nach 24 h, Vergrößerung 10fach

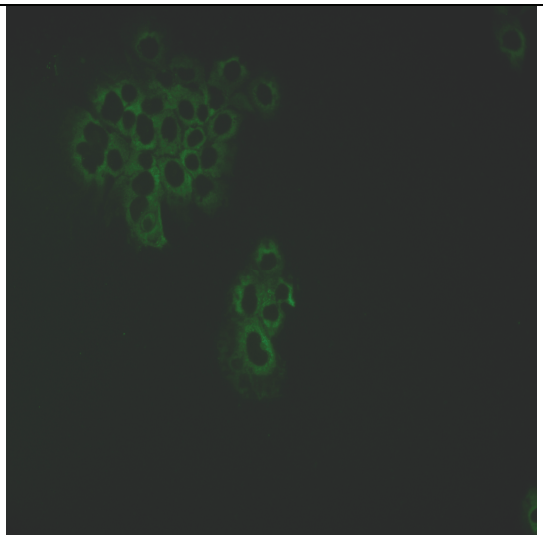


Abbildung 17: M30, Hep3B behandelt mit Thymoquinon 10 µM nach 24 h, Vergrößerung 20fach

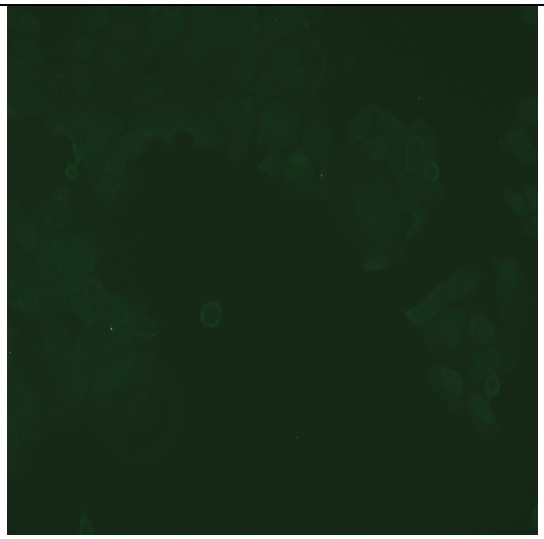


Abbildung 18: M30, Hep3B behandelt mit Thymoquinon 10 µM nach 48 h, Vergrößerung 20fach

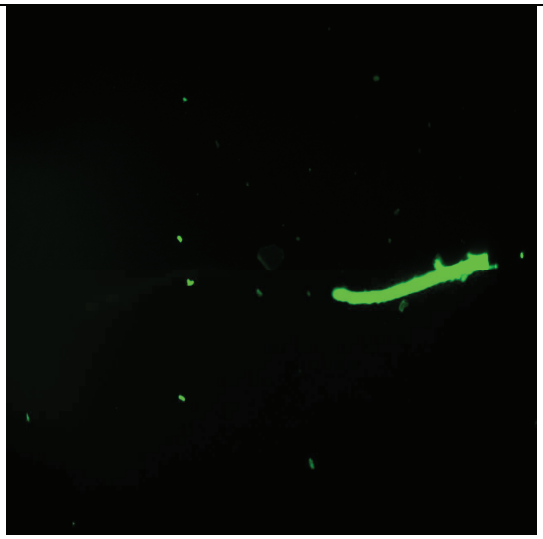


Abbildung 19: M30, Hep3B behandelt mit Thymoquinon 100 µM nach 24 h, Vergrößerung 5fach

Die HF-Zellen zeigen sowohl in der unbehandelten Kontrolle, als auch bei 10 µM keine M30-Signale und eine dichte Zellpopulation bei 24 und 48 Stunden Inkubationszeit. Bei 100 µM Konzentration kommt es neben einer Ausdünnung der Zelldichte auch zu einer Abkugelung der Zellen und einer vermehrter M30-Signalintensität.

Abbildung 20: M30, HF unbehandelt nach 24 h, Vergrößerung 20fach

Abbildung 21: M30, HF behandelt mit Thymoquinon 10 µM nach 24 h, Vergrößerung 20fach

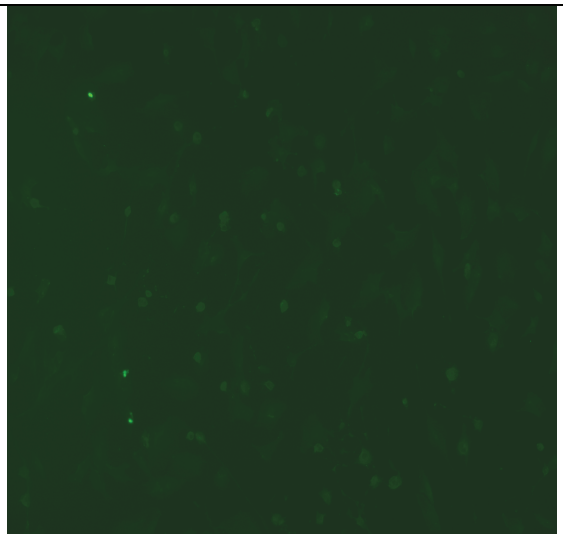


Abbildung 22: M30, HF behandelt mit Thymoquinon 100 µM nach 24 h, Vergrößerung 10fach

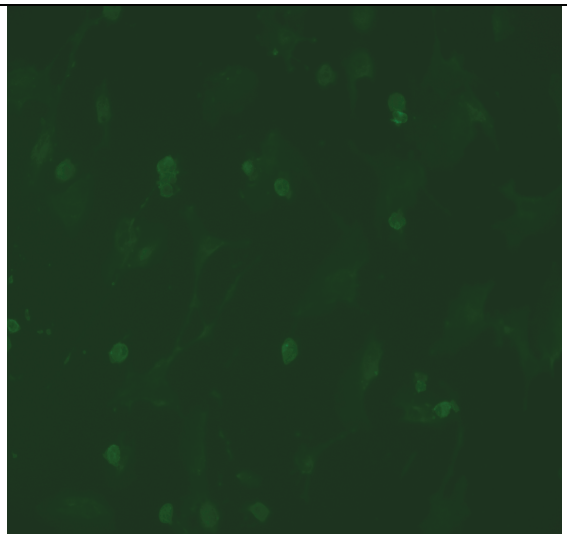


Abbildung 23: M30, HF behandelt mit Thymoquinon 100 µM nach 24 h, Vergrößerung 20fach

Ähnlich wie bei den HF-Zellen bewirkt eine 10 µm Konzentration auch bei den HepG2 Zellen keine vermehrte Fluoreszenz. Die höhere Konzentration von 100 µM bewirkt hingegen ein komplettes Auslöschen vitaler Zellen.

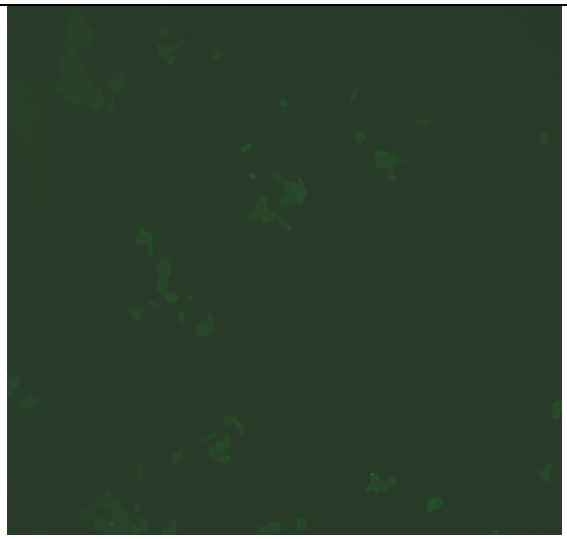


Abbildung 24: M30, HepG2 behandelt mit Thymoquinon 10 µM nach 48 h, Vergrößerung 10fach

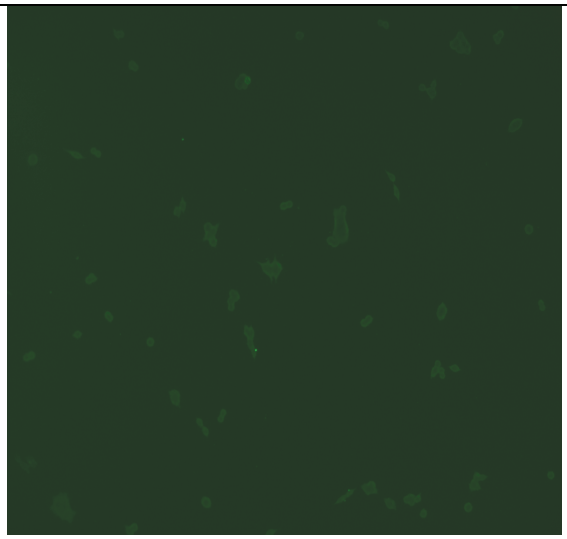


Abbildung 25: M30, HepG2 unbehandelt nach 24 h, Vergrößerung 10fach

4.6 Ergebnisse Caspase 3/7-Assay

Die Caspase 3 ist eine Effektorcaspase, die beim Ablauf der Apoptose von sogenannten Initiatorcaspasen aktiviert wird und daraufhin als Katalysator weiterer Reaktionen dient. Nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit wurden Lumineszenzmessungen bei den

Hep3B-, HepG2- und HF-Zellen bei 50 µM, 100 µM und einer unbehandelten Kontrolle vorgenommen. Diese Messungen erfolgten über einen Zeitraum von ca. 4 Stunden in halbstündigen Abständen.

Die drei Zelllinien zeigten hierbei nach 24 Stunden Inkubation mit 50 µM Lösung ähnliche Ergebnisse. Sie wiesen zunächst eine Caspaseaktivität mit ähnlich hohem Niveau wie bei der Kontrolle auf.

Nach 48 Stunden zeigte sich dann bei den Hep3B-Zellen eine 1,5fach erhöhte Caspaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle, bei den HepG2-Zellen sogar ein Anstieg um das 1,8fache. Ausschließlich bei den HF-Zellen sank die Aktivität auf einen Wert von 0,82 ab.

Konzentrationen von 100 µM ließen die Caspaseaktivität aller verwendeter Zelllinien bereits nach 24 Stunden massiv abfallen, so dass man hier an einen Prozess im Sinne einer Nekrose denken könnte.

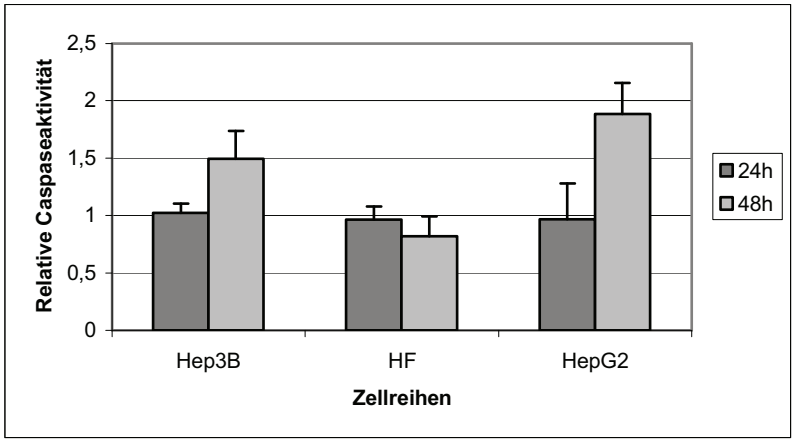


Abbildung 26: Relative Caspaseaktivität nach Inkubation mit 50 µM Thymoquinon nach 24 und 48 Stunden

4.7 Semiquantitativer Westernblot

Der semiquantitative Westernblot diente zur Ermittlung der Expression apoptose- bzw. proliferationsrelevanter Proteine. Zur Vorbereitung musste zunächst das Gesamtprotein isoliert werden, das dann auf Gele pipettiert und schließlich elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Schließlich wurden spezifische Antikörper aufgetragen und geblottet. Die spezifischen Antikörper richteten sich gegen das sogenannte „housekeeping“ Protein ß-Aktin sowie gegen das proapoptotische Protein Bax und das antiapoptotische Protein Bcl-2.

Gemessen wurden bei allen drei Zelllinien die Konzentrationen 100 µM, 50 µM und eine unbehandelte Kontrolle zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden. Bei der Kontrolle

ohne TQ-Zusatz wurde eine Probe je Zeitpunkt mitgeführt, bei 50 µM waren es zwei und bei 100 µM drei Vergleichsproben.

Bei den HF-Zellen konnte bei der unbehandelten Kontrolle und bei der 50 µM Konzentration zu beiden Zeitpunkten eine ß-Aktin Expression in Form einer breiten Bande nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27). Wobei zum Zeitpunkt 48 h die Expression bei 50 µM geringer zu sein scheint, erkennbar an der abnehmenden Breite im Vergleich zu 24 Stunden. Bei der hohen Konzentration von 100 µM werden nur sehr dezente Banden sichtbar, am besten zu sehen in der jeweils ersten Vergleichprobe. Beim Blotten der Antikörper gegen Bax zeigten sich für die unbehandelte Kontrolle und die 50 µM Konzentration zu beiden Zeitpunkten ähnlich breite Banden, folglich vergleichbar hohe Expression von Bax. 100 µM TQ Konzentration ergab zum Messpunkt 24 h prominentere Banden, nach 48 h hingegen schwächere Expression.

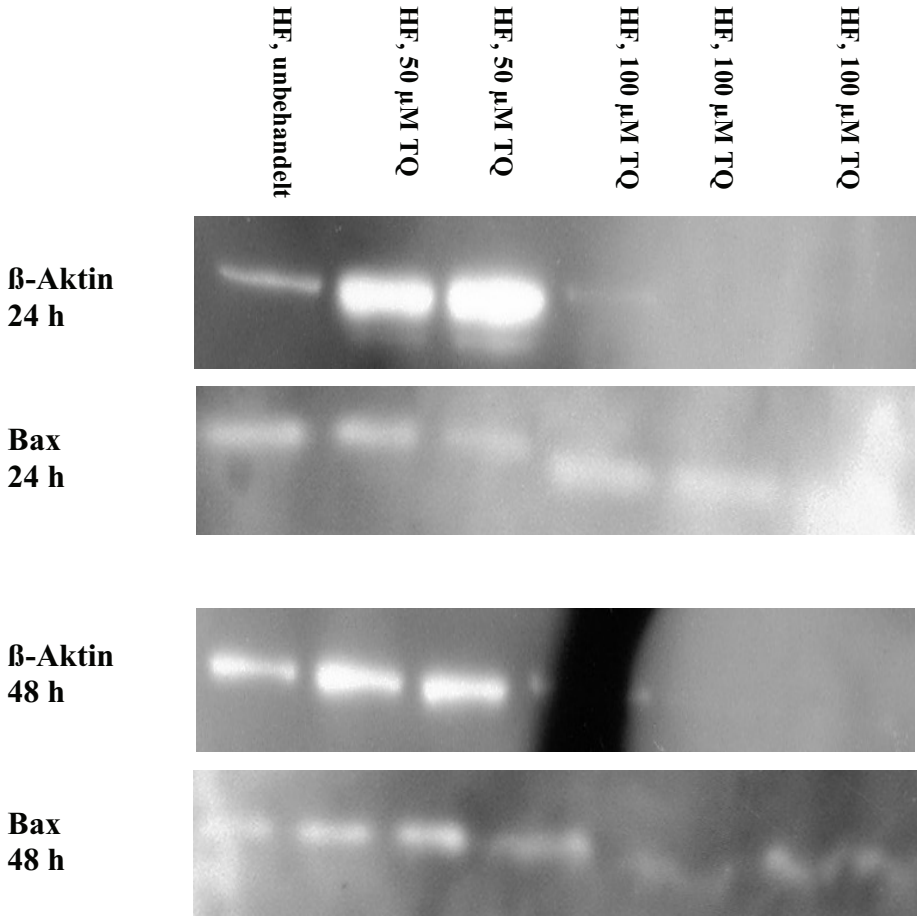


Abbildung 27: Semiquantitativer Westernblot zum Nachweis von ß-Aktin und Bax. Abgebildet sind unbehandelte, mit 50 µM und 100 µM TQ behandelte HF-Zellen zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h.

Messung der Bcl-2 Expression ergab keine verwertbaren Ergebnisse, es waren keine Banden an erwarteter Position nachweisbar.

Die Hepatomzelllinie HepG2 zeigte bei den unbehandelten Kontrollen zu beiden Zeitpunkten eindeutige Banden, die bei 50 µM Konzentration etwas schwächer ausfielen. Bei 100 µM Konzentration zeigt sich sehr geringe Expression von ß-Aktin, sichtbar durch schwächere Banden. Beim Blotten der Antikörper gegen Bax wurde in der unbehandelten Kontrolle und bei 50 µM Konzentration bei 24 und 48 h eine schwache Expression ermittelt. Die hohe Konzentration zeigt ausschließlich bei 48 h sehr diskrete Banden, wie in Abbildung 28 zu sehen ist.

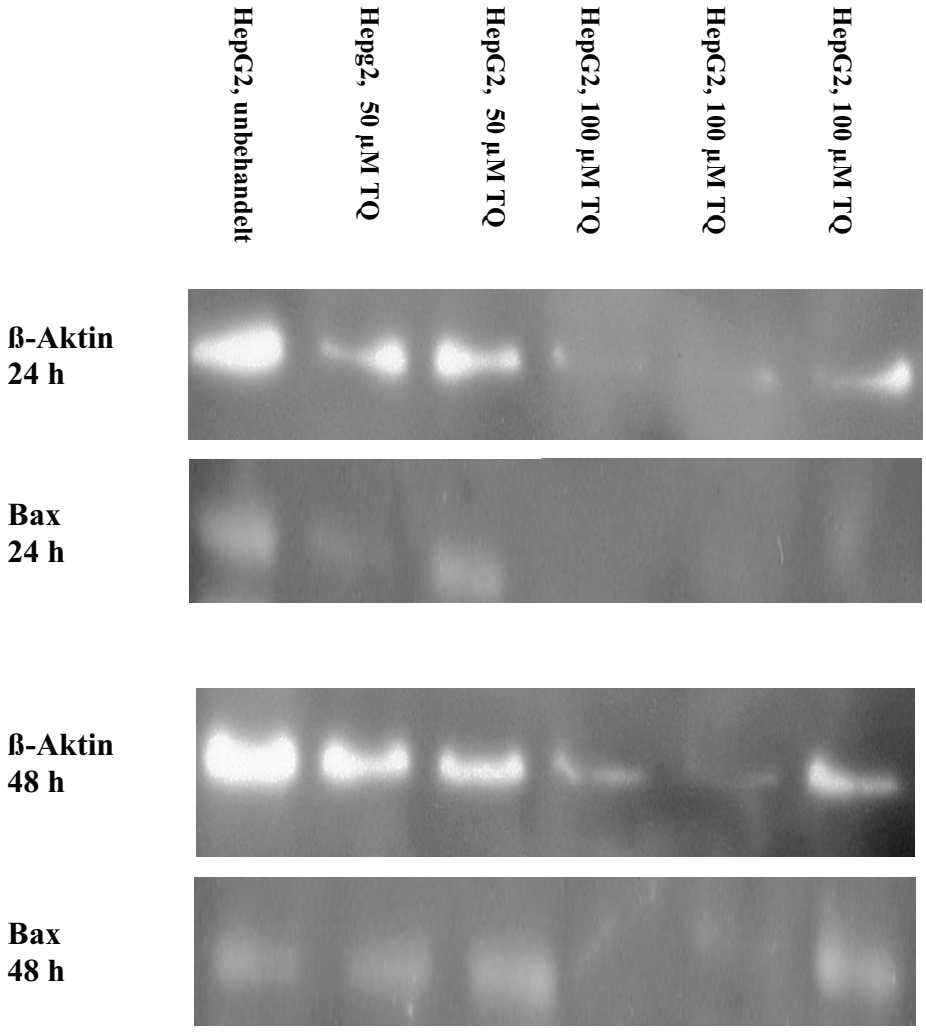


Abbildung 28: Semiquantitativer Westernblot zum Nachweis von ß-Aktin und Bax. Abgebildet wurden unbehandelte, mit 50 µm und mit 100 µm TQ behandelte HepG2-Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 48 h.

Auch die Hep3B-Zellen weisen für die unbehandelte Kontrolle und die geringere TQ Konzentration markante Banden entsprechend einer starken Expression des housekeeping Proteins bei 24 und 48 Stunden auf. 100 µM Konzentration führt zu kaum erkennbaren Banden. Für Bax zeigen sich bei der unbehandelten Kontrolle zu beiden

Zeitpunkten markante Banden, die bei 50 µM eine noch etwas deutlichere Expression zeigen (eine der 50 µM-Vergleichsproben zum Zeitpunkt 24 h ist fehlerhaft und zeigt keine Bande). 100 µM Konzentrationen führen nur nach 24 h zu schwach sichtbaren Banden.

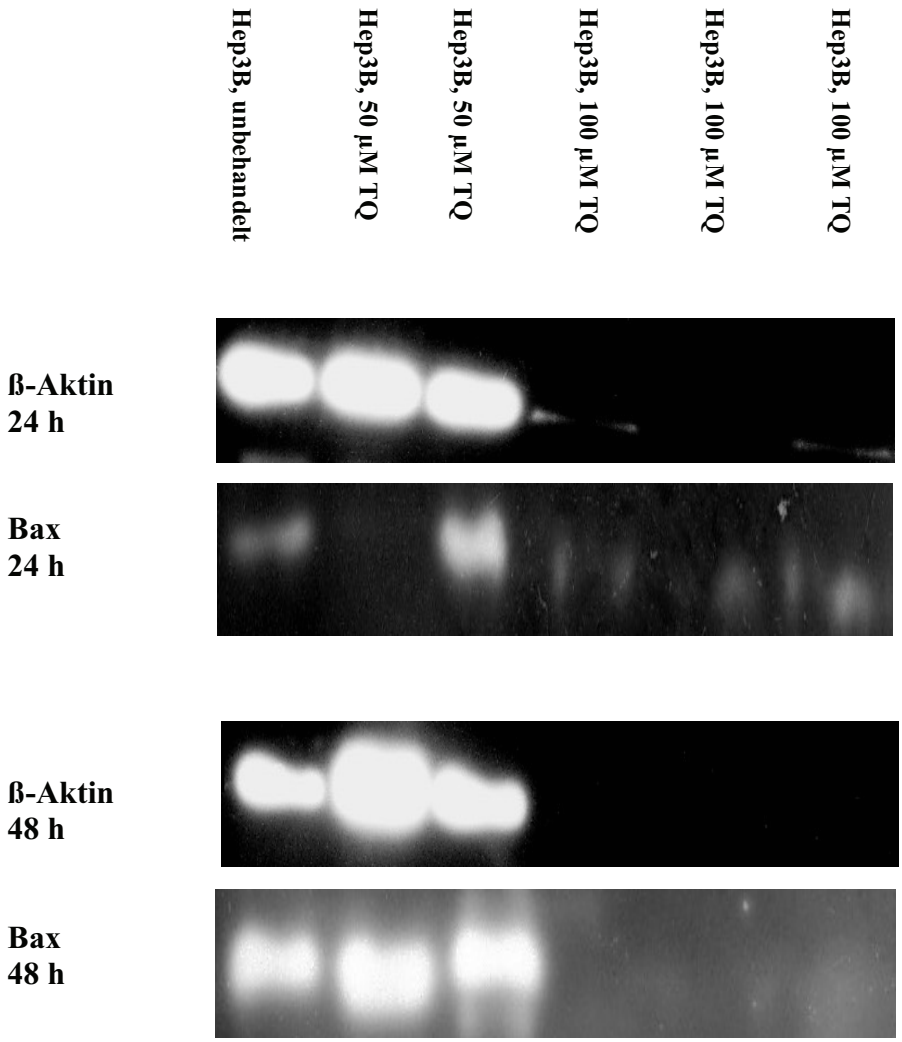


Abbildung 29: Semiquantitativer Westernblot zur Abbildung von ß-Aktin und Bax. Abgebildet sind unbehandelte, mit 50 µM und mit 100 µM TQ behandelte Hep3B-Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 48 h.

Bei beiden Hepatomzelllinien konnten keine aussagekräftigen Banden für das Bcl-2-Protein gefunden werden.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Die Wirkung von Thymoquinon auf die Hepatomzellen und Hautfibroblasten wurde in sieben verschiedenen *in vitro* Versuchen evaluiert. Die Versuche bauten aufeinander auf und dienten dazu einander zu bestätigen, bzw. die Ergebnisse möglichst genau einzugrenzen und zu spezifizieren.

So wurde die Proliferationsrate zum einen relativ mittels BrdU-Inkorporations-ELISA bestimmt, bei dem der Einbau eines Pyrimidinanalogons in neu synthetisierte DNA-Stränge photometrische dargestellt wird. Zum anderen wurde die absolute Zellzahl durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch beide Methoden konnte der Einfluss von TQ auf das Zellwachstum beurteilt werden.

Ergänzend hierzu wurden auch die apoptotischen Zellen dargestellt. Hierzu wurde den Zellen der DNA-Interkalationsfarbstoff Propidiumjodid zugesetzt, der sich unspezifisch in DNA-Doppelstränge einlagert. Dieser Farbstoff emittiert eine rote Fluoreszenz, die durchflußzytometrisch erfasst wurde. Im FACS wurden alle Zellen mit fragmentierter DNA, also subdiploidem DNA-Satz als apoptotisch gewertet.

Als Bestätigung der FACS-Ergebnisse wurden die Änderungen in der Expression apoptoserelevanter Proteine mittels semiquantitativem Westernblot untersucht. Es wurden das proapoptotische Bax und das antiapoptotische Bcl-2 geblottet. Beides sind Proteine, die maßgeblich an der Signaltransduktion der Apoptose beteiligt sind. Ergänzend wurde auch die Aktivität des Enzyms Caspase-3 als Katalysator des kontrollierten Zelltodes bestimmt.

Ein frühes Ereignis in der Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges ist der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Diese Potentialänderung wurde bei den Hepatom- und den HF-Zellen mittels JC-1-Färbung im Durchflusszytometer nachgewiesen.

Als qualitativer Apoptosenachweis diente die Immunfluoreszenzfärbung von Zytokeratin-18-Fragmenten (M30). Wird das Zytokeratin-18 in einem frühen Stadium der Apoptose durch Caspasen fragmentiert, entstehen Bindungsstellen für den M30 Cytodeath-Antikörper. An diesen Antikörper können wiederum Fluoreszein-gekoppelte Anti-Maus-Antikörper ansetzen, deren Fluoreszenz durch UV-Licht Anregung sichtbar gemacht wurde.

Bei den durchflußzytometrischen Apoptosemessungen (FACS) zeigten sich, wie bereits in Kapitel 4.2 erläutert, falsch hohe Apoptoseraten bei allen TQ Konzentrationen inklusive der Negativkontrolle. Dies führte zu der Vermutung, dass TQ in der genutzten

chemischen Lösung bei entsprechend hohen Temperaturen leicht vom flüssigen in den gasförmigen Zustand übergehen kann. Verifiziert wurde dies durch ein komplettes Umstellen des Versuchsaufbaus, nachdem andere Fehlerquellen ausgeschlossen werden konnten. In den weiteren Versuchen wurde dies stets berücksichtigt.

In den Versuchen wurde das pulverisierte TQ der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH mit DMSO und Nährmedium versetzt, in anderen Arbeiten wäre es sinnvoll die Substanz anderweitig in Lösung zu bringen und zu testen, ob ebenfalls ein leicht flüchtiges chemisches Verhalten zu beobachten ist. In der Literatur lassen sich Arbeiten finden, in denen neben TQ auch strukturverwandte Substanzen ausgetestet wurden (5). Hier ist zum einen das tertiäre Butylhydroquinon (THBQ) und das Dihydrothymoquinon zu nennen (36).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Thymoquinon an Zellen des hepatozellulären Karzinoms zu testen erscheint aus mehrerer Hinsicht sinnvoll. Zum einen ist das HCC leider auch derzeit noch ein Tumor, der im fortgeschrittenen Stadium nicht zufriedenstellend therapiert werden kann, so dass hier weitere Forschung nötig ist. Zum anderen hat TQ schon an verschiedenen Tumorzelllinien eindrucksvoll seine anti-tumoralen Eigenschaften gezeigt.

Die zu Beginn durchgeführten Versuche evaluierten das Wachstum und die Zellvitalität der Zelllinien. Hierzu gehörten die FACS-Analyse, der BrdU-ELISA und die Bestimmung der absoluten Zellzahl. Was alle drei Versuche bestätigten, war, dass die Wirkung von TQ bereits in den ersten 24 h einsetzt. Eine derart schnell einsetzende Wirkung passt zu den Beobachtungen von Shoieb et. al, die erste proapoptotische Effekte auf COS31-Zellen (Osteosarkom des Hundes) schon nach 6 h Inkubationszeit feststellten (50).

Ebenfalls übereinstimmend bei diesen Experimenten war die Tatsache, dass die Anzahl vitaler Zellen in allen drei Zelllinien bei Konzentrationen von 1000 µM und 100 µM schon nach 24 h unter 90 % abfielen. Bestätigt wurde dies durch die durchflußzytometrische Apoptosemessung, die entsprechend ab 24 h ansteigende Raten ermittelte.

Auffällig war bei den HepG2- und den HF-Zellen, dass hier die Behandlung mit 100 µM Konzentration kontinuierlich mehr apoptotische Zellen ergab, als die mit 1000 µM behandelten Zellen. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Einerseits könnte die 100 µM Konzentration tatsächlich bei beiden Zelllinien zu höheren Apoptoseraten führen als 1000 µM. Andererseits ist es denkbar, dass das Ergebnis ein durch die

Technik des FACS Calibur Gerätes bedingter Fehler ist. Durchflußzytometrisch wurde die Apoptoserate nach Propidiumjodidfärbung der DNA gemessen. 1000 µM ist eine sehr hohe Konzentration für *in vitro* Versuche und könnte sich teilweise zytotoxisch im Sinne einer Nekrose auf die Zellen ausgewirkt haben. Da hierbei, anders als bei der Apoptose keine kontrollierte DNA-Fragmentierung abläuft, kann auch die PI-Färbung nur unzureichend erfolgen. Dies führt bei einem relativ hohen Anteil an nicht-vitalen Zellen zu einem verhältnismäßig geringen Signal.

Dass Konzentrationen ≤ 10 µM keine Auswirkungen haben zeigten die Versuche übereinstimmend. Was die 50 µM Konzentration angeht, so zeigen sich teils widersprüchliche, nicht vollkommen klar abzugrenzende Ergebnisse. Beispielsweise konnte in der Zellzahlbestimmung bei den HepG2-Zellen ein kontinuierlicher und signifikanter Abfall der vitalen Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, der sich dann in der FACS-Analyse nicht bestätigen ließ. Hier wurde nur nach 24 h eine signifikante Apoptoserate gefunden. Die Wirksamkeitsgrenze könnte somit durchaus in einem Bereich zwischen 50 und 100 µM liegen. Gali-Muhtasib et al. fanden nach 24 h eine Wirkung auf HCT116 Zellen ab 60 µM Konzentration (20).

In einigen Arbeiten wird neben der Wirksamkeit gegenüber den Tumorzelllinien auch beschrieben, dass TQ die nicht-malignen Kontrollen kaum beeinträchtigt (21, 50). Dies konnte in unseren Experimenten nicht bestätigt werden. Zwar zeigten die HF-Zellen in der Zellzahl keine Beeinträchtigung durch 50 µm TQ-Zusatz, dafür waren bei der durchflußzytometrischen Apoptosemessung die Raten im Vergleich zu den Hepatomzellen am höchsten.

Um die proapoptotische Wirkung der Substanz zu verifizieren, wurden die Immunfluoreszenzfärbung des Zyrokeratin-18-Fragmentes (M30 Cytodeath) und die JC-1-Färbung zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials vorgenommen.

Die JC-1-Färbung konnte die vorangegangenen Versuche bestätigen, da bei 100 µM hohe Apoptoseraten und ein massiver Abfall an roter Fluoreszenz gemessen wurde, wohingegen bei 10 µm Konzentration die Ergebnisse denen der Kontrolle entsprachen.

Im M30 Cytodeath wird dieser Trend bestätigt. Bemerkenswert ist, dass hier bei den Hepatomzelllinien unter dem Mikroskop bei 100 µM praktisch keine vitalen Zellen mehr zur erkennen sind (siehe Abbildung 19). Es finden sich nur noch Zellfragmente. Bei den nicht-malignen Kontrollzellen hingegen ist die Resistenz gegen das TQ größer. Zwar ist die Zelldichte vermindert und das M30 Signal verstärkt, aber es sind noch vitale Zellen vorhanden (siehe Abbildung 23). Im Westernblot bestätigte sich, dass die 100 µM Konzentration nur wenige vitale Zellen zurücklässt, erkennbar an der geringen

Expression des ß-Aktins. Beim Blotten des Bax zeigte sich bei den HF-Zellen nach 24 h und 100 µM eine kräftigere Expression als bei der 50 µM Konzentration und der unbehandelten Kontrolle. Die Hep3B-Zellen zeigten bei 50 µM wiederum stärkere Bax-Banden als in der Kontrolle. Nur bei den HepG2-Zellen lassen sich zwischen unbehandelter Kontrolle und 50 µM keine klaren Unterschiede ausmachen. Diese Ergebnisse lassen einen Trend zu einer erhöhten Bax-Expression in den behandelten Zelllinien vermuten.

Die Veränderung des Bax/Bcl-2-Quotienten beim programmierten Zelltod ist ein physiologischer Schritt in der Signaltransduktion. Bax steht hierbei für die Aktivierung der Apoptose durch erhöhte Ausschüttung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium. Cytochrom c wiederum bindet an das zytoplasmatische Protein Apaf-1 und führt so zu einer Aktivierung von Caspasen. Das Bcl-2-Protein dagegen dichtet das Mitochondrium ab, so das Cytochrom c nicht austreten kann, was die Apoptose verhindert. Das Niveau von Bax kann beispielsweise durch Strahlung, Chemotherapeutika und DNA-Schäden angehoben werden, das Niveau von Bcl-2 durch Wachstumsfaktoren (26).

El-Mahdy et. al beschreiben eine Erhöhung des Bax/Bcl-2-Quotienten nach Behandlung von HL-60-Zellen (myeloblastische Leukämie) mit TQ infolge einer Hochregulation von Bax und einer Downregulation von Bcl-2. Sie schließen daraus, dass im weiteren Ablauf eine Aktivierung von Caspasen zum Zelltod führt (14). Auch Gali-Muhtasib et al. können diese Veränderung des Bax/Bcl-2-Quotienten nach TQ-Behandlung bei Tumorzellen bestätigen und beschreiben vor allem eine Abnahme des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL (21).

Eine Aktivierung der Caspasen bildet auf dem Weg zum programmierten Zelltod sozusagen die Endstrecke. El-Mahdy et al. kommen zu dem Ergebnis, dass eine Aktivierung von Caspase-3 und -8 auf die TQ-Wirkung zurückzuführen ist. In unseren Versuchen zeigte sich nach 48 Stunden Inkubationszeit bei 50 µM Konzentration bei den Hepatomzelllinien ein 1,5-1,8facher Anstieg der Caspaseaktivität. Die HF-Zellen und die kürzere Inkubationszeit von 24 Stunden erbrachten Werte im Bereich der Kontrolle. Bei 100 µM lag die Aktivität sehr gering. Dies lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass diese hohe Konzentration wie bereits beschrieben kaum vitale Zellen zurücklässt und die Wirkung dermaßen zytotoxisch ist, dass hier wohl auch der Vorgang der Nekrose eine Rolle spielt.

Eine weitere Fähigkeit des TQ, die 2008 von Yi et. al anhand von *in vitro* und *in vivo* Versuchen an PC3-Zellen (Prostatakarzinom) und Umbilikalvenenendothelien beschrieben wird, ist die Hemmung der Angiogenese und Tumorangiogenese.

Endothelzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Tumorangiogenese (58). Beim Wachstum, der Proliferation und Migration der Endothelzellen spielen zwei wichtige Signaltransduktionswege eine Rolle. Dies sind der PI3K-AKT- und der Raf (receptor activation factor)-MEK (mitogen extracellular kinase)-ERK (extracellular signal-related-kinase)-Signalweg. PI3K steht hierbei für Phosphoinositid-3-Kinase, AKT stellt das Gen für die Proteinkinasen B dar, die eine zentrale Rolle in der Homöostase der Zellen haben. Die Raf-Kinase beispielsweise ist in mehreren Tumoren überexpremiert, so im Nierenzellkarzinom, nicht-kleinzelligen Lungenkrebs und auch im HCC (22). Yi et. al stellten fest, dass TQ durch Suppression der Aktivierung der AKT- und ERK-Signalwege die de novo-Angiogese unterbindet (58). Diese Wirkung am HCC zu untersuchen wäre sehr sinnvoll, da neuere Therapien auch in eben diese Signalwege eingreifen. Zu nennen ist hier das Sorafenib, das ein Inhibitor der Raf-Kinase und des vascular endothelial growth factor Rezeptors (VEGFR) ist. Da einige Studien für Sorafenib ein verlängertes Überleben im Vergleich zur Best Supportiv Care zeigten, konnte sich das Medikament vor allem in den USA gut etablieren.

Neben diesen antitumoralen Eigenschaften, könnte TQ auch einen präventiven Nutzen aufweisen. Das HCC ist ein Tumor, der auf dem Boden chronischer Entzündung entsteht. TQ hat nachweislich antiinflammatorische und antioxidative Wirkung, was der Entzündung entgegenwirken und somit die Tumorentstehung möglicherweise zumindest hinauszögern könnte. Eine präventive, protektive Wirkung an Leberzellen konnte jedenfalls in einer Studie festgestellt werden (34). Durch Zugabe von TQ in das Trinkwasser von Mäusen wurde hier die Hepatotoxizität von Carbon-Tetrachlorid gesenkt, was nach einmaliger Gabe normalerweise zu einer massiven Leberschädigung führt.

Die Säulen der Chemotherapie des HCC bilden aktuell Doxorubicin, Sorafinib oder Kombinationstherapien, wie das PIAF-Protokoll (Cisplatin, INF-alpha, Doxorubicin, 5-Fluorouracil) oder Gemcitabine plus Cisplatin (53). Limitiert werden die Therapien durch die unerwünschten Nebenwirkungen. Beim HCC sind diese wegen der schlechten Leberfunktion meist stark ausgeprägt. Ob TQ hier die chemotherapeutische Wirkung verbessern und sich protektiv auf die Leberfunktion auswirken kann, sollte ein Ansatzpunkt für weitere Forschung sein. Einen Hinweis hierauf geben kann eine Studie von 1997, bei der neben einer verbesserten antitumoralen Aktivität von Cisplatin an Ehrlich Ascites Karzinomen der Maus auch gleichzeitige eine TQ-vermittelte verminderte Nephrotoxizität nachgewiesen wurde (6).

5.3 Zusammenfassung der Diskussion

Thymoquinon zeigt in unseren Experimenten ab einer Konzentration von 100 µM eindeutig proapoptotische und antiproliferative Wirkung. Da dies für *in vitro* Versuche eine relativ hohe Konzentration darstellt, muss sich zeigen, inwieweit TQ auch am Menschen einsetzbar ist. In einzelnen Versuchen gab es durchaus Hinweise auf eine Wirksamkeit bei niedrigeren Konzentrationen. Dies an Hepatomzelllinien näher einzugrenzen sollte Bestandteil weiterer Forschung sein. Ebenso sollte getestet werden, ob TQ in einer anderen Form der Suspension ein ähnlich flüchtiges Verhalten bei 37 °C zeigt, wie in unserer Arbeit. Bisher war in der Literatur nicht davon berichtet worden.

Es konnte in unserer Arbeit zwar keine ausgeprägte Resistenz der nicht-malignen Zellen bestätigt werden, wie das in anderen Studien der Fall war (21, 50). Dennoch konnten wir, was die Signaltransduktion und Expression apoptoserelevanter Proteine angeht andere Arbeiten bestätigend ergänzen.

Da Thymoquinon neben den antitumoralen auch antiinflammatorische und antioxidative Effekte hat, bietet sich für die Substanz in Zukunft ein weites Feld an Einsatzmöglichkeiten. Hier sollten nicht nur mögliche Tumortherapien, sondern, wie bereits erläutert, auch ein präventiver Nutzen des Thymoquinons evaluiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. "A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators." (1998) Hepatology, 28(3), 751-5
2. "Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators." (2000) Hepatology, 31(4), 840-5
3. Abdalla, E.K. a S., K.E., (2009) "Overview of treatment approaches for hepatocellular carcinoma." 17.2, 1-13, up to date database
4. Badary, O.A., Al-Shabanah, O.A., Nagi, M.N., Al-Rikabi, A.C. and Elmazar, M. M. (1999). "Inhibition of benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice by thymoquinone." Eur J Can Prev, 8(5), 435-5
5. Badary, O.A., Taha, R.A., Gamal el-Din, A.M., and Abdel-Wahab, M.H. (2003). "Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger." Drug Chem Toxicol, 26(2), 87-98
6. Badary, O. A., al-Shabanah, O. A.; al-Sawaf, H. A.; al-Sohaibani, M. O.; al-Bekairi, A.M. (1997). "Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity." Can J Physiol Pharmacol, 75(12), 1356-61
7. Blum, H. E. u. H., U.T. (2003). "Hepatozelluläres Karzinom: Pathogenese und das Problem der Multizentrizität." Der Chirurg; Springer Berlin/ Heidelberg, 74, Number 08, August 2003, 709-716
8. Bouza, C., Lopez-Cuadrado, T., Alcazar, R., Saz-Parkinson, Z., and Amate, J.M. (2009). "Meta- analysis of percutaneous radiofrequency ablation versus ethanol injection in hepatocellular carcinoma." BMC Gastroenterol, 9, 31
9. Bravi, F., Bosetti, C., Tavani, A., Bagnardi, V., Gallus, S., Negri, E., Franceschi, S., and La Vecchia, C. (2007). "Coffee drinking and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis." Hepatology, 46(2), 430-5
10. Bruix, J., and Sherman, M. (2005). "Management of hepatocellular carcinoma." Hepatology, 42(5), 1208-36
11. Caselmann, W.H., Spengler, U., Fischer, H.P. und Sauerbruch, T. (1997). "Leberzirrhose als Präkanzerose." Der Internist, Springer Berlin/ Heidelberg, 928- 936
12. Cheng, A.L., Kang, Y.K., Chen, Z., Tsao, C.J., Qin, S., Kim, J.S., Luo, R., Feng, J., Ye, S., Yang, T.S., Xu, J., Sun, Y., Liang, H., Liu, J., Wang, J., Tak, W.Y., Pan, H., Burock, K., Zou, J., Voliotis, D., and Guan, Z. (2009). "Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial." Lancet Oncol, 10(1), 25-34
13. Deuffic, S., Poynard, T., Buffat, L., and Valleron, A.J. (1998). "Trends in primary liver cancer." Lancet, 351(9097), 214-5

14. El-Mahdy, M.A. ; Wang, Q. E.;Wani, G.;Wani, A.A. (2005). "Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells." Int J Cancer, 117(3), 409-17

15. El-Serag, H.B. (2001). "Epidemiology of hepatocellular carcinoma." Clin Liver Dis, 5(1), 87-107,vi

16. El-Serag, H.B. (2002). "Hepatocellular carcinoma: an epidemiologic view." J Clin Gastroenterol, 35(5 Suppl 2), S72-8

17. El-Serag, H.B., Davila, J.A., Petersen, N.J., and McGlynn, K.A. (2003). "The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update." Ann Intern Med, 139(10), 817-23

18. Fuss, M., Salter, B.J., Herman, T.S., and Thomas, C.R., Jr. (2004). "External beam radiation therapy for hepatocellular carcinoma: potential of intensity-modulated and image-guided radiation therapy." Gastroenterology, 127(5 Suppl 1), S206-17

19. Gaiani, S., Celli, N., Cecilioni, L., Piscaglia, F., and Bolondi, L. (2003). "Review article: percutaneous treatment of hepatocellular carcinoma." Aliment Pharmacol Ther, 17 Suppl 2, 103-10

20. Gali-Muhtasib, H., Diab-Assaf, M., Boltze, C., Al-Hmaira, J., Hartig, R., Roessner, A., and Schneider-Stock, R. (2004a). "Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism." Int J Oncol, 25(4), 857-66

21. Gali-Muhtasib, H.U., Abou Kheir, W.G., Kheir, L.A., Darwiche, N., and Crooks, P.A. (2004b). "Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes." Anticancer Drugs, 15(4), 389-99

22. Gollob, J.A., Wilhelm, S., Carter, C., and Kelley, S.L. (2006). "Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway." Semin Oncol, 33(4), 392-406

23. Gomaa, A.I., Khan, S.A., Leen, E.L., Waked, I., and Taylor-Robinson, S.D. (2009). "Diagnosis of hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol, 15(11), 1301-14

24. Henderson, J., Sherman, M., Tavill, A., Abecassis, M., Chejfec, G., and Gramlich, T. (2003). "AHPBA/AJCC consensus conference on staging of hepatocellular carcinoma: consensus statement." HPB (Oxford), 5(4), 243-50

25. Hochster, H.S., Green, M.D., Speyer, J., Fazzini, E., Blum, R., and Muggia, F.M. (1985). "4' Epidoxorubicin (epirubicin): activity in hepatocellular carcinoma." J Clin Oncol, 3(11), 1535-40

26. Hoffbrand, A.V.P., J.E.; Moss, P.H.A.; Hoelzer, D. (2003). "Grundkurs Hämatologie." Blackwell Verlag, 2. Auflage, 7-8

27. Lai, C.L., Lau, J.Y., Wu, P.C., Ngan, H., Chung, H.T., Mitchell, S.J., Corbett, T.J., Chow, A.W., and Lin, H.J. (1993). "Recombinant interferon-alpha in inoperable hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial." Hepatology, 17(3), 389-94

28. Larsson, S.C., and Wolk, A. (2007). "Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis." Gastroenterology, 132(5), 1740-5

29. Llovet, J.M., Bru, C., and Bruix, J. (1999a). "Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification." Semin Liver Dis, 19(3), 329-38

30. Llovet, J.M., and Bruix, J. (2008). "Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008." J Hepatol, 48 Suppl 1, S20-37

31. Llovet, J.M., Fuster, J., and Bruix, J. (1999b). "Intention-to-treat analysis of surgical treatment for early hepatocellular carcinoma: resection versus transplantation." Hepatology, 30(6), 1434-40

32. Llovet, J. M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J. F., de Oliveira, A. C., Santoro, A., Raoul, J. L., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, T. F., Galle, P. R., Seitz, J. F., Borbath, I., Haussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., and Bruix, J. (2008). "Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma." N Engl J Med, 359(4), 378-90

33. Lodato, F., Mazzella, G., Festi, D., Azzaroli, F., Colecchia, A., and Roda, E. (2006). "Hepatocellular carcinoma prevention: a worldwide emergence between the opulence of developed countries and the economic constraints of developing nations." World J Gastroenterol, 12(45), 7239-49

34. Mansour, M.A. (2000). "Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice." Life Sci, 66(26), 2583-91

35. Mansour, M.A., Ginawi, O.T., El-Hadiyah, T., El-Khatib, A.S., Al-Shabanah, O.A., and Al-Sawaf, H.A. (2001). "Effects of volatile oil constituents of Nigella sativa on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone." Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 110(3-4), 239-51

36. Mansour, M.A., Nagi, M.N., El-Khatib, A.S., and Al-Bekairi, A.M. (2002). "Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action." Cell Biochem Funct, 20(2), 143-51

37. Marelli, L., Stigliano, R., Triantos, C., Senzolo, M., Cholongitas, E., Davies, N., Yu, D., Meyer, T., Patch, D.W., and Burroughs, A.K. (2006). "Treatment outcomes for hepatocellular carcinoma using chemoembolization in combination with other therapies." Cancer Treat Rev, 32(8), 594-606

38. Mazzaferro, V., Regalia, E., Doci, R., Andreola, S., Pulvirenti, A., Bozzetti, F., Montalto, F., Ammatuna, M., Morabito, A., and Gennari, L. (1996). "Liver transplantation for the

treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis." N Engl J Med, 334(11), 693-9

39. McGlynn, K.A., Tsao, L., Hsing, A.W., Devesa, S.S., and Fraumeni, J.F., Jr. (2001). "International trends and patterns of primary liver cancer." Int J Cancer, 94(2), 290-6
40. Nagahama, H., Okada, S., Okusaka, T., Ishii, H., Ikeda, M., Nakasuka, H., and Yoshimori, M. (1997). "Predictive factors for tumor response to systemic chemotherapy in patients with hepatocellular carcinoma." Jpn J Clin Oncol, 27(5), 321-4
41. Nowak, A.K., Stockler, M.R., Chow, P.K., and Findlay, M. (2005). "Use of tamoxifen in advanced-stage hepatocellular carcinoma. A systematic review." Cancer, 103(7), 1408-14
42. Okamoto. K; Neureiter, D; Ocker, M (2009). “Biomarkers for novel targeted therapies of hepatocellular carcinoma.” Histology and Histopathology 24, 493-502
43. Okuda, K. (1993). "Intratumor ethanol injection." J Surg Oncol Suppl, 3, 97-9
44. Okuda, K. (2000). "Hepatocellular carcinoma." J Hepatol, 32(1 Suppl), 225-37
45. Orlando, A., Leandro, G., Olivo, M., Andriulli, A., and Cottone, M. (2009). "Radiofrequency thermal ablation vs. percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: meta-analysis of randomized controlled trials." Am J Gastroenterol, 104(2), 514-24
46. Pereira, P.L. (2009). "Interventionelle Radiologie bei HCC." Hepatitis & more, Fortbildung, 1/ 2009, 18-21
47. Perry, J.F., Strasser, S.I., George, J., Farrell, G.C., and McCaughan, G.W. (2003). "Pharmacotherapy of hepatocellular carcinoma." Expert Opin Pharmacother, 4(12), 2175-85
48. Rozan, L.M., and El-Deiry, W.S. (2007). "p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution." Cell Death Differ, 14(1), 3-9
49. Schwartz, J. a. C., RL. (2009). "Epidemiology and etiologic associations of hepatocellular carcinoma". City, pp. 6
50. Shoieb, A.M., Elgayyar, M., Dudrick, P.S., Bell, J.L., and Tithof, P.K. (2003). "In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone." Int J Oncol, 22(1), 107-13
51. Simonetti, R.G., Camma, C., Fiorello, F., Politi, F., D'Amico, G., and Pagliaro, L. (1991). "Hepatocellular carcinoma. A worldwide problem and the major risk factors." Dig Dis Sci, 36(7), 962-72
52. Spangenberg, H. (2007). "Hepatozelluläres Karzinom." Falk Gastro- Kolleg, 1/2007, 35-48
53. Stuart, K. E. (2009). "Systemic treatment for advanced hepatocellular carcinoma." Up to date database

54. Van Rensburg, S.J., Cook-Mozaffari, P., Van Schalkwyk, D.J., Van der Watt, J.J., Vincent, T.J. and Purchase, I.F. (1985). "Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei." Br J Cancer, 51(5), 713-26

55. Verslype, C., Van Cutsem, E.,Dicato, M., Arber, N. (2008). "The management of hepatocellular carcinoma. Current expert opinion and recommendations derived from the 10th World Congress on Gastrointestinal Cancer, 2008, Barcelona." Symposium article, annals of oncology 20 (suppl 7)

56. Yan, B.C., and Hart, J.A. (2009). "Recent developments in liver pathology." Arch Pathol Lab Med, 133(7), 1078-86

57. Yeo, W., Mok, T.S., Zee, B., Leung, T.W., Lai, P.B., Lau, W.Y., Koh, J., Mo, F.K., Yu, S.C., Chan, A.T., Hui, P., Ma, B., Lam, K.C., Ho, W.M., Wong, H.T., Tang, A., and Johnson, P.J. (2005). "A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma." J Natl Cancer Inst, 97(20), 1532-8

58. Yi, T.C.; Yi, Z.; Pang, X.; Rodriguez, M.; Wang, Y.; Sethi, G.; Aggarwal, B.B.; Liu, M. (2008). "Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways." Mol Cancer Ther, 7(7), 1789-96

7. Abkürzungsverzeichnis

AFP	Alpha-Fetoprotein
AKT	Gen der Proteinkinasen B
DMSO	Dimethylsulfoxid
ERK	extracellular signal-related kinase
FACS	Fluorescence
h	Stunden
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C virus
HDV	Hepatitis D Virus
MW	Mittelwert
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Raf	receptor activation factor
SD	Standardabweichung
TQ	Thymoquinon

8. Anhang

Tabelle 10: Schweregradeinteilung der Leberzirrhose nach Child-Pugh

	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Bilirubin (mg/dl)	< 2	2-3	> 3
Albumin (g/dl)	> 3,5	3-3,5	< 3
Quick %/ INR	>65 / <1,7	40-65 / 1,7-2,3	<40 / >2,3
Hepatische Enzephalopathie	nein	gering (Stadium 1-2)	Schwer (Stadium 3-4)
Aszites	nein	Leicht, medikamentös therapierbar	Schwer, therapierefraktär

Grad A: 5-7 Punkte **Grad B:** 8-10 Punkte **Grad C:** 11-15 Punkte

Tabelle 11: Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC)-Klassifikation nach Llovet et al. (2000)

Stadium	**ECOG**	**Tumor**	**Okuda**	**Leberfunktion**
A: frühes Stadium				
A1 normal	0	solitär	I	Keine PH, Bili
A2	0	solitär	I	PH, Bili normal
A3	0	solitär	I	PH und Bili erhöht
A4	0	3 Tumoren <3 cm	I-II	Child-Pugh A-B
B: intermediäres HCC	0	Mutilokulär, groß	I-II	Child-Pugh A-B
C: fortgeschrittenes HCC	1-2	Gefäßinvasion oder Fernmetastasen	I-II	Child-Pugh A-B
D: Endstadium	3-4	alle		Child-Pugh C

ECOG entspricht der ECOG-Klassifikation des „performance status“

PH entspricht portaler Hypertension

Stadium A, B: alle Kriterien sollten erfüllt sein

Stadium C: erfüllt, wenn ECOG oder Tumorkriterien zutreffen

Stadium D: erfüllt, wenn mindestens 1 der 4 Kriterien zutrifft

8.1 Ergebnisse Zellzahl

Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer.

8.1.1 Ergebnisse Hep3B

Hep3B	TQ	0h		50000			
24h					**Mittelwert**	**SD**	**Ttest**
Kontrolle		42500	20000	45000	35833,3333	13768,9264	
1000µM		5000	2500	0	**2500**	2500	0,024203376
100µM		2500	2500	0	**1666,66667**	1443,37567	0,024349453
50µM		50000	30000	35000	38333,3333	10408,33	0,407571405
10µM		37500	17500	20000	25000	10897,2474	0,174194393
1µM		50000	45000	20000	38333,3333	16072,7513	0,42404922
0.1µM		50000	32500	27500	36666,6667	11814,5391	0,470247758
48h							
Kontrolle		65000	130000	95000	96666,6667	32532,0355	
1000µM		7500	2500	0	**3333,33333**	3818,81308	0,01830878
100µM		12500	5000	2500	**6666,66667**	5204,165	0,056399319
50µM		45000	72000	75000	64000	16522,7116	0,081379639
10µM		67500	110000	107500	95000	23848,48	0,01556947
1µM		80000	127500	115000	107500	24622,1445	0,014847069
0.1µM		97500	90000	127500	105000	19843,1348	0,01609906
72h							
Kontrolle		160000	162500	165000	162500	2500	
1000µM		2500	2500	0	**1666,66667**	1443,37567	5,92197E-07
100µM		5000	2500	2500	**3333,33333**	1443,37567	6,12264E-07
50µM		77500	105000	80000	**87500**	15206,9063	0,00587081
10µM		125000	187500	215000	175833,333	46120,3137	0,333205755
1µM		120000	112500	115000	**115833,333**	3818,81308	8,26311E-05
0.1µM		105000	192500	160000	152500	44229,515	0,366659477
96h							
Kontrolle		227500	200000	187500	205000	20463,3819	
1000µM		0	0	0	**0**	0	0,001652489
100µM		2500	0	0	**833,333333**	1443,37567	0,0016026
50µM		165000	220000	262500	215833,333	48883,3646	0,374637481
10µM		105000	140000	185000	**143333,333**	40104,0314	0,04950775
1µM		155000	235000	197500	195833,333	40026,0332	0,373731237
0.1µM		205000	232500	220000	219166,667	13768,9264	0,19173497
120h							
Kontrolle		262500	350000	340000	317500	47893,1102	
1000µM		2500	0	0	**833,333333**	1443,37567	0,003748121
100µM		5000	0	2500	**2500**	2500	0,00374533
50µM		215000	305000	262500	260833,333	45023,1422	0,104976752
10µM		282500	217500	305000	268333,333	45437,6863	0,133386208
1µM		280000	335500	395000	336833,333	57511,593	0,339222712
0.1µM		320000	380000	390000	363333,333	37859,389	0,133390677

8.1.2 Ergebnisse HepG2

HepG2	TQ	0 h	50000			
24 h				**Mittelwert**	**SD**	**Ttest**
Kontrolle	67500	80000	70000	72500	6614,37828	
1000 µM	5000	2500	0	**2500**	2500	0,00051834
100 µM	5000	0	2500	**2500**	2500	0,00051834
50 µM	33500	40000	15000	**29500**	12971,1218	0,00738324
10 µM	57500	80000	100000	79166,6667	21262,2514	0,32413105
1 µM	75000	77500	70000	74166,6667	3818,81308	0,36457429
0.1 µM	67000	62500	77500	69000	7697,40216	0,29157368
48 h						
Kontrolle	215000	215000	280000	236666,667	37527,7675	
1000 µM	2500	0	0	**833,333333**	1443,37567	0,00413081
100 µM	2500	0	2500	**1666,66667**	1443,37567	0,00415987
50 µM	55000	77500	65000	**65833,3333**	11273,1244	0,00527953
10 µM	237500	252500	180000	223333,333	38269,875	0,34438972
1 µM	200000	262500	212500	225000	33071,8914	0,35360272
0.1 µM	147500	172500	180000	**166666,667**	17017,1482	0,03303552
72 h						
Kontrolle	517500	630000	490000	545833,333	74176,0294	
1000 µM	0	0	0	**0**	0	0,00304978
100 µM	0	0	0	**0**	0	0,00304978
50 µM	150000	132500	147500	**143333,333**	9464,84724	0,00509981
10 µM	335000	435000	385000	**385000**	50000	0,02135694
1 µM	397000	410000	445000	**417333,333**	24826,0616	0,04155624
0.1 µM	565000	440000	620000	541666,667	92240,6273	0,47721743
96 h						
Kontrolle	860000	780000	770000	803333,333	49328,8286	
1000 µM	0	0	0	**0**	0	0,00062725
100 µM	5000	0	7500	**4166,66667**	3818,81308	0,00059797
50 µM	227500	180000	162500	**190000**	33634,0601	6,9798E-05
10 µM	607500	875000	720000	734166,667	134311,516	0,23705455
1 µM	0	215000	462500	**225833,333**	231440,237	0,02215057
0.1 µM	787500	990000	1157500	978333,333	185275,695	0,11968921
120 h						
Kontrolle	1192500	1757500	1440000	1463333,33	283221,792	
1000 µM	0	0	2500	**833,333333**	1443,37567	0,00613479
100 µM	12500	5000	7500	**8333,33333**	3818,81308	0,00619198
50 µM	157500	142500	135000	**145000**	11456,4392	0,00745972
10 µM	1332500	1292500	1855000	1493333,33	313850,416	0,45408147
1 µM	1125000	2020000	1605000	1583333,33	447893,216	0,35917542
0.1 µM	1122500	1392500	1105000	1206666,67	161174,078	0,13061184

8.1.3 Ergebnisse HF

HF	TQ	0h	50000			
24h				**Mittelwert**	**SD**	**Ttest**
Kontrolle	62500	30000	47500	46666,6667	16266,0177	
1000µm	0	0	0	**0**	0	0,01909623
100µM	0	2500	0	**833,333333**	1443,37567	0,01929234
50µM	80000	80000	70000	**76666,6667**	5773,50269	0,03609839

10µM	62500	52500	37500	50833,3333	12583,0574	0,37220017
1µM	20000	35000	50000	35000	15000	0,20654388
0,1µM	25000	52500	62500	46666,6667	19418,6337	0,5
48h						
Kontrolle	70000	77500	67500	71666,6667	5204,165	
1000µm	2500	0	0	**833,333333**	1443,37567	0,00045991
100µM	5000	2500	5000	**4166,66667**	1443,37567	0,00051377
50µM	105000	115000	90000	**103333,333**	12583,0574	0,01711695
10µM	105000	92500	72500	90000	16393,5963	0,09230699
1µM	80000	92500	60000	77500	16393,5963	0,30376389
0,1µM	75000	72500	102500	83333,3333	16645,8203	0,17465599
72h						
Kontrolle	112500	112500	160000	128333,333	27424,1378	
1000µm	0	0	0	**0**	0	0,00744141
100µM	7500	1000	10000	**6166,66667**	4645,78662	0,00718422
50µM	135000	127500	140000	134166,667	6291,5287	0,37548536
10µM	142500	137500	112500	130833,333	16072,7513	0,44985008
1µM	100000	115000	105000	106666,667	7637,62616	0,15148925
0,1µM	162500	157500	135000	151666,667	14648,6632	0,14151087
96h						
Kontrolle	57500	87500	67500	70833,3333	15275,2523	
1000µm	0	0	0	**0**	0	0,00757517
100µM	5000	2500	7500	**5000**	2500	0,00775395
50µM	175000	137500	150000	**154166,667**	19094,0654	0,00238665
10µM	80000	70000	67500	72500	6614,37828	0,43719527
1µM	107500	77500	67500	84166,6667	20816,66	0,21293355
0,1µM	77500	82500	90000	83333,3333	6291,5287	0,14584709
120h						
Kontrolle	147500	90000	125000	120833,333	28975,5644	
1000µm	0	0	0	**0**	0	0,0093168
100µM	2500	2500	0	**1666,66667**	1443,37567	0,00946819
50µM	167500	145000	170000	160833,333	13768,9264	0,06201684
10µM	120000	112500	87500	106666,667	17017,1482	0,25730134
1µM	147500	92500	102500	114166,667	29297,3264	0,39659987
0,1µM	97500	150000	122500	123333,333	26259,9188	0,45860562

8.2 Ergebnisse FACS

Durchflußzytometrische Bestimmung der Apoptoseraten.

8.2.1 Ergebnisse Hep3B

Hep3B FACS Apoptoseraten

	24h	**48h**	**72h**	**96h**	**120h**
Kontrolle	5,05	11,01	4,37	3,72	3,69
1000µM	**45,97**	**84,81**	**64,51**	**55,78**	**77,69**
100µM	**41,24**	**90,01**	**73,44**	**43,88**	**61,02**
50µM	9,41	6,65	7,53	12,32	**13,15**
10µM	5,71	10,97	4,08	4,36	3,58
1µM	5,59	10,86	3,47	3,85	3,89
0,1µM	5,6	6,89	3,47	3,23	3,95

8.2.2 Ergebnisse HepG2

HepG2	FACS	Apoptoseraten			
	24h	**48h**	**72h**	**96h**	**120h**
Kontrolle	1,99	1,64	1,4	1,71	2,79
1000µM	**15,65**	**26,89**	**31,5**	**23,53**	**19,09**
100µM	**31**	**52,66**	**52,4**	**57,47**	**57,82**
50µM *	**13,23**	8,23	5,72	18,87	22,04
10µM	2,18	1,93	1,67	2,32	3,86
1µM	2,06	1,74	1,47	4,16	3,79
0,1µM	1,75	1,84	1,59	7,3	3,8

* hier wurde nachgemessen: die Werte werden statistisch auf eine andere Kontrollgruppe bezogen

8.2.3 Ergebnisse HF

HF	FACS	Apoptoseraten			
	24h	**48h**	**72h**	**96h**	**120h**
Kontrolle	1,31	6,07	2,36	3,42	2,82
1000µM	**18,67**	**31,82**	**36,96**	**78,52**	**79,29**
100µM	**77,98**	**20,12**	**98,07**	**99,63**	**99,31**
50µM	2,03	0,81	0,99	**93,44**	**81,23**
10µM	1,06	3,68	1,66	2,64	1,68
1µM	1,21	2,95	1,44	3,95	3,35
0,1µM	1,08	3,8	1,17	5,98	3,4

8.3. Ergebnisse BrdU

Bestimmung der relativen Proliferationsrate durch Einbau von BrdU.

8.3.1 Ergebnisse Hep3B

Hep3B		**TQ**	**24 h**	**BrdU**		
	Kontrolle	1000 µM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM
	0,115	0,078	0,067	0,09	0,111	0,081
	0,137	0,066	0,066	0,099	0,131	0,093
	0,145	0,065	0,063	0,137	0,13	0,124
	0,136	0,082	0,064	0,116	0,125	0,134
	0,151	0,055	0,066	0,126	0,12	0,132
	0,15	0,062	0,065	0,122	0,137	0,135
MW	0,139	**0,068**	**0,06516667**	**0,115**	**0,12566667**	**0,1165**
SD	0,01334166	0,01013903	0,00147196	0,01752712	0,00920145	0,02348404
Relativ	1	0,48920863	0,46882494	0,82733813	0,90407674	0,8381295
ttest		9,8738E-07	1,6995E-05	0,0124461	0,03756586	0,03797614

8.3.2 Ergebnisse HepG2

HepG2		**TQ**	**24 h**	**BrdU**		
	Kontrolle	1000 µM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM
	0,078	0,06	0,057	0,075	0,073	0,075
	0,07	0,076	0,12	0,08	0,073	0,074
	0,092	0,074	0,06	0,094	0,091	0,085
	0,077	0,08	0,065	0,098	0,093	0,097
	0,099	0,066	0,066	0,094	0,089	0,099
	0,095	0,062	0,068	0,099	0,09	0,093
MW	0,08516667	**0,06966667**	0,07266667	0,09	0,08483333	0,08716667
SD	0,01168617	0,00814043	0,02354287	0,01001998	0,00926103	0,01092551
Relativ	1	0,81800391	0,85322896	1,05675147	0,99608611	1,02348337

ttest	0,0129863	0,14029478	0,23001119	0,47873238	0,38287048

8.3.3 Ergebnisse HF-Zellen

HF	**TQ**	**24 h**	**BrdU**		
	Kontrolle	1000 µM	100 µM	10 µM	1 µM	0.1 µM
	0,126	0,058	0,056	0,111	0,102	0,139
	0,113	0,076	0,053	0,097	0,09	0,112
	0,124	0,082	0,055	0,135	0,126	0,111
	0,108	0,062	0,057	0,102	0,097	0,167
	0,151	0,085	0,058	0,139	0,13	0,15
	0,165	0,068	0,067	0,16	0,133	0,146
MW	0,13116667	**0,07183333**	**0,05766667**	0,124	0,113	0,1375
SD	0,02228378	0,01092551	0,00488535	0,02459268	0,01878297	0,02215175
Relativ	1	0,5476493	0,43964422	0,94536213	0,86149936	1,04828463
ttest		0,00027201	0,00017087	0,3042397	0,0793239	0,31607998

8.4 Ergebnisse Caspase-3/7-Assay

Messung der Aktivität der Caspase.

8.4.1 Ergebnisse Hep3B

Hep3B Caspase 3/7

Verwendete Cycles: 1,2,4, 6,8,10
Mittelwerte verwendet aus Proben mit gleicher Konzentration und Zeitwert

24h

	0h	0,5h	1,5h	2,5h	3,5h	4,5h
Kontrolle	1070	5573	4982	4977	4952	4921
50µM	1421	6078,5	5278,5	5087	5056	4896
100µM	722,66	2200,33	1933,66	1923	1949,33	1906,66

48h

	0h	0,5h	1,5h	2,5h	3,5h	4,5h
Kontrolle	1462	6237	5429	5161	4968	4914
50µM	1961,5	9310,5	8098,5	7721	7542,5	7316
100µM	800,66	2773,33	2487	2417	2470,66	2485

8.4.2 Ergebnisse HepG2

HepG2 Caspase3/7

Mittelwerte verwendet aus Proben mit gleicher Konzentration und Zeitwert.
Verwendete Cycles: 1,2,4, 6,8,10

24h

	0h	0,5h	1,5h	2,5	3,5	4,5
Kontrolle	2592	16421	16169	15407	15098	14329
50µM	2370,5	15499,5	15467,5	14933	14402,5	14009,5
100µM	1328,33	12719	12879,33	12415,66	11746,33	11096

48h

	0h	0,5h	1,5h	2,5h	3,5h	4,5h
Kontrolle	1626	8547	6810	1932	1081	312
50µM	1491,5	7161,5	6412	3643,5	1465,5	991,5
100µM	745,33	2867,66	1136,33	486,66	328,33	246,66

8.4.3. Ergebnisse HF-Zellen

HF Caspase3/7
Mittelwerte verwendet aus Proben mit gleicher Konzentration und Zeitwert.

24h

	0s	0,5h	1h	1,5h	2h	3h
Kontrolle	1633	3530	3344	3393	3250	3165
50µM	1433	3472,5	3357	3207,5	3205,5	3090,5
100µM	762,3	550,3	548	528	509	497,33

48h

	0h	0,5h	1h	1,5h	2h	3h
Kontrolle	1271	2759	2841	2769	2605	2494
50µM	1294	2743,5	2454,5	2460,5	2322,5	2076
100µM	1049	1492,33	1430	1384,33	1327,66	1308,66

8.5 Ergebnisse JC-1

Messung des Anteils intakter Mitochondrien.

8.5.1 Ergebnisse HepG2 und Hep3B

JC-1		JC-1	Apoptose
Hep3B	Kontrolle	45,23	1,98666667
	100 µM	**2,57**	**30,9966667**
	10 µM	62,23	2,17666667
HepG2	Kontrolle	71,05	1,31
	100 µM	**45,05**	**77,9766667**
	10 µM	71,67	1,06333333

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Matthias Ocker für die Überlassung des Dissertationsthemas und vor allem für die immer freundlich hilfsbereite und präsente Unterstützung während der gesamten Zeit der Dissertationsanfertigung.