

Aus der Chirurgischen Klinik I
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Die Wirkung von Kombinationschemotherapien
mit Taurolidin auf Pankreaskarzinomzellen unter besonderer
Berücksichtigung der Induktion von Apoptose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johanna Elisabeth Margarete Adelheid Rust

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.09.2016

Meiner Mutter, meinem viel zu früh verstorbenen Vater
sowie John und Hans Thomas gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	14
1.1	Das duktale Adenokarzinom des exokrinen Pankreas	14
1.1.1	Ätiologie	14
1.1.2	Pathogenese	15
1.1.3	Therapie des Pankreaskarzinoms	16
1.2	Formen des Zelltodes	18
1.2.1	Cysteine-dependent aspartate-directed proteases	19
1.2.3	Signaltransduktionswege zur Apoptoseinduktion	20
1.2.4	Der Liganden-vermittelte (= extrinsische) Weg	21
1.2.5	Cellular fllice like protein	22
1.2.6	Intrinsischer (= mitochondrialer) Weg	22
1.2.7	BCL-2 Proteine	23
1.2.8	Typ I und Typ II – apoptotische Zellen	24
1.2.9	Apoptoseresistenz beim Pankreaskarzinom	25
1.2.10	Apoptose als Ziel pharmakologischer Therapie	25
1.3	Untersuchte Zytostatika	26
1.3.1	Taurolidin	26
1.3.2	Gemcitabine	28
1.3.3	Docetaxel	26
1.3.4	Suramin	29
2.	Fragestellung dieser Untersuchung	30

3.	Material und Methoden	31
3.1	Materialien	31
3.1.1	Geräte, Instrumente und Chemikalien	31
3.1.2	Zelllinien und Zellkulturmedien	36
3.2	Methoden	37
3.2.1	Zellkultur	37
3.2.2	Assay zur indirekten Viabilitätsbestimmung	38
3.2.3	Bestimmung der Tumorzellproliferation	38
3.2.4	Polymerase Chain Reaction	39
3.2.4.1	mRNA-Isolierung	39
3.2.4.2	Synthese von cDNA aus mRNA	40
3.2.4.3	Reverse Transkriptase-PCR	40
3.2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.5	Caspase 3/7-Assay	41
3.2.6	Prinzip von SDS-PAGE und Western Blot	42
3.2.6.1	Proteinisolierung für den Immunblot	43
3.2.6.2	Proteinquantifizierung mit Bicinchoninsäure	43
3.2.6.3	SDS-PAGE	44
3.2.6.4	Transfer und Entwicklung	45
3.3	Statistische Methoden und verwendete Programme	47
4.	Ergebnisse	48
4.1	Untersuchung des Einflusses von Taurolidin auf Viabilität und Proliferation unterschiedlicher Pankreaskarzinomzellen	48
4.1.1	Die Viabilität von HPAF-2, AspC-1 und DSL 6AC1 nach Inkubation mit Taurolidin als Monosubstanz	49

4.1.2	Die Proliferation von HPAF-2, AspC-1 und DSL 6AC1 nach Inkubation mit Taurolidin als Monosubstanz	50
4.1.3	Vergleich des Effekts von Taurolidin auf Viabilität und Proliferation unterschiedlicher Pankreaskarzinomzellen	52
4.2	Die Beeinflussung von Proliferation und Viabilität von Pankreaskarzinomzellen durch Taurolidin in Kombination mit unterschiedlichen anti-neoplastischen Wirkstoffen	53
4.2.1	Der Effekt einer kombinierten Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine auf Viabilität und Proliferation von HPAF-2, AsPC-1 und DSL 6AC1	53
4.2.1.1	Zellviabilität nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine	54
4.2.1.2	Proliferation nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine	57
4.2.2	Der Effekt einer Kombination von Taurolidin und Docetaxel auf Viabilität und Proliferation von HPAF-2, AsPC-1 und DSL 6AC1	60
4.2.2.1	Zellviabilität nach Co-Inkubation mit Taurolin und Docetaxel	60
4.2.2.2	Proliferation nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Docetaxel	63
4.2.3	Der Effekt der Kombinationstherapie mit Taurolidin und Suramin auf HPAF-2, AsPC-1 und DSL 6AC1	66
4.2.3.1	Zellviabilität nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Suramin	66
4.2.3.2	Proliferation nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Suramin	69
4.3	Die Beeinflussung der Apoptose-Regulatoren BCL-2, BAX und c-Flip durch Taurolidin und Gemcitabine	72
4.3.1	Ergebnisse der Reverse Transkriptase-PCR	73
4.3.2	Ergebnisse der Western Blots	74
4.3.2.1	Die Proteinexpression von BCL-2 und BAX nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine	75
4.3.2.2	Der Einfluss von Taurolidin und Gemcitabine auf die Proteinexpression von c-Flip	77
4.3.3	Die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine	79

5.	Diskussion	81
5.1	Das anti-neoplastische Potential von Taurolidin	81
5.2	Taurolidin in Kombination mit anderen Wirkstoffen	83
5.3	Diskussion eigener Ergebnisse	83
5.3.1	Untersuchung des Einflusses von Taurolidin in Mono- und Kombinationstherapie auf Wachstum und Viabilität unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien	83
5.3.1.1	Die Monoinkubation mit Taurolidin hemmt konzentrationsabhängig Proliferation und Viabilität von AsPC-1, HPAF-2 und DSL 6AC1	83
5.3.1.2	Alle untersuchten Kombinationstherapien mit Taurolidin hemmen Viabilität und Proliferation von AsPC-1, HPAF-2 und DSL 6AC1	84
5.4	Molekulargenetischen Analyse von Schlüsselregulatoren der Apoptose unter Einfluss von Taurolidin und Gemcitabine	85
5.4.1	Die Proteinexpression des pro-apoptotischen Proteins BAX bei AsPC-1, HPAF-2 und DSL 6AC1	85
5.4.2	Das anti-apoptotische Protein BCL-2 kann bei AsPC-1 auf Proteinebene nicht dargestellt werden	86
5.4.3	Das anti-apoptotische Protein c-Flip ist bei allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien auf Proteinebene nachweisbar	86
5.4.4	Proteinexpression von BCL-2 und BAX nach Inkubation mit Gemcitabine	87
5.4.5	Die Proteinexpression von c-Flip nach Inkubation mit Gemcitabine	87
5.4.6	Taurolidin senkt bei den Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL 6AC1 die BCL-2/BAX-Ratio	88
5.4.7	Taurolidin hemmt bei allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien die Proteinexpression von c-Flip _L	89
5.4.8	Die Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine führt zu einer Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität	89
5.4.9	Die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine hemmt die Expression von c-Flip _L und c-Flip _S	90
6.	Schlussfolgerungen	91

7.	Zusammenfassung und Ausblick	94
8.	Literaturverzeichnis	96
9.	Anhang	103
	Eidesstattliche Versicherung	103
	Danksagung	105
	Lebenslauf	106
	Publikationsliste	107
	Anteilerklärung an Publikation	108

Abstrakt

Kombinationstherapien mit Taurolidin und unterschiedlichen anti-neoplastischen Substanzen: Einfluss auf Viabilität, Proliferation und Apoptoseinduktion bei 3 Pankreaskarzinomzelllinien

Einleitung:

Für den antibakteriellen Wirkstoff Taurolidin wurden sowohl in vitro als auch in Tierversuchen anti-neoplastische Effekte nachgewiesen. Ein typisches Merkmal von Pankreaskarzinomzellen ist die Resistenz gegenüber etablierten Zytostatika. Die Hemmung des programmierten Zelltodes ist als wichtiger Mechanismus der Zytostatikaresistenz bei Tumorzellen identifiziert worden.

In dieser Untersuchung wurde zunächst der Effekt von Taurolidin in Monotherapie und in Kombination mit Gemcitabin, Docetaxel und Suramin, auf Viabilität und Proliferation von 3 unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien untersucht. Ausgehend von den Ergebnissen des ersten Teils dieser Arbeit, wurde die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine für eine weiterführende Analyse von Schlüsselregulatoren der Apoptose ausgesucht. Die mitochondriale Apoptose wurde anhand des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 und des pro-apoptotischen Proteins BAX untersucht. Zudem wurde der Einfluss von Taurolidin auf c-Flip, einem Regulatorprotein der extrinsischen Apoptose beim Pankreaskarzinom untersucht.

Material und Methoden:

Pankreaskarzinomzelllinien: AsPC-1 (human), HPAF-2 (human) und DSL-6A (Ratte)

Die Tumorzellen wurden für die Dauer von 24 h und 72 h mit Taurolidin (100 μ M-500 μ M), oder mit Taurolidin (100 μ M and 200 μ M) in Kombination mit Gemcitabin (100 μ M), Docetaxel (0,03 μ g and 0,3 μ g) oder Suramin (10 μ g and 100 μ g) inkubiert.

Proliferation und Viabilität wurden mittels Zellzählung und MTT-Assay untersucht.

Die Induktion von Apoptose wurde anhand eines Caspase 3/7 Assays ermittelt. Die Beeinflussung der Expression von BCL-2, BAX und c-Flip wurde mittels Western Blot analysiert.

Ergebnisse:

Taurolidin als Monosubstanz und in Kombination mit verschiedenen anti-neoplastischen Wirkstoffen hemmte bei allen hier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien signifikant Tumorzellproliferation und Viabilität.

Die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine führte zu einer weiteren signifikanten Reduktion der Tumorzellproliferation. Im Caspase 3/7 Assay konnte nachgewiesen werden, dass die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine zu einer effektiven Steigerung der Apoptose bei Pankreaskarzinomzellen führt.

Im Western Blot zeigte sich eine zelllinienspezifische Abnahme der anti-apoptotischen Proteine BCL-2 und c-Flip, wohingegen eine Zunahme des pro-apoptotischen Proteins BAX nachgewiesen werden konnte.

Schlussfolgerungen:

Der Wirkstoff Taurolidin erscheint potentiell geeignet, Pankreaskarzinomzellen sowohl für etablierte Zytostatika als auch für neue, Todesrezeptor-agonistische Therapien zu sensitivieren.

Abstract

Combinatory treatment with taurolidine and different antineoplastic agents: Influence on viability, proliferation and apoptosis induction of 3 pancreatic cancer cell lines

Introduction:

The antibacterial agent taurolidine has been shown to exhibit antineoplastic effects both in vitro and in animal models. Resistance towards established cytotoxic agents is a typical feature of pancreatic cancer. Inhibition of programmed cell death was identified as an important mechanism of drug resistance in cancer cells.

Firstly in this study the effect of taurolidine in monotherapy and in combination with gemcitabine, docetaxel and suramin on viability and proliferation of 3 different pancreatic cancer cell lines has been evaluated. Deriving from the results of the first part of this investigation, the combinatory treatment with taurolidine and gemcitabine was chosen to conduct a further analysis of key regulators of apoptosis. Mitochondrial apoptosis was investigated by assessment of anti-apoptotic protein bcl-2 and pro-apoptotic protein bax. The influence of taurolidine on c-flip, which is a regulator of death-receptor mediated apoptosis in pancreatic cancer, was also assessed.

Materials and Methods:

Ductal pancreatic cancer cell lines: AsPC-1 human, HPAF-2 (human) and DSL-6A (rat). Cells were incubated for 24h and 72 h with taurolidine (100 μ M-500 μ M), or with taurolidine (100 μ M and 200 μ M) in combination with gemcitabine (100 μ M), docetaxel (0,03 μ g and 0,3 μ g) or suramine (10 μ g and 100 μ g) Proliferation and viability were investigated by cell counting and MTT assay. Apoptosis in general was analyzed by caspase 3/7 assay. Expression of bcl-2, bax and c-flip were assessed by western blot analysis.

Results:

Taurolidine in monotherapy and combination with different antineoplastic agents inhibited cell growth and viability significantly in all investigated pancreatic cancer cell lines. Combinatory treatment with taurolidine and gemcitabine in a further reduction of proliferation. As revealed by caspase 3/7 assay, combinatory treatment with taurolidine

and gemcitabine (vs. gemcitabine monotherapy) was highly effective in apoptosis induction. Cell line specific, expression of anti-apoptotic proteins bcl-2 and c-flip decreased, whereas an increase of pro-apoptotic bax was observed.

Conclusion:

Taurolidine might be a promising sensitizer for established antineoplastic agents as well as for new death receptor agonistic therapies in pancreatic cancer.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	
AFC	Aminotriflourmethylcoumarin
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor 1
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinichoninsäure
BCL-2	B-cell lymphoma 2
Brij 36	2-Dodecycloxyethanol
bp	Basepair
BSA	Bovine serum albumin
CARD	Caspase recruitment domaine
Caspasen	Cysteine dependent aspartate directed proteases
CEA	Carcinoembryonales Antigen
c-Flip	Cellular fllice like protein
CK	Cytokeratin
DD	Death domaine
dd H ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DED	Death effector domaine
DISC	Death inducing signaling complex
DMPC	Dimethylpyrocarbonate
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial mesenchymale transition
FADD	Fas associated death domain containing protein
FasL	FasLigand/ CD95 Ligand
FKS	Fetales Kälberserum
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer
HER	Human epidermal growth factor receptor
HIF	Hypoxia inducible factor
IAP	Inhibitors of apoptosis
IL	Interleucin
KDa	Kilodalton
M-MLV-RT	Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase
MDB	Dimethylaminobenzophenoxamin Meldola`s Blue
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MUC	Mucin
MTT	Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid
Na-Azid	Natriumazid
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid

NF	Nuclear factor
NP-40	Nonidet P-40
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RB	Retinoblastom
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfate
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
Smac/Diablo	Second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low PI
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TBST	TBS Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	Tumor growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF- α related apoptosis inducing Ligand
TRIS	Trisaminomethan
VEGF	Vasoendothelial growth factor
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Das duktales Adenokarzinom des exokrinen Pankreas (PDAC)

Bei den malignen Neoplasien des Pankreas handelt es sich überwiegend (>90%) um PDAC. Die muzinös-zystische Neoplasie (MCN), die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und pankreatische intraepitheliale Neoplasien (PanIN) gelten als Präkanzerosen [1]. Charakteristische Merkmale des PDAC sind aggressives, infiltratives Wachstum, frühe Metastasierung und ein schlechtes Ansprechen auf Zytostatika und Radiatio. Erschwert wird die Therapie durch den Umstand, dass das Pankreaskarzinom in der Regel erst in einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium symptomatisch wird. Aktuell besteht der einzige potentiell kurative Behandlungsansatz in der radikalen Resektion des Tumors, jedoch werden zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nur ca. 20% der Karzinome als operabel eingestuft. Trotz Operation und adjuvanter Chemotherapie, kommt es bei ca. 80% der Patienten innerhalb der ersten 2 Jahre zum Rezidiv. Verteilt über alle Stadien der Erkrankung beträgt die mediane Überlebenszeit nur ca. 6 Monate, die 5-Jahres-Überlebensraten liegen bei ca. 5%. Selbst im günstigsten Fall, d.h. bei frühzeitiger Diagnosestellung und sofortiger Einleitung einer Therapie, können die mittleren Überlebenszeiten nur auf ca. 20 Monate verlängert werden, die 5-Jahres-Überlebensraten betragen hier ungefähr 20% [2]. Insgesamt zählt das Pankreaskarzinom damit zu den prognostisch ungünstigsten Tumorerkrankungen.

Im aktuellen US-amerikanischen Krebsregister steht das PDAC bei beiden Geschlechtern an 4. Stelle der Krebstodesursachen, in der Reihenfolge der Krebsneuerkrankungen nimmt es jeweils den 10. Platz ein [1, 2]. Die US-amerikanische Statistik zeigt zudem, dass die Anzahl der Neuerkrankungen sich bei Männern und Frauen inzwischen annähernd angeglichen hat. Das mittlere Erkrankungsalter liegt laut der US-amerikanischen Statistik bei 76 Jahren (Frauen) bzw. 68 Jahren (Männer). Insgesamt entspricht die Inzidenz der Erkrankung bei beiden Geschlechtern weitgehend der Sterberate [3,2].

1.1.1 Ätiologie

Zu den Faktoren, die mit der Entstehung eines Pankreaskarzinoms assoziiert sind, zählen sowohl Tabak-, als auch exzessiver Alkoholkonsum sowie der Verzehr Nitrosamin-haltiger Speisen. Als Risikofaktoren gelten auch Diabetes mellitus Typ II,

ausgeprägte Adipositas (BMI >30), sowie eine langjährige chronische Pankreatitis [4]. Bei 5-10 % der Patienten mit PDAC liegt eine positive Familienanamnese für die Erkrankung vor [1]. Eine familiär erhöhtes Risiko gilt als gegeben, wenn anamnestisch ein oder mehrere Verwandte 1. Grades an einem Pankreaskarzinom erkrankt sind. Man unterscheidet zwischen dem sporadischen Pankreaskarzinom (SPC) und dem familiären Pankreaskarzinom (FPC). Für die Einstufung als SPC darf definitionsgemäß nicht mehr als ein Verwandter 1. Grades von dem Malignom betroffen sein, ansonsten muss die Erkrankung als FPC eingeordnet werden. Auch eine Reihe von hereditären Erkrankungen bzw. Syndromen ist mit einem gesteigerten Risiko für die Entstehung eines PDAC assoziiert. Dazu zählen das Peutz-Jeghers Syndrom, das FAMMM- und Pankreaskarzinom-Melanom Syndrom, sowie die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP) und das von-Hippel–Lindau–Syndrom. Ein erhöhtes Risiko besteht auch bei Mamma- und Ovarialkarzinom mit BRAC-1 und BRAC-2-Keimbahnmutation, sowie bei hereditärer Pankreatitis [4].

1.1.2 Pathogenese

Die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms ist durch ein Zusammenspiel multipler genetischer- und epigenetischer Veränderungen bedingt [5].

Beim PDAC finden sich häufig genetische Veränderungen bei Mitgliedern der K-RAS Protoonkogen-Familie. Die Aktivierung von RAS-Proteinen durch Signalpartner wie z.B. Epidermal growth factor (EGFR) führt zur Initiierung verschiedener proliferationsfördernder Signalkaskaden. K-RAS Mutationen sind mit einer permanenten Aktivierung der RAS-Proteine assoziiert [6]. Veränderungen finden sich auch bei verschiedenen Tumorsuppressorgenen wie z.B. bei p53, SMAD 4 und INK4A [7].

Der Transkriptionsfaktor p53 spielt sowohl bei der Regulation des Zellzyklus, als auch bei der Induktion von Apoptose eine wichtige Rolle, er wird durch extra- oder intrazellulären Stress aktiviert [5]. Für das Pankreaskarzinom ist eine fundamentale Störung des Zellzyklus auf der Stufe des RB-abhängigen G1-Phase-Kontrollpunktes beschrieben. Störungen im p53-System führen zur Aufhebung der p53-abhängigen G1-Arrest-Induktion am RB-Kontrollpunkt [5].

SMAD4 ist ein wichtiger Regulator der Tumor growth factor β (TGF- β) Signaltransduktion. TGF- β inhibiert unkontrolliertes Zellwachstum durch Arrestierung des Zellzyklus in der G1-Phase. Zusätzlich ist SMAD 4 an der Regulation der

Angiogenese beteiligt [7]. INK4A, ein spezifischer Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, hemmt die Zellproliferation durch Induktion eines G1-Arrests am RB-Kontrollpunkt [7].

Angiogenese, eine unabdingbare Voraussetzung für Wachstum und Metastasierung von Tumoren wird vorrangig durch Vasoendothelial growth factor (VEGF) induziert. VEGF wird Hypoxie-vermittelt exprimiert, zentraler Hypoxiesensor und VEGF-Induktor ist Hypoxie induzierbarer Faktor 1 (HIF-1). Beim Pankreaskarzinom liegt HIF-1 überexprimiert vor, er kann aber auch durch Wachstumsfaktoren, wie z. B. Platelet derived growth factor β (PDGF- β) und EGFR, oder angiogene Zytokine (z.B. IL-8) zusätzlich induziert werden [5].

Die sog. epitheliale mesenchymale Transition (EMT) ist ein entscheidender Vorgang bei der Metastasierung des Pankreaskarzinoms. Typische Merkmale der EMT sind der Verlust epithelialer Polarität, die Aufhebung von Zell-Zell-Kontakten, sowie eine Reorganisation des Zytoskeletts. Es kommt zum Verlust epithelialer Marker (z.B. E-Cadherin) bei gleichzeitig gesteigerter Expression mesenchymaler Proteine wie z.B. N-Cadherin und Vimentin [5].

1.1.3 Therapie des Pankreaskarzinoms

Bis zum aktuellen Zeitpunkt liegt der kurative Therapieansatz zur Behandlung des Pankreaskarzinoms in der radikalen chirurgischen Resektion des Tumors. Standardverfahren zur chirurgischen Therapie des Pankreaskopfkarzinoms sind die partielle Duodenopankreatektomie (Kausch-Whipple) bzw. die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (Traverso-Longmire), beide Verfahren werden hinsichtlich Komplikationen, Letalität und Langzeitergebnissen als gleichwertig eingestuft [4]. Sind bereits Fernmetastasen vorhanden, so ergibt sich auch durch die R0 Resektion kein prognostischer Vorteil mehr für den Patienten [4]. Eine lokale Infiltration stellt keine grundsätzliche Kontraindikation für eine Operation dar, entscheidend ist hierbei vielmehr die topographische Ausdehnung des Tumors. So kann trotz einer Infiltration von Nachbarorganen sowie bei Infiltration der Pfortader und der Vena mesenterica superior, eine Resektion im Gesunden möglich sein [4]. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gilt die adjuvante, additive oder palliative Zytostatikatherapie als die wesentliche konservative Behandlungsform des Pankreaskarzinoms. Der Nutzen einer Radio bzw. Radio-Chemotherapie zur Behandlung des PDAC konnte bislang nicht ausreichend nachgewiesen werden [4].

Im Anschluss an eine R0 oder R1 Resektion eines PDAC soll eine adjuvante bzw. additive Chemotherapie durchgeführt werden, als First-Line Zytostatika werden hier Gemcitabine oder 5-FU (5-Floururacil) empfohlen [4]. Für die Therapie des inoperablen Pankreaskarzinoms stehen sowohl die Monotherapie mit Gemcitabine, als auch Kombinationen aus Gemcitabine und Erlotinib bzw. Gemcitabine und nab-Paclitaxel sowie die Kombination aus 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin (Folfirinox-Protokoll) zur Verfügung [4]. Bei der Indikationsstellung für ein palliatives Therapieregime spielt sowohl das Vorhandensein von Fernmetastasen als auch der Allgemeinzustand des Patienten eine entscheidende Rolle. In der Behandlung des metastasierten PDAC konnte eine Verlängerung von progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben durch die Kombinationstherapie mit Gemcitabine und dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib nachgewiesen werden [11]. Bei Patienten mit metastasiertem PDAC und günstigem Risikoprofil (Karnowsky-Index >90% /ECOG-Status 0-1, Alter bis 75 Jahre, Bilirubin < des 1,5-fachen des Normwertes) zeigte sich unter der Behandlung mit Folfirinox ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabine [12]. Bei Patienten in schlechtem Allgemeinzustand (Karnowsky-Index < 70 / ECOG-Status > 2) gilt der Nutzen einer Zytostatikatherapie generell als fraglich [4].

Staging-Ergebnis	Therapie	Zytostatikum	Studie/Autor
R0-Resektion	adjuvante Chemotherapie	5-FU/Folat nach Mayo Schema oder Gemcitabine	CONKO-1 [7] ESPAC-3 [8]
R1-Resektion	additive Chemotherapie	Gemcitabine	CONKO-1 [9]
Inoperabilität bei lokaler Infiltration	palliative Chemotherapie	Gemcitabine	Burris [10]
Nachweis von Fernmetastasen	palliative Chemotherapie	Gemcitabine+Erlotinib Gemcitabine+nab-Paclitaxel Folfirinox-Protokoll	Moore [11] von Hoff [13] Conroy [12]

Tabelle 1: Übersicht über S3-Leitlinien-Empfehlungen 2013 zur Chemotherapie des PDAC

1.2 Formen des Zelltodes

Unter dem Begriff "Apoptose" (*apo=weg/ab; Ptoxis= fallen*), begründet von Kerr et al. 1972 [14], versteht man per definitionem die genetisch programmierte Eliminierung von Zellen [15].

Typische morphologische Kennzeichen der Apoptose sind das Schrumpfen der Zelle, die Ausstülpung von Zellmembranblasen, Kernpyknose, Kondensation des Kernchromatins und Fragmentierung des Zellkerns (Karrhiohexis). Die Prozessierung apoptotischer Zellen erfolgt durch Abschnürung membranumhüllter Vesikel, der sog. "apoptotischen Körperchen", welche durch Makrophagen bzw. dendritische Zellen geschlossen aufgenommen und phagozytiert werden. Zur Erkennung durch die Phagozyten dienen dabei Oberflächensignalproteine auf der Membran apoptotischer Zellen, wie z.B. das Phosphatidylserin. Zusätzlich setzen die beteiligten Makrophagen im Rahmen des programmierten Zelltodes antiinflammatorische Zytokine (TGF- β , IL-10) frei [16]. Bei der Apoptose handelt es sich um einen aktiven, energieverbrauchenden Prozess. Auslösefaktoren können unter anderem oxidativer Stress, Nährstoff- bzw. Wachstumsfaktormangel, Toxine, Glucocortikoide, Zytostatika, Gamma- oder UV-Strahlung sein. Gehemmt werden kann der programmierte Zelltod durch Wachstumsfaktoren, Androgene bzw. Estrogene und Pharmazeutika, aber auch durch Infektionen mit bestimmten Viren wie z.B. mit dem Epstein-Barr-Virus [17]. Wichtige physiologische Funktionen der Apoptose liegen in Steuerungsprozessen während der Embryonalentwicklung, in der Modulation überschießender immunologischer Reaktionen (z.B. Eliminierung autoreaktiver T-Lymphozyten), sowie im Abbau virusinfizierter- und maligne entarteter Zellen. Pathologisch gesteigerte Apoptoseraten finden sich u. a. bei AIDS, neurodegenerativen Erkrankungen (M. Alzheimer, M. Parkinson), myelodysplastischen Syndromen sowie im Rahmen ischämischer Gewebeschädigungen. Inhibiert ist die Apoptose z.B. bei Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematodes oder der rheumatoiden Arthritis. Eine gravierende Rolle spielt die Hemmung des programmierten Zelltods in der Pathogenese neoplastischer Erkrankungen [17].

Eine Sonderform des programmierten Zelltodes ist die „Anoikis“ (*an=ohne; Oikis=Haus*), man versteht darunter das Eintreten von Apoptose als Folge eines Verlustes der zellulären Adhäsion. Anoikis kann durch die Aufhebung von Zell-Zell,- und/ oder Zell-Matrix Kontakten eingeleitet werden [18,19]. Als physiologische Funktion der Anoikis

vermutet man einen Schutzmechanismus des Organismus vor einer inadäquaten Wiederansiedlung von ursprünglich solide organisierten Zellen, welche durch den Verlust der zellulären Verankerung aus ihrem Herkunftsgewebe herausgelöst wurden [20].

Im Gegensatz zur Apoptose handelt es sich bei der Nekrose um einen passiv ablaufenden Zelltodmechanismus, welcher durch gravierende chemische und physikalische Noxen auslösbar ist. Zellkern und Zytoplasma werden irreversibel strukturell geschädigt. Typischerweise kommt es zur ATP-Depletion mit Versagen der Ionenpumpenfunktion und Verlust der Plasmamembranintegrität. Der Flüssigkeitseinstrom führt zum Anschwellen der Zelle bis es zur onkotischen Lyse kommt [21]. Der Inhalt der Zelle wird freigesetzt, dies induziert im umliegenden Gewebe eine inflammatorische Reaktion [22].

1.2.1 Cysteine-dependent aspartate-directed proteases (Caspasen)

Caspasen nehmen eine zentrale Funktion in der Exekution der Apoptose ein, es handelt sich um hochspezifische Cysteinproteasen, deren Gemeinsamkeit darin liegt, ihre Substrate hinter einer x-glu-x-asp Sequenz zu spalten [23]. Funktionell differenziert man zwischen apoptotischen und inflammatorischen Caspasen. Die apoptotischen Caspasen werden in Initiatoren (Caspasen 2; 8; 9; 10) und Effektoren (Caspasen 3; 6; 7) unterteilt [24]. Die Synthese von Caspasen erfolgt zunächst in Form von Zymogenen, d.h. als Proenzyme ohne bzw. mit geringer katalytischer Aktivität. Alle Procaspasen verfügen über eine NH₂-terminale Prodomäne von unterschiedlicher Länge und Sequenz, sowie über eine große (20 kDa) und eine kleine (10 kDa) Untereinheit [23]. Die Zymogene der Initiatorcaspasen liegen als latente Monomere vor, welche durch Dimerisierung aktiviert werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Proenzymen der Effektorcaspasen um präformierte Dimere, deren Latenzzustand durch ihre sterische Konformation bedingt ist [24]. Ein wesentlicher funktioneller Unterschied zwischen Initiator- und Effektorcaspasen besteht in ihrem Aktivierungsmodus. Initiatorcaspasen sind autokatalytisch aktivierbar, vermittelt wird dies über spezifische Rekrutierungsdomänen in ihren langen Prodomänen, wie die caspase recruitment domain (CARD) und die death effector domain (DED) [16]. Die Aktivierung erfolgt hier durch autoprozessive Dimerisierung der monomeren Zymogene an einem Multiproteinaktivierungskomplex [24]. Die Effektorcaspasen benötigen dagegen die

katalytische Wirkung der Initiatorcaspasen, welche durch Spaltung interdomäner Linker die Konformation der dimeren Zymogene ändern und sie auf diese Weise in die Form des aktiven Enzyms überführen [24].

Bislang sind mehr als 280 Caspasesubstrate bekannt. Ein großer Teil dieser Proteine, wie z.B. β -Catenin oder E-Cadherin dienen funktionell der Zelladhäsion bzw. der Zell-Zell-Kommunikation. Weitere wichtige Substrate sind Strukturproteine aus allen Zellkompartimenten sowie Zellzyklusregulatoren, Transkriptions- und Translationsfaktoren [25]. Die Exekution der Apoptose durch Caspasen erfolgt systematisch über die Aufhebung von Zell-Zell Kontakten, Reorganisation des Zytoskeletts, Hemmung der DNA Replikation, Zerstörung von DNA und nukleären Strukturen bis hin zur vollständigen Desintegration der Zelle mit Induktion sog. "eat-me" Signale an die phagozytierenden Zellen [23,16]. Caspasen unterliegen einer direkten Kontrolle durch Proteine der inhibitors of apoptosis (IAP) Familie, welche unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren verstärkt exprimiert werden. Inhibiert werden können IAPs durch Proteine wie second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) oder (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI (Smac/Diablo), die nach der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials zusammen mit dem Cytochrom c ins Zytosol ausgeschüttet werden [26,24].

1.2.3 Signaltransduktionswege zur Apoptoseinduktion

Von den Mechanismen der Apoptoseinduktion sind gegenwärtig zwei Hauptwege sehr gut untersucht. Der sog. extrinsische Weg unterliegt der Modulation des angeborenen Immunsystems, er wird ligandenvermittelt über Proteine der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Familie initiiert. Die Bindung des Liganden an einen sog. Todesrezeptor in der äußeren Zellmembran führt intrazellulär zur autoproteolytischen Aktivierung der extrinsischen Initiatorcaspase 8 [27,26]. Der intrinsische Weg wird durch zellulären Stress induziert. Auslösefaktoren für die Induktion des programmierten Zelltods auf intrinsischem Weg können DNA-Schäden, Zytostatika, Nährstoff- bzw. Wachstumsfaktormangel, aber auch Hypoxie sein, welche zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials führen [23,27]. Die Mitochondrien sind hier von zentraler Bedeutung, da mitochondrial freigesetztes Cytochrom c zur Aktivierung der intrinsischen Initiatorcaspase 9 benötigt wird. Die Kontrolle des intrinsischen Weges unterliegt im Wesentlichen den Proteinen der sog. BCL-2-Familie. Gemeinsame

Endstrecke beider Wege sind die Effektorcaspasen 3, 6 und 7, sie werden sowohl durch die Caspase 8 als auch Caspase 9 induziert [28]. Zusätzlich zu den genannten Hauptstrecken, sind mehrere sog. alternative Wege bekannt. So können zytotoxische T-Zellen, vermittelt durch eine Gruppe von Serinproteasen, den sog. Granzymen sowohl caspaseabhängig, als auch caspaseunabhängig Apoptose induzieren [16].

1.2.4 Der ligandenvermittelte (= extrinsische) Weg

Die Tumornekrosefaktor (TNF) Superfamilie besteht aus 18 Liganden (u. a. TNF, CD 95, TRAIL) und 28 TNF Rezeptoren. Funktionell sind die Mitglieder der TNF Familie sowohl an der Aktivierung inflammatorischer, als auch apoptotischer Signaltransduktionswege beteiligt [26]. TNF- α erfüllt primär eine proinflammatorische Funktion, es induziert NF- κ B und fördert so konsekutiv die Expression inflammatorischer Zytokine wie IL 1, 6 und 8 sowie leukozytenadhäsiver Proteine [18,26]. Typische Vertreter der Familie der Todesrezeptorliganden sind Apo1/CD95/FasLigand (FasL) oder TNF- α related apoptosis inducing Ligand (TRAIL). FasL oder TRAIL sind in der Lage, in einem p53 unabhängigen Mechanismus, den programmierten Zelltod zu induzieren [27].

Die Typ 1- transmembranen Todesrezeptoren (Fas/Apo1/CD95; DR4; DR5) tragen auf ihrer zytoplasmatischen Seite eine sog. Todesdomäne (death domain, DD) [26]. Durch die Interaktion mit dem Liganden kommt es am Todesrezeptor zu einer Konformationsänderung, in deren Folge intrazellulär der sog. death inducing signaling complex (DISC) rekrutiert werden kann. Ein funktionell wichtiger Bestandteil des DISC ist ein Adapterprotein, das Fas associated death domain containing protein (FADD), es verfügt über eine Todesdomäne und eine Todeseffektordomäne (death effector domain, DED). Mit seiner Todesdomäne bindet FADD an die korrespondierende Todesdomäne des Todesrezeptors, die Todeseffektordomäne rekrutiert die Procaspase 8 [16; 26; 27]. Die Bindung der Procaspase 8 an den DISC führt zu ihrer autoproteolytischen Aktivierung. Die aktiven Untereinheiten der Caspase 8 werden ins Zytosol entlassen, während ein Teil ihrer Prodomäne am DISC verbleibt [27].

Zu den Regulationsmechanismen TNF vermittelter Reaktionen gehören Rezeptoren ohne Signaltransduktionsfunktion, die sog. Decoy Rezeptoren, welche mit den Todesrezeptoren um die Liganden konkurrieren [26]. Ein wichtiger intrazellulärer Regulator der extrinsischen Apoptose ist das cellular fllice like protein (c-Flip), eine

trunkierte Form der Caspase 8 [29].

1.2.5 Cellular fllice like protein (c-Flip)

C-Flip wirkt als Schlüsselregulator todesrezeptorvermittelter Apoptose, indem es am DISC die Prozessierung und Aktivierung der Procaspase 8 blockiert. Beim Menschen sind auf Proteinebene die drei Splicevarianten c-Flip_L (55 kDa) und c-Flip_S (26 kDa) exprimiert. C-Flip_S inhibiert die Dimerisierung der Procaspase 8 und verhindert so ihre Aktivierung [30]. Der Mechanismus von c-Flip_L ist gegenwärtig noch nicht vollständig aufgeklärt. Als Homolog der Caspase 8 verfügt c-Flip_L über zwei N-terminale Todeseffektordomänen, sowie eine C-terminale Domäne, letzterer fehlt jedoch ein, für die proteolytische Aktivität der Caspasen verantwortlicher, katalytischer Cystein Rest [29]. C-Flip_L bildet zwar funktionstüchtige heterodimere Komplexe mit der Procaspase 8, diese können jedoch nicht vom DISC abgespalten werden. Trotz ihrer persistierenden Bindung an den DISC, haben die aktivierten c-Flip/Caspase 8-Komplexe noch Zugang zu einer limitierten Anzahl von Substraten [29]. Chang et al. wiesen eine Inhibition der Caspase 8 durch überexprimiertes c-Flip_L nach, wohingegen es in physiologischer Konzentration mit einer Caspase Aktivierung assoziiert war [31]. Als Hauptregulator von c-Flip gilt NF-κB [32]. Bei verschiedenen Tumorzelllinien wurden erhöhte Level von c-Flip nachgewiesen (u.a. Kolon-, Magen-, Pankreas-, Ovarial- und Prostatakarzinom), zudem korrelierte die Überexpression bei verschiedenen Malignomen, wie z.B. dem kolorektalen Karzinom, die mit einer schlechteren Überlebensprognose [29]. Eine starke Korrelation besteht auch zwischen erhöhtem c-Flip und der Resistenz gegenüber ligandenvermittelter Apoptose, [26]. Nachgewiesen wurde zudem eine c-Flip-vermittelte Inhibierung der Zelltodinduktion durch konventionelle Zytostatika [33]. Zu den pharmakologische Inhibitoren von c-Flip zählen einige etablierte Zytostatika wie 5-FU [34], Cisplatin [35] und Paclitaxel [29], aber auch neuere Substanzen wie der Multikinaseinhibitor Sorafenib [36].

1.2.6 Intrinsischer (= mitochondrialer) Weg

Durch die Konvergenz zahlreicher zytotoxischer Stimuli wird am Mitochondrium die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran induziert, reguliert wird dieser Vorgang durch Proteine der BCL-2-Familie [37,38]. Dabei werden aus dem Intermembranraum nicht nur Cytochrom c, sondern auch andere apoptoseregulierende

Proteine (z.B. Smac /DIABLO, Omi/HtrA2, AIF und Endonuklease G) ins Zytosol freigesetzt [37]. Eine wichtige Rolle spielt für die Caspase-abhängige Apoptoseinduktion der sog. apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1), an dessen C-terminale Region das mitochondrial freigesetzte Cytochrom c bindet. Apaf-1 verfügt an seinem n-Terminus über eine sog. caspase recruitment domain (CARD) zur Bindung der Procaspase 9. Durch dATP abhängige Oligomerisierung entsteht das (heptamere) Apoptosom, ein Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und (Pro-) Caspase 9. Am Apoptosom wird die Caspase 9 aktiviert [39]. AIF und Endonuklease A sind Mediatoren der Caspase- unabhängigen Apoptose, sie translozieren in den Nukleolus und induzieren dort Kernchromatisierung und DNA Fragmentierung. Omi/HtraA2 erfüllt eine doppelte Funktion. Als Protease kann es Caspase- unabhängig, und als IAP Inhibitor Caspase- abhängig zur Apoptoseinduktion beitragen [37, 40].

1.2.7 BCL-2 Proteine

Mitglieder der Familie der sog. BCL-2 (B Cell Lymphoma 2) homologen (BH) Proteine sind Regulatoren der intrinsischen Apoptose. Die BCL-2 Superfamilie wird in drei Gruppen unterteilt: Anti-apoptotische Proteine (BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL-1), pro-apoptotische Proteine der BAX-Gruppe (BAX, BAK, BOK), sowie eine weitere pro-apoptotischen Untergruppe, die sog. BH3-only Proteine (Bad, BIK, BID, BIM, HRK, NOXA, PUMA) [41]. Trotz ihrer gegensätzlichen Funktionen weisen alle Proteine der ersten beiden Gruppen eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit BCL-2 auf. Eine kennzeichnende Gemeinsamkeit besteht dabei im Vorhandensein von drei BCL-2 homologen Regionen (BH1, BH2, BH3). Mitglieder der BH3-only Gruppe tragen dagegen charakteristischerweise nur ein einziges (BH3) Motif [42]. Sie erfüllen die Funktion initialer Sensoren zellulären Stresses und übermitteln apoptotische Signale an andere BCL-2 Proteine. BAX und BAK induzieren direkt oder indirekt den Prozess der sog. mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) mit Freisetzung von Cytochrom c und anderen Proteinen aus dem Bereich zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran ins Zytosol. In neuere Studien wurde gezeigt, dass BAX dazu nicht nur die Bildung von Poren in den mitochondrialen Membranen induziert, sondern auch am morphologischen und funktionellen Umbau der Mitochondrien (mitochondrial fission) beteiligt ist. BCL-2 und BCL-X_L inhibieren BAX und BAK und verhindern damit konsekutiv die Aktivierung der Caspase 9. Zusätzlich scheinen BCL-2 und BCL-X_L

auch an Mechanismen zur Aufrechterhaltung des clonogenen Potentials beteiligt zu sein und so Caspase- unabhängig den Zelltod zu hemmen [41].

Todesrezeptorvermittelter Weg (=extrinsische Apoptoseinduktion)

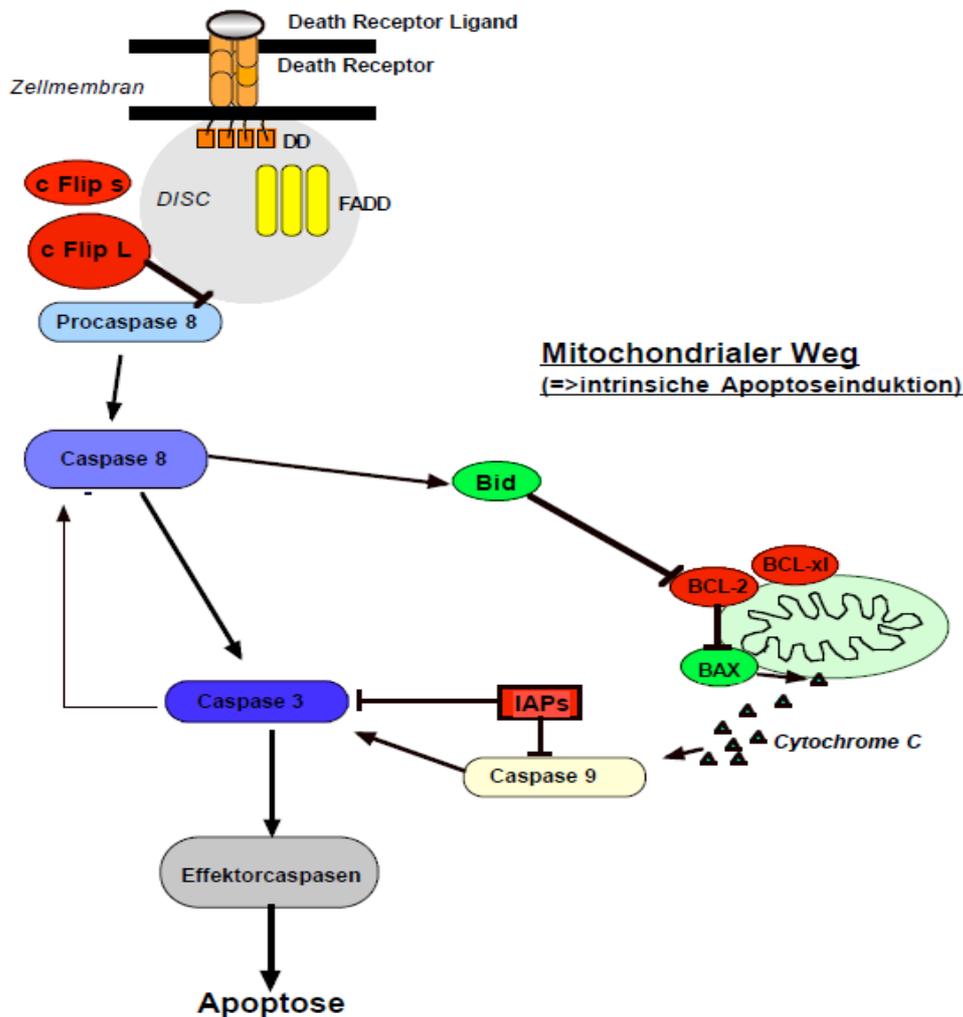


Abbildung 1: Übersicht über die beiden Hauptsignaltransduktionswege der Apoptoseinduktion

1.2.8 Typ I und Typ II Zellen

Abhängig vom funktionell dominierenden Weg der apoptotischen Signaltransduktion wird zwischen sog. Typ I und Typ II Zellen unterschieden. In den Typ I Zellen (bspw. Thymozyten) ist die Induktion der Effektorcaspasen lediglich von der suffizienten Aktivierung der vorgeschalteten Caspase 8 abhängig, während in Typ II Zellen (z.B. Hepatozyten) zusätzlich die mitochondriale Signalkaskade induziert werden muss. Die Verbindung zwischen beiden Wegen wird dabei durch das BH3-only Protein BID hergestellt, welches durch die Caspase 8 in seine aktive Form tBID prozessiert wird

[16,43]. Am Mitochondrium verstärkt tBID durch Induktion von BAX die Freisetzung von Cytochrom c, dies führt zur Amplifizierung des ligandenvermittelten proapoptotischen Signals. In Typ II Zellen kann daher der ligandeninduzierte Zelltod durch antiapoptotische BCL-2 Proteine inhibiert werden [16]. Pankreaskarzinomzellen gehören hinsichtlich ihrer apoptotischen Signaltransduktion zu den Typ II Zellen [27]

1.2.9 Apoptoseresistenz beim Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom weist eine ausgeprägte Apoptoseresistenz auf, welche durch Deregulation multipler apoptoseregulierender Gene bedingt ist [44]. Ein Merkmal vieler Pankreaskarzinomzelllinien ist die Insensitivität gegenüber ligandenvermittelter Apoptose [39]. Als Ursachen hierfür wurden sowohl funktionell insuffiziente Todesrezeptoren, als auch Störungen im Gleichgewicht zwischen pro-apoptotischen und pro-inflammatorischen Rezeptoren nachgewiesen [39]. Für das Pankreaskarzinom wurden c-Flip_L und c-Flip_S als kritische Regulatoren der todesrezeptorvermittelten Apoptose identifiziert [30].

Im Pankreaskarzinomgewebe liegen antiapoptotische Proteine des intrinsischen Wegs wie z.B. MCL-1 und BCL-X_L überexprimiert vor [45]. Stark exprimiert ist auch Survivin, ein selektiv in neoplastischem Gewebe nachgewiesenes IAP Protein, welches funktionell in die Kontrolle der Zellteilung eingreift und an der antiapoptotischen Signaltransduktion beteiligt ist [46]. In verschiedenen Studien zeigte sich eine Korrelation zwischen überexprimiertem BCL-2 und Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod [47]. Wenig untersucht ist die Bedeutung antiapoptotischer BCL-2 Proteine für das PDAC. In Untersuchungen an Tumorgewebe wurde in 50 % der Fälle eine verminderte BAX Expression festgestellt [45]. Magistrelli et al. wiesen eine positive Korrelation zwischen BAX Expressionsstatus und mittlerer Überlebenszeit (19 vs. 11 Monate) nach chirurgischer Resektion eines Pankreaskarzinoms nach [48].

NF-κB reguliert direkt die Expression antiapoptotischer Zielgene wie cIAP, XIAP, c-Flip, BCL-X_L und TRAIL-R3 [50, 51]. Beim Pankreaskarzinom liegt NF-κB in 45-70% nukleär transloziert vor, es gilt als Prädiktor für schlechtes Überleben. Inhibition von NF-κB sensitiviert Pankreaskarzinomzellen für Chemotherapeutika und Todesrezeptor vermittelte Apoptose. Zielgene von NF-κB, die diese Sensitivierung erklären, sind c-Flip und BCL-X_L [45].

1.2.10 Apoptose als Ziel pharmakologischer Therapie

Die meisten Chemotherapeutika, wie z. B. Etoposid, Doxorubicin, Cisplatin oder Paclitaxel, induzieren Apoptose auf mitochondrialem Signaltransduktionsweg [39]. Toxische Zellschäden führen über die Induktion von Transkriptionsfaktoren wie z. B. p53, zu einer Beeinflussung der Expression apoptoseregulierender Proteine [52]. Tumorzellen entwickeln häufig Resistenzmechanismen gegenüber konventionellen antineoplastischen Therapien, in vielen Fällen spielt die Überexpression von BCL-2 oder BCL-X_L dabei eine wichtige Rolle [27]. BCL-2 Proteine gelten daher als vielversprechender Angriffspunkt in der pharmakologischen Tumorthherapie [37]. Beispiel für ein zielgerichtetes Medikament, ist der BCL-2 Antagonist ABT-737 [37,47]. Weitere potentielle Ziele sind Smac und XIAP [37].

Ein neuer Ansatz in der Therapie maligner Erkrankungen ist die pharmakologische Aktivierung von Todesrezeptoren. Während die klinische Applikation von CD95L und TNF- α durch schwere Nebenwirkungen limitiert ist, zeigten sich für TRAIL insgesamt relativ wenige allgemeintoxische Effekte [37]. Die antineoplastische Wirkung von TRAIL wurde für zahlreiche Malignome nachgewiesen, jedoch kam es in zwei Untersuchungen (Pankreas- bzw. Gallenblasenkarzinom) unter der Behandlung mit TRAIL zu einer Zunahme von Invasivität und Metastasierung [53,54]. Als Ursache für diesen Effekt wird eine unspezifische Wirkung von TRAIL, im Sinne einer NF- κ B Aktivierung angenommen [53].

1.3. Untersuchte Zytostatika

1.3.1 Taurolidin

Taurolidin (Bis - (1,1 dioxoperhydro-1,2,4-thiadiziny-4) Methan), ein Syntheseprodukt der Aminosäure Taurin, wurde in den 1970er Jahren als Chemotherapeutikum mit breitem antimikrobiellen Wirkspektrum zur lokalen und intravenösen Therapie chirurgischer Infektionen entwickelt [55,56]. Taurolidin besteht strukturell aus zwei, durch eine Aminogruppe verbundenen, aromatischen Ringstrukturen. In wässrigen Lösungen zerfällt die Substanz in ihre Metabolite Hydroxymethyltaurultam und Taurultam, welche über Hydroxymethyltaurinamid bzw. Taurinamid zu Taurin abgebaut werden. Bei der hydrolytischen Spaltung des Taurolidins kommt es zur Freisetzung von reaktiven Methylgruppen, diese sind in der Lage an Bakterienzellwände, Rezeptoren

und Zellmembranen zu binden, Endo- und Exotoxine zu inaktivieren, sowie durch Methylierung der extrazellulären Matrix die Adhäsion von Bakterien zu verhindern [55, 57]. In einer Untersuchung zum Einfluss von Taurolidin auf die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α , wurde bei lipopolysaccharidstimulierten Makrophagen eine reversible Hemmung der Zytokinsekretion nachgewiesen [58]. Weitere Studien zeigten die Reduktion der proinflammatorischer Zytokine IL1, IL-6 und IL-8 (59), sowie eine Beeinflussung der perioperativen Immunmodulation [60]. Braumann et al. untersuchten die Wirkung von Taurolidin auf die Proteinsynthese und identifizierten sowohl Taurolidin, als auch den aktiven Metaboliten Taurultam als Inhibitoren der frühen Translation [61].

In zahlreichen in vitro und in vivo Studien, sowie in Case Reports wurde der antineoplastische Effekt von Taurolidin bei unterschiedlichen Tumorentitäten nachgewiesen [56, 57, 62, 63, 64].

Zum antineoplastischen Wirkspektrum des Taurolidins gehören sowohl die Apoptoseinduktion, als auch antiangiogenetische, antiadhäsive und antiinflammatorische Effekte [59]. Die Induktion des programmierten Zelltods durch Taurolidin konnte auf vielen Tumorzelllinien reproduziert werden, zelllinienspezifisch wurden jedoch unterschiedliche, diesem Effekt zugrundeliegende Wirkmechanismen identifiziert. So wurden sowohl die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs, als auch die Verstärkung extrinsisch vermittelter Apoptose, sowie eine caspase- unabhängige Apoptoseinduktion nachgewiesen [59].

Für diverse Malignome konnte die Hemmung von Tumorwachstum und Metastasierung durch Taurolidin tierexperimentell nachgewiesen werden [65,66,67,68]. So kam es im Hamstermodell eines chemisch induzierten Pankreaskarzinoms, nach intraperitonealer Irrigation mit Taurolidin (vs. Kochsalzlösung), zur signifikanten Reduktion von Leber- bzw. zur vollständigen Hemmung von Trokarmetastasen, zudem war die Inzidenz des makroskopisch erkennbaren Pankreaskarzinoms signifikant gesenkt [65]. In einem Kolonkarzinom-Rattenmodell wurde eine signifikante Senkung von Größe und Anzahl der Metastasen nachgewiesen [67]. Die immunhistochemische Analyse von Adhäsionsproteinen im Metastasengewebe aus o. g. Studie, zeigte eine signifikante Senkung von E-Cadherin in der Taurolidin-Gruppe [69], erklärt wurde dieser Effekt mit einer Caspase-vermittelten Spaltung von E-Cadherin [67,69]. In einer Untersuchung (Rattenmodell eines Harnblasenkarzinoms), zeigte sich dagegen eine Steigerung des

Tumorwachstums nach Installation von Taurolidin [70].

Seit der klinischen Einführung des Taurolidins haben sich keine gravierenden allgemeintoxischen Nebenwirkungen bei intraperitonealer oder intravenöser Anwendung gezeigt [59]. Wenige Ergebnisse liegen bisher zu einem kombinierten Einsatz von Taurolidin mit anderen Zytostatika vor. Daigeler et al. zeigten einen synergistischen Effekt von Taurolidin und TRAIL bei Ösophaguskarzinomzellen [71]

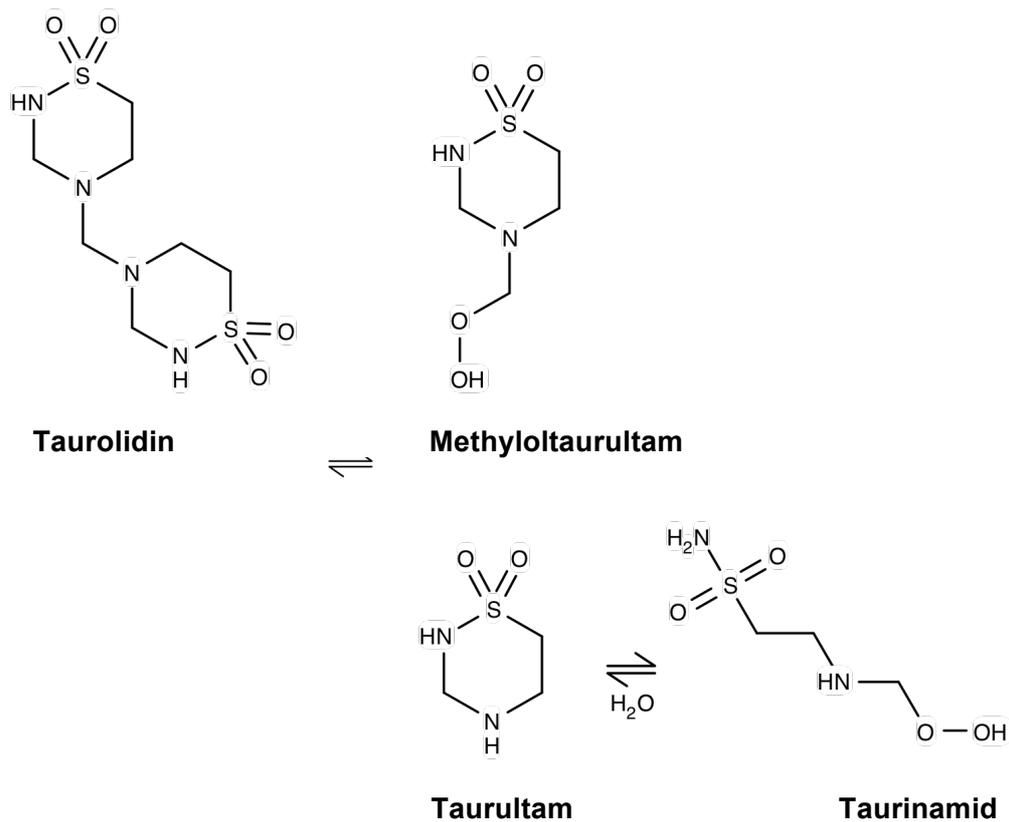


Abbildung 2: Strukturformel von Taurolidin (Molekulargewicht: 284,37) und seinen Metaboliten (nach Calabresi 2001)

1.3.2 Gemcitabine

Bei Gemcitabine (Diflourdeoxycytidin; dFdC) handelt es sich um ein Deoxycytidinanalogon mit strukturellen und metabolischen Ähnlichkeiten zu Cytarabin [72]. Der Wirkstoff wird durch intrazelluläre Phosphorylierung zu Diflourdeoxycytidintriphosphat (dFdCTP) aktiviert, welches mit Deoxycytidintriphosphat (dCTP) um die Inkorporation in die DNA kompetitiert, so dass es über einen Kettenabbruch zur direkten Hemmung der DNA Synthese kommt. Zusätzlich wirkt Gemcitabine indirekt, durch Inhibition der Nucleotidsynthese [10].

Faktoren, die zur Resistenz gegenüber Gemcitabine führen, liegen sowohl in Veränderungen der Genexpression von Transportern wie z.B. dem human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1), sowie in Metabolisierungsstörungen im Sinne einer insuffizienten Transformation des Gemcitabines in seiner aktiven Metaboliten. Weitere Faktoren sind Hypoxie und Veränderungen in der apoptotischen Signaltransduktion [73]. In verschiedenen Studien zeigte sich eine Korrelation zwischen Resistenz gegenüber Gemcitabine und einer Überexpression der antiapoptotischen Proteine BCL-2 und BCL-X_L [72, 74].

1.3.3 Docetaxel

Wie bei Gemcitabine, so handelt es sich auch bei Docetaxel um ein etabliertes Zytostatikum. Die vorhandenen Studien zum Einsatz von Docetaxel in der Therapie des Pankreaskarzinoms zeigen bislang uneinheitliche Ergebnisse [75]. Als wesentlicher Wirkmechanismus von Docetaxel gilt die Hemmung der mitotischen Zellteilung durch Stabilisierung der Mikrotubuli [76].

1.3.4 Suramin

Suramin (Germanin) wurde bereits in den 1920er Jahren als Mittel zur Therapie von parasitären Erkrankungen wie Trypanosomiasis (Schlafkrankheit) und Onchocerciasis (Flussblindheit) eingesetzt. Die Substanz beeinflusst verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF und VEGF) und interferiert mit zellulären Enzymen (DNA-Polymerase, Proteinkinase C, Topoisomerase II) interferiert [77].

In jüngerer Zeit ist auch die anti-neoplastische Wirkung der Substanz untersucht worden. Der inhibitorische Effekt von Suramin auf das Pankreaskarzinom wurde durch unsere Arbeitsgruppe umfassend evaluiert. So konnte gezeigt werden, dass Suramin einen inhibitorischen Effekt auf Proliferation und Viabilität humaner Pankreaskarzinomzellen hat. Im Tiermodell wurde eine Reduktion von Tumorgröße und Metastasierung sowie eine Hemmung der Angiogenese im Tumorgewebe nachgewiesen [77].

2. Fragestellung dieser Untersuchung

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die antineoplastische Wirkung von Taurolidin auf die unterschiedlich differenzierten Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 (human), AsPC-1 (human) und DSL-6AC1 (Ratte), anhand folgender Aufgaben zu untersuchen:

1. Untersuchung der Fragestellung, ob und inwieweit es zu einer Beeinflussung von Proliferation und Viabilität verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien durch Taurolidin kommt. Taurolidin sollte dazu sowohl als Monosubstanz, als auch in Kombination mit den etablierten Zytostatika Gemcitabine und Docetaxel, sowie mit der, durch unsere Arbeitsgruppe ausführlich evaluierten, anti-neoplastischen Substanz Suramin getestet werden. Anhand der Ergebnisse der vorgenannten Experimente sollte anschließend eine der getesteten Kombinationstherapien mit Taurolidin für eine weiterführende molekulargenetische Untersuchung ausgewählt werden.

2. Zunächst sollte untersucht werden, ob es durch eine Mono- bzw. Kombinationstherapie mit Taurolidin zu einer Induktion des programmierten Zelltodes kommt. Im Weiteren sollte dann die Beeinflussung von Schlüsselregulatoren der Apoptose auf Proteinexpressionsebene analysiert werden. Dabei sollten die beiden Hauptsignaltransduktionswege des programmierten Zelltodes berücksichtigt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte, Instrumente und Chemikalien

Gerät	Hersteller
Bio Photometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany
Brutschrank Hera Cell	Haereus Instruments, Hanau, Germany
EL 808 Ultra Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Winooski, USA
Elektrophorese Apparatur Sub-Cell GT	BioRad, Hercules, California, USA
Gel Blot Apparatur Mini Protean Gerät	BioRad, Hercules, California, USA
Hämocytometer Neubauer Improved	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany
Kamera	Canon, Tokyo, Japan
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart, Germany
Kühltruhe (-80°C)	Thermo Scientific Waltham, USA
Kühlzentrifuge Biofuge primo R	Thermo Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen, Germany
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach, Germany
Mastercycler Gradient	Eppendorf Wesseling-Berzdorf, Germany
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Hanau, Germany
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon, Tokyo, Japan
Peqlab Fusion SL	PeqLab, Tampa, Florida, USA
pH – Meter CG 840	Schott, Mainz, Germany
Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany
Pipettus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Germany
Sicherheitswerkbank Captair	Erlab, Köln, Germany
Sicherheitswerkbank	Clean Air, Chicago, USA
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, Germany
Thermomixer 5436	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany
Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Tischzentrifuge Minispin plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany
Transsonic Ultraschallbad	Elma, Singen Germany
UVT-28 M UV Transluminator	Herolab, Wiesloch, Germany
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage BP 310S	Sartorius, Göttingen, Germany

Material	Hersteller
3 M Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel, Germany
Cellstar 6 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one Frickenhausen, Germany
Cellstar 96 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-one Frickenhausen, Germany
Mini Protean Spacer Plates 1,0 mm + Glas Plates	BioRad, Hercules, California, USA
Nitrocellulose Membranen 0,45 µm	BioRad Hercules, California, USA

Material	Hersteller
Pipettenspitzen Serologica Pipette	BD Falcon, San Jose, California, USA
PVDF Membranen 0,45 µm	Perkin & Elmer, Waltham, US
PVDF Membranen 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel, Germany
Tissue Culture Flask 75 cm ³	Falcon 388313
Zentrifugenröhrchen 10 ml bzw. 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Germany

Chemikalie/ Reagenz	Hersteller
Acrylamid Rothiphorese 40	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Agarose Broad Range	Carl Roth Karlsruhe, Germany
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Brij 36	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Brilliant Blue RG 250	Carl Roth Karlsruhe, Germany
Bromphenol Blau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
BSA Stammlösung 1mg/ ml	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Digitonin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DMPC	Promega, Madison, California, USA
DNA Ladder , 100 bp	Biolab, Tampa, Florida, USA
dNTP	Promega, Madison, California, USA
EDTA	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	Roth Karlsruhe, Germany
Ethanol	Merck, Darmstadt, Germany
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Ficoll	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Fötales Kälberserum	PAA, Piscataway, NJ, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
HEPES Buffer Solution 1M	PAA, Piscataway, NJ, USA
Isopropanolol	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
MDB	Sigma, Aldrich, St. Louis, USA
M-MLV	Promega, Madison, California, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
MTT	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
NaFl	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
NP 40	Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Oligo dt	Promega, Madison, California, USA
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas Thermo Scientific Waltham, USA
PBS	Dulbecco Invitrogen/ Life Technologies, St. Louis, USA
Penicillin/ Streptomycin x 100	PAA, Piscataway, NJ, USA
Peq Gold Proteinmarker V	Peqlab, Tampa, Florida, USA
Ponceau S	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Fermentas Thermo Scientific, Waltham, USA
RNAsin	Promega, Madison, California, USA

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Sodiumdesoxycholat	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Sodium Pyruvate	PAA, Piscataway, NJ, USA
Staurosporin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
β- Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Sucrose	Merck, Darmstadt, Germany
TEMED	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Top Blot	Fluka Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tris- HCL	Merck, Darmstadt, Germany
Trizma Base minimum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin EDTA 0,5 %	GIBCO Life Technologies, Carlsbad California, USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
Xylene Cyanol FF	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Gele, Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
Lysepuffer III	1 ml 1 M Tris-HCL pH 6,8 0,4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 3 ml 5 M NaCl 8,75 ml Brij 96 10% 1,25 ml NP 40 10% ad 100 ml ddH ₂ O
RIPA-Puffer	1ml Tris-HCL 1M, pH 6,8 0,4 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 3 ml 5 M NaCl 1 ml Sodiumdesoxycholat (10%) 500 µl SDS (10 %) 5 ml NP-40 (10 %) ad 100 ml ddH ₂ O
Digitonin Lysepuffer	5 µl Digitonin (50 mg/ml) 1995 µl Sucrose 500 mM 30 Minuten bei 90°C erwärmen
Lämmli-Puffer (5 x)	5 ml Glycerol 1 g SDS 2,5 ml β-Mercaptoethanol 0,01 g Bromphenolblau 2,5 ml Tris Base (pH=6,8)
Running-Puffer (5 x) (Tris-Glycin Puffer)	15 g Tris-Base 72 g Glycine 5 g SDS ad 1000 ml ddH ₂ O
Transfer-Puffer	3,03 g Tris-Base 14,4 g Glycin 200 ml Methanol ad 1000 ml ddH ₂ O
TBS	6,1 g Tris-Base 37 ml 1M HCL 8,8 g NaCl ad 1000 ml ddH ₂ O

Gele, Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
TBS Tween	1000 ml TBS 5 ml Tween 20
Tris HCL (0,5M) pH 6,8	6 g Tris-Base 60 ml ddH ₂ O pH 6,8 mit HCL, ad 100 ml ddH ₂ O
Trenngel (14 %)	3,5 ml Acrylamid (40%) 3,9 ml ddH ₂ O (sonst wie 12 % Trenngel)
Trenngel (12 %)	2,4 ml 1,5 M Tris HCL (pH 8,8) 3 ml Acrylamid 40% 100 µl SDS 10% 100 µl APS 10% 5 µl Temed 4,4 ml ddH ₂ O
10% Trenngel (12 %)	2,5 ml Acrylamid 4,9 ml dd H ₂ O (sonst wie 12 % Trenngel)
Sammelgel (4 %)	1,25 ml 0,5 M Tris-HCL pH 6,8 0,5 ml Acrylamid (40%) 50 µl SDS 50 µl APS 5 µl Temed 3,145 ml ddH ₂ O
TAE (50 x)	121 g Tris Base 28,5 g Eisessig 50 ml 0,5 M EDTA ad 50 ml ddH ₂ O
DNA Loading Buffer (5 x)	0,025 g Bromphenol Blau 0,025 g Xylene Cyanol FF 1,5 g Ficoll 400 ad 10 ml ddH ₂ O
MTT-Lösung (1x)	5 mg MTT-Reagenz 5 ml PBS
Agarosegel (1%) f. PCR-Gel	0,5 g Agarose Broad Range 50 ml TAE 1 µl Ethidiumbromid (1%)
Mastermix zur c-DNA Synthese (Ansatz für eine Probe):	1 µl dNTPs 1 µl Oligo dts 5 µl 5 x Puffer 1 µl RNAsin 1 µl m-MLVT-RT
Ponceau Staining Lösung	0,5 g Ponceau S 1 ml Eisessig ad 100 ml ddH ₂ O
Coomassie Färbelösung	1 g Coomassie Brilliant Blue 400 ml Methanol (100%) 100 ml Eisessig ad 1000 ml ddH ₂ O
Coomassie Entfärber	400 ml Ethanol (vergällt) 100 ml Eisessig ad 1000 ml ddH ₂ O

Gele, Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
BSA (5 %) / NaAzid (0,02 %) / TBST	25 g Albumin Fraktion 0,1 g Na Azid ad 500 ml TBST
Lumi Light Blocking Reagent (1%) / TBS	0,2 g Lumi Light 20 ml TBS
EDTA (0,5 M)	186,1 g EDTA 800 ml ddH ₂ O pH 8,0 mit NaOH, ad 1000 ml ddH ₂ O
NaCl (5 M)	282,22 g NaCl ad 1000 ml ddH ₂ O

Kits	Hersteller
Lumi-Light Western Blotting Kit Mouse/Rabbit 12 015218 001	Roche, Basel, Switzerland
Nucleospin RNA II	Machery Nagel, Düren, Germany
Quanti Pro BCA Assay Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
SensoLyte Homogeneous AFC Caspase-3/7 Assay Kit	Ana Spec Fremont, California, USA
Super Signal West Pico Chemiluminiszent ECL-Kit ProdH 34080	Thermo Scientific, Waltham, USA

Primer	Sequenz	bp	Hersteller
BCL-2 SE	5- gATgTCCAgCCAgCTgCACCTg-3'	355	TIB MOLBIOL, Berlin, Germany Nr. 966 908
BCL-2 AS	5- CACAAAggCATCCCAgCCTCC-3'	355	TIB MOLBIOL, Berlin, Germany Nr. 966 909
BAX SE	5- ggACCCggTgCCTCAggA-3'	495	TIB MOLBIOL, Berlin, Germany Nr. 966 910
BAX AS	5- CAAAgATggTCAggTCTgC-3'	495	TIB MOLBIOL, Berlin, Germany Nr. 966 911
c-Flip L SE	5- AATTCAAaggCTCAgAAgCgA-3'	200	TIB MOLBIOL, Berlin, Germany Nr. 111 3422
c-Flip L AS	5- ggCAgAAACTCTgCTgTTCC-3'	200	TIB MOLBIOL, Berlin, Germany Nr. 111 3423

Die Primer für BCL-2 und BAX wurden nach Literaturrecherche ausgesucht [78]. Für c-Flip wurden die Primersequenzen mittels des Programms Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) erstellt.

Antikörper	Bezugsquelle
Anti BAX 20 KDa polyclonal Rabbit	Cell Signaling # 2772
Anti BCL-2 26 KDa monoclonal Rabbit	Cell Signaling # 2870
Anti c-Flip L und s polyclonal Rabbit	Abcam, Cambridge, UK 8421
Anti β -Actin Clone AC-15 Mouse	Sigma Aldrich, St. Louis, USA A 5441
Sekundär Antibody Anti- Rabbit Anti-Rabbit IgG-Peroxidase Antibody	Sigma Aldrich, St. Louis, USA A 0545
Sekundär Antibody Anti- Mouse Anti-Mouse IgG-Peroxidase Antibody	Sigma Aldrich, St. Louis, USA A 9044

3.1.2 Zelllinien und Zellkulturmedien

HPAF-2: Die mittelgradig-gut differenzierte Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 wurde aus dem Aszitespunktat eines 44-jährigen Patienten mit Metastasierung in Leber, Diaphragma und Lymphknoten isoliert. Die Tumorzellverdopplungszeit liegt bei ca. 42 h. [79]. Wichtige immunzytochemische Merkmale sind CEA, MUC-1, MUC-5, Vimentin und CK 7 [80].

AsPC-1: Die schlecht differenzierte Tumorzelllinie AsPC-1 stammt von Nacktmaus Xenografts, welche mit Tumorzellen aus dem Aszitespunktat einer 62-jährigen Patientin mit metastasiertem Pankreaskopfkarzinom initiiert worden sind. Die Verdopplungszeit von AsPC-1 beträgt 38-40 h [79].

Zu den immunzytochemischen Merkmalen gehören CEA, MUC-1, MUC-2, MUC-5, Vimentin, CK 7 und HER-2 [80].

DSL-6AC1: DSL-6A wurde als transplantabler Tumor aus einem Azazerin-induzierten, primären Azinuszellkarzinom des Pankreas einer männlichen Lewis-Ratte gewonnen. Die Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 ist durch Kultivierung von Zellen aus dem DSL-6A-Tumor etabliert worden. Innerhalb der ersten 1-2 Wochen der Subkultivierung kam es bei DSL-6AC1 zu einem Verlust der strukturellen und immunhistochemischen Charakteristika azinöser Pankreaskarzinomzellen, parallel dazu wurden Merkmale duktaler Tumorzellen exprimiert [81].

Jurkat: Bei Jurkat handelt es sich um immortalisierte T-Lymphozyten, die aus dem Blut eines 14-jährigen Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie gewonnen wurden [82].

Zelllinie	Donor	Bezugsquelle	Kulturmedium	Hersteller des Mediums
HPAF-2	Mensch(m)	ECACC	MEM with Earls Salt + L-Glutamin Sigma M 4655 50 ml FKS (10%) 5 ml Sodium Pyruvate 5 ml Pen+Strep 4 ml Glutamin	PAA
AsPC-1	Mensch (w)	ECACC	RPMI 1640 + L-Glutamin 50 ml FKS (10%) 5 ml HEPES (1M) 5 ml Pen +Strep (1%) 5 ml MEM (Sodium Pyruvate)	PAA
DSL 6AC1	Ratte (m)	ECACC	Waymouth MB 75211+ L-Glutamin 50 ml FKS 5 ml Pen+Strep (1%)	GIBCO
Jurkat	Mensch (m)	ECACC	Entsprechend DSL-6A	GIBCO

Tabelle 2: Übersicht über die Zelllinien, ihre Herkunft und die erforderlichen Zellkulturmedien

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung aller 3 verwendeten Tumorzelllinien erfolgte in 75 cm³ Zellkulturflaschen unter Standardbedingungen, bei einer Temperatur von 37° C, einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO₂-Gehalt der Luft von 5 %. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen (2-3 x pro Woche) passagiert. Der Wechsel des Nährmediums erfolgte bei allen Tumorzelllinien im Abstand von 2 Tagen.

Passagieren adhärenter Zellen:

- 2 x Waschen der adhärenter Zellen mit PBS
- Entfernung des PBS und Zugabe von 1 ml Trypsin zur Ablösung der Zellen
- Inkubation bei 37 °C (Inkubationszeiten abhängig von der Zelllinie :
HPAF= 25-30 Min., AsPC= 20 Min., DSL 6AC1= 1 Min.)
- Zugabe von 9 ml Zellkultur-Medium und vorsichtiges Resuspendieren
- Überführung der Zell-Suspension in Zentrifugenröhrchen, 5 Min. Zentrifugation (1000 rpm)
- Entfernung des überstehenden Mediums vom Zell-Pellet und Zugabe von 10 ml Medium
- mehrfaches Resuspendieren und Aufteilung der Zell-Suspension auf neue Zellkulturgefäße

3.2.2 Assay zur indirekten Viabilitätsbestimmung von Zellen

Lebendige (viable) Zellen sind in der Lage, vermittelt durch mitochondriale Dehydrogenasen, MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) zu Formazan umzusetzen. Das Prinzip des MTT-Tests beruht auf der photometrischen Quantifizierung des, durch die viablen Zellen katalysierten, dunkelblauen Formazans (nach Mosmann 1983) [83].

1.Tag	Ausplattieren der Tumorzellen (Konzentration= 1×10^4 /ml) in eine 96-Well Mikrotiterplatte; Volumen der Zellsuspension: 300 µl/ Well (entspr. 300 Zellen/Well)
2.Tag	Wechsel des Nährmediums und Applikation des Zytostatikums; Gesamtvolumen von Nährmedium+ Zytostatikum: 200µl/Well
3.+ 4.Tag	Inkubation bei 37° C
5.Tag	- Entfernung von Zellkulturmedium und Zytostatikum - Applikation von 100 µl frischem Medium+10 µl MTT Reagenz (10%) - 4 h Inkubation bei 37°C - Stop der Reaktion durch Applikation von 100 µl SDS (10%)/ Well - Inkubation über Nacht bei 37°C
6.Tag	Messung der Extinktion bei 550 nm

3.2.3 Bestimmung der Tumorzellproliferation

1.Tag	Ausplattieren der Tumorzellen in 6-Well Platten; Volumen der Zellsuspension: 2000 µl/Well (entsprechend 2000 Zellen/Well)
2.Tag	Mediumwechsel + Zytostatika-Applikation, Gesamtvolumen von Medium + Zytostatikum: 2000 µl/
3.+4.Tag	Inkubation bei 37°C
5.Tag	Zellzählung - Entfernung des Zellkulturmediums + 2 x Waschen mit jeweils 2 ml PBS/ Well - 5 Tropfen Trypsin in jedes Well pipettieren - Inkubation (Zeiten wie oben beschrieben) - 5 Tropfen Zellkulturmedium /Well pipettieren - jeweils mit frischer Pipettenspitze den Inhalt der Wells in Zentrifugen-Röhrchen überführen - vorsichtig Resuspendieren - Zellsuspension in Neubauer-Zählkammer einpipettieren und entsprechend dem Protokoll zählen
Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer	- jeweils 50 µl der Zellsuspension in die Zählkammer überführen- - Anzahl lebender Zellen anhand der Berücksichtigung von 2 x 4 großen Quadraten auszählen

Formel zur Berechnung der Zellzahl: Zellen/ml = Mittelwert aus 4 Quadraten $\times 10^4 \times 2$

3.2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit der Etablierung der PCR [84], wurde es möglich auch sehr kleine DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Untersuchung der Fragestellung eingesetzt, ob die Apoptose-regulierenden Proteine BAX, BCL-2, BCL-XL und c-Flip bei den hier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien auf Genexpressionsebene nachweisbar sind. Als Voraussetzung für die Durchführung der PCR war zunächst die Isolierung von Messenger RNA (mRNA) aus den Tumorzellen erforderlich. In einem zweiten Schritt wurde dann die mRNA in ihre komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Nach gezielter Amplifizierung der gesuchten, d.h. die Target-Proteine kodierenden, DNA-Sequenzen in der PCR, wurden die PCR-Produkte in einem, mit Ethidiumbromid versetzten, Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.2.4.1 mRNA Isolierung

Versuchsvorschrift zur mRNA Isolierung (nach Machery Nagel 10/2007):

- Entfernung des Zellkultur-Mediums , Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS und mechanische Lösung der adhärenen Zellen
- Überführung der Suspension in Zentrifugenröhrchen und 5 Min. Zentrifugation bei 1000 rpm, dann Entfernung des PBS vom Zell-Pellet
- 350 µl Buffer RA1 und 3,5 µl Mercaptoethanol auf das Pellet pipettieren
- Zell- Lysat in Nucleo Spin Filtersäulen (im Sammelröhrchen) überführen und 1 Min. mit 11.000x g zentrifugieren
- zur Bindung der RNA die Filter-Säule entfernen und 350 µl Ethanol zu dem gefilterten Lysat im Sammelröhrchen pipettieren
- 5 x Resuspendieren, dann Lysat in eine RNA-Säule pipettieren und für 30 Sek. bei 11.000x g zentrifugieren
- RNA-Säule in neues Sammelröhrchen stellen und zum Entsalzen der Siliziummembran 350 µl MDB in die RNA-Säule pipettieren und 1 Min. Bei 11.000x g Zentrifugieren
- zur Eliminierung von DNA jeweils 95 µl DNase Reaction Mix in die Mitte der Siliziummembran pipettieren und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- jeweils 200 µl RA 2 hinzu pipettieren, 30 Sek. bei 11.000x g zentrifugieren
- RNA-Säule in neues Sammelröhrchen überführen, jeweils 600 µl RA 3 hinzu pipettieren und 30 Sek. bei 11.000x g zentrifugieren
- jeweils 250 µl RA 3 hinzufügen und 2 Min. bei 11.000x g zentrifugieren
- RNA-Säule in RNase-freies Sammelröhrchen überführen, Pellet in 30 µl RNase-freiem Wasser lösen und das Lysat 1 Min. bei 11.000x g zentrifugieren
- Überstand bei – 80° C einfrieren

3.2.4.2 Synthese von c-DNA aus mRNA

Zunächst erfolgte eine photometrische Quantifizierung der mRNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), dazu wurde 1 μl RNA-Probe in 99 μl DMPC H₂O pipettiert und mit dem Eppendorf Biophotometer (Programm: RNA) die Extinktion bei 260 nm gemessen. Aus dem hier ermittelten Wert erfolgte die Berechnung des erforderlichen (hier 2 μg mRNA entsprechenden) Volumens der mRNA-Probe. Für die cDNA-Synthese wurden jeweils 2 μg mRNA mit 9 μl Mastermix (siehe Tabelle Seite 30) und ddH₂O in einem Gesamtvolumen von 25 μl / Probe angesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Mastercycler (Programm: Reverse Transkription).

Protokoll zur Durchführung der cDNA-Synthese:

- zuerst Wasser, dann mRNA in Reaktionsgefäße (1ml) pipettieren und die Proben für 5 Min. bei 70°C inkubieren (Mastercycler)
- Proben für 1 Min. auf Eis stellen
- kurz mit 7000-8000 rpm Zentrifugieren und Mastermix hinzu pipettieren).
- 1 h bei 37°C inkubieren, 15 Min. bei 70°C inkubieren (Mastercycler)
- Einfrieren der Proben bei -20°C.

3.2.4.3. Reverse Transkriptase PCR

Die PCR verläuft in 3 wesentlichen Schritten. Zuerst erfolgt die Denaturierung, hier wird (bei hoher Temperatur) die DNA–Doppelhelix eröffnet. Im zweiten Schritt, der Hybridisierung (=Annealing), lagern sich die spezifischen Primer an die eröffneten DNA-Einzelstränge an. Zuletzt wird die DNA amplifiziert, indem die angelagerten Primer unter Zuhilfenahme einer hitzestabilen Polymerase mit dNTPs verlängert werden (Elongation).

1. Initiale Denaturierung	T= 95°	3 Min.
2. Denaturierung	T= 95°	1 Min.
3. Annealing	T= x° (abhängig vom Primer)	1 Min.
4. Elongation	T= 72°	1 Min.
5. Finale Elongation	T= 72°	10 Min.

Zyklus 2-4 werden jeweils 35x wiederholt

3. 2. 3. 4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung der DNA

Zunächst wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE für 90 Sek. bei 900 W in der Mikrowelle erhitzt und 5 μl Ethidiumbromid (1%) hinzugefügt. Anschließend erfolgte das Giessen der Gele, welche nach einer Aushärtungszeit von 30 Min. bei Raumtemperatur verwendet werden konnten. Für jede Probe wurden jeweils 2 μl DNA Loading Buffer

und 10 µl des PCR-Produkts in eine Geltasche des Agarose-Gels pipettiert. In eine Geltasche wurden 10 µl eines Größenmarkers (100 bp DNA Ladder) gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA im Agarosegel erfolgte bei 70-80 V, für die Dauer von 60 Min. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet.

3.2.5 Caspase 3/7-Assay

Die Analyse der Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 erfolgte unter Verwendung des Sensolyte Homogeneous AFC Caspase 3/7 Assay Kits (Protokoll entsprechend Appendix III). Das Prinzip des Assays basiert auf der photometrischen Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3 und 7. Das Fluoreszenz-markierte Substrat N-acetyl-asp-glu-val-asp-7-amino-4-Trifluormethylcoumarin wird selektiv durch die Caspasen 3 und 7 gespalten. Ausgehend von den Messwerten der photometrischen Bestimmung der Fluoreszenz, kann die Aktivität der Caspasen 3 und 7 quantifiziert werden.

Für die Durchführung des Caspase 3/7-Assays wurden jeweils 300.000 Zellen/Well in 6-Well Platten ausplattiert und über Nacht in normalem Zellkulturmedium inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums und die Zugabe der Testsubstanzen, entsprechend folgendem Schema:

Positivkontrolle: Zellen + Staurosporin (100 nM)

Negativkontrolle: Zellen + Medium ohne Wirkstoff

Leerwertkontrolle A: Medium ohne Zellen

Leerwertkontrolle B: Medium + Wirkstoff ohne Zellen

Testsubstanzen (jeweils in Doppelbestimmung): Zellen+ Medium+ Wirkstoffe

Nach einer Inkubationszeit von 24- bzw. 72 h wurde das Medium entfernt und jeweils 300 µl Lysepuffer/ Well pipettiert. Dann wurden die Zellen mit einem Scraper mechanisch gelöst, im Lysepuffer in Reaktionsgefäße überführt und für 30 min. auf Eis auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation der Proben bei 2500 rpm in der Kühlzentrifuge (Temperatur von 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei - 80°C eingefroren.

Zur Auswertung war zunächst die Herstellung einer AFC-Standardreihe erforderlich, dazu wurden 2 µl AFC in 318 µl ddH₂O pipettiert (entsprechend 60 µM) und die Lösung dann im Verhältnis 1:2 weiterverdünnt. Dann wurden die Standardreihe (jeweils 50 µl AFC-Standard /Well) und die Proben (150 µl Probenvolumen+50 µl Caspase-Substrat /Well) in Doppelbestimmung in eine lichtgeschützte 96-Well-Platte einpipettiert. Nach

einer 60-minütigen Inkubation im Dunkeln für erfolgte eine Extinktionsmessung bei 500 nm (Spectramax Microplate Reader).

3.2.6 Prinzip von diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli und Western Blot

Das Prinzip der SDS-PAGE nach Lämmli beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel [85].

Um die Proteine zu denaturieren und den Einfluss ihrer Eigenladung auszuschalten, wird das anionische Natrium Dodecyl Sulfate (SDS) eingesetzt. Durch die Bindung von SDS an hydrophobe Gruppen der Proteine werden diese einheitlich mit einer negativen Gesamtladung ausgestattet und die Sekundär- und Tertiärstruktur aufgehoben. Praktisch wird diese Denaturierung durchgeführt, indem das Protein für 5 Minuten im SDS-haltigem Probenpuffer aufgekocht wird. Zur weiteren Denaturierung wird dem Probenpuffer β -Mercaptoethanol oder DTT zugesetzt, welche durch Spaltung von Disulfidbrücken die Struktur der Proteine aufbrechen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt diskontinuierlich, d.h. das Proteingemisch wird zunächst in einem sog. Sammelgel konzentriert, bevor im Trenngel die eigentliche Auftrennung erfolgt. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins, werden dazu Trenngele in unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen verwendet. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern durch das Gel zur Kathode, dabei werden die einzelnen Proteine entsprechend ihrer Größe bandenförmig im Trenngel zurückgehalten werden. Um die Proteinbanden im Gel visualisierbar zu machen, kann es anschließend mit Färbelösung (Coomassie Blau) behandelt werden

Beim Western-Blot-Verfahren werden Proteine elektrophoretisch aus einem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert, anschließend kann das nachzuweisende Protein durch Inkubation mit einem spezifischen Antikörper (dem sog. Primärantikörper) auf der Membran detektiert werden. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wird die Membran vor der Verwendung des Primärantikörpers für eine festgesetzte Zeit mit einer Blockierungslösung auf Proteinbasis behandelt. Durch die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, an den ein Lumineszenz- markierter Farbstoff gekoppelt ist, kann das zuvor identifizierte Protein markiert und mittels einer Entwicklungslösung, sowie einer hochsensitiven Kamera mit Chemilumineszenz-sensitivem Filter optisch sichtbar gemacht werden.

3.2.6.1 Proteinisolierung für den Immunblot

Die Zellen wurden zunächst bis zu einer Dichte von ca. 80 % in 75 cm² Flaschen kultiviert, dann erfolgte (abhängig vom Wachstumsverhalten der jeweiligen Zelllinie) ein Splitting im Verhältnis 1:4 (DSL 6AC1 bzw. 1:3 (HPAF-2, AsPC-1). Nach einer weiteren Subkultivierung der Zellen für weitere 48 h in normalem Nährmedium wurden die Zellen mit den Testsubstanzen in frischem Medium für 24 h bzw. 72 h inkubiert.

Isolierung des Gesamtproteins:

Nach der Entfernung des Mediums wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen, mechanisch gelöst und in PBS aufgenommen. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und dann das Zell-Pellet in 300 µl Lysepuffer (+3 µl Protease Inhibitor Cocktail) mehrfach vorsichtig resuspendiert. Das Lysat wurde für die Dauer von 3-8 Minuten im Ultraschallbad (Eiswasser) behandelt, anschließend erfolgte eine Inkubation im Lysepuffer (auf Eis) für die Dauer von 10-20 Min. Die Proben wurden nun bei einer Temperatur von 4° C mit 10.000 rpm für 15 Min. zentrifugiert, der Überstand in frische Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Nicht-adhärenente Zellen (Jurkat), sowie Zellen, bei denen es nach der Inkubation mit den Wirkstoffen zu einem (teilweise stark ausgeprägten) Adhäsionsverlust gekommen ist, wurden zunächst im Medium aufgenommen und dieses erst nach dem Zentrifugieren des Pellets entfernt (das weitere Procedere entsprach dem oben beschriebenen Protokoll).

3.2.6.2 Proteinquantifizierung mit Bicinchoninsäure (BCA)

(Quanti Pro BCA Assay Kit, Sigma)

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Reduktion von Kupfer II zu Kupfer III durch die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin. BCA ist in der Lage mit dem Kupfer einen Farbkomplex zu bilden, dessen Extinktion photometrisch bei 550 nm bestimmt werden kann. Für die Quantifizierung von Proteinen wird als Referenz eine Standardkurve mit BSA erstellt, aus der dann die jeweiligen Proteinkonzentration im zu analysierenden Zellysat errechnet werden kann.

Zur Erstellung des Proteinstandards wurde eine Ansatz von 50 µl BSA Stammlösung (1mg/ml) zunächst mit 950 µl ddH₂O und anschließend im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Konzentrationen (µg/ml): 0 - 3,125 - 6,25 - 12,5 – 25 - 50

Für die Proteinquantifizierung (Standard und Proben in Doppelbestimmung) wurden die zu quantifizierenden Proteine im Verhältnis 1:200 mit ddH₂O verdünnt und je 100 µl Protein oder Standard in jeweils ein Well einer 96-Well Platte pipettiert. Nun wurden

jeweils 100 µl BCA Indikatorlösung in jedes Well gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 60°C, erfolgte eine Messung der Extinktion bei 550 nm. Anschließend wurden aus den ermittelten Werten die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Proben errechnet.

3.2.6.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE erfolgte in allen Versuchen in einem Tris-Glycin Lauf-Puffer (siehe Tabelle 2, Seite 39). Als Referenz für die Proteingröße wurde bei jeder PAGE ein Molekulargewichtsmarker verwendet.

Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten und Halterungen mit destilliertem Wasser bzw. absolutem Alkohol und dem Aufbau der Tracer-Apparatur, wurde zunächst das Acrylamid-Trenngel in der jeweils erforderlichen Konzentration (Angaben siehe Tabelle 2 Seite 39) mit einer 1000 µl Pipette zwischen die Glasplatten pipettiert. Zur Vermeidung von Luftblasen und zum Schutz vor zu starker Austrocknung wurden wenige Tropfen Isopropanolol auf das Trenngel aufgeschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von ca. 30 Minuten (bei Raumtemperatur) wurde zunächst das Isopropanolol vorsichtig abpipettiert und dann das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zur Vordefinition der Geltaschen wurden Kämmen in das Sammelgel eingefügt. Die Aushärtung der Gele erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 4°C.

Vor der Elektrophorese war eine Denaturierung des Proteins erforderlich. Das Lysat wurde dazu mit 5 x Lämmli-Puffer und Lysepuffer zu einem Gesamtvolumen von 30 µl/Probe vermischt, dann erfolgte eine Inkubation der Proben für 5 Min. bei 95°C, anschließend wurde das Protein vor der Verwendung für 1 Min. auf Eis gestellt.

Vor Durchführung der Elektrophorese wurden die Kämmen aus den Gelen entfernt und die Taschen des Sammelgels vorsichtig mit dem Laufpuffer gespült. Die vorbereiteten Proteinproben wurden (jeweils in einem Volumen von 26 µl) in die vorgesehenen Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese gestartet (Versuchsbedingungen siehe Tabelle 3, Seite 46)

3.2.6.4 Transfer und Entwicklung

Nach einer Aktivierung der PVDF-Membranen für 15 Sekunden in Methanol (bei Nitrocellulosemembranen war dies nicht erforderlich), wurden die Membranen, sowie Schwämme und Filterpapier für 5 Minuten im kaltem Transferpuffer equilibriert. Dann wurden die sog. Gel-Membran-Sandwiches (bestehend aus Schwamm-Filterpapier-Gel-Membran-Filterpapier-Schwamm) zusammengebaut, in den Gel-Blot Tank eingesetzt und der Transferpuffer bis zur halben Höhe des Behälters angegossen. Der Transfer des Proteins aus dem Gel auf die Membran, erfolgte zu den für das gesuchte Protein erforderlichen Bedingungen (siehe Tabelle 3, Seite 46). Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Entfernung evtl. vorhandener Gelreste 1 Minute in TBST gespült, dann in der jeweiligen Blockierungslösung (siehe Tabelle 3, Seite 46) inkubiert und anschließend für 3 Minuten in TBST gespült. Nun erfolgte eine Inkubation im Primärantikörper (Verdünnung siehe Tabelle 3, Seite 46 über Nacht, bei 4°C auf einer rotierenden Platte. Nach weiteren Waschschritten wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur im Sekundärantikörper inkubiert und erneut mit TBST gewaschen (siehe Tabelle 3, Seite 39). In der Zwischenzeit wurden beide Reagentien des ECL-Kits im Verhältnis 1:1 gemischt und dann die Membranen für 5 Min. (in einem lichtgeschützten Behälter) in der ECL-Lösung inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte zwischen zwei durchsichtige Folien mit dem PeqLab Fusion SL 4.2 und der PeqLab CAP Analysesoftware.

Targetprotein	BAX (20 KDa)	BCL-2 (26 KDa)	c-Flip _{L/s} (55 und 29 KDa)
Proteinkonzentration	100 µg	150 µg	50 µg
Gelkonzentration	12 %	14 %	12 %
PAGE	15 Min. bei 80 V 75 Min. bei 120 V	15 Min. bei 80 V 75 Min. bei 120 V	120 Min. bei 80 V
Transfer	55 V/ 1 h	25 V/ 2 h	100 V/ 1 h
Blockierung	2 % Milchpulver/TBS 1h	2% Top Blot/ TBS 1h	3% Milchpulver/TBS 1h
Waschschritte	3 x 10 Min. in TBST	3 x 10 Min. in TBST	3 x 10 Min. in TBST
Primärantikörper Verdünnung des Primärantikörpers in 5 % BSA/+0,02 % NaAzid /TBST	1:1000	1:500	1:1000
Waschschritte	3 x 5 Min. in TBS	3 x 5 Min. in TBS	1 x 7 Min. TBST 2 x 5 Min. TBS
Sekundärantikörper Ansatz des Sekundärantikörpers (1:1000) in Lumi Light Blocking Reagent (1%): 0,2 g Lumi Light in 20 ml TBS + 20 µl Sekundärantikörper	1: 1000 1 h Inkubation	1:1000 1 h Inkubation	1:1000 1 h Inkubation
Waschschritte	3 x 5 Min. in TBST	3 x 5 Min. in TBST	3 x 5 Min. in TBST

Tabelle 3 : Übersicht über die Versuchsbedingungen für den Western Blot

3.3 Statistische Methoden und Software

3.3.1 Statistik

Die Ergebnisse von Zellzählung, Viabilitätsbestimmung und Casapase-3/7-Aktivität wurden mit dem Students t-Test für normalverteilte Werte ausgewertet. Angegeben ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Ergebnisse der Caspase 3/7-Assays wurden ergänzend in der Box-Plot Graphik dargestellt.

Als signifikant wurden alle Werte mit $p < 0,05$ definiert.

3.3.2 Software

Microsoft Office Word for Mac 2008, Excel 2008, Microsoft Corp. (USA)

Adobe Photoshop CS, Adobe System Inc. (USA)

PeqLab, CAP, Steuerungs und Analysesoftware

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchung des Einflusses von Taurolidin auf Viabilität und Proliferation unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien

Im ersten Versuchsteil sollte zunächst die Frage beantwortet werden, inwieweit der, bereits für andere Tumorzellen beschriebene, anti-neoplastische Effekt des Taurolidins bei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien (HPAF-2, AsPC-1 und DSL-6AC1) reproduzierbar ist. Zunächst wurde die Beeinflussung von Viabilität und Proliferation der Tumorzellen, durch eine Behandlung mit Taurolidin in Monoapplikation untersucht. Alle Tumorzellen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit Taurolidin in verschiedenen Verdünnungsstufen (2-20-100-2000 μ M) inkubiert. Als Stock Solution diente Taurolidin in handelsüblicher Lösung (2% Taurolidin in Povidon). Die weiteren Verdünnungen erfolgten mit dem für die Subkultivierung der jeweiligen Zelllinie erforderlichen normalen Nährmedium.

Die Ergebnisse der Versuche sind in Balkendiagrammen, jeweils in prozentualer Relation zur Negativkontrolle dargestellt. Als Negativkontrollen wurden Viabilität- bzw. Proliferation unbehandelter Zellen, nach einer 72-stündigen Inkubation in Normalmedium ermittelt. Alle Testreihen wurden in 9-facher Wiederholung durchgeführt (n=9). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus den 9 Versuchen.

Bei allen untersuchten Zelllinien zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung von Viabilität und Proliferation nach Monoinkubation mit Taurolidin. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse zeigt zudem, dass die Behandlung mit Taurolidin als Einzelsubstanz, bei allen hier untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zu einer stärkeren Beeinflussung der Zellproliferation als der Viabilität führte.

4.1.1 Die Viabilität von HPAF-2, AspC-1 und DSL-6AC1 nach Inkubation mit Taurolidin als Monosubstanz

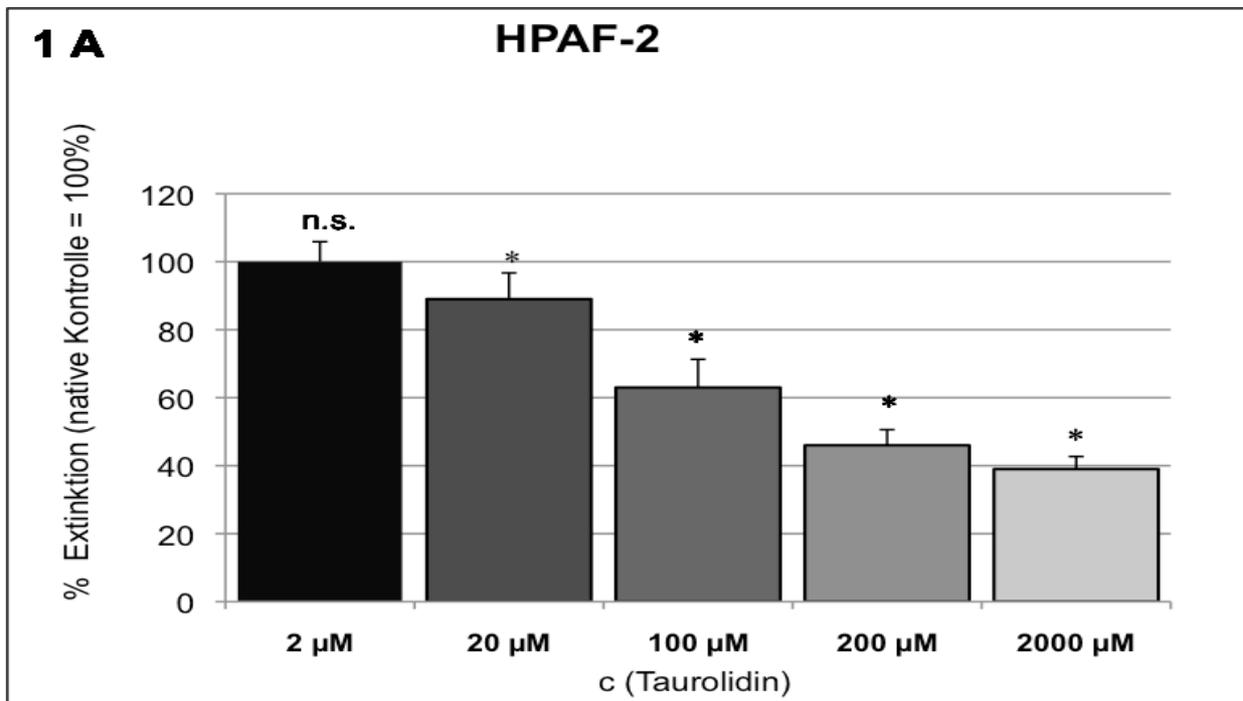


Abbildung 1 A: Ergebnisse des MTT-Assays zur Bestimmung der Zellviabilität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 (gut-mittelgradig differenziert) nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Taurolidin-Konzentrationen dargestellt. n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle

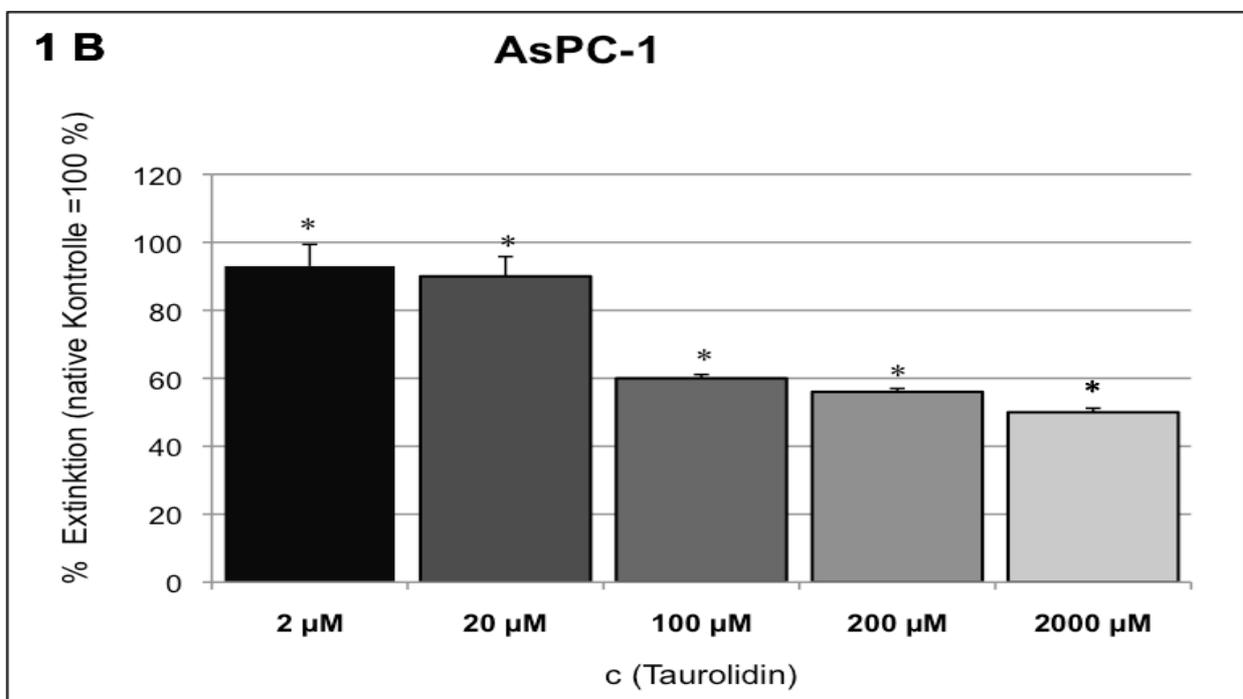


Abbildung 1 B: Ergebnisse des MTT-Assays zur Bestimmung der Zellviabilität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 (schlecht differenziert) nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Taurolidin-Konzentrationen dargestellt. n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle

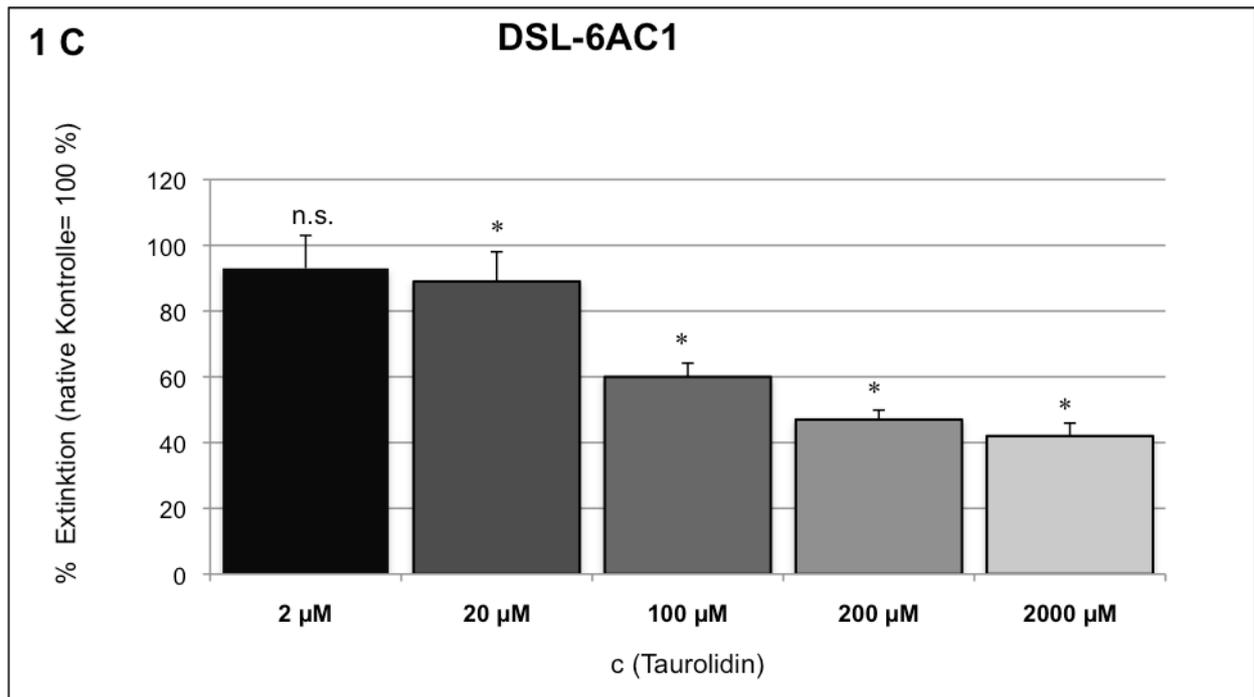


Abbildung 1 C: Ergebnisse des MTT-Assays zur Bestimmung der Zellviabilität der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin. Auf der Abszisse sind die unterschiedlichen Taurolidin-Konzentrationen dargestellt. n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle

4.1.1 Die Proliferation von HPAF-2, AspC-1 und DSL- 6AC1 nach Inkubation mit Taurolidin als Monosubstanz

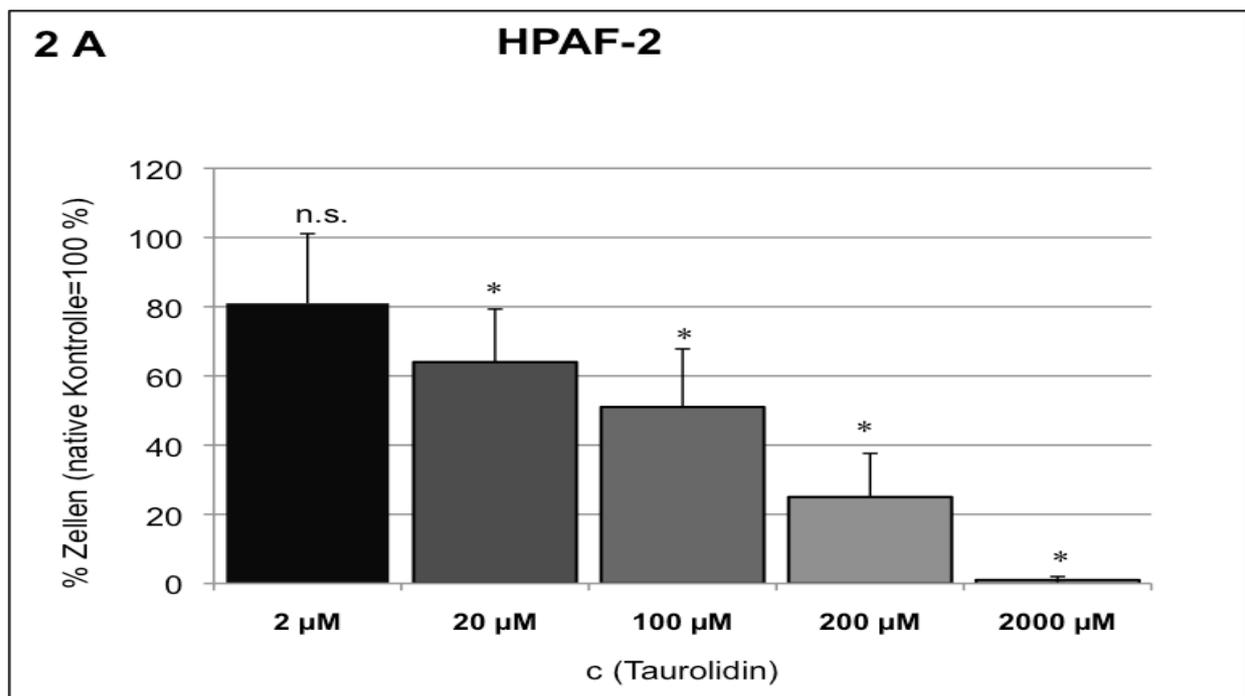


Abbildung 2 A: Ergebnisse der Zellzählung zur Ermittlung der Proliferation der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 nach einer 72-stündigen Inkubation mit Taurolidin. Die unterschiedlichen Taurolidin-Konzentrationen sind auf der Abszisse dargestellt. n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle

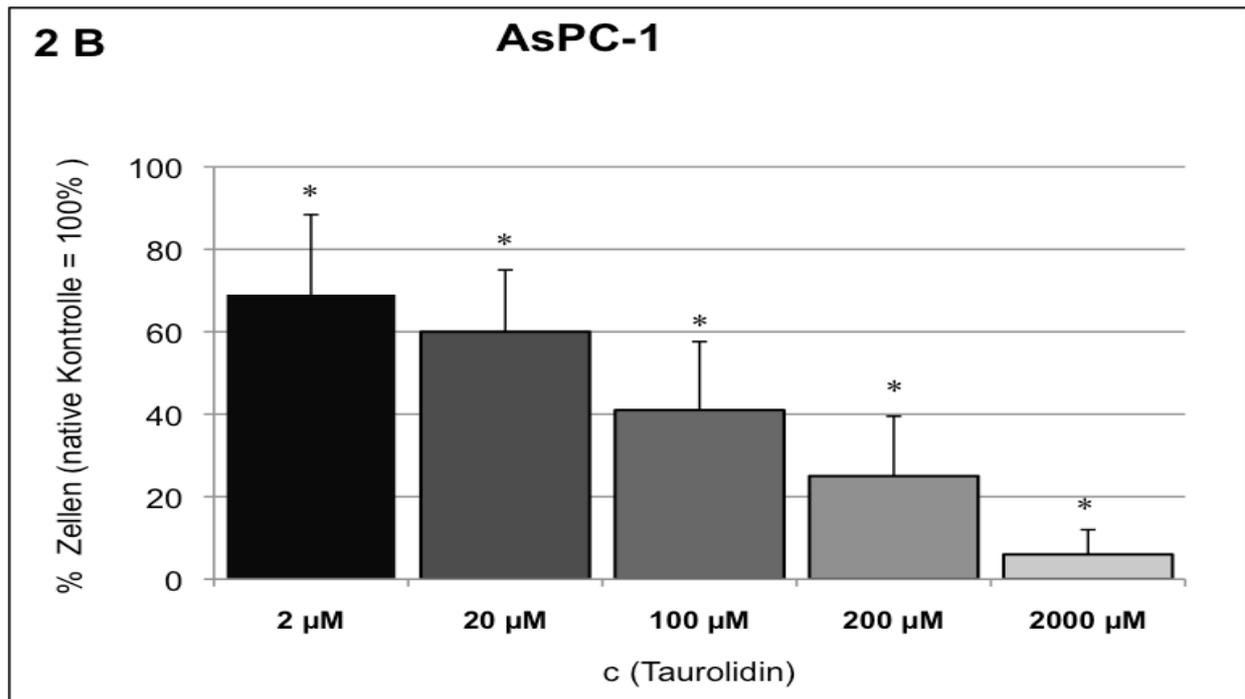


Abbildung 2 B: Ergebnisse der Zellzählung zur Ermittlung der Proliferation der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin. Die unterschiedlichen Taurolidin-Konzentrationen sind auf der Abszisse dargestellt. n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle

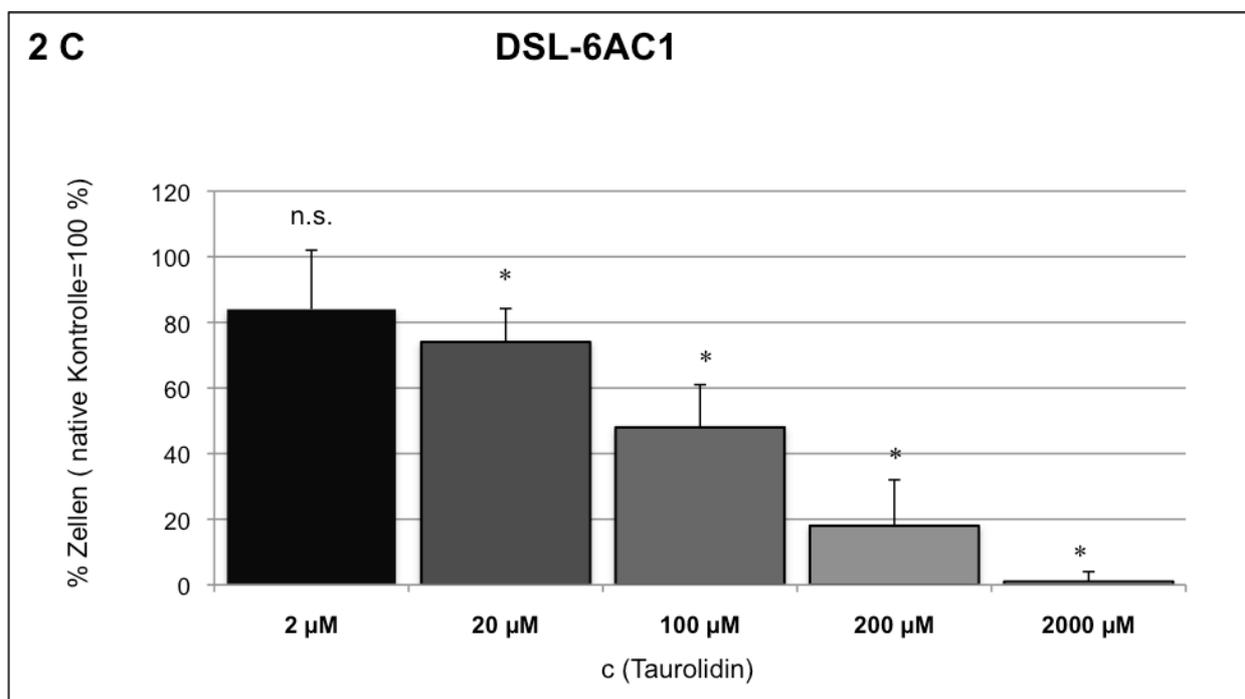
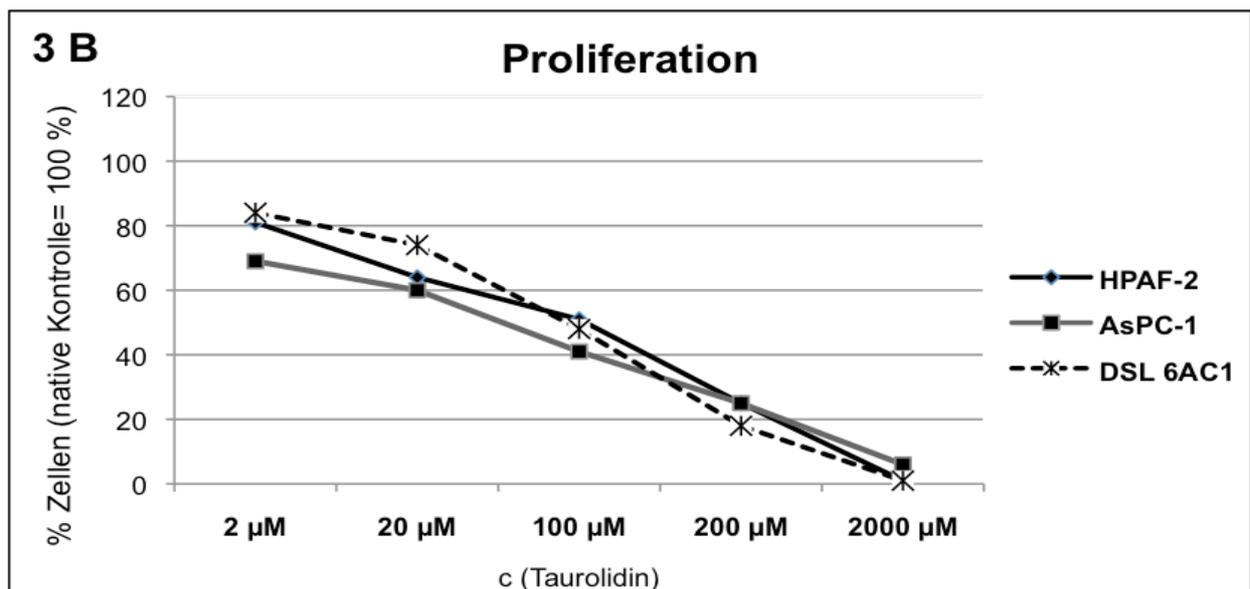
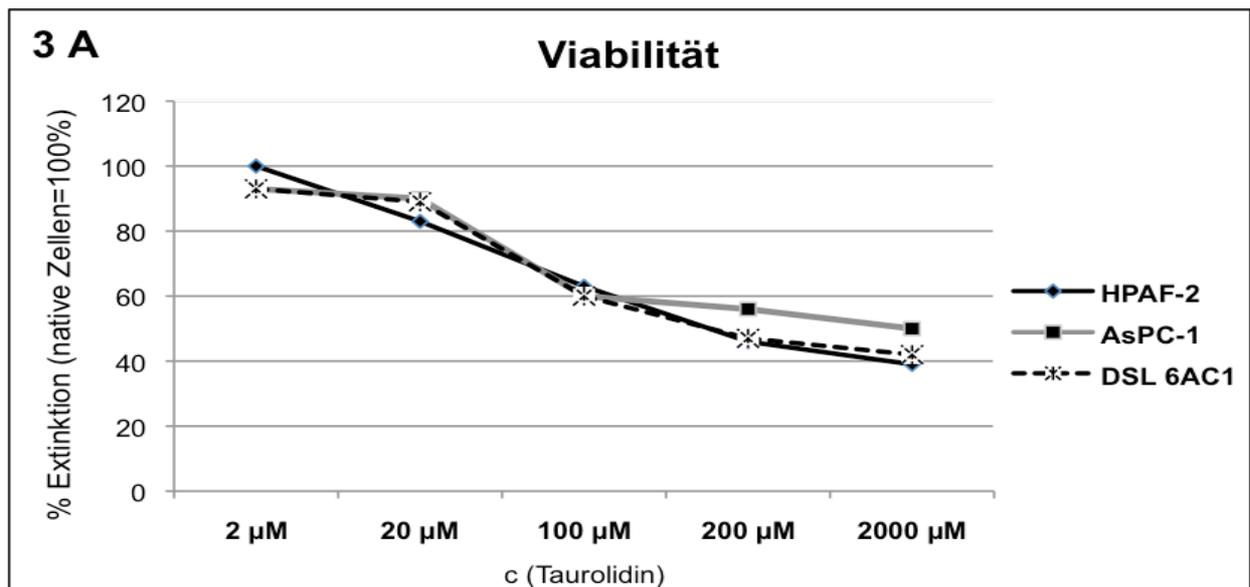


Abbildung 2 C: Ergebnisse der Zellzählung zur Ermittlung der Proliferation der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin. Die unterschiedlichen Taurolidin-Konzentrationen sind auf der Abszisse dargestellt. n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle

4.1.3 Vergleich des Effekts von Taurolidin auf Viabilität und Proliferation unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien

Im Vergleich der Ergebnisse zeigte sich bei der schlecht-differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 der hemmende Effekt von Taurolidin (in Konzentrationen > 100 µM) hinsichtlich der Viabilität tendenziell schwächer ausgeprägt, als bei den Tumorzelllinien HPAF-2, DSL-6AC1.



Abbildungen 3 A und 3 B: Ergebnisse zur Ermittlung von Viabilität (Abbildung 3 A) und Proliferation (Abbildung 3 B) der Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2, AsPC-1 und DSL 6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die unterschiedlichen Taurolidin-Konzentrationen sind auf der Abszisse dargestellt.

n=9

4.2 Die Beeinflussung von Proliferation und Viabilität unterschiedlicher Pankreas-karzinomzellen durch Taurolidin in Kombination unterschiedlichen anti-neoplastischen Wirkstoffen

In diesem Versuchsteil wurde das Taurolidin jeweils mit Gemcitabine, Docetaxel oder Suramin kombiniert, drei anti-neoplastischen Substanzen, die sich hinsichtlich ihres Wirkmechanismus deutlich voneinander unterscheiden.

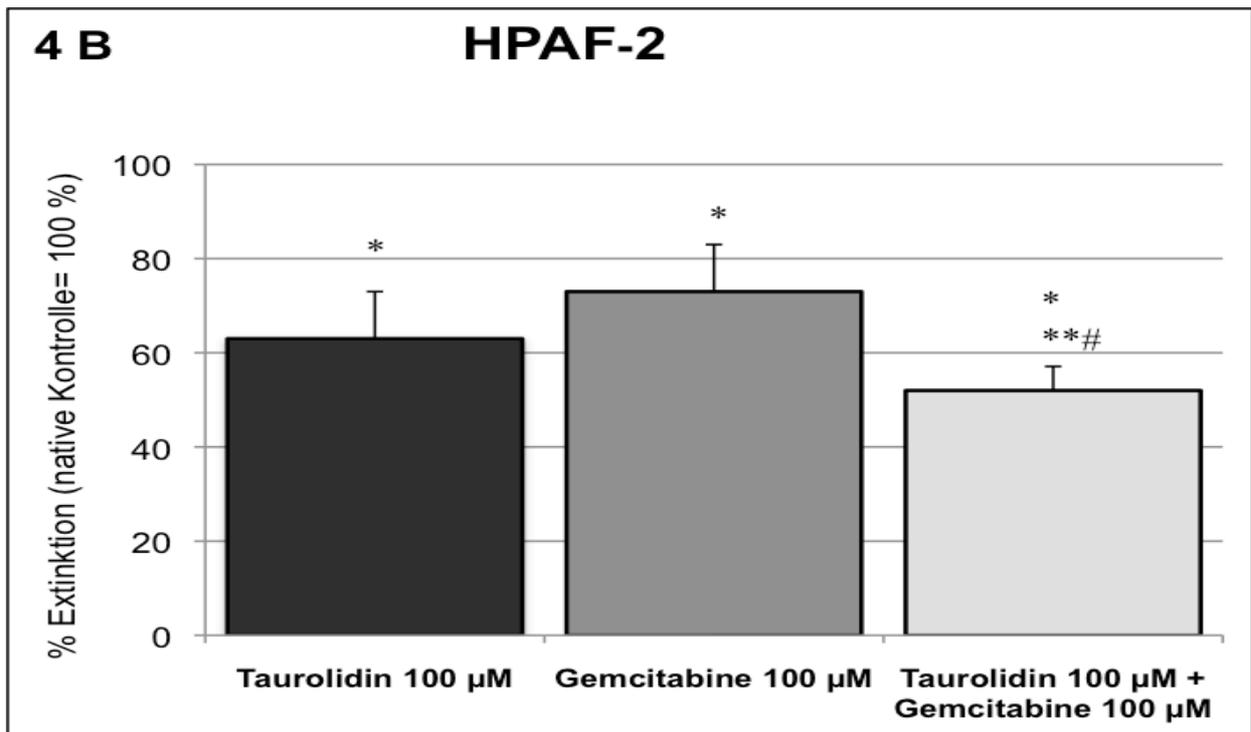
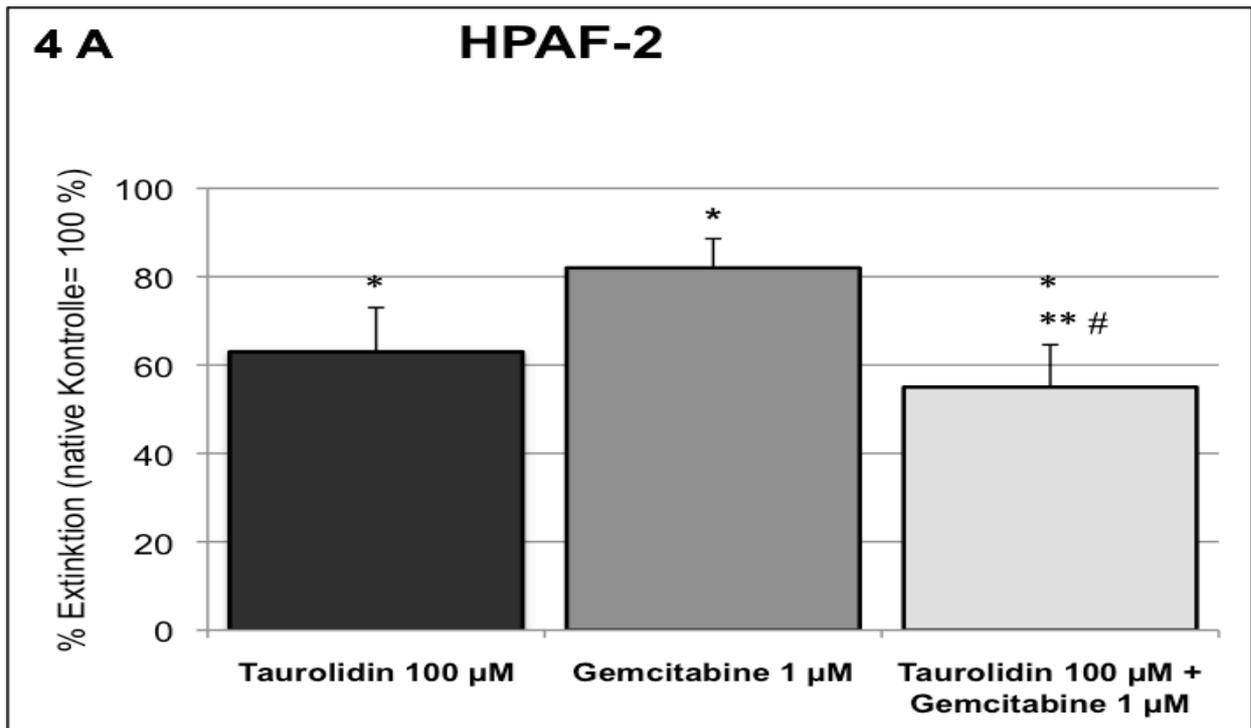
Analog zu den Versuchen mit Taurolidin als Einzelsubstanz (siehe 4.1 ff), wurden auch bei der Untersuchung der Kombinationstherapien jeweils Viabilität und Proliferation der Tumorzelllinien nach 72-stündiger Inkubationszeit mit der jeweiligen Kombination ermittelt. Nach Auswertung der Versuchsreihen mit Taurolidin als Einzelsubstanz, wurde entschieden, den Wirkstoff bei der Untersuchung der Kombinationstherapien jeweils in einer Konzentration von 100 μM einzusetzen. Gemcitabine, Docetaxel und Suramin sollten jeweils in zwei unterschiedlichen Dosierungen getestet werden.

4.2.1. Der Effekt einer kombinierten Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine auf Viabilität und Proliferation von HPAF-2, AsPC-1 und DSL 6AC1

Bei der Untersuchung der Beeinflussung von Viabilität und Proliferation wurde Gemcitabine bei den beiden humanen Zelllinien HPAF-2 und AsPC-1 in den Konzentrationen 1 μM und 100 μM mit Taurolidin (100 μM) kombiniert. Bei der murinen Zelllinie DSL 6AC1 wurde in einer weiteren Testreihe das Gemcitabine in einer Konzentration von 10 μM verwendet. Dies erwies sich als erforderlich, da nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine in höherer Konzentration (100 μM) keine Tumorzellen mehr auszählbar waren

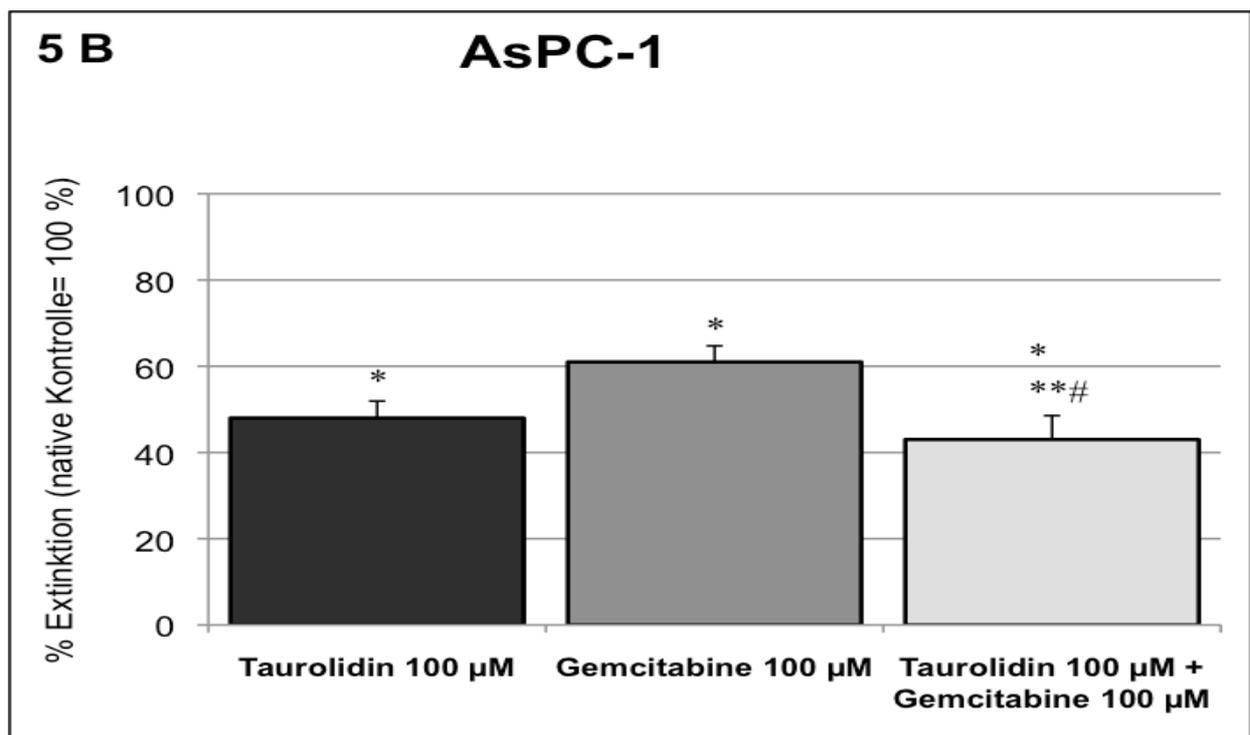
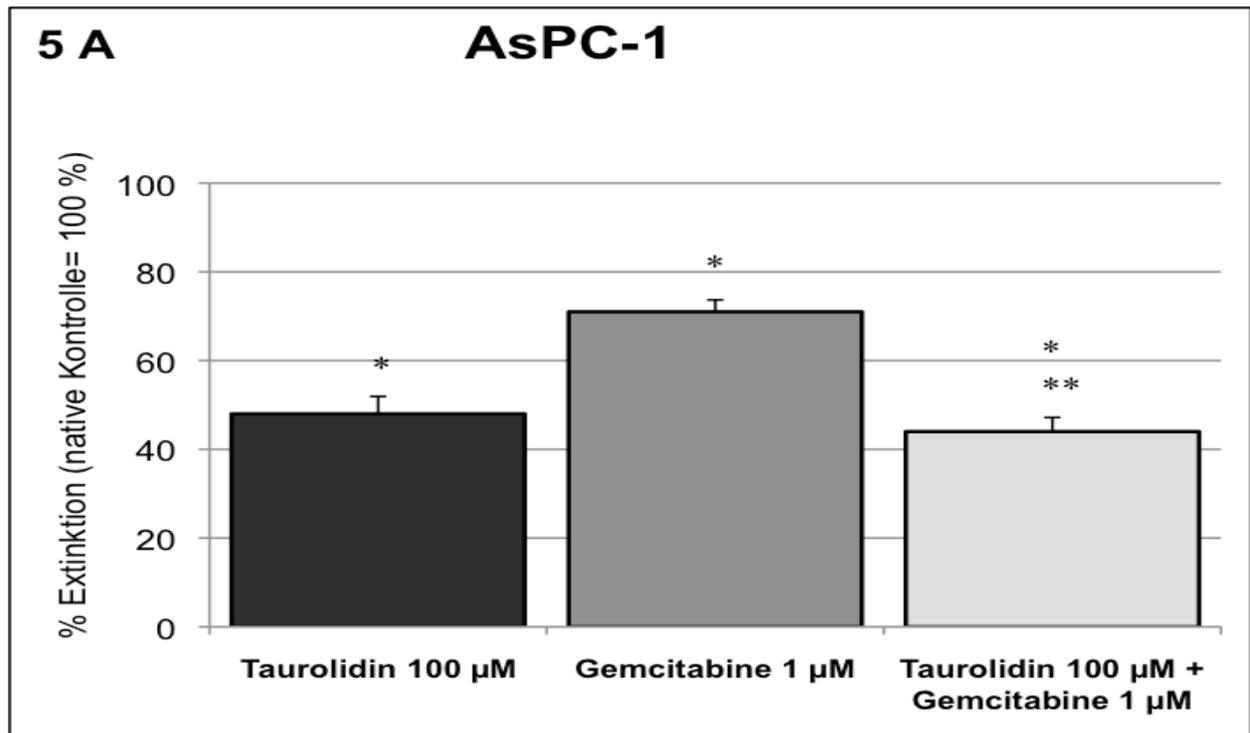
Wie bei der Untersuchung der Monotherapie mit Taurolidin, so hemmte auch die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine die Proliferation der Tumorzellen stärker als die Viabilität.

4.2.1.1 Zellviabilität nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine



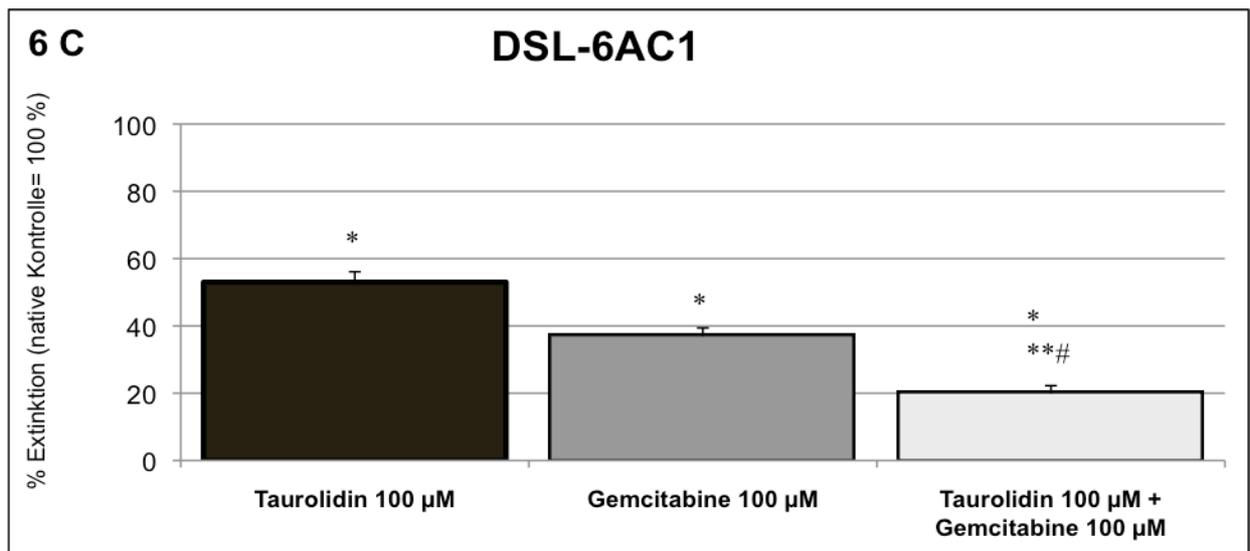
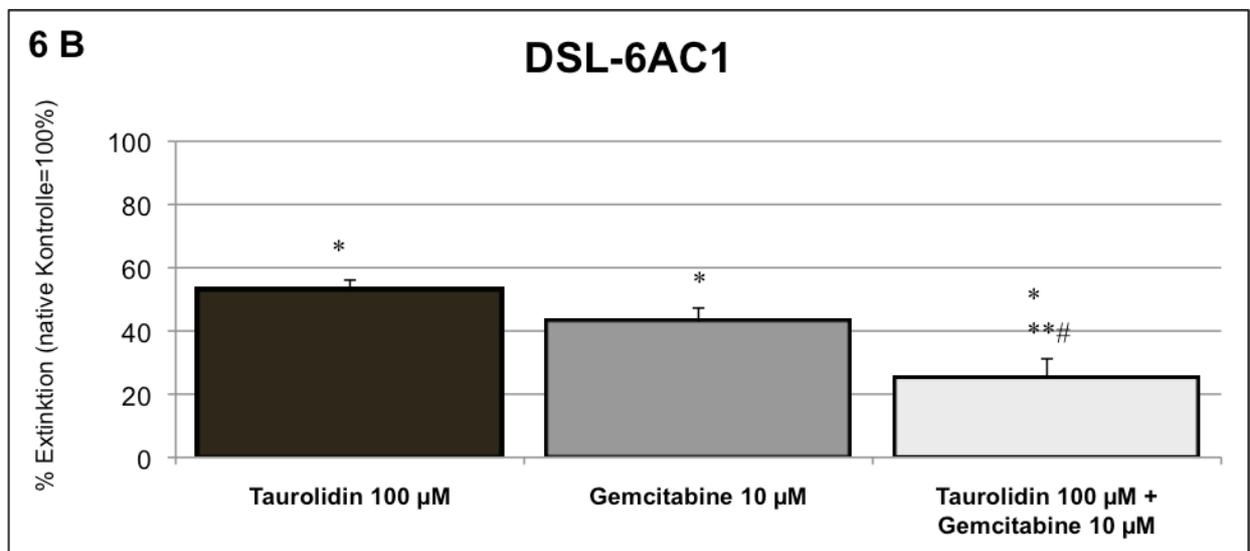
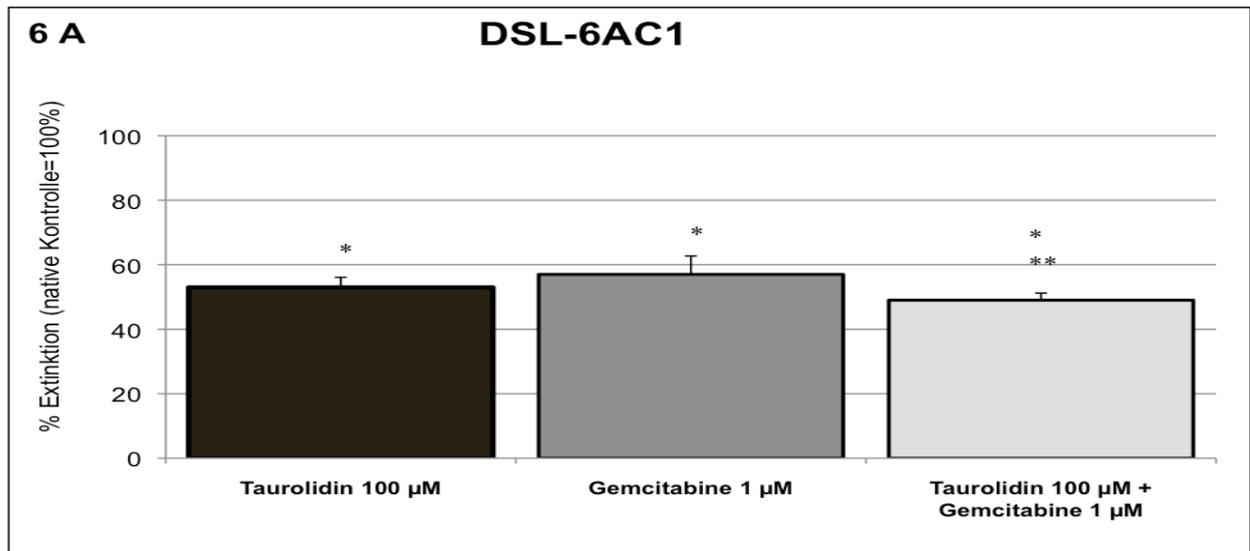
Abbildungen 4 A und 4 B: Viabilität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Gemcitabine (1 µM) (Abbildung A) und Gemcitabine (100 µM) (Abbildung B).

n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** = $p \leq 0,05$ vs. Gemcitabine, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin



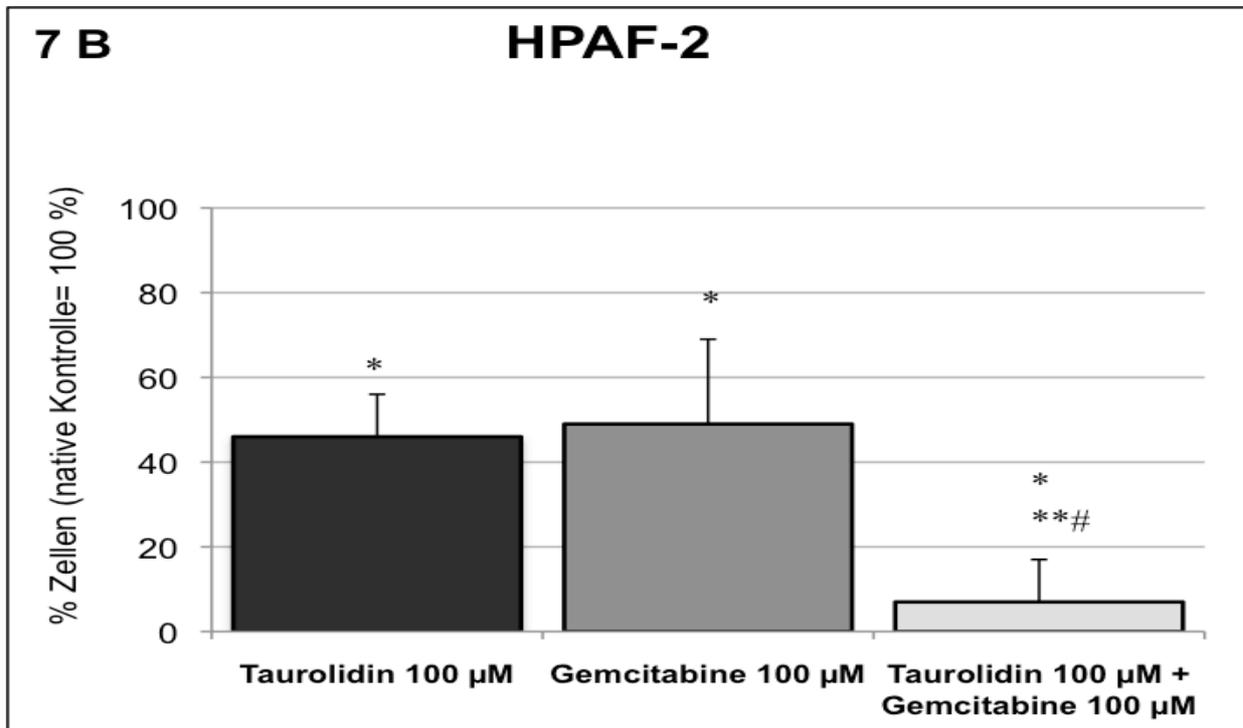
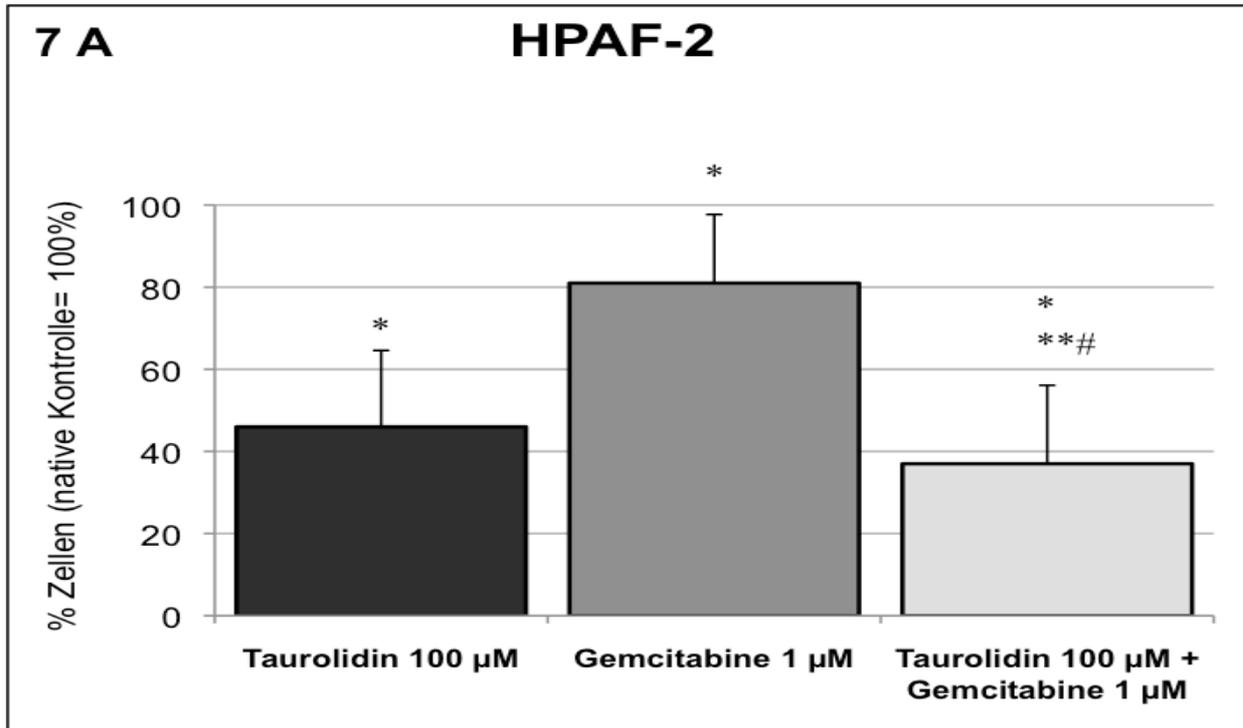
Abbildungen 5 A und 5 B: Viabilität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Gemcitabine (1 µM) (Abbildung A) bzw. Gemcitabine (100 µM) (Abbildung B).

n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** = $p \leq 0,05$ vs. Gemcitabine, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin



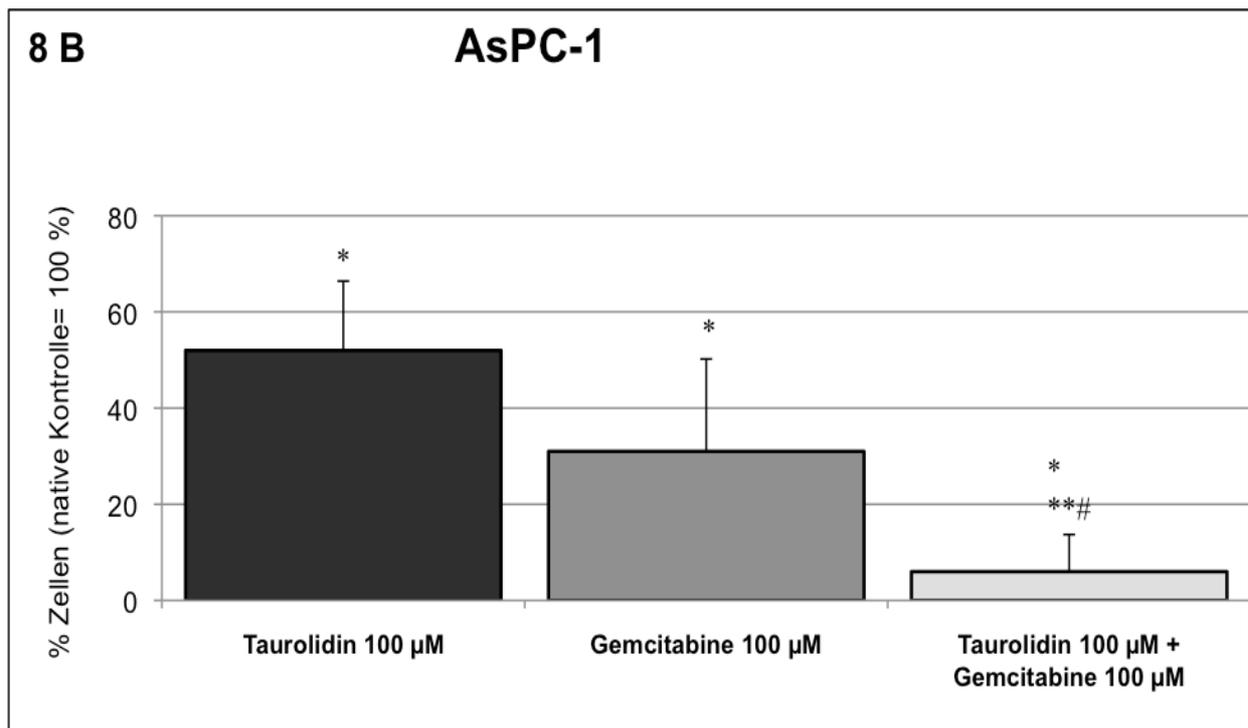
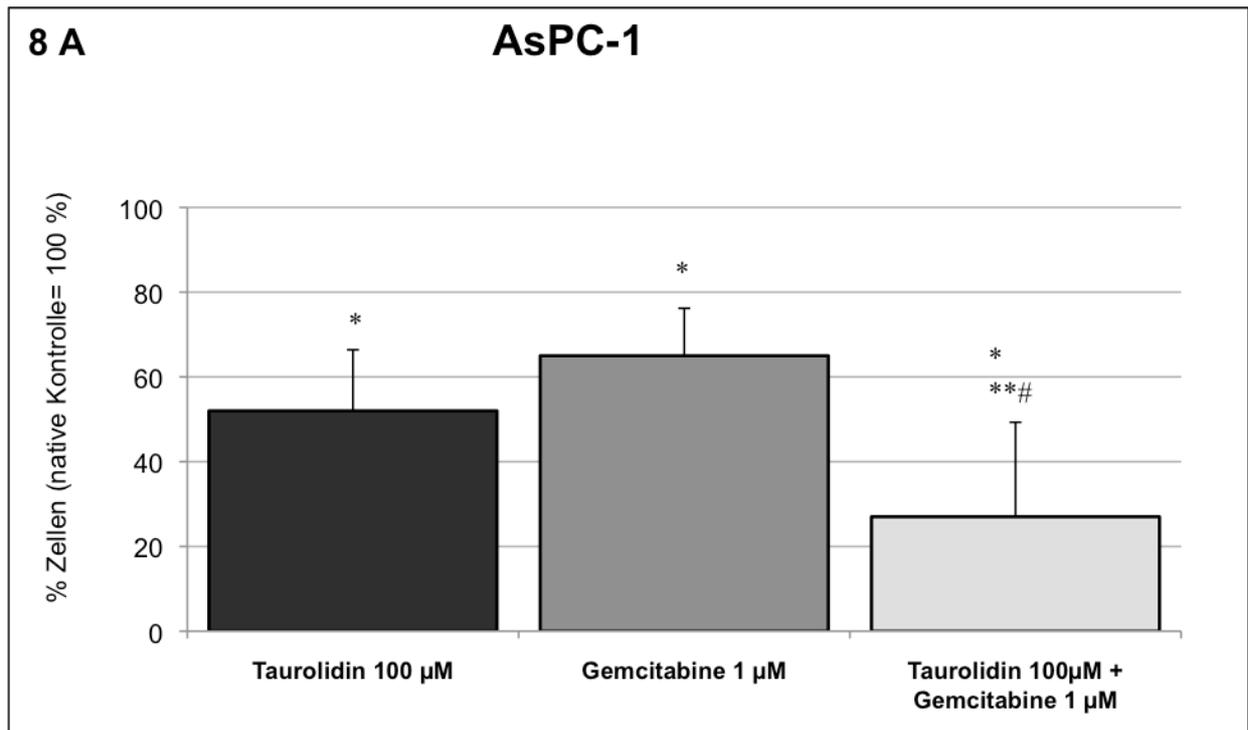
Abbildungen 6 A ,6B und 6C: Viabilität der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL 6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Gemcitabine (1 µM) (Abbildung A) und Gemcitabine (10 µM) (Abbildung B) bzw. Gemcitabine (100 µM) (Abbildung C) n=9, * = p ≤ 0,05 vs. Negativkontrolle, **≤ 0,05 vs. Gemcitabine, # = p ≤ 0,05 vs Taurolidin

4.2.1.2 Proliferation nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine

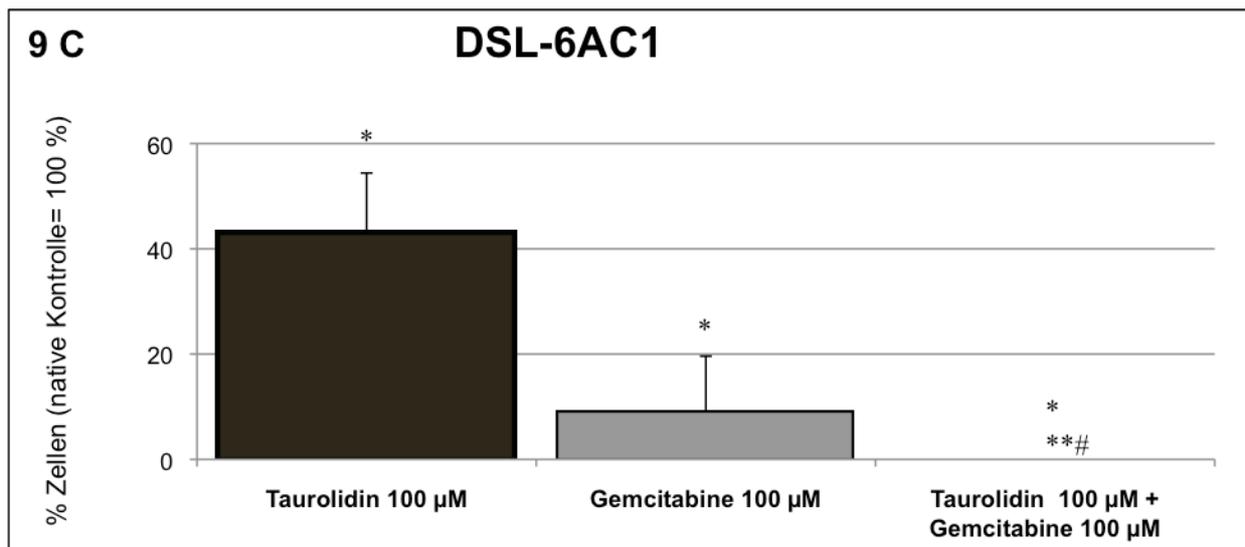
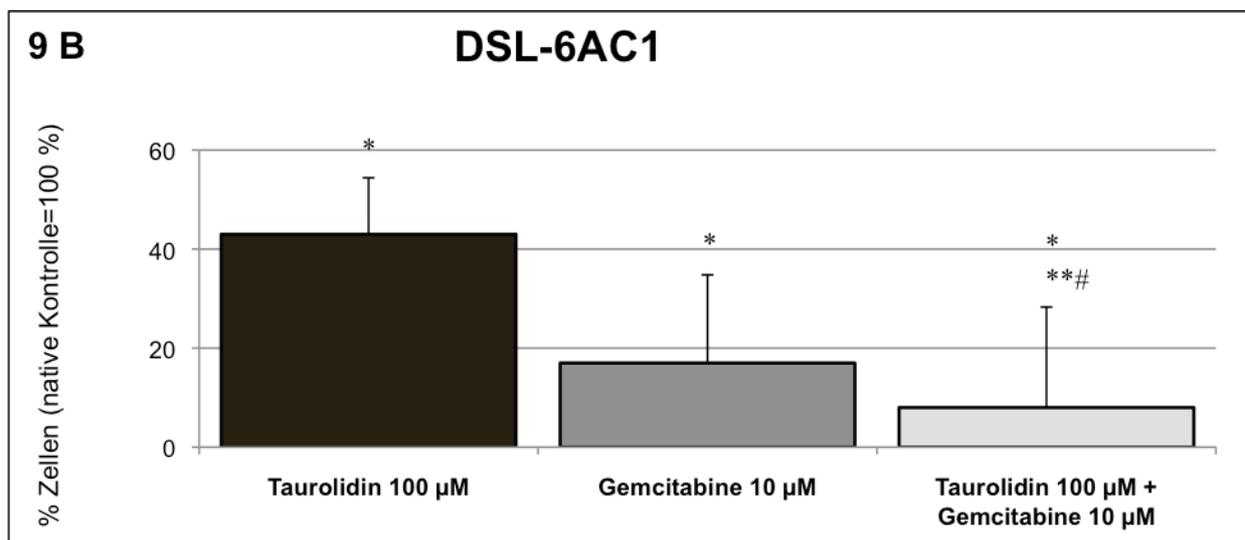
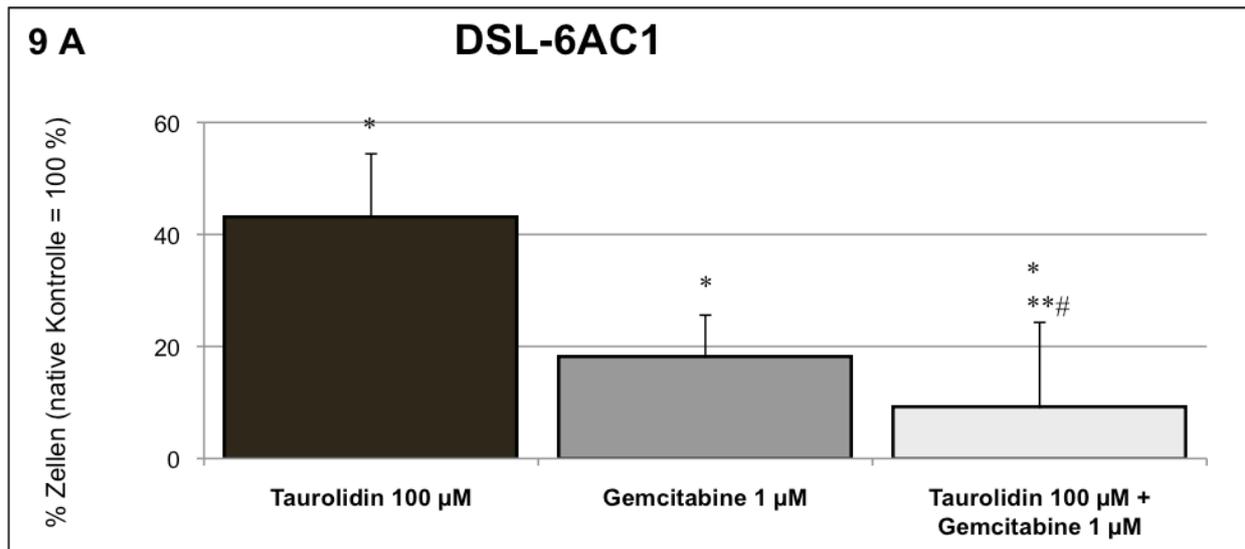


Abbildungen 7 A und 7 B: Proliferation der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2, nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Gemcitabine (1 µM) (Abbildung A) bzw. Gemcitabine (100 µM) (Abbildung B).

n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Gemcitabine, # = $p \leq 0,05$ vs Taurolidin



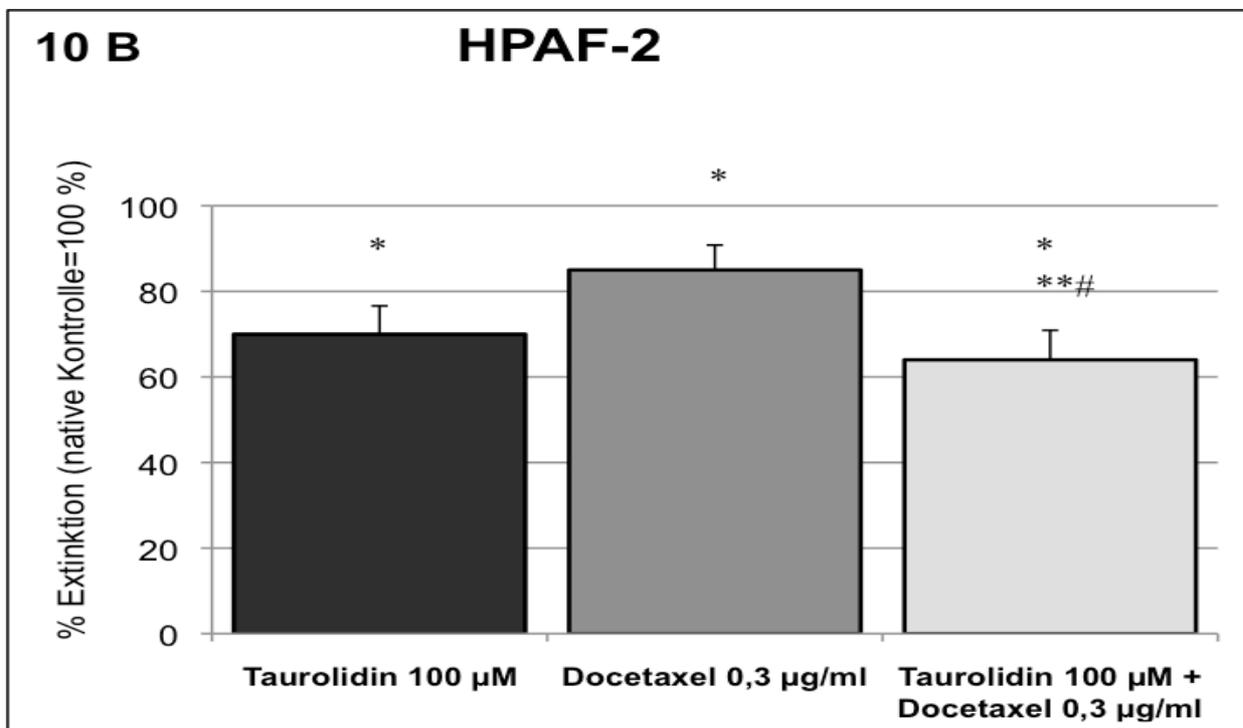
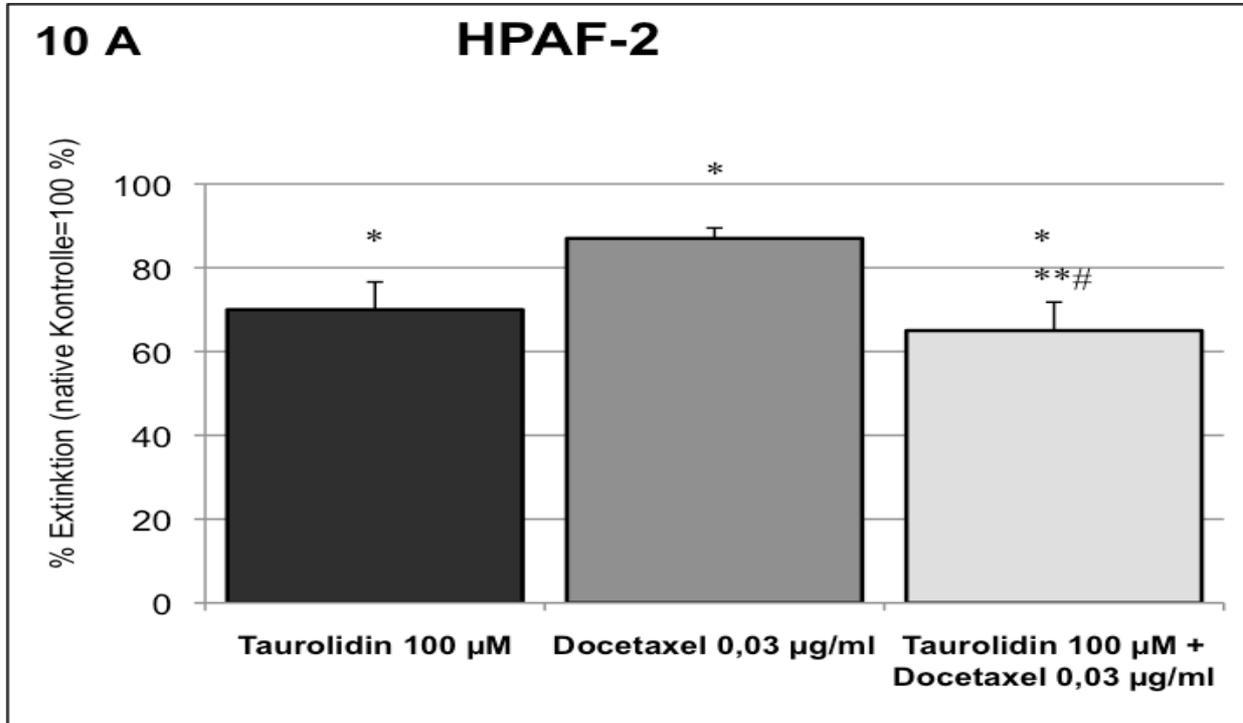
Abbildungen 8 A und 8 B: Proliferation der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Gemcitabine (1 µM) (Abbildung A) bzw. Gemcitabine (100 µM) (Abbildung B). n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Gemcitabine, # = $p \leq 0,05$ vs Taurolidin



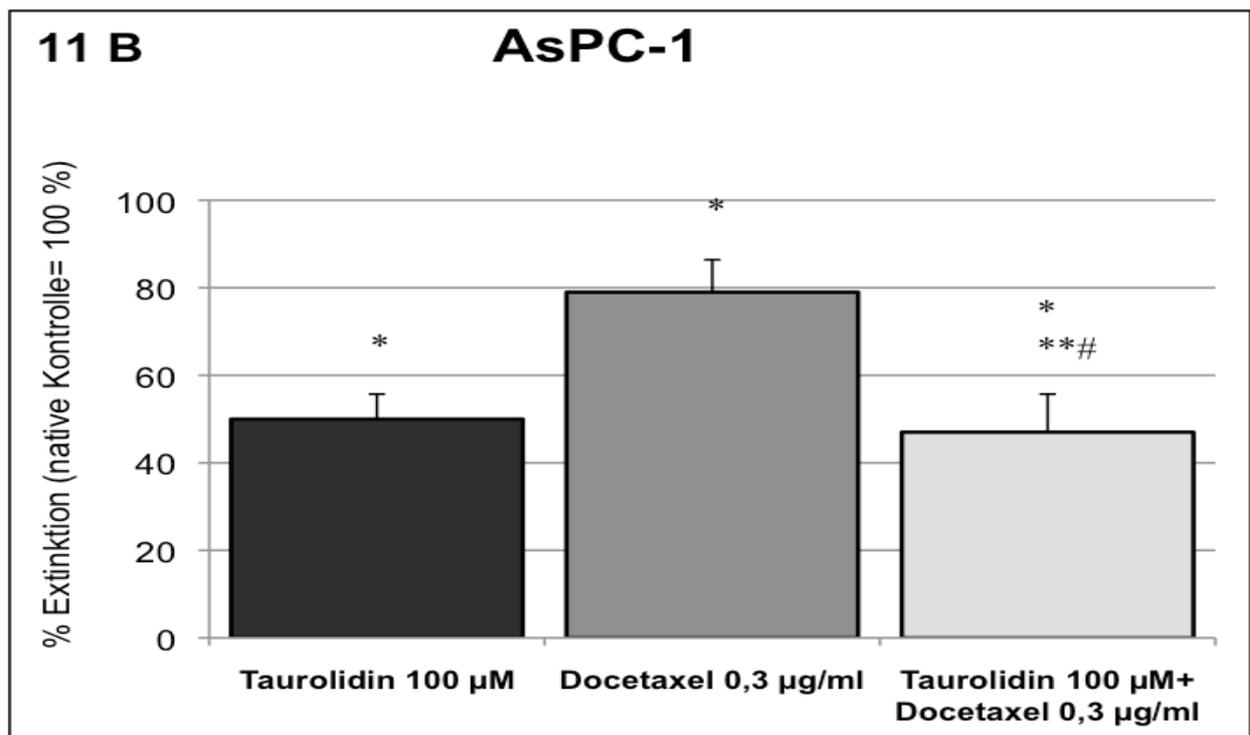
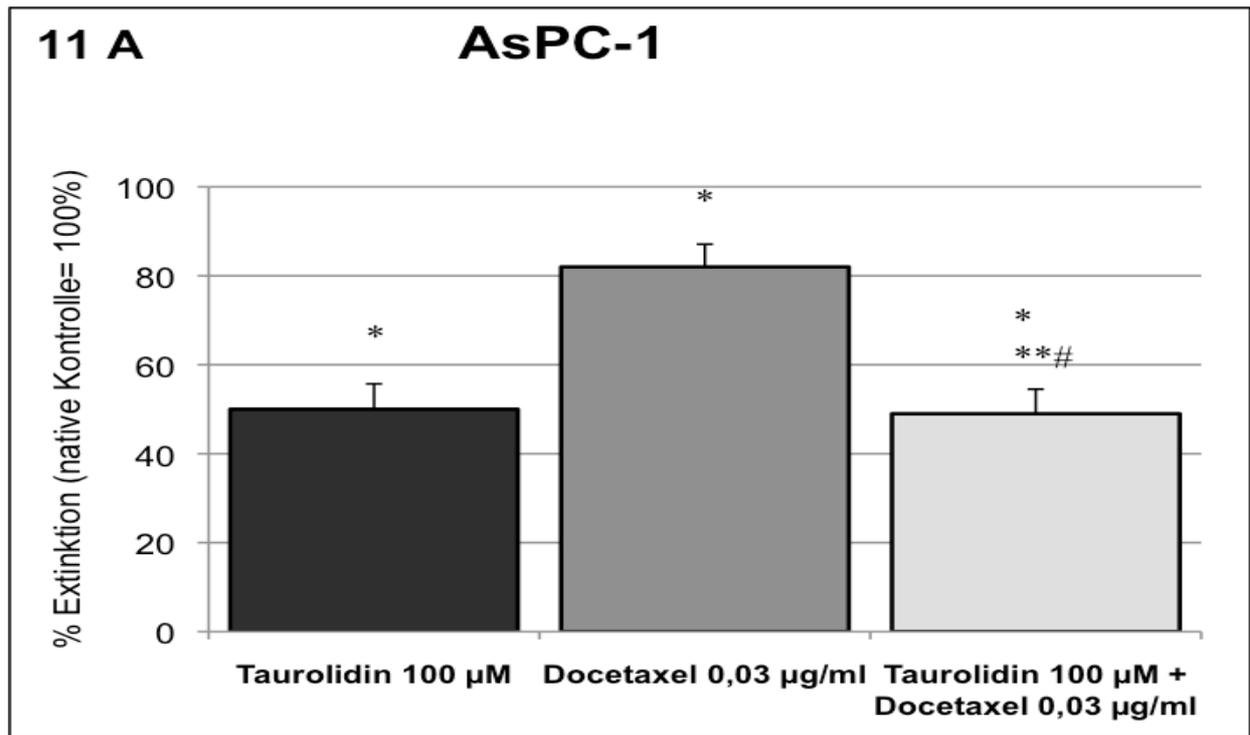
Abbildungen 9 A, 9 B und 9 C: Proliferation der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Gemcitabine 1 µM (Abbildung A), Gemcitabine 10µM (Abbildung 9 B) und Gemcitabine 100 µM (Abbildung 9 C)
 n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Gemcitabine, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin

4.2.2 Der Effekt einer Kombination von Taurolidin und Docetaxel auf Viabilität und Proliferation von HPAF-2, AsPC-1 und DSL-6AC1

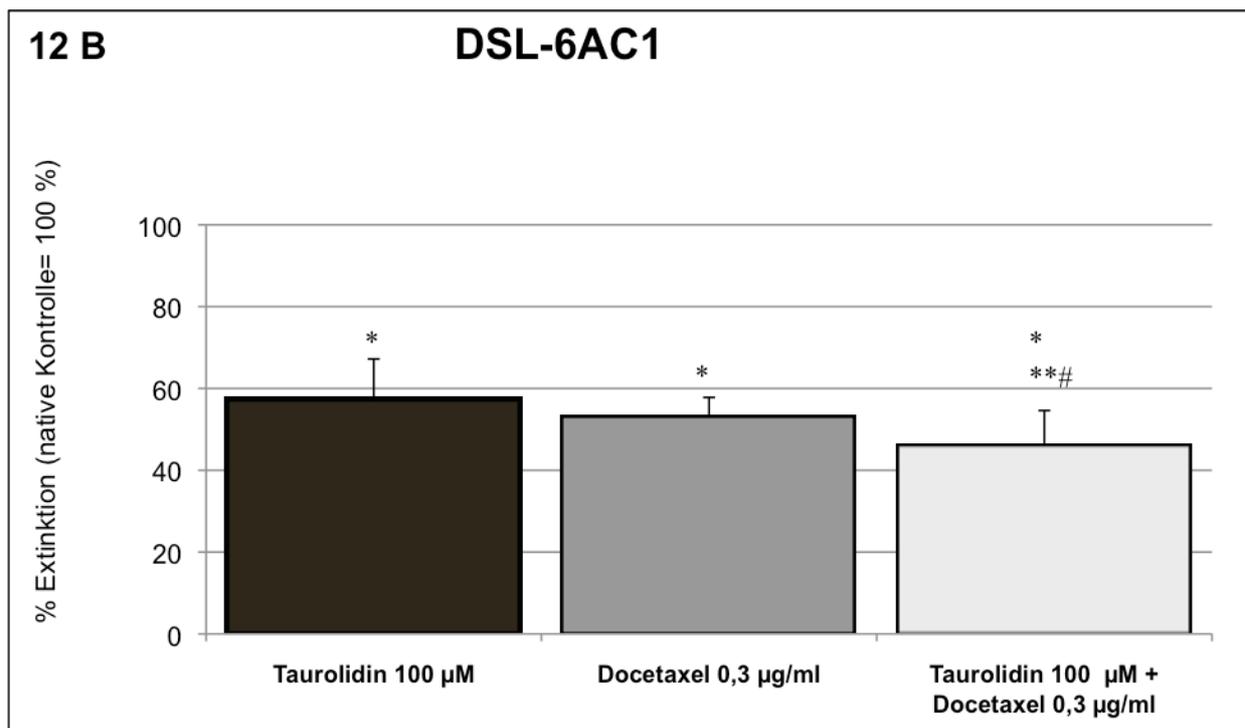
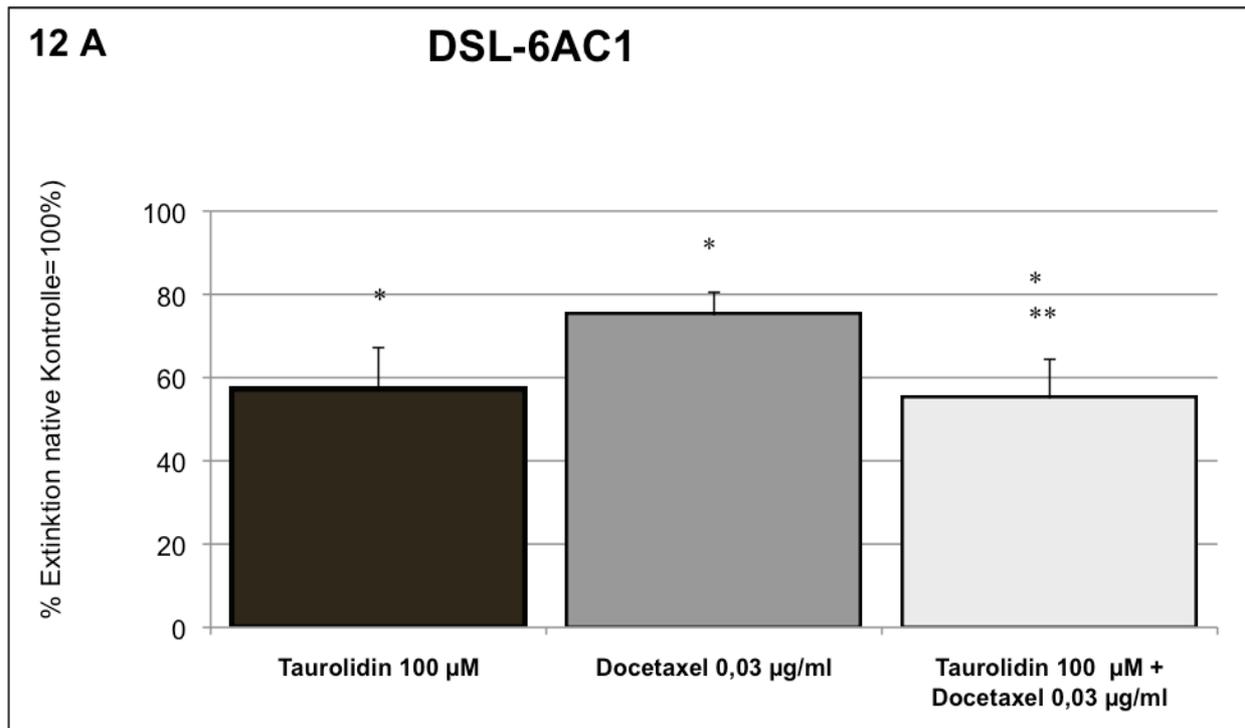
4.2.2.1 Zellviabilität nach Co-Inkubation mit Taurolin und Docetaxel



Abbildungen 10 A und 10 B: Viabilität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Docetaxel 0,03 mg/ml (Abbildung 10 A) bzw. Docetaxel 0,3 µg/ml (Abbildung 10 B). n=9, * = p ≤ 0,05 vs. Negativkontrolle, ** ≤ 0,05 vs. Negativkontrolle, # = p ≤ 0,05 vs. Taurolidin

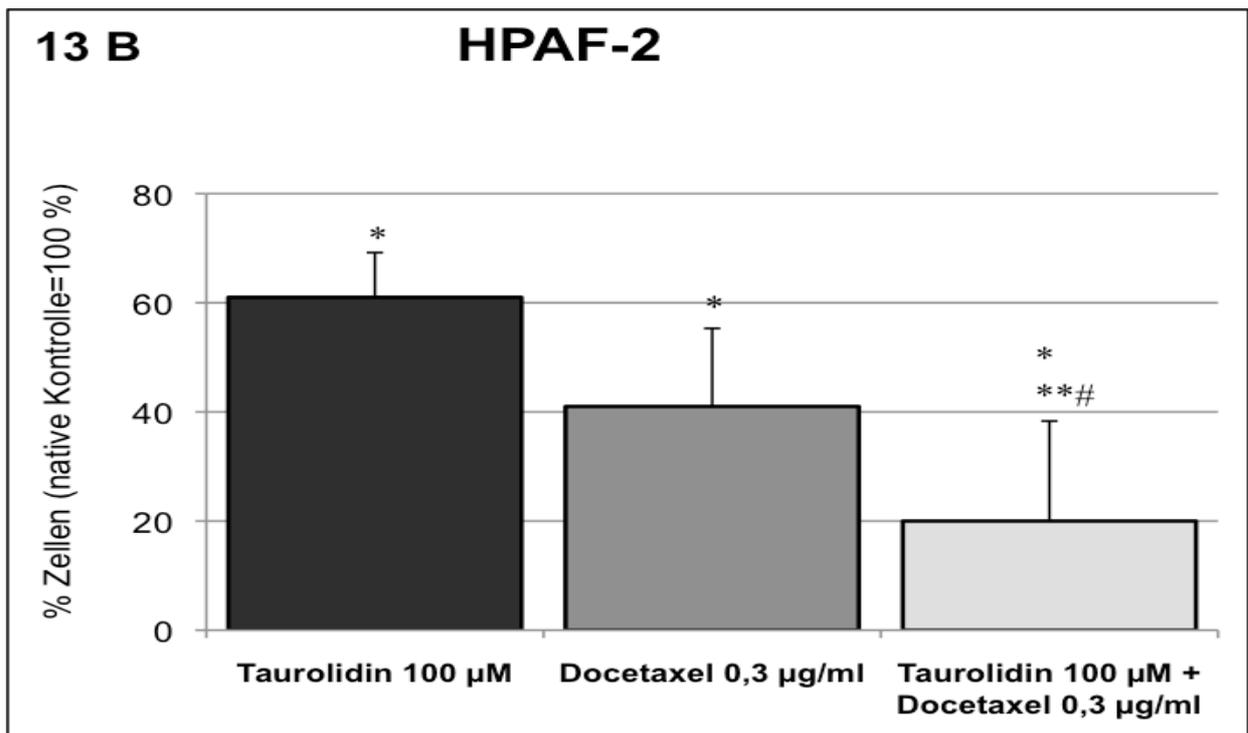
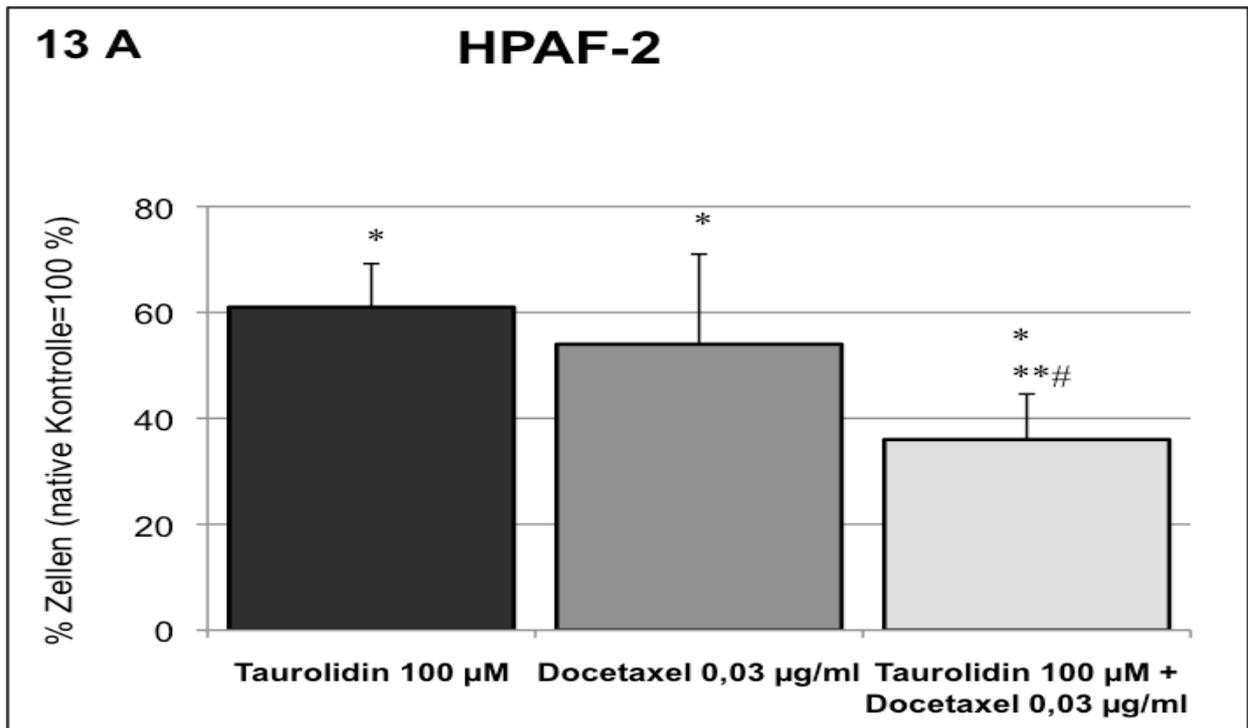


Abbildungen 11 A und 11 B: Viabilität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Docetaxel (0,03 mg/ml) (Abbildung 11 A) und Docetaxel (0,3 µg/ml) (Abbildung 11 B).
 n=9, * = p ≤ 0,05 vs. Negativkontrolle, ** ≤ 0,05 vs. Docetaxel, # = p ≤ 0,05 vs. Taurolidin

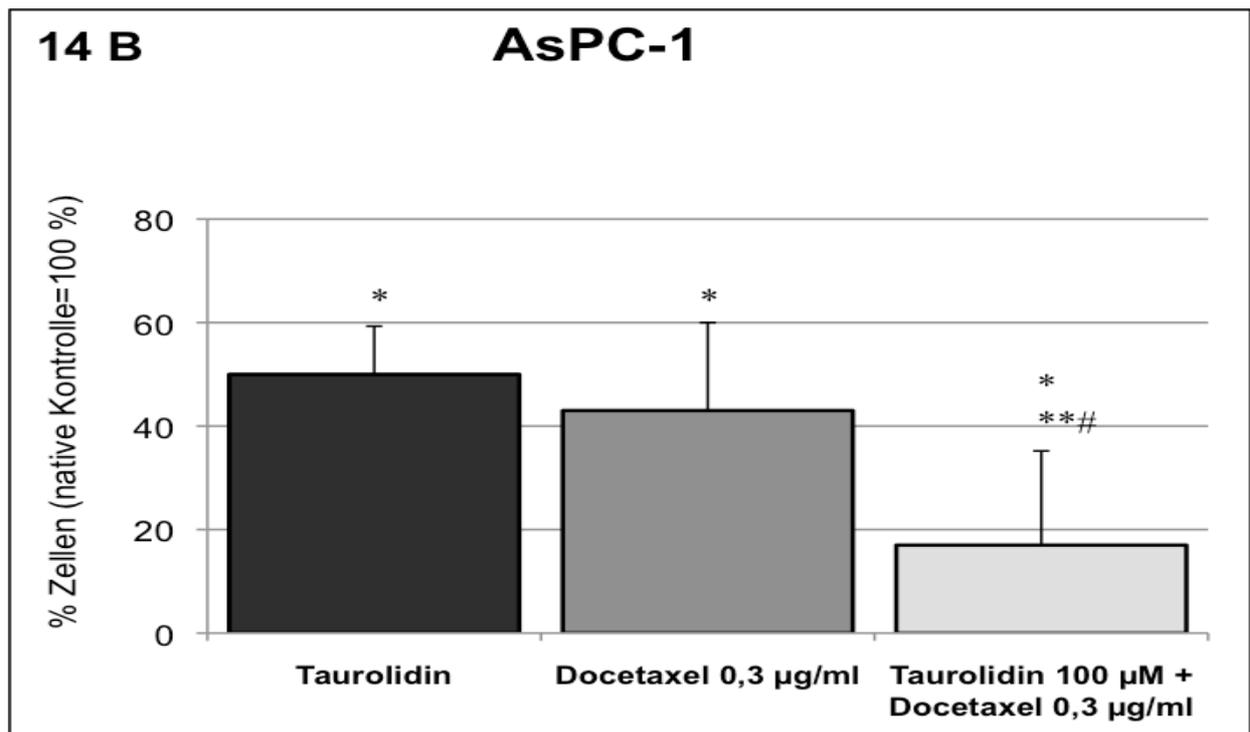
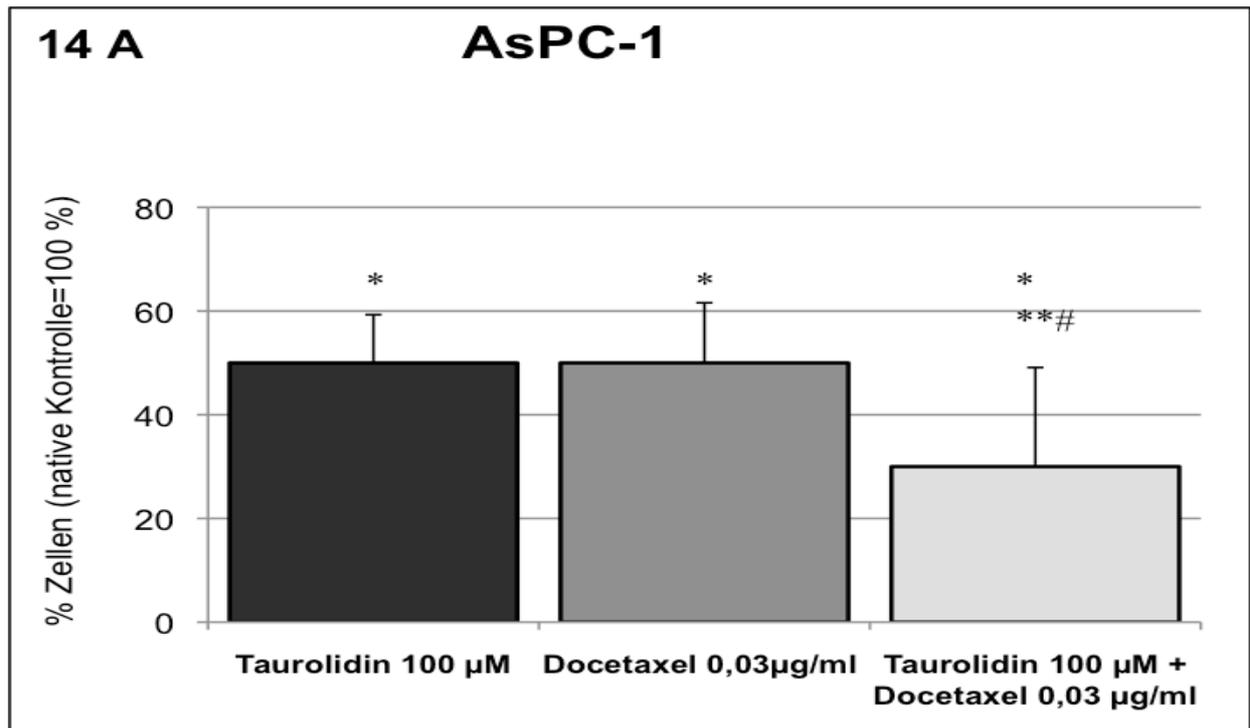


Abbildungen 12 A und 12 B: Viabilität der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Docetaxel (0,03 mg/ml) (Abbildung 12 A) bzw. Docetaxel (0,3 µg/ml) (Abbildung 12 B). n=9, * = p ≤ 0,05 vs. Negativkontrolle, ** ≤ 0,05 vs. Docetaxel, # = p ≤ 0,05 vs. Taurolidin

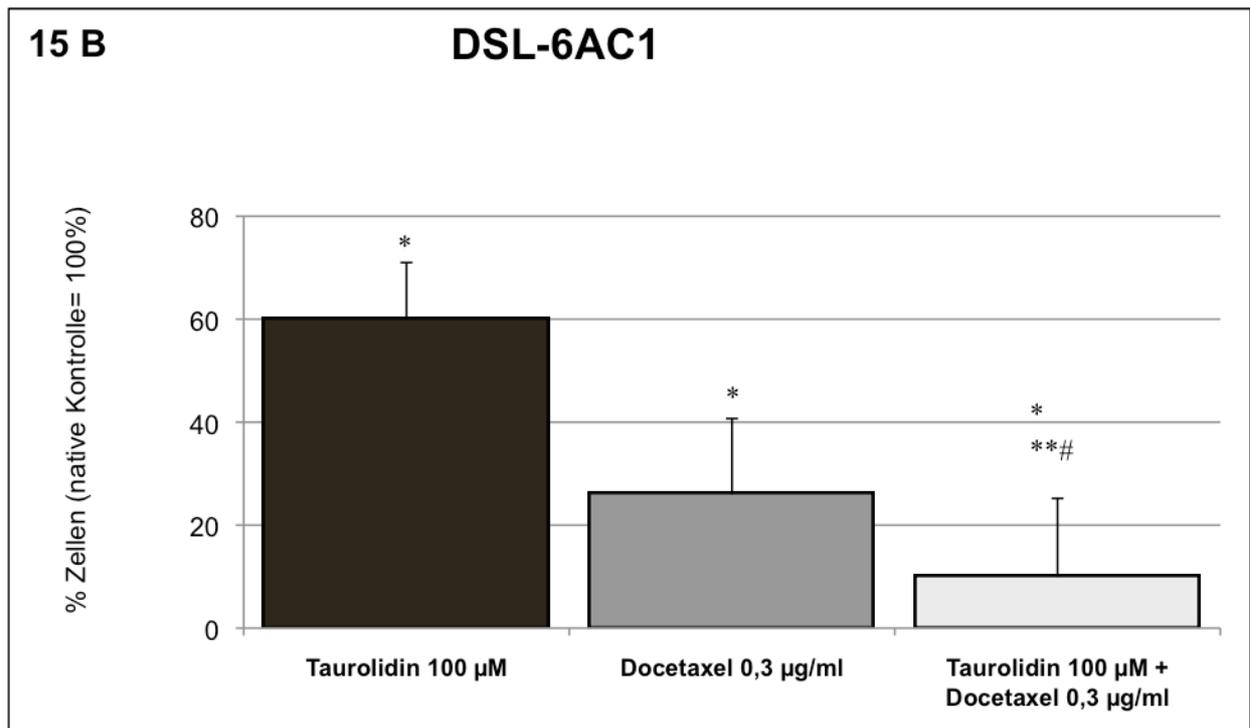
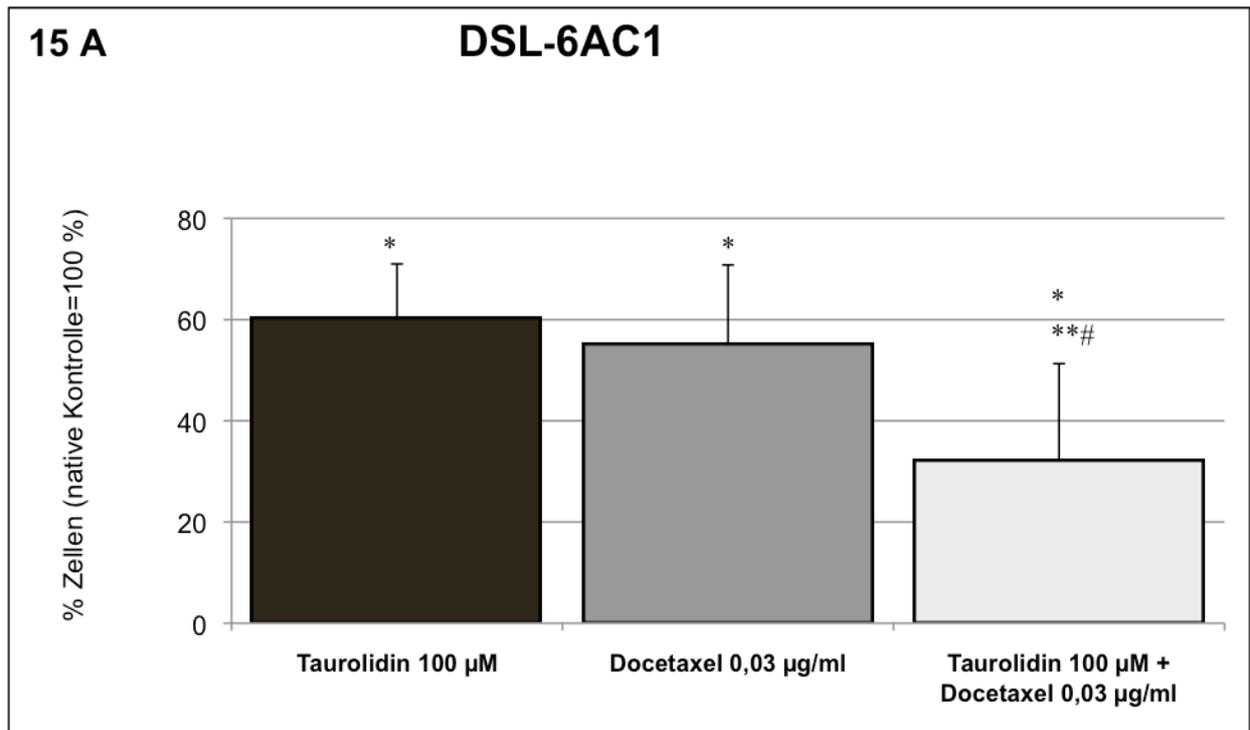
4.2.2.2 Proliferation nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Docetaxel



Abbildungen 13 A und 13 B: Proliferation der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Docetaxel (0,03 mg/ml) (Abbildung 13 A) bzw. Docetaxel (0,3 µg/ml) (Abbildung 13 B).
 n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Docetaxel, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin



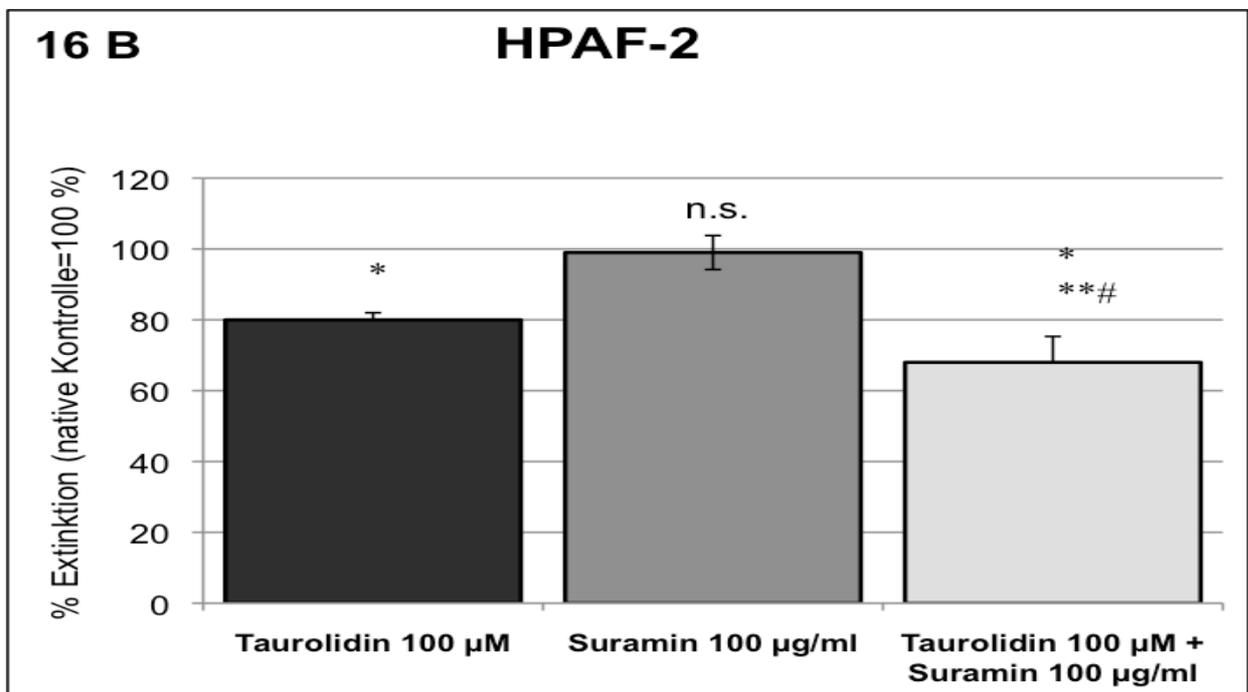
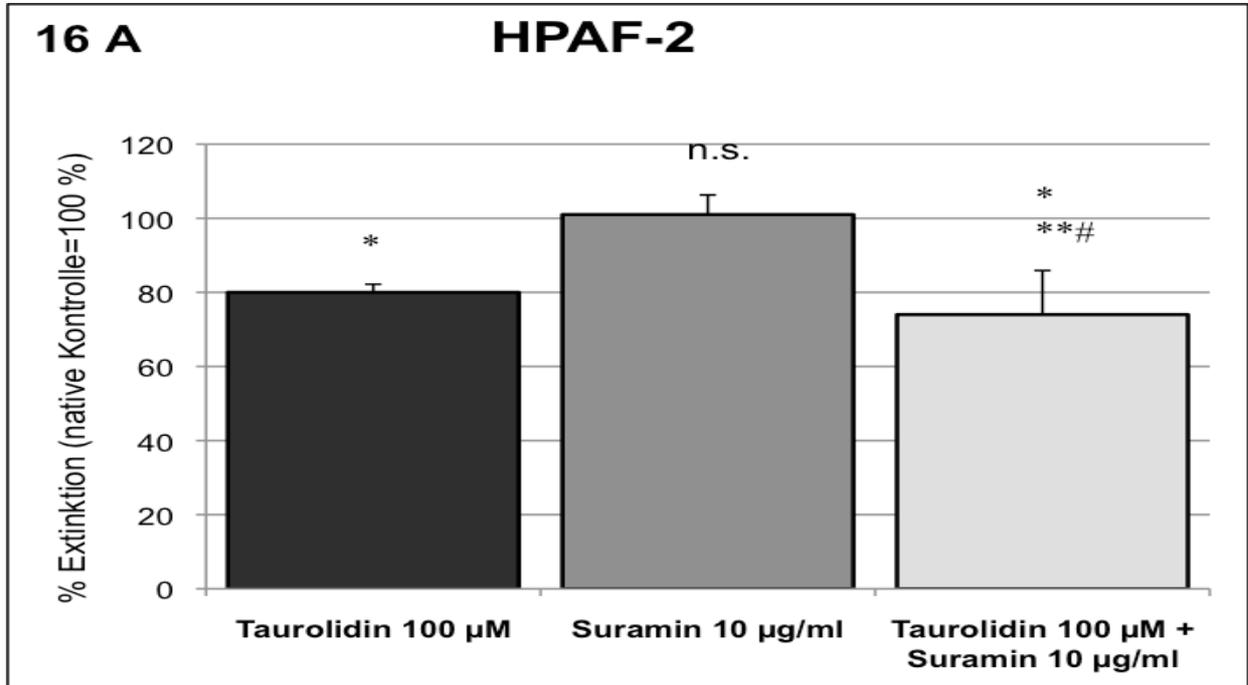
Abbildungen 14 A und 14 B: Proliferation der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Docetaxel 0,03 mg/ml (Abbildung 14 A) bzw. Docetaxel (0,3 µg/ml) (Abbildung 14 B).
 n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Docetaxel, # = $p \leq 0,05$ vs Taurolidin



Abbildungen 15 A und 15 B: Proliferation der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL 6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Docetaxel (0,03 mg/ml) (Abbildung 15 A) bzw. Docetaxel (0,3 µg/ml) (Abbildung 15 B).
 n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Docetaxel, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin

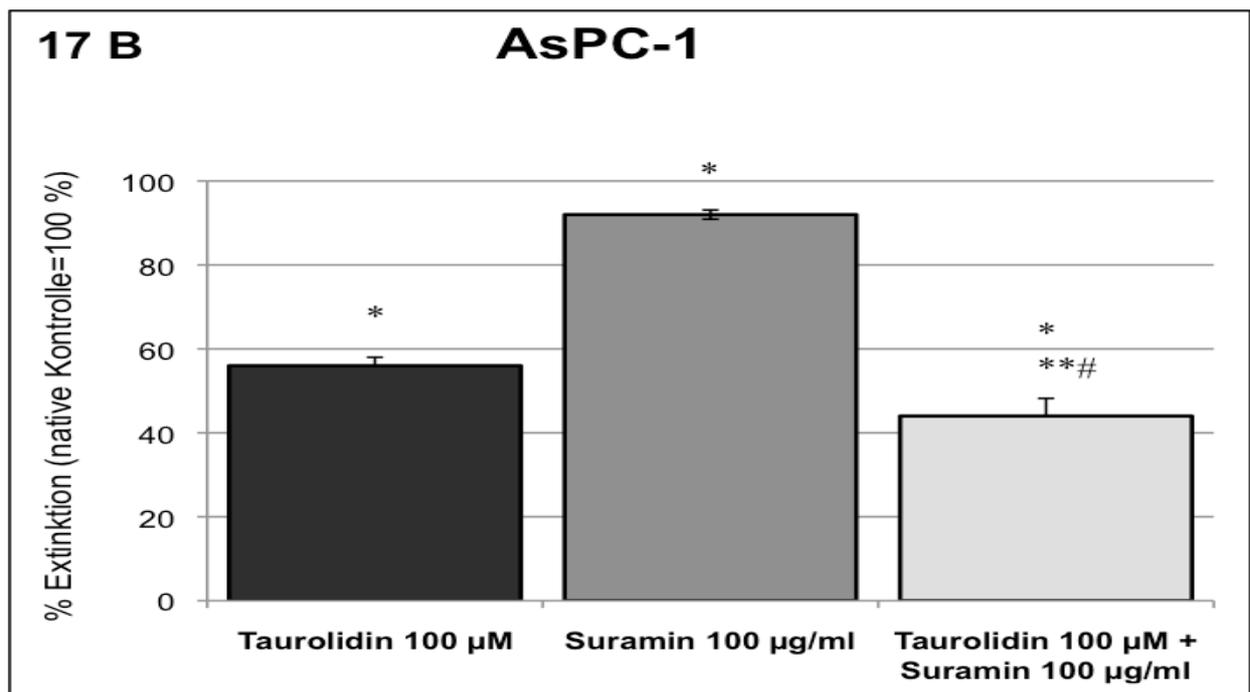
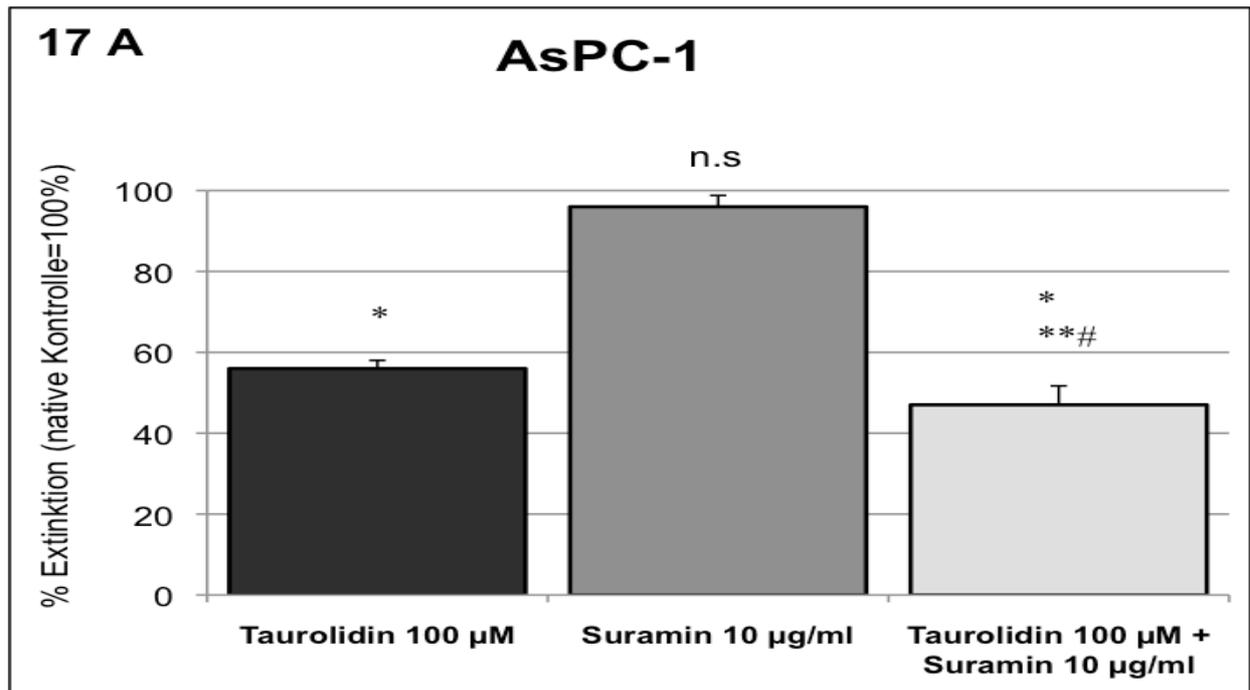
4.2.3 Effekt der Kombinationstherapie mit Taurolidin und Suramin auf Proliferation und Viabilität

4.2.3.1 Zellviabilität nach Co-Inkubation Taurolidin und Suramin



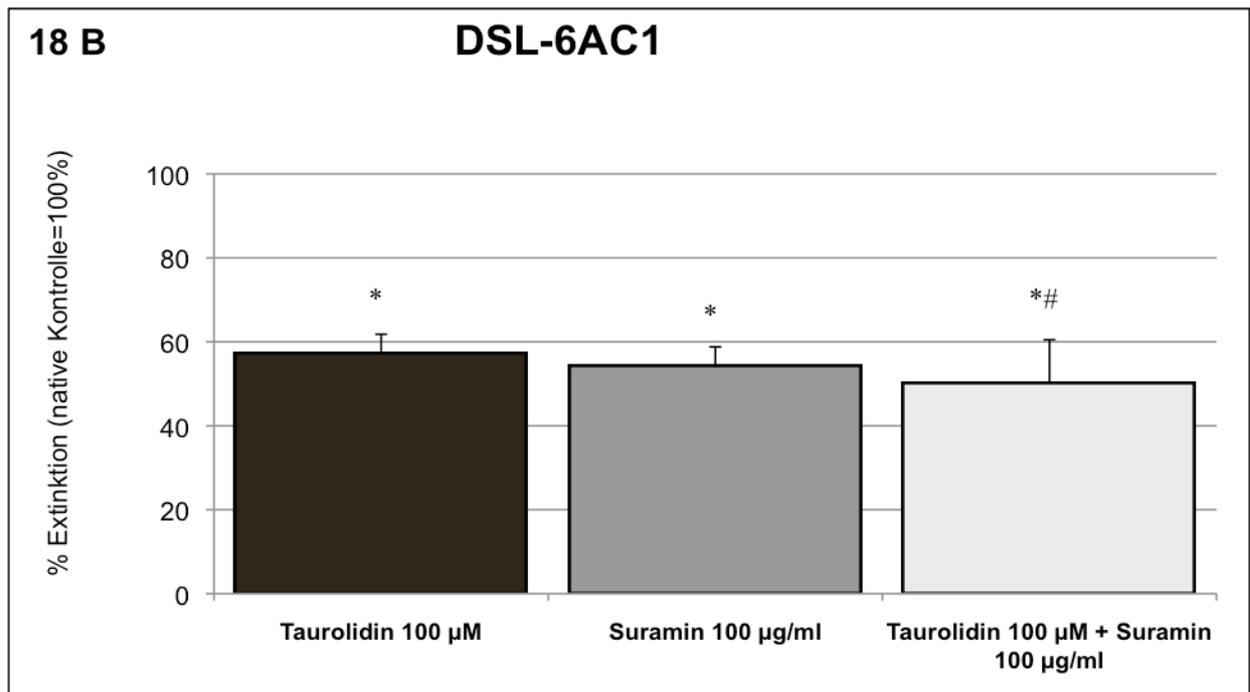
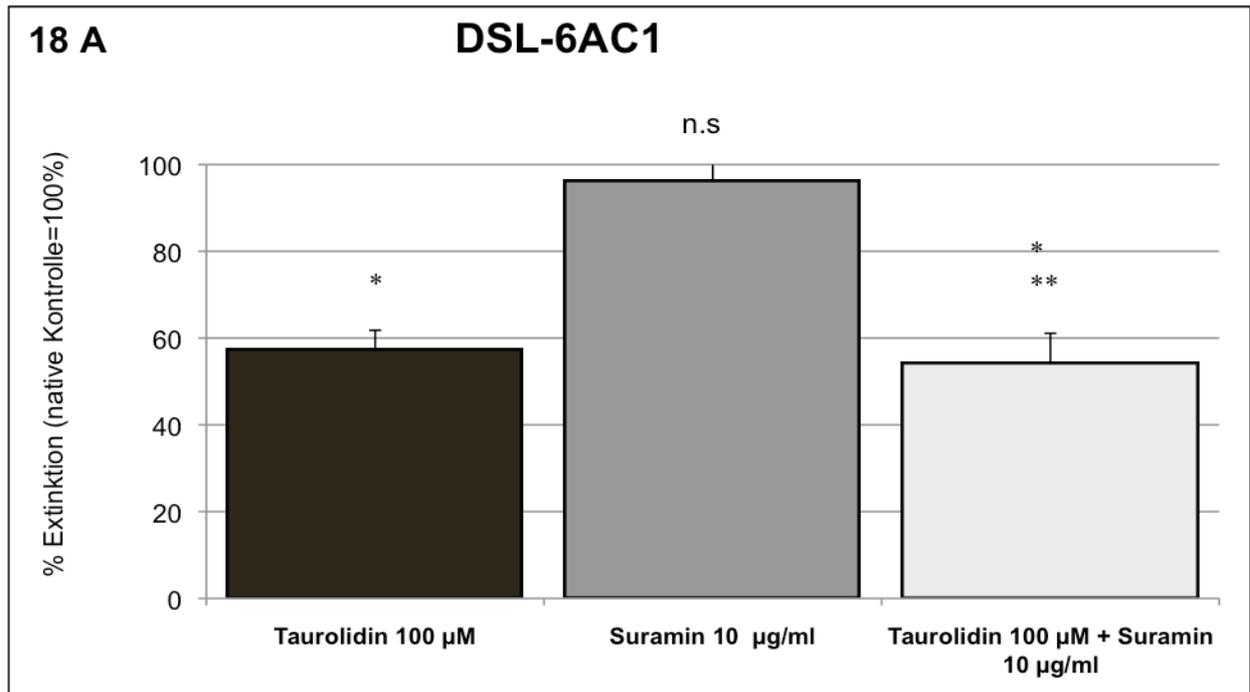
Abbildungen 16 A und 16 B: Viabilität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Suramin (10 µg/ml) (Abbildung 16 A) bzw. Suramin (100 µg/ml) (Abbildung 16 B).

n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Suramin, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin



Abbildungen 17 A und 17 B: Viabilität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Suramin (10 µg/ml) (Abbildung 17 A) bzw. Suramin (100 µg/ml) (Abbildung 17 B).

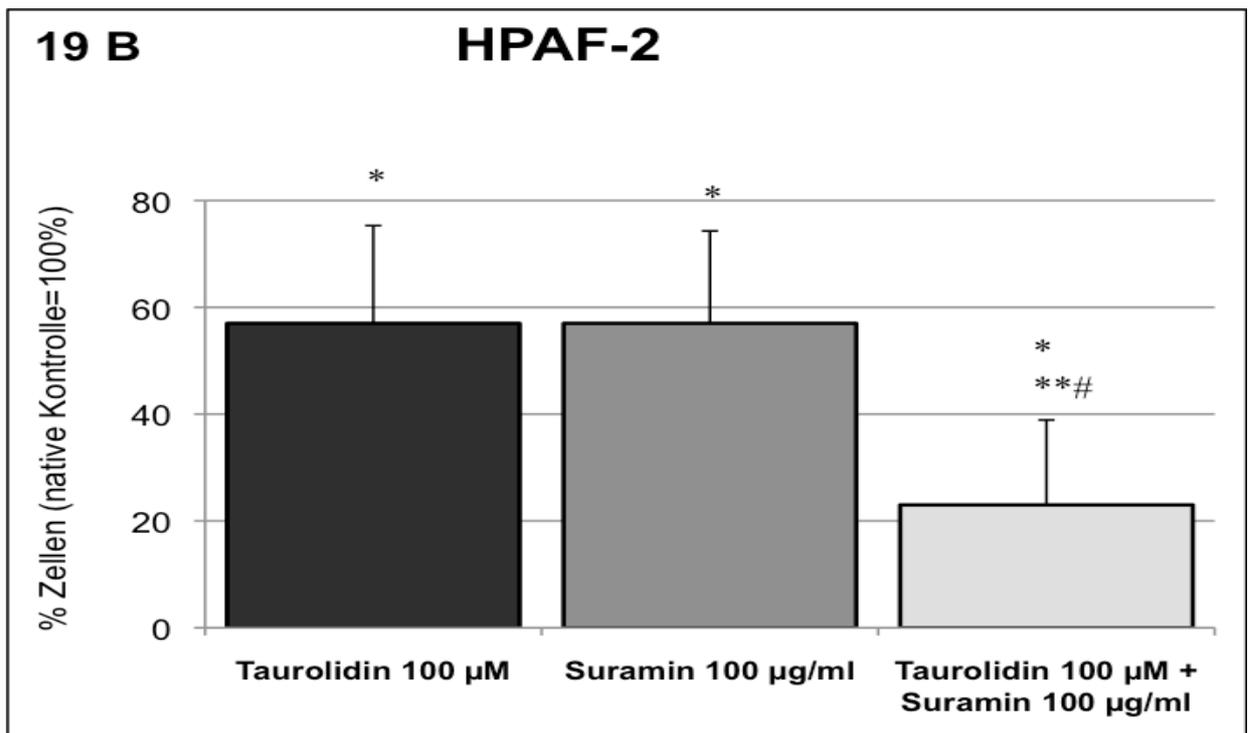
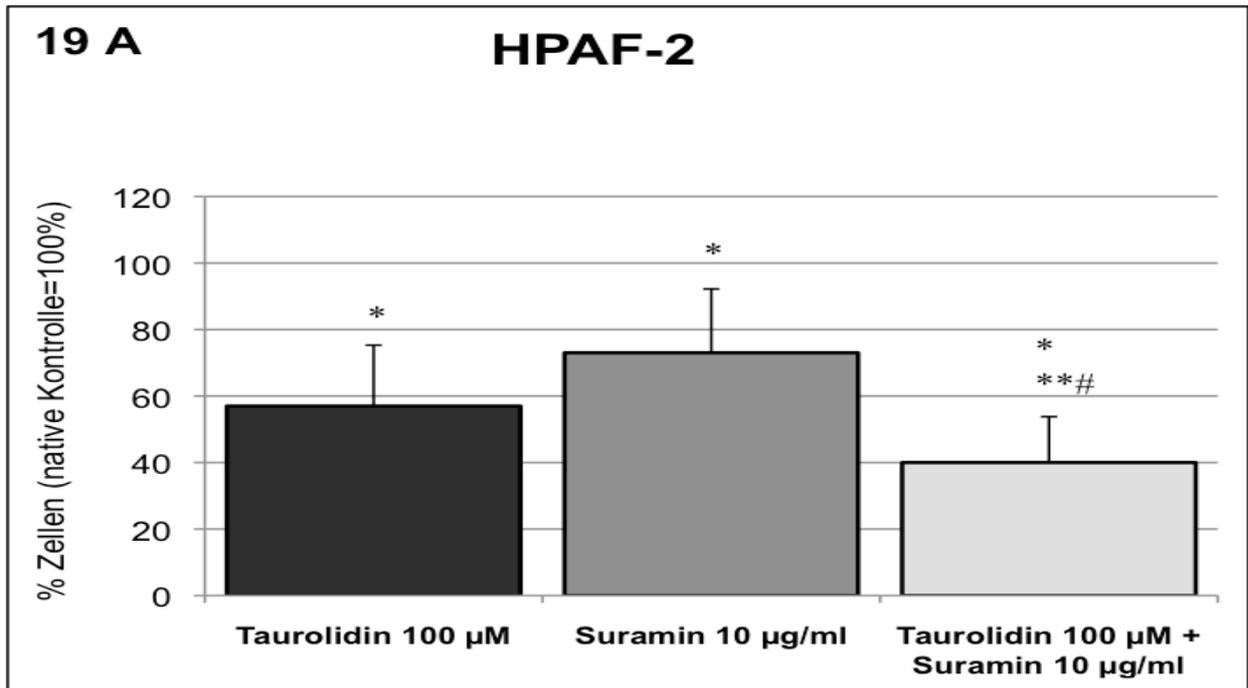
n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Suramin, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin



Abbildungen 18 A und 18 B: Viabilität der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL 6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Suramin (10 µg/ml) (Abbildung 18 A) bzw. Suramin (100 µg/ml) (Abbildung 18 B).

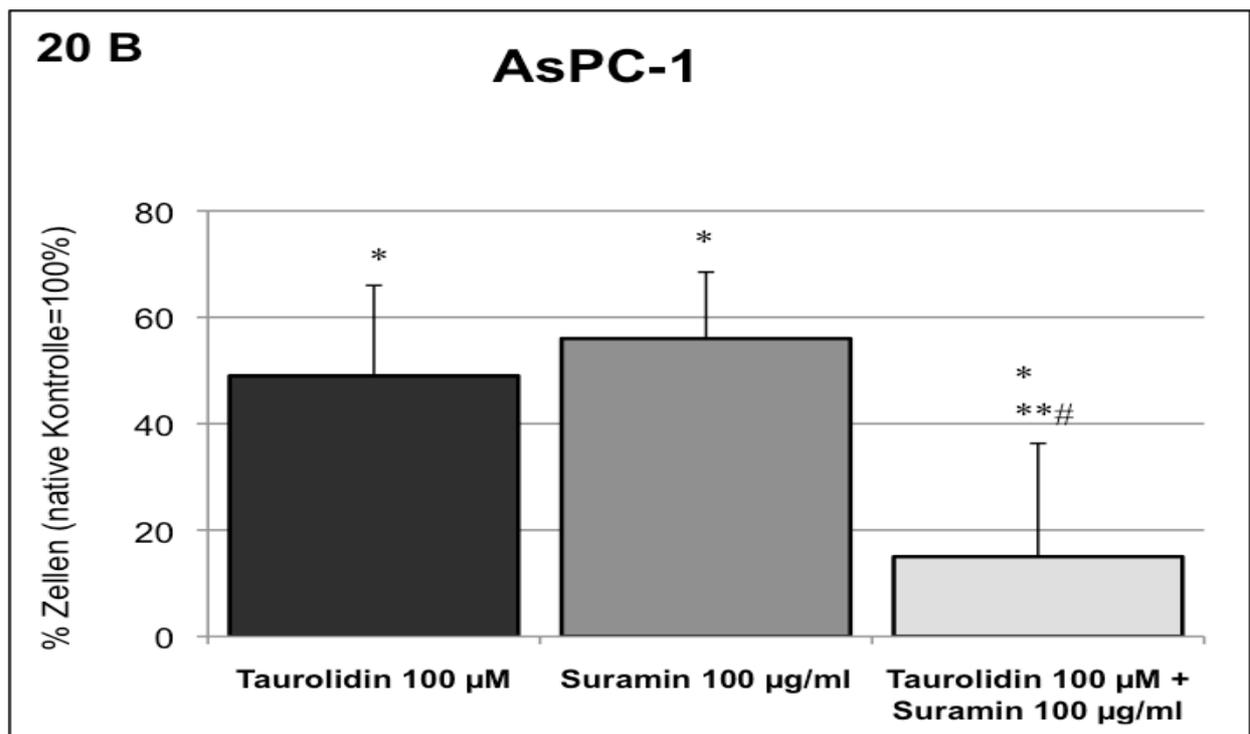
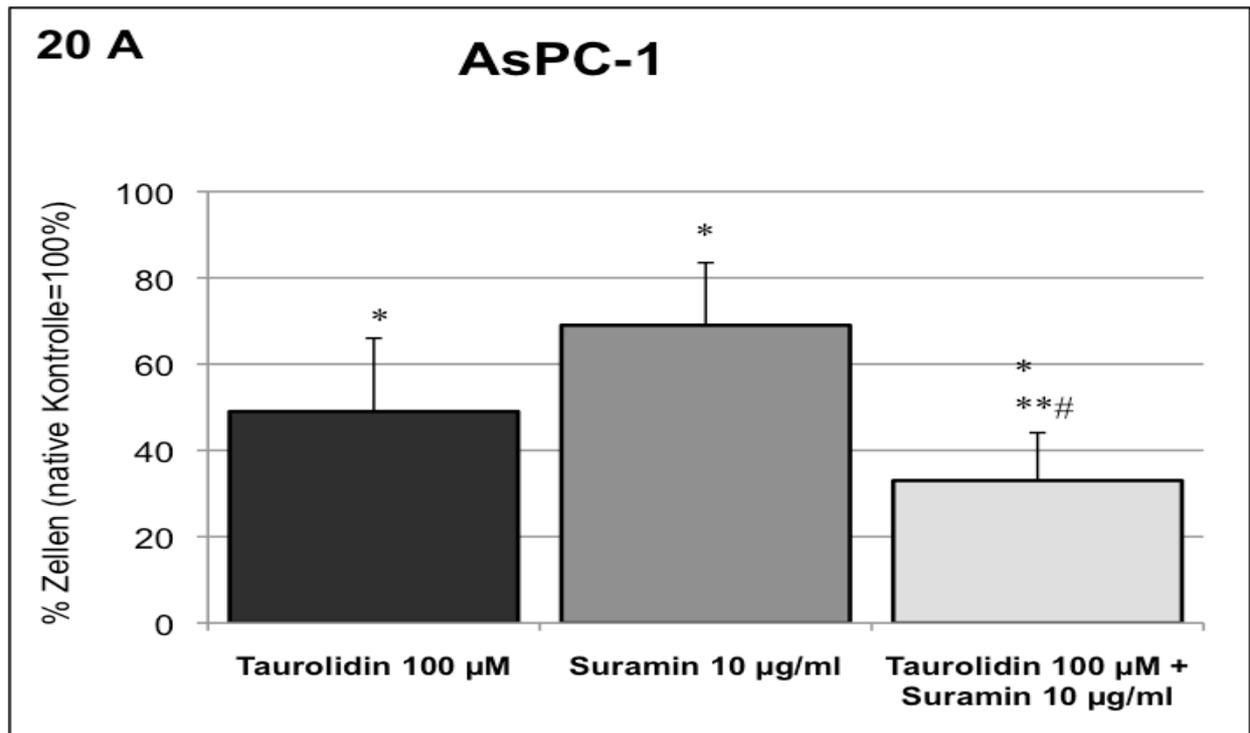
n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Suramin, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin

4.2.3.2 Proliferation nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Suramin

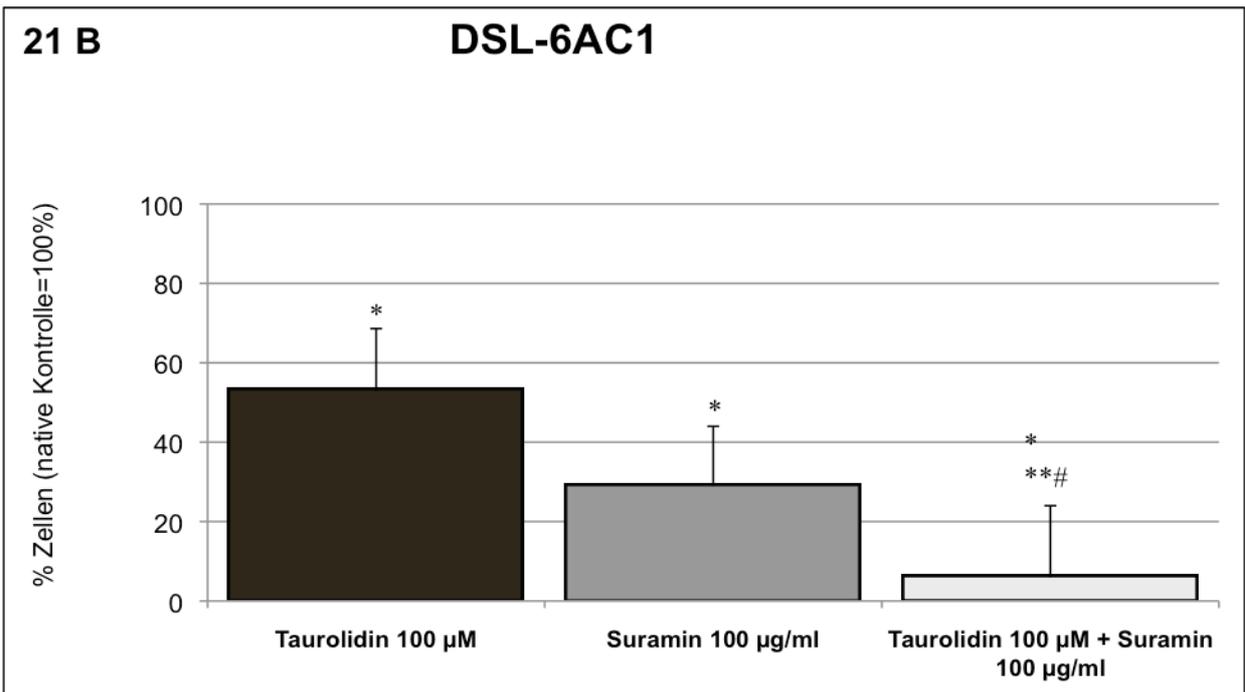
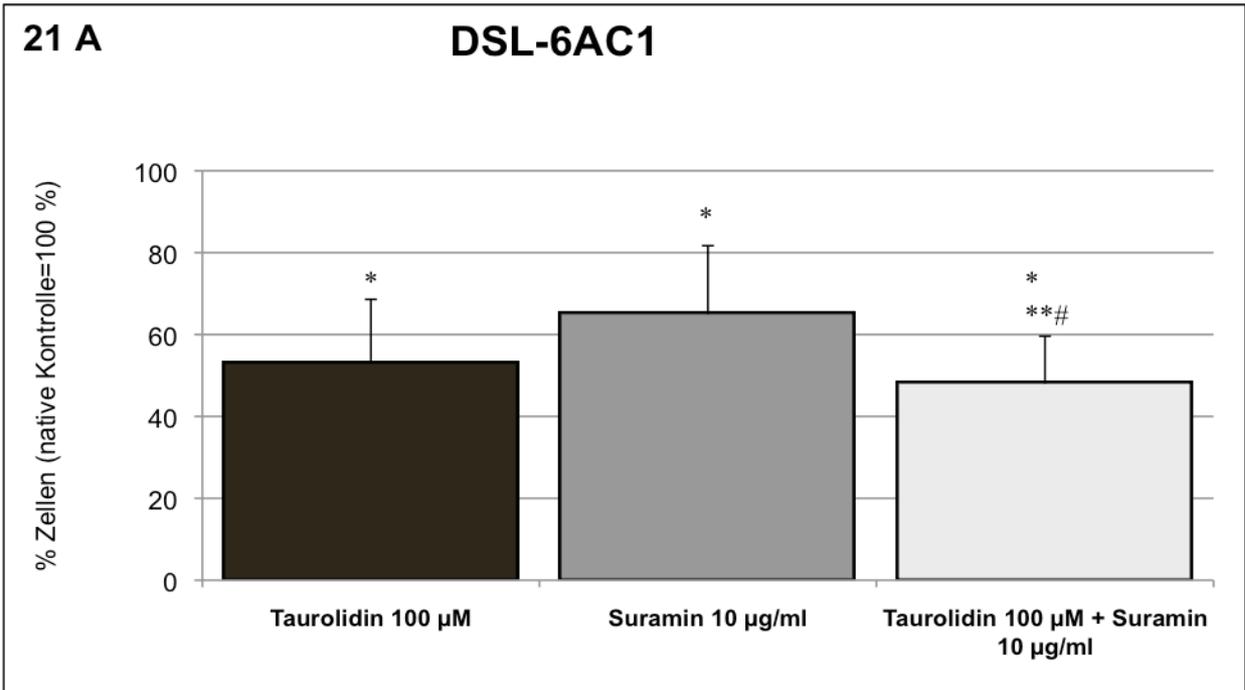


Abbildungen 19 A und 19 B: Proliferation der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Suramin (10 µg/ml) (Abbildung 19 A) bzw. Suramin (100 µg/ml) (Abbildung 19 B).

n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Suramin, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin



Abbildungen 20 A und 20 B: Proliferation der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Suramin (10 µg/ml) (Abbildung 20 A) bzw. Suramin (100 µg/ml) (Abbildung 20 B).
 n=9, * = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Suramin, # = $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin



Abbildungen 21 A und 21 B: Proliferation der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL 6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin (100 µM) und Suramin (10 µg/ml) (Abbildung 21 A) bzw. Suramin (100 µg/ml) (Abbildung 21 B). n=9, * = p ≤ 0,05 vs. Negativkontrolle, ** ≤ 0,05 vs. Suramin, # = p ≤ 0,05 vs. Taurolidin

4.3 Die Beeinflussung der Apoptoseregulatoren BCL-2, BAX und c-Flip durch eine Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine

Vor der eigentlichen Analyse der Apoptoseregulatoren auf Proteinebene sollte zunächst in einem Vorversuch (PCR) überprüft werden, ob die zu untersuchenden Proteine bei allen verwendeten Zelllinien auf m-RNA-Ebene exprimiert sind. Die Untersuchung der verschiedenen Apoptoseregulatoren auf Proteinebene erfolgte mit dem Western Blot-Verfahren (die Etablierung der Primärantikörper erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit). Der quantitative Umfang der Aktivierung der gemeinsamen Endstrecke der Apoptose wurde mit dem Caspase 3/7-Assay ermittelt.

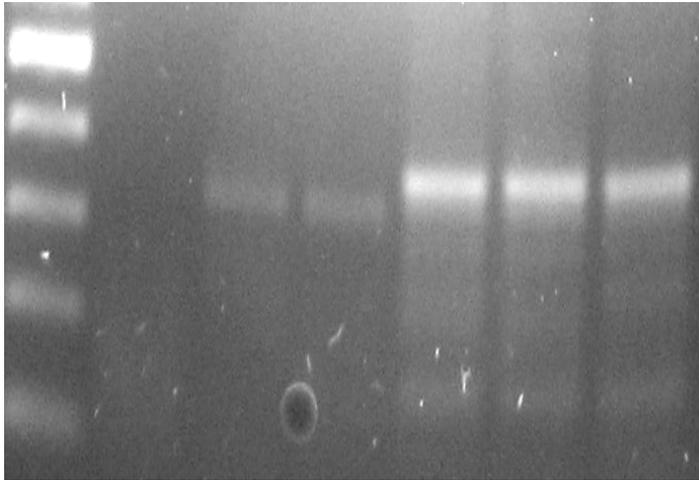
Die Apoptose-Regulatoren c-Flip_L, BCL-2 und BAX wurden bei allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien auf Genexpressionsebene nachgewiesen (Abbildungen 22, 23 und 24 / Seiten 73 und 74). Dagegen konnte BCL-2 auf Proteinebene nur bei zwei der getesteten Tumorzelllinien dargestellt werden (HPAF-2 und DSL-6AC1).

Im Vergleich mit den humanen Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und AsPC-1, zeigte die murine Zelllinie DSL-6AC1 die größte Sensitivität für eine Beeinflussung der untersuchten Apoptose-Regulatoren. Bereits nach 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin zeigte sich hier auf Proteinebene eine konzentrationsabhängige Abnahme aller untersuchten anti-apoptotischen Proteine (c-Flip_L, c-Flip_r und BCL-2), parallel wurden eine Zunahme der Proteinexpression des pro-apoptotischen Proteins BAX und eine Caspase 3/7-Aktivierung nachgewiesen (Abbildung 27 und 30, Seite 76 bzw. Seite 78) sowie Abbildung 31C / Seite 80).

Bei den beiden humanen Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und AsPC-1 zeigte sich nicht nur eine unterschiedliche Aktivierung der Caspasen 3 und 7, sondern auch eine spezifische Beeinflussbarkeit der vorgeschalteten Regulator-Proteine.

4.3.1 Ergebnisse der Reverse Transkriptase PCR

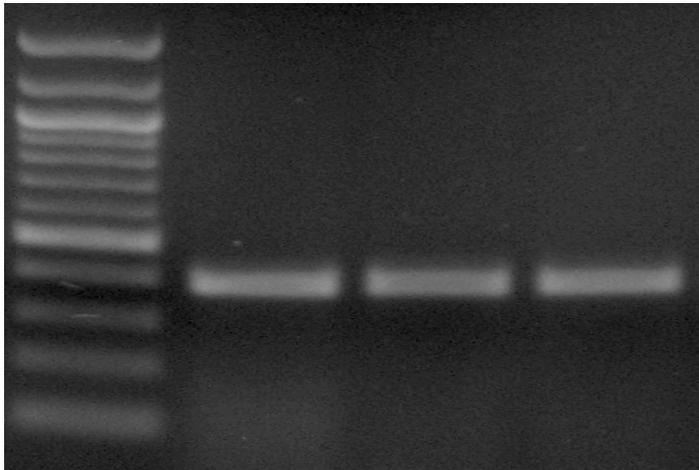
22 BCL-2



HPAF-2 DSL-6AC1 AsPC-1

Abbildung 22: PCR zum Nachweis von BCL-2 (355 bp) bei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzellen. Reihe 1=100 bp DNA Ladder; Reihe 3-5= Tests
Reihe 5=HPAF-2; Reihe 6=DSL 6AC1; Reihe 7=AsPC-1

23 BAX



HPAF-2 DSL-6AC1 AsPC-1

Abbildung 23: PCR zum Nachweis von BAX (495 bp) bei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzellen. Reihe 1=100 bp DNA Ladder; Reihe 2=HPAF-2; Reihe 3=DSL 6AC1; Reihe 4=AsPC-1

24 c-Flip_L

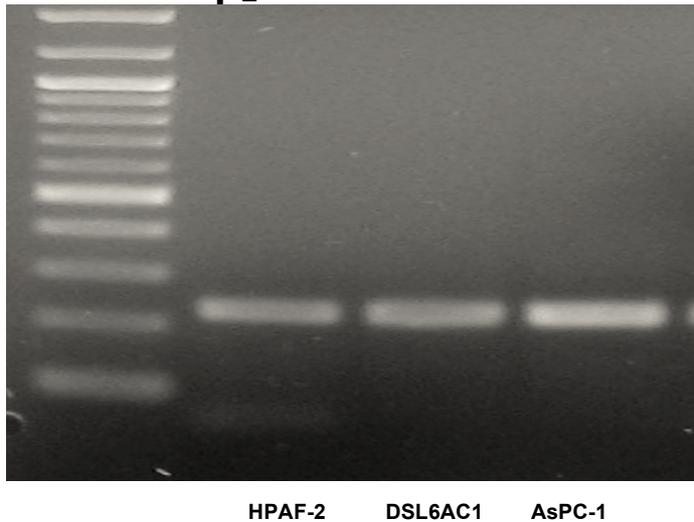


Abbildung 24: PCR zum Nachweis von c-Flip_L (200 bp) bei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzellen. Reihe 1= 100 bp DNA Ladder; Reihe 2=HPAF-2; Reihe 3=DSL 6AC1; Reihe 4=AsPC-1

4.3.2 Ergebnisse der Western Blots

Für die Untersuchung des Einflusses von Taurolidin bzw. Taurolidin und Gemcitabine auf die Proteinexpression unterschiedlicher Apoptoseregulatoren, wurden die humanen Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und AsPC-1 mit Taurolidin als Monosubstanz in zwei unterschiedlichen Konzentrationsstufen (200 μ M und 500 μ M) für 24 Stunden inkubiert. Dies war erforderlich, um die bei der Untersuchung der humanen Zelllinien erhobenen Ergebnisse mit denen der murinen Tumorzelllinie DSL-6AC1 vergleichen zu können. Bei DSL-6AC1 zeigte sich bereits nach 24 Stunden eine deutliche Reaktion auf die Behandlung mit den Testsubstanzen. Da eine Isolation von qualitativ ausreichend viel Protein nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden nicht mehr möglich war, musste die Inkubationszeit hier auf 24 Stunden beschränkt werden. Die Analyse der Proteine nach Inkubation mit der Kombinationstherapie, erfolgte bei den humanen Tumorzelllinien nach 72 Stunden. Bei der murinen Zelllinie DSL-6AC1 wurde die Inkubationszeit auch hier auf 24 Stunden reduziert, zudem wurden die Wirkstoffe in niedrigeren Konzentrationen verwendet. Auf eine prä-Inkubation in Serum-freiem Zellkulturmedium (Serum Starvation) zur Zellzyklussynchronisation wurde hier, wie auch in allen anderen Versuchen, verzichtet, um eine akzidentelle Apoptose-Induktion durch Nährstoffmangel auszuschließen. Jedes Versuchsergebnis wurde dreimal

reproduziert, dabei wurden jeweils Zellen aus unterschiedlichen Passagen verwendet. Bei der Western Blot Analyse konnte bei den humanen Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und AsPC-1 der Effekt von Taurolidin und Gemcitabine in Mono- und Kombinationstherapie untersucht werden. Bei der murinen Tumorzelllinien DSL-6AC1 musste die Untersuchung auf den Effekt der Monosubstanzen beschränkt werden, da nach Inkubation mit der Wirkstoffkombination bei dieser Zelllinien nicht ausreichend viel Protein zur Durchführung des Western Blots isoliert werden konnte.

4.3.2.1 Die Proteinexpression des pro-apoptotischen Proteins BAX und des anti-apoptotisch wirkenden Proteins BCL-2 nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine

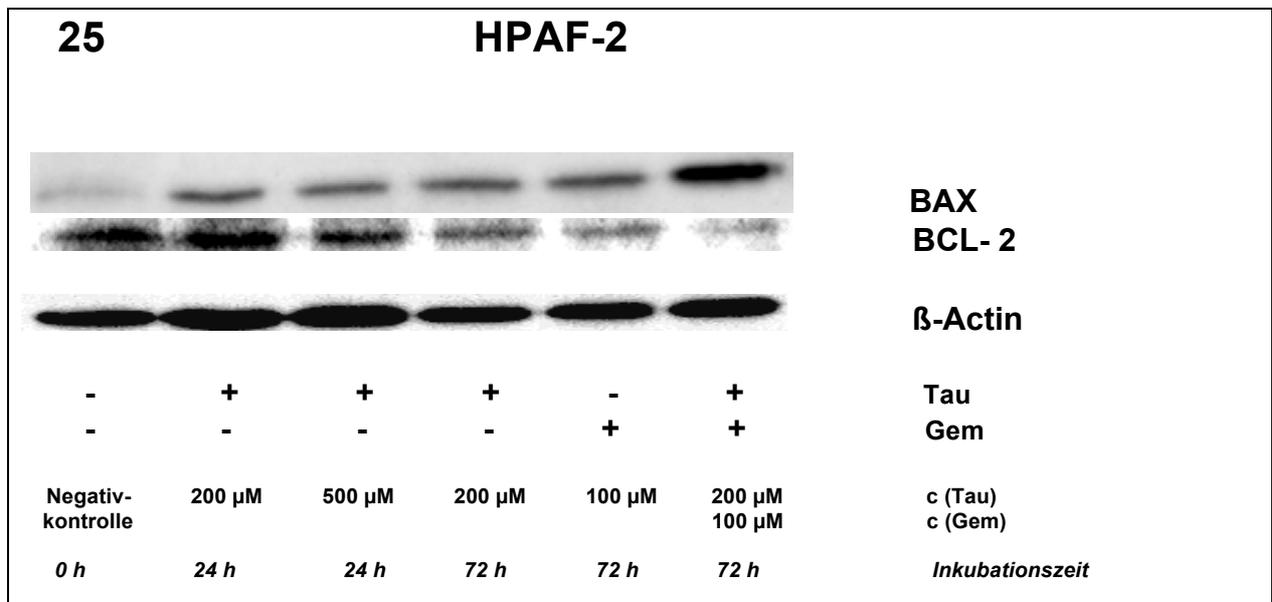


Abbildung 25: Western Blot zur Darstellung der Proteinexpression von BAX und BCL-2 bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2, nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine
Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Versuchen

Reihe 1= Negativkontrolle; Reihe 2= 24 h Inkubation mit Taurolidin (200 µM); Reihe 3= 24 h Inkubation mit Taurolidin (500 µM); Reihe 4= 72 h Inkubation mit Taurolidin (200 µM); Reihe 5= 72 h Inkubation mit Gemcitabine (100 µM); Reihe 6= 72 h Inkubation mit Taurolidin (200 µM) und Gemcitabine (100 µM) in Kombination.

Bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF.2 zeigt sich in Abhängigkeit von Zeit und Wirkstoffkonzentration eine Zunahme des pro-apoptotischen Proteins Bax sowie eine Senkung des anti-apoptotischen Proteins BCL-2 im Sinne einer Senkung der BCL-2/BAX-Ratio.

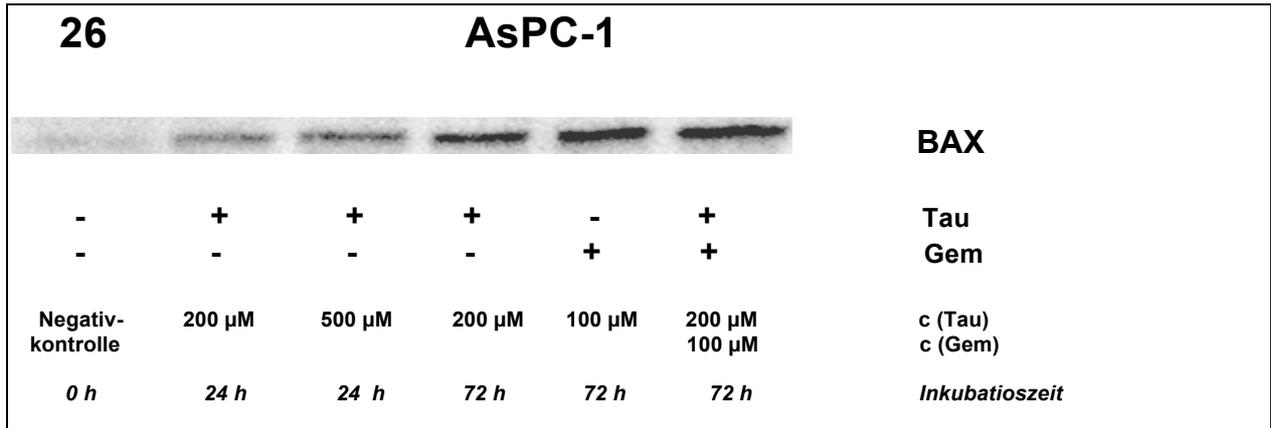


Abbildung 26: Western Blot zur Darstellung der Proteinexpression von BAX bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1, nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine.

Repräsentatives Ergebnis für n=3 Versuche

Reihe 1= Negativkontrolle; Reihe 2= 24 h Inkubation mit Taurolidin (200 µM); Reihe 3= 24 h Inkubation mit Taurolidin (500 µM); Reihe 4= 72 h Inkubation mit Taurolidin 200 µM; Reihe 5= 72 h Inkubation mit Gemcitabine (100 µM); Reihe 6= 72 h Inkubation mit Taurolidin (200 µM) und Gemcitabine (100 µM).

Bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 war die Darstellung des anti-apoptischen Proteins BCL-2 auf Proteinebene nicht möglich, daher konnte bei dieser Zelllinie nur der Einfluss von Taurolidin bzw. Gemcitabine auf das pro-apoptische Protein BAX dargestellt werden. Wie bei HPAF-2, so zeigt sich auch hier eine Zunahme von BAX auf Proteinebene nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin bzw. Gemcitabine.

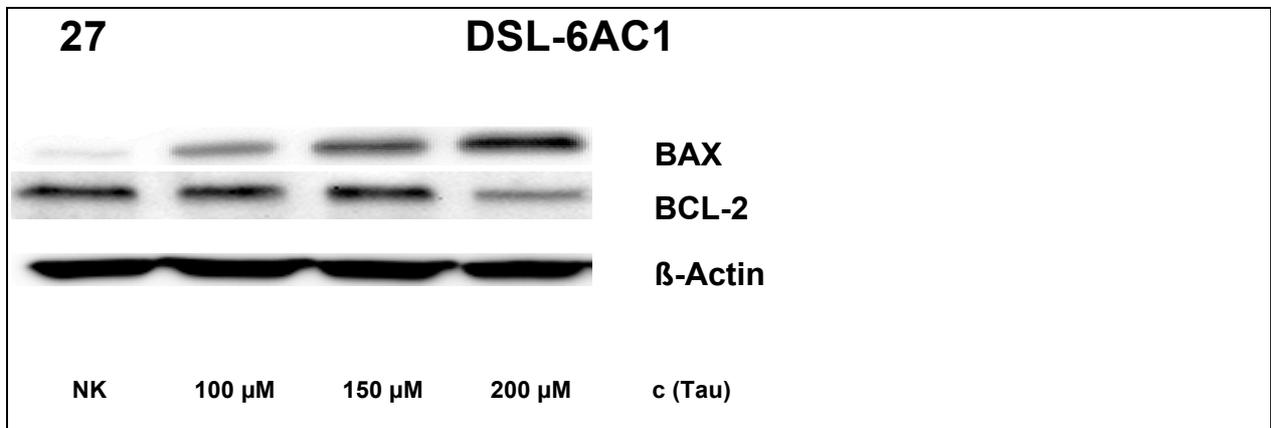


Abbildung 27: Western Blot zur Darstellung der Proteinexpression von BAX und BCL-2 bei der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL 6AC1, nach einer 24-stündigen Inkubation mit Taurolidin
Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Versuchen

Reihe 1=Negativkontrolle; Reihe 2= Taurolidin (100 µM); Reihe 3= Taurolidin (150 µM);
Reihe 4= Taurolidin (200 µM).

Bei der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 führte bereits die 24-stündige Inkubation mit Taurolidin zu einer Zunahme des pro-apoptischen Proteins BAX bei gleichzeitiger Abnahme des anti-apoptischen Proteins BCL-2.

4.3.2.2 Der Einfluss von Taurolidin und Gemcitabine auf die Proteinexpression von c-Flip, eines Regulators der extrinsischen Apoptose

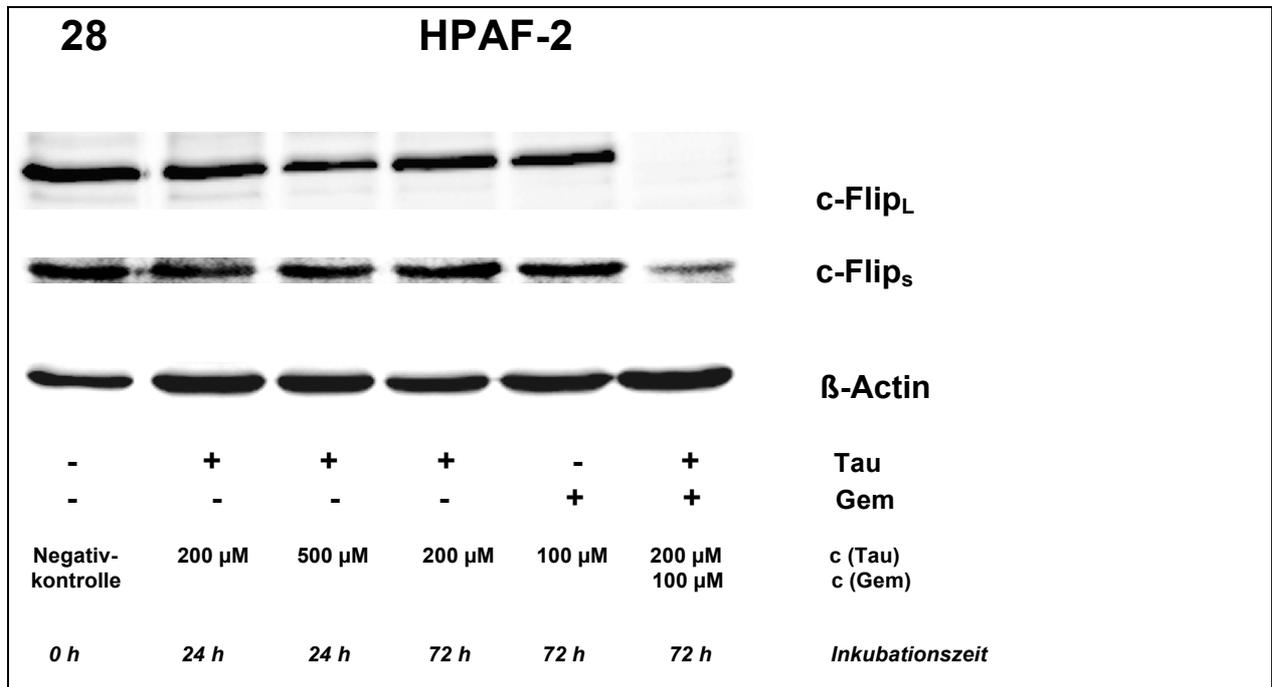


Abbildung 28: Western Blot zur Darstellung der Proteinexpression von c-Flip_L und c-Flip_S bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2, nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine. Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Versuchen
 Reihe 1= Negativkontrolle; Reihe 2= 24 h Inkubation mit Taurolidin (200 μM); Reihe 3= 24 h Inkubation mit Taurolidin (500 μM); Reihe 4= 72 h Inkubation mit Taurolidin 200 μM; Reihe 5= 72 h Inkubation mit Gemcitabine (100 μM); Reihe 6= 72 h Inkubation mit Taurolidin (200 μM) und Gemcitabine (100 μM).

Nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine in Kombination zeigte sich bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 ein Verlust der Proteinexpression von c-Flip_L sowie eine Abnahme des kleineren Isoenzym c-Flip_S.

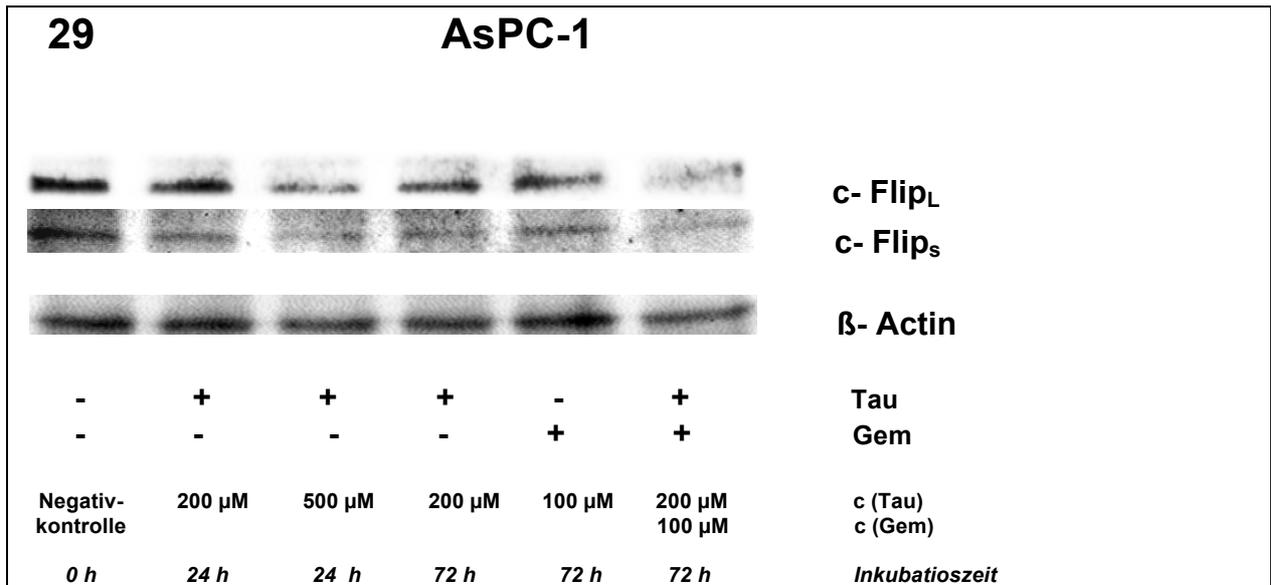


Abbildung 29: Western Blot zur Darstellung der Proteinexpression von c-Flip_L und c-Flip_S bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1, nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine.

Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Versuchen

Reihe 1= Negativkontrolle; Reihe 2= 24 h Inkubation mit Taurolidin (200 μ M); Reihe 3= 24 h Inkubation mit Taurolidin (500 μ M); Reihe 4= 72 h Inkubation mit Taurolidin 200 μ M; Reihe 5= 72 h Inkubation mit Gemcitabine (100 μ M); Reihe 6= 72 h Inkubation mit Taurolidin (200 μ M) und Gemcitabine (100 μ M).

Bei der schlecht-differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 führte die 72-stündige Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine zur Abnahme von c-Flip_L und c-Flip_S auf Proteinebene. Im Unterschied zur mittelgradig-differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 wurde bei AsPC bereits nach 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin in höherer Konzentration eine Senkung von c-Flip_L nachgewiesen.

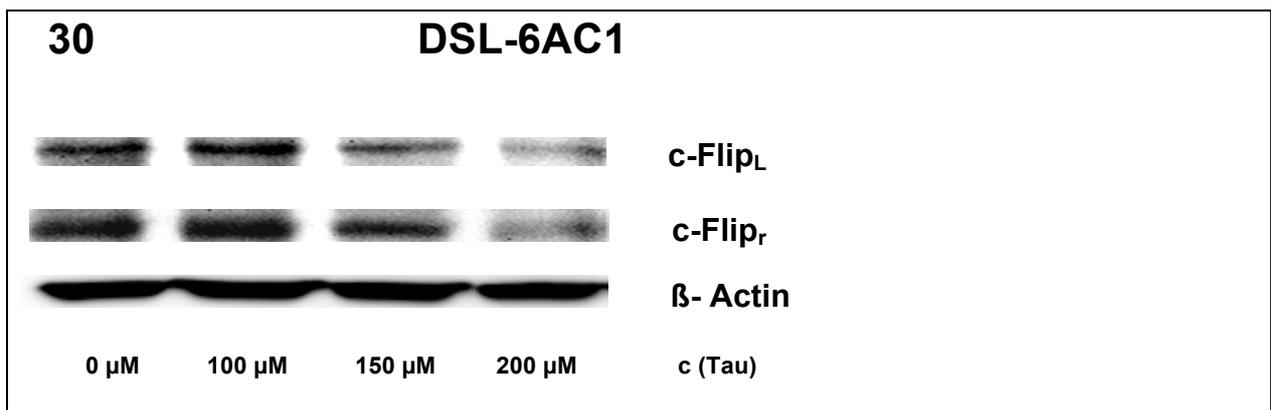


Abbildung 30: Western Blot zur Darstellung der Proteinexpression von c-Flip_L und c-Flip_R bei der murinen Zelllinie DSL-6AC1, nach einer 24-stündigen Inkubation mit Taurolidin.

Repräsentatives Ergebnis aus n=3 Versuchen

Reihe 1=Negativkontrolle; Reihe 2= Taurolidin (100 μ M); Reihe 3= Taurolidin (150 μ M); Reihe 4= Taurolidin (200 μ M). n=3 Versuche

Die 24-stündige Inkubation mit Taurolidin führte konzentrationsabhängig zu einer Senkung von c-Flip.

4.3.3 Die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 nach Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine

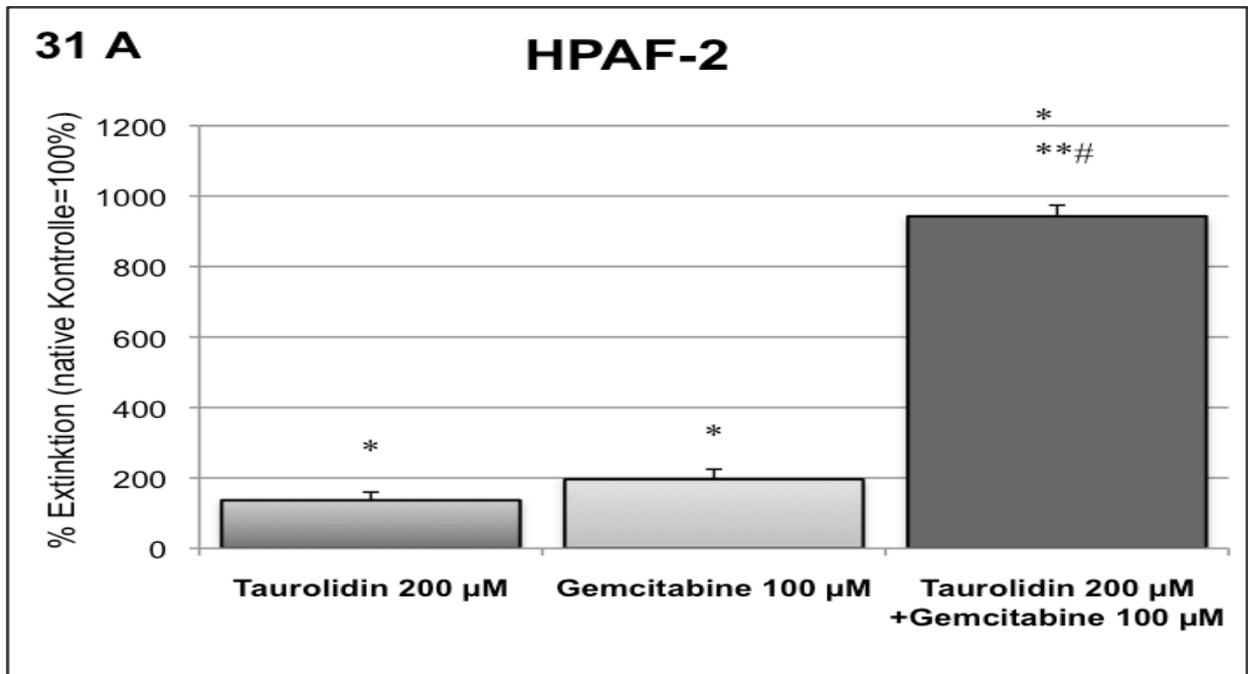


Abbildung 32 A: Caspase 3/7-Aktivität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine.

* = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Gemcitabine, #= $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin
n=4 Versuche

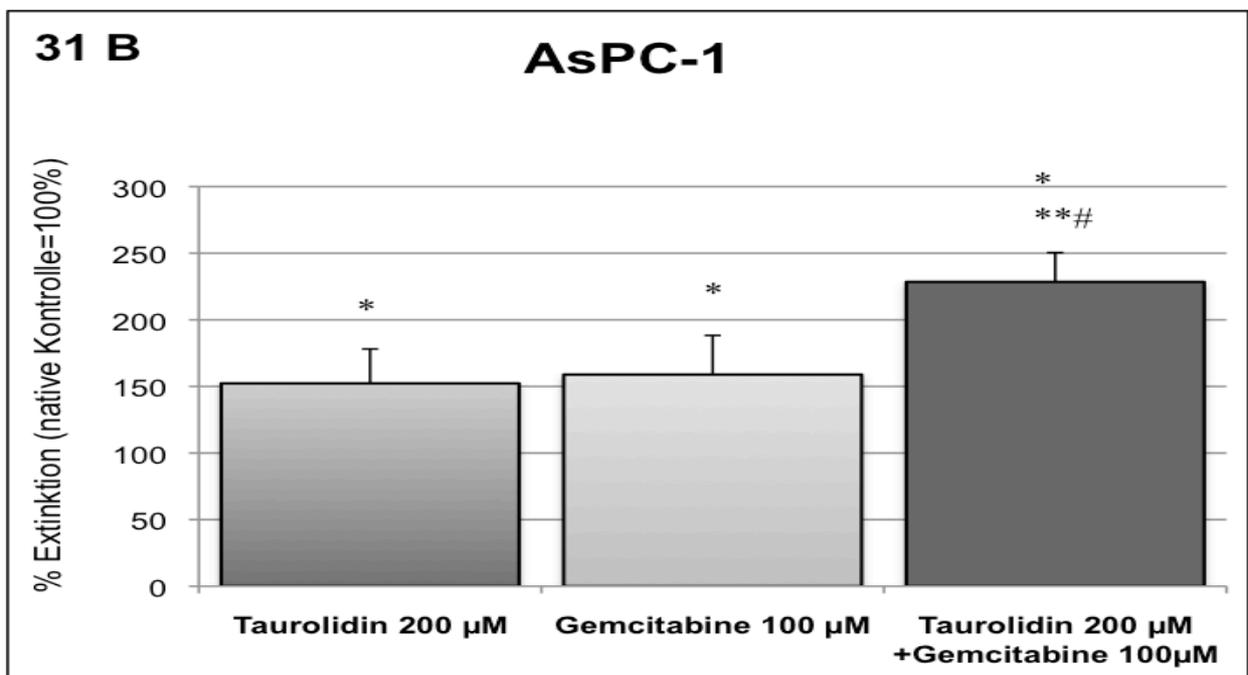


Abbildung 32 B: Caspase 3/7-Aktivität der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine.

* = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, **= $p \leq 0,05$ vs. Gemcitabine, #= $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin,
n=4 Versuche

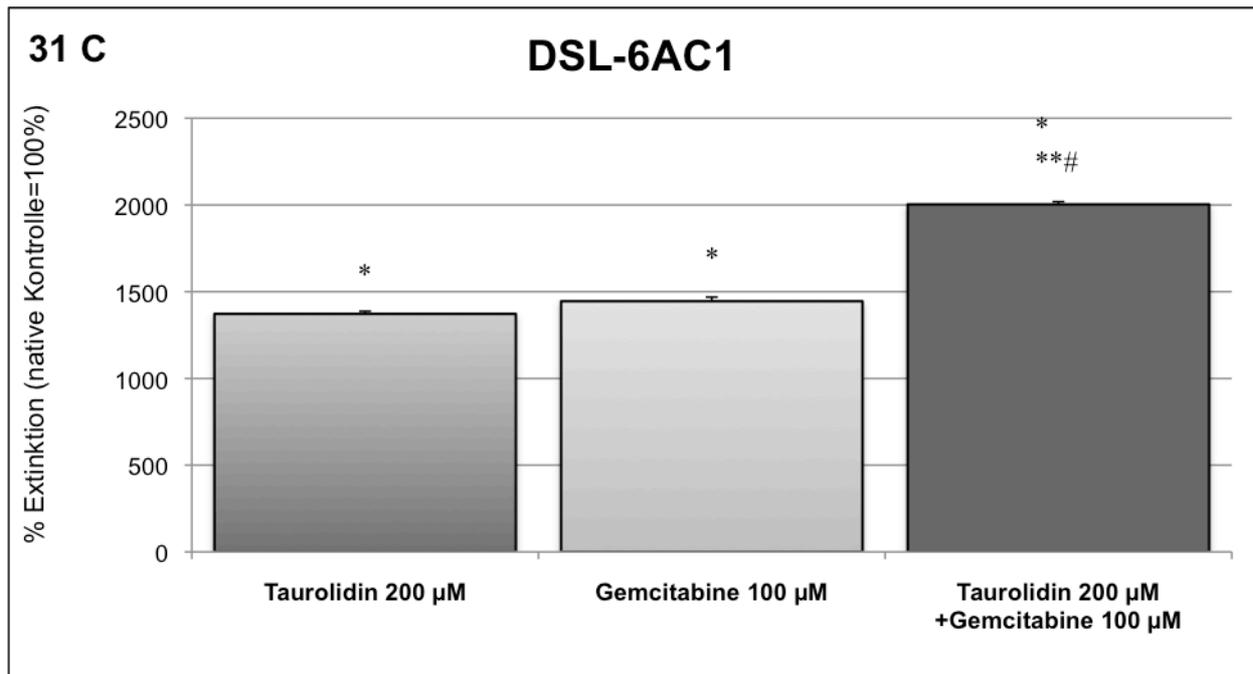


Abbildung 32 C: Caspase 3/7-Aktivität der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 nach 72-stündiger Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine.

*** = $p \leq 0,05$ vs. Negativkontrolle, ** $\leq 0,05$ vs. Gemcitabine, #= $p \leq 0,05$ vs. Taurolidin
n=4 Versuche**

Bei allen hier untersuchten Pankreaskarzinomzellen zeigte sich nach Inkubation mit einer Kombination von Taurolidin und Gemcitabine eine signifikant stärkere Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7, als nach Inkubation mit den jeweiligen Wirkstoffen in Monoapplikation.

5. Diskussion

5.1 Das anti-neoplastische Potential von Taurolidin

Aufgrund seiner anti-mikrobiellen, anti-inflammatorischen und anti-adhäsiven Effekte, ist Taurolidin in der Abdominalchirurgie als Spülflüssigkeit zur Behandlung von Peritonitis bzw. zur Reduzierung postoperativer Infektionen und Adhäsionen seit mehreren Dekaden etabliert [56]. Ursprünglich wurde Taurolidin als anti-endotoxiner Wirkstoff für die Behandlung gramnegativer Sepsis entwickelt [55, 59]. Bereits in den 1980er Jahren konnte nachgewiesen werden, dass der Wirkstoff Zellwände von Bakterien biochemisch und morphologisch so verändern kann, dass eine Bindung von Mikroorganismen an biologische Oberflächen verhindert wird [55,86]. Die antineoplastische Wirkung des Taurolidins muss unter Berücksichtigung der bekannten anti-adhäsiven und anti-inflammatorischen Effekte der Substanz gesehen werden. So kommt es unter dem Einfluss bakterieller Endotoxine zu einer verstärkten Adhärenz von Tumorzellen an Peritonealoberflächen und konsekutiv zur Förderung von Tumorwachstum bzw. Metastasierung [87]. Nachgewiesen wurde auch eine Assoziation zwischen chirurgischem Trauma und Tumorzellproliferation. Dabei kommt es zunächst zur Adhäsion von Tumorzellen an die verletzten Peritonealoberflächen, im Rahmen der entzündlichen Reaktion des normalen Heilungsprozesses, wird dann auch die Proliferation der maligne entarteten Zellen gefördert [87].

In diversen Untersuchungen wurde ein hemmender Einfluss von Taurolidin auf verschiedene pro-inflammatorische Zytokine gezeigt. So führte die Behandlung von Lipopolysaccharid-stimulierten Makrophagen mit Taurolidin zu einer reversiblen Hemmung der Sekretion von IL-1 β und TNF- α [58]. Braumann et al. konnten in einer Multicenterstudie die Inhibierung von IL-1 β durch Taurolidin klinisch nachweisen [88]. Gezeigt wurde auch eine Inhibierung von IL-6 und IL-8 [88]. Die kritische Rolle der Inflammation bei der Tumorigenese konnte erst in den letzten Jahren evident dargestellt werden [89,90]. Chronisch-entzündliche Vorgänge sind häufig mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert, jedoch können inflammatorische Prozesse auch sekundär, als Folge einer Tumorentstehung auftreten. Bestimmte Onkogene (z.B. RAS-Proteine) induzieren ein transkriptionales Programm, welches über die Rekrutierung von Lymphozyten, die Expression von Tumor-fördernden Chemo- und Zytokinen, sowie über die Induktion des sog. angiogenetischen Switch, zum Remodelling des Tumor-

umgebenden Mikromilieu führt. Eine wichtige Rolle spielen dabei die sog. Tumor-Associated Macrophages (TAMs), sie exprimieren wachstumsfördernde Zytokine (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23) und fördern die Tumorangiogenese. Einige Tumorzellen sind in der Lage, solche wachstumsfördernde Zytokine autokrin zu produzieren [91]. Für Taurolidin konnte nachgewiesen werden, dass die Substanz nicht nur bei immunologischen Zellen inhibitorisch auf die Sekretion inflammatorischer Zytokine wirkt, sondern auch bei Tumorzellen die Produktion derartiger Zytokine hemmen kann. So wiesen Braumann et al. für die Kolonkarzinomzelllinie DHD/K12 (Ratte) eine Inhibierung der Sekretion von TNF- α und VEGF durch die Behandlung mit Taurolidin nach [66].

Taurolidin wirkt jedoch nicht nur indirekt antineoplastisch, sondern es vermittelt auch direkte zytotoxische Effekte auf Tumorzellen [69]. Der Wirkstoff induziert bei zahlreichen Tumorentitäten den programmierten Zelltod, zelllinienabhängig zeigten sich allerdings große Unterschiede hinsichtlich der erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen und Inkubationszeiten [56,61]. Chromik et al. untersuchten die Taurolidin-vermittelten Zelltodinduktion bei unterschiedlichen humanen Tumorzelllinien, darunter die beiden Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1 und BxPC-3, unter Berücksichtigung von Viabilität, Apoptose und Nekrose [92]. In genannter Studie erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit Taurolidin in ansteigenden Konzentrationen (100-250-1000 μ M). Die Effekte des Wirkstoffs waren bei den getesteten Tumorzelllinien nicht homogen. Insgesamt zeigte sich bei allen untersuchten Tumorzellen eine maximale Apoptoseinduktion durch niedrigere bzw. mittlere Taurolidin-Konzentrationen (100 bzw. 250 μ M). Bei der schlecht-differenzierten Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1, wurde eine signifikante Reduktion der Viabilität erst durch Taurolidin in hoher Konzentration (1000 μ M) erreicht, dieser Effekt war mit einem Anstieg der nekrotischen Zellen assoziiert, eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen zeigte sich bei dieser Tumorzelllinie nicht [92]. Nachgewiesen wurden zelllinienspezifische Unterschiede nicht nur bei der Frage, ob Taurolidin den programmierten Zelltod induziert, sondern auch hinsichtlich des jeweiligen Mechanismus der Taurolidin-vermittelten Apoptoseinduktion [92,93].

In zahlreichen Studien konnte die antineoplastische Wirkung von Taurolidin bei unterschiedlichen Tumorentitäten in vivo bestätigt werden. Im Rahmen von zwei tierexperimentellen Untersuchungen zeigte sich jedoch eine unerwartete Zunahme der Metastasierung [94,70].

5.2 Taurolidin in Kombination mit anderen Wirkstoffen

Wenige Daten liegen bisher zum Einsatz von Taurolidin in Kombination mit anderen anti-neoplastischen Substanzen vor. So wurde die Substanz bei verschiedenen Tumorentitäten (Kolonkarzinom, Ösophaguskarzinom, Fibrosarkom) in Kombination mit TRAIL angewendet. Hier zeigte sich bei unterschiedlichen Tumorzelllinien eine Sensitivierung für die TRAIL-vermittelte Apoptoseinduktion durch Co-Inkubation mit Taurolidin [95,96].

5.3 Diskussion eigener Ergebnisse

In dieser Promotionsarbeit sollte der Effekt von Taurolidin auf die humanen Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 (mittelgradig differenziert) und AsPC-1 (schlecht differenziert), sowie auf die murine Tumorzelllinie DSL-6AC1 untersucht werden. Die Einbeziehung von DSL-6AC1 erfolgte dabei auch in Hinblick auf eine weiterführende tierexperimentelle Studie.

5.3.1 Untersuchung des Einflusses von Taurolidin in Mono- und Kombinationstherapie auf Wachstum und Viabilität der drei unterschiedlich differenzierten Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, HPAF-2 und DSL-6AC1

5.3.1.1 Die Monoinkubation mit Taurolidin hemmt konzentrationsabhängig Proliferation und Viabilität bei den Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, HPAF-2 und DSL-6AC1

Zur Untersuchung des Einflusses von Taurolidin auf Proliferation und Viabilität wurde eine Inkubationszeit von 72 Stunden festgelegt. Zunächst wurde Taurolidin als Einzelsubstanz in ansteigenden Konzentrationen (2-20-200-2000 µM) getestet.

Die 72-stündige Inkubation mit Taurolidin als Monosubstanz führte konzentrationsabhängig bei allen drei untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien zu einer Hemmung der Tumorzellproliferation (Abbildungen 2A, 2B und 2C / Seiten 50 und 51). Hinsichtlich der quantitativen Wirkung wurden zelllinienspezifische Unterschiede nachgewiesen. Am stärksten ausgeprägt zeigte sich der anti-proliferative Effekt bei der murinen Zelllinie DSL-6AC1.

Der Einfluss von Taurolidin auf die Viabilität der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Analog zur anti-proliferativen Wirkung, zeigte sich bei allen hier getesteten Tumorzelllinien eine

signifikante Hemmung der Viabilität durch Taurolidin in mittleren Konzentrationen. Auch in Bezug auf die Viabilität konnte die stärkste inhibitorische Wirkung bei der murinen Tumorzelllinie DSL-6AC1 nachgewiesen werden (Abbildungen 1A, 1B und 1C / Seiten 49 und 50). Beim PDAC scheint daher eine zelllinienspezifisch unterschiedliche Sensitivität gegenüber Taurolidin vorzuliegen.

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien wurde die Proliferation durch Taurolidin stärker gehemmt als die Viabilität. Möglicherweise besteht eine Assoziation zwischen der vorbeschriebenen geringen Allgemeintoxizität des Wirkstoffs und der, im Vergleich zur anti-proliferativen Wirkung, geringer ausgeprägten Hemmung der Viabilität. Durch weiterführende Studien, unter Einbeziehung nicht-neoplastisch veränderter humaner Zellen, könnte gezeigt werden, ob und inwieweit es sich bei der Taurolidin-vermittelte Hemmung von Proliferation und Viabilität um einen spezifischen Effekt bei neoplastisch veränderten Zellen handelt.

5.3.2.1 Alle untersuchten Kombinationstherapien mit Taurolidin hemmen Viabilität und Proliferation bei den Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1, HPAF-2 und DSL- 6AC1

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss verschiedene Kombinationstherapien mit Taurolidin auf Viabilität und Proliferation unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien haben. Taurolidin wurde dazu mit den etablierten Zytostatika Gemcitabine und Docetaxel, sowie mit dem Naphtanyl-Harnstoffderivat Suramin kombiniert. Für die Untersuchung des Einflusses der Zytostatika-Kombinationen sollte das Taurolidin in unterschwelliger Dosierung eingesetzt werden, dies erwies sich als erforderlich, da bei höherer Wirkstoffkonzentration eine vergleichende Zellzählung mit dem hier angewandten Verfahren (Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer) nicht mehr möglich gewesen wäre. Nach Auswertung der Versuche mit Taurolidin in Monoapplikation, wurde für die Untersuchung des Effektes der Kombinationstherapien eine einheitliche Taurolidin-Konzentration von 100 μ M festgelegt. Unabhängig davon, ob Taurolidin in Co-Inkubation mit Gemcitabine, Docetaxel oder Suramin verwendet wurde, konnte eine additive Steigerung der Hemmung von Proliferation und Viabilität bei allen untersuchten Tumorzelllinien nachgewiesen werden, die effektivste Wirkung zeigte sich bei der kombinierten Anwendung von Taurolidin und Gemcitabine (Abbildungen 4A-21B / Seiten 54-71). Wie dies bereits bei der Untersuchung des Effektes von Taurolidin als

Monosubstanz nachgewiesen werden konnte, so zeigte sich die größte Sensitivität gegenüber allen hier untersuchten Kombinationstherapien bei der murinen Zelllinie DSL-6AC1. Trotz der unterschiedlichen Sensitivität der verschiedenen Tumorzelllinien gegenüber dem Taurolidin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Wirkprofil der Substanz hinsichtlich der Hemmung von Proliferation und Viabilität bei der murinen Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 mit dem bei den beiden humanen Tumorzelllinien vergleichbar ist. Dies gilt sowohl für die Behandlung mit Taurolidin als Monosubstanz als auch in Kombination mit Gemcitabine, Docetaxel bzw. Suramin. Die murine Pankreaskarzinomzelllinie DSL-6AC1 erscheint daher als geeignet, im Rahmen tierexperimenteller Studien zur weiterführenden Untersuchungen zur Wirkung von Taurolidin eingesetzt zu werden.

5.4 Molekulargenetischen Analyse von Schlüsselregulatoren der Apoptose unter Einfluss einer Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine

5.4.1 Die Proteinexpression des pro-apoptotischen Proteins BAX bei AsPC-1, HPAF-2 und DSL-6AC1

Beim PDAC gilt BAX als potentieller Sensitizer für eine Zytostatikatherapie [97,74]. Es wurde beschrieben, dass das pro-apoptotische Protein BAX bei ca. 50 % der Pankreaskarzinome vermindert exprimiert vorliegt [48,98]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte BAX bei allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien auf RNA-Ebene dargestellt werden. In nativem Zustand zeigte sich jedoch bei allen getesteten Tumorzelllinien auf Proteinebene nur ein geringer Expressionsgrad. Sowohl bei den humanen Zelllinien AsPC-1 und HPAF-2, als auch bei der murinen Zelllinie DSL6AC1 konnte BAX nach Inkubation mit Taurolidin bzw. Gemcitabine auf Proteinebene verstärkt exprimiert nachgewiesen werden (Abbildungen 25, 26 und 27 / Seiten 75 und 76). Ob die nachgewiesene Induktion von BAX mit einer zusätzlichen Sensitivierung für die Behandlung mit weiteren Zytostatika einhergeht, oder ob die Expression des Proteins lediglich ein funktionelles Korrelat der Behandlung mit Gemcitabine bzw. Taurolidin ist, muss in weiteren Studien untersucht werden.

5.4.2 Das anti-apoptotische Protein BCL-2 kann bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 auf Proteinebene nicht dargestellt werden

Die funktionelle Bedeutung von BCL-2 beim Pankreaskarzinom wird kontrovers diskutiert. So fand sich in einigen Untersuchungen eine positive Korrelation zwischen Überlebenszeit nach R0-Resektion und der Expression von BCL-2 [48, 99], während von anderen Autoren ein solcher Zusammenhang nicht bestätigt wurde [100, 101]. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte BCL-2 bei der humanen Zelllinie HPAF-2 und bei der murinen Zelllinie DSL-6AC1 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dagegen war bei der schlecht-differenzierten Tumorzelllinie AsPC-1 eine Darstellung von BCL-2, weder nach Analyse des Gesamt-Zelllysats, noch nach fraktionierter Proteinisolierung (Auftrennung des Zelllysats in zytoplasmatische und mitochondriale Fraktion) möglich. Nicht auszuschliessen ist, dass die Sensitivität des hier verwendeten Antikörpers zur Darstellung des Proteins nicht ausreichte. Die Expression von BCL-2 bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie AsPC-1 ist jedoch in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. Während BCL-2 in früheren Untersuchungen auf Proteinebene exprimiert dargestellt wurde [72,102]), konnten Rückert et al. in einer jüngeren Studie das Protein bei der Zelllinie AsPC-1 nicht nachweisen [103]. Die Verschiebung der Proteinexpression von BCL-2 zugunsten einer stärkeren Expression der anti-apoptotischen Proteine MCL-1 bzw. BCL-XL wurde als Merkmal der Entdifferenzierung von Pankreaskarzinomzellen vorbeschrieben [102]. Es ist nicht auszuschliessen, dass es im Rahmen der Subkultivierung von AsPC-1 zu einer weiteren Entdifferenzierung der Zelllinie mit konsekutivem Verlust der Expressionsfähigkeit von BCL-2 auf Proteinebene gekommen ist. Hier könnte eine Erklärung für den fehlenden Nachweis des Proteins in neueren Untersuchungen liegen.

5.4.3 Das anti-apoptotische Protein c-Flip ist bei allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien auf Proteinebene nachweisbar

Bei der schlecht-differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1 ist eine Überexpression von c-Flip_L [30] bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnten nicht nur bei AsPC-1, sondern auch bei der mittelgradig-differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2 die Isoformen c-Flip_L und c-Flip_S auf Proteinebene dargestellt werden. Sowohl c-Flip_L als auch c-Flip_S wurden bei AsPC-1 quantitativ stärker exprimiert nachgewiesen als bei HPAF-2. Bei der murinen Zelllinie DSL-6AC1 waren sowohl c-Flip_L, als auch die murine Isoform c-Flip_r auf Proteinebene darstellbar.

Im Vergleich der drei hier getesteten Pankreaskarzinomzelllinien, zeigte sich c-Flip_L bei DSL-6AC1 am schwächsten exprimiert. In weiteren Studien muss untersucht werden, inwieweit eine Korrelation zwischen der Überexpression von c-Flip und dem Differenzierungsgrad unterschiedlicher Pankreaskarzinomzelllinien besteht.

5.4.4 Proteinexpression von BCL-2 und BAX nach Inkubation mit Gemcitabine

Ein wichtiger Wirkmechanismus von Gemcitabine beim Pankreaskarzinom ist die intrinsische (=mitochondriale) Induktion von Apoptose [72]. Das etablierte Zytostatikum Gemcitabine aktiviert den programmierten Zelltod über eine Induktion der mitochondrialen Cytochrom C-Freisetzung [74]. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Gemcitabine bei den Pankreaskarzinomzelllinien DSL-6AC1 und HPAF-2, auf Proteinebene eine Abnahme von BCL-2 und eine Zunahme von BAX induziert. Ob die in dieser Arbeit nachgewiesene Senkung der BCL-2/BAX-Ratio bei den Zelllinien HPAF-2 und DSL-6AC1 mit einer Zunahme der mitochondrialen Cytochrom C-Liberalisierung assoziiert ist und es so zu einer direkten Induktion der mitochondrialen Apoptose kommt, muss in weiteren Versuchen bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte bei HPAF-2 und DSL-6AC1 eine Korrelation zwischen Senkung der BCL-2/BAX-Ratio und einer Zunahme der Caspase 3/7-Aktivität nach Inkubation mit Gemcitabine nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie AsPC-2 musste die Analyse auf BAX beschränkt werden, da kein ausreichender Nachweis von BCL-2 auf Proteinebene möglich war. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei AsPC-1 nach Monoinkubation mit Gemcitabine eine signifikant schwächere Aktivierung der Caspasen 3 und 7, als dies bei HPAF-2 und DSL-6AC1 der Fall war. Die schwache Expression von BCL-2 bei AsPC-1 steht möglicherweise in Assoziation mit einem schlechteren Ansprechen dieser Tumorzelllinie auf die Behandlung mit Gemcitabine. So wiesen Bold et al. bei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien eine Korrelation zwischen der Expression von BCL-2 und der Sensitivität für Gemcitabine (gemessen anhand der Apoptoserate und der zelllinienspezifisch erforderlichen LD₅₀) nach [68].

5.4.5 Proteinexpression von c-Flip nach Inkubation mit Gemcitabine

Haag et al. wiesen nach, dass die Expression von c-Flip_L durch prä-Inkubation mit den etablierten Zytostatika 5-FU und Cisplatin auf Proteinebene inhibiert werden kann [30]. In der vorliegenden Arbeit fand sich bei den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien keine wesentliche Abnahme der Expression von c-Flip_L nach Inkubation mit

Gemcitabine. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit früheren Studien, so fand sich in den meisten Untersuchungen kein wesentlicher Einfluss von Gemcitabine auf c-Flip [30].

5.4.6 Taurolidin senkt bei HPAF-2 und DSL-6AC1 die BCL-2/BAX-Ratio

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei den Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL 6AC1 eine Taurolidin-induzierte Senkung der BCL-2/BAX-Ratio nachgewiesen. Der Effekt war bei der murinen Tumorzelllinie DSL-6AC1 quantitativ stärker ausgeprägt, als bei der humanen Pankreaskarzinomzelllinie HPAF-2. Für die murine Melanomzelllinie B164A5 ist eine Abnahme von BCL-2 und eine Steigerung von BAX nach 24-stündiger Inkubation mit Taurolidin vorbeschrieben worden [104]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das Ergebnis der oben zitierten Studie bei den Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL-6AC1 reproduziert werden. Im Vergleich mit den vorbeschriebenen Ergebnissen mit der murinen Melanomzelllinie B164A5 [104], waren jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit größere Wirkstoffkonzentrationen (50 µM vs. 200 µM), bzw. bei der humanen Tumorzelllinie HPAF-2 auch eine längere Inkubationszeit (24h vs. 72h) erforderlich, um eine Senkung der BCL-2/BAX-Ratio zu erzielen. Bei der humanen Tumorzelllinie HPAF-2 konnte nach 24 Stunden Inkubation mit Taurolidin weder bei Verwendung einer niedrigeren (200 µM), noch durch eine höhere Wirkstoffkonzentration (500 µM) eine Beeinflussung der Proteinexpression von BCL-2 und BAX nachgewiesen werden. Dagegen führte die 72-stündige Inkubation mit Taurolidin (200 µM) bei HPAF-2 zu einer Senkung der BCL-2/BAX-Ratio. Diese Beobachtung könnte auf unterschiedlichen Verdopplungszeiten der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien beruhen, sie kann aber auch als Indiz für eine potentielle Zytostatikaresistenz interpretiert werden. Wie es in dieser Arbeit bereits bei der Untersuchung mit Gemcitabine dargestellt werden konnte, so fand sich auch nach Monoinkubation mit Taurolidin eine Korrelation zwischen der Senkung der BCL-2/BAX Ratio und einer Aktivierung der Capasen 3/7. Die Beeinflussung der intrinsischen Apoptoseregulatoren BCL-2 und BAX erscheint daher als synergistischer anti-neoplastischer Wirkmechanismus von Taurolidin und Gemcitabine beim PDAC.

5.4.7 Taurolidin hemmt bei allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien die Proteinexpression von c-Flip_L

Die Inhibierung von c-Flip_L ist als Mechanismus zur Sensitivierung von Pankreaskarzinomzellen für die Liganden-vermittelten Apoptose vorbeschrieben worden [30]. Erstmals wurde in der vorliegenden Untersuchung der Einfluss von Taurolidin auf die Expression von c-Flip analysiert. Bei den humanen Pankreaskarzinomzellen HPAF-2 und AsPC-1 konnte nach 24-stündiger Monoinkubation mit Taurolidin in höherer Konzentration (500 µM) eine Abnahme des großen Iso-Enzyms c-Flip_L nachgewiesen werden, ohne dass dieser Effekt jedoch mit einer hochsignifikanten Aktivierung der Caspasen 3 und 7 korrelierte. Verschiedene Autoren wiesen eine Taurolidin-vermittelte Sensitivierung von Tumorzellen für die extrinsische Apoptoseinduktion durch TRAIL nach [95,96]. Über den Mechanismus der Taurolidin-induzierten TRAIL-Sensitivierung ist bislang wenig bekannt. Für die Pankreaskarzinomzelllinien AsPC-1 und PancTu-1 wurde eine Steigerung der TRAIL-induzierten Apoptose nach Inhibierung von c-Flip beschrieben [30]. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Senkung von c-Flip durch Taurolidin erscheint daher potentiell geeignet, die Sensitivität von Pankreaskarzinomzellen für eine Apoptoseinduktion durch TRAIL zu erhöhen. In weiteren Studien muss evaluiert werden, ob die Taurolidin-induzierte Senkung von c-Flip bei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzellen mit einer Steigerung der Sensitivität für TRAIL, bzw. für die Behandlung mit einem spezifischen Todesrezeptorliganden assoziiert ist.

5.4.8 Die Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine führt zu einer Steigerung der Caspase 3/7-Aktivität

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Co-Inkubation mit Gemcitabine und Taurolidin bei den Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL-6AC1 nicht nur eine Senkung der BCL-2/BAX-Ratio induziert werden kann, sondern dass auch die Caspasen 3 und 7 signifikant stärker aktiviert werden, als durch Inkubation mit Gemcitabine bzw. Taurolidin als Monosubstanzen. Im Vergleich mit HPAF-2 und DSL-6AC1, zeigte sich bei der schlecht-differenzierten Zelllinie AsPC-1 zwar sowohl hinsichtlich der Steigerung der Proteinexpression von Bax, als auch in Bezug auf die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 eine geringere Effektivität der Behandlung mit Taurolidin und Gemcitabine. Durch eine kombinierte Inkubation mit den beiden Wirkstoffen konnte jedoch auch bei AsPC-1 eine signifikant stärkere Caspase-

Aktivierung erreicht werden, als nach Behandlung mit den jeweiligen Einzelsubstanzen. In dieser Untersuchung zeigten sich zelllinienspezifische Unterschiede hinsichtlich des quantitativen Umfangs der Aktivierung der Caspasen 3 und 7 nach Inkubation mit Gemcitabine und Taurolidin, nichtsdestotrotz konnte bei allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien ein additiver Effekt beider Substanzen in der Kombinationstherapie nachgewiesen werden.

5.4.9 Die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine hemmt die Expression von c-Flip_L und c-Flip_s

In der vorliegenden Arbeit konnte bei den humanen Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und AsPC-1 eine Hemmung der Proteinexpression von c-Flip_L und c-Flip_s nach 72-stündige Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine nachgewiesen werden. Im Unterschied zur Beeinflussung der untersuchten intrinsischen Apoptoseregulatoren, fand sich hinsichtlich der Inhibierung von c-Flip kein deutlicher Unterschied zwischen AsPC-1 und HPAF-2. Nach Co-Inkubation mit Gemcitabine und Taurolidin wurde bei HPAF-2 eine signifikant stärkere Aktivierung der Caspasen 3/7 nachgewiesen, als dies bei AsPC-1 der Fall war. Ob bzw. inwieweit die beobachtete Hemmung von c-Flip nach 72-stündiger Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine zur Caspase 3/7 Aktivierung beiträgt, lässt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung nicht belegen. Trotz des Nachweises einer Inhibierung von c-Flip bei beiden Tumorzelllinien, wurde eine unterschiedlich starke Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 beobachtet (Abbildungen 31A, 31B, 31C / Seiten 79 und 80. Im Rahmen dieser Arbeit fanden sich daher keine eindeutigen Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen c-Flip Inhibierung und einer Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7.

Unklar ist, welche Rolle die hier nachgewiesene Inhibierung der kleinen Isoform c-Flips für die Apoptoseinduktion bei den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien spielt.

6. Schlussfolgerungen

1. Anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte von Taurolidin treten beim Pankreaskarzinomzellen unabhängig voneinander auf

Bei allen untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien konnte eine signifikante Hemmung von Proliferation und Viabilität nach Inkubation mit Taurolidin als Einzelsubstanz, sowie durch die Inkubation mit Taurolidin in Kombination mit den antineoplastischen Wirkstoffen Gemcitabine, Docetaxel und Suramin nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Hemmung von Viabilität und Proliferation zeigte Taurolidin bei den Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2, ASPC-1 und DSL-6AC1 eine effektive Wirkung. Dagegen fanden sich bei der Apoptoseinduktion zelllinienspezifische Unterschiede. So wurde bei HPAF-2 und DSL-6AC1, sowohl nach Inkubation mit Taurolidin als Einzelsubstanz, als auch nach Co-Inkubation mit Taurolidin und Gemcitabine, eine signifikant stärkere Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 nachgewiesen, als bei der schlecht-differenzierten humanen Zelllinie AsPC-1. Dies indiziert, dass die Taurolidin-vermittelte Hemmung von Viabilität und Proliferation beim Pankreaskarzinom nicht notwendigerweise an Induktion von Apoptose gekoppelt ist.

2. Die Induzierbarkeit von BAX korreliert mit der Zytostatika-Sensitivität der untersuchten Pankreaskarzinomzellen

Ein hoher Expressionsstatus von BAX gilt bei verschiedenen Tumorentitäten als positiver Prädiktor für das Therapieansprechen [105,106,107]. In dieser Untersuchung zeigte sich das pro-apoptotische Protein BAX bei allen getesteten Zelllinien exprimiert. Im Vergleich zu HPAF-2 und DSL-6A, konnte bei AsPC-1 jedoch durch die Behandlung mit den Testsubstanzen nur eine relativ geringe Steigerung von BAX auf Proteinebene induziert werden. Unabhängig davon, ob Taurolidin oder Gemcitabine als Einzelsubstanzen, oder aber die Kombination beider Wirkstoffe eingesetzt wurde, zeigte sich bei HPAF-2, AsPC-1 und DSL-6AC1 eine Korrelation zwischen der Steigerung von BAX auf Proteinebene und dem quantitativen Umfang einer Aktivierung der Caspasen 3/7. Bei Pankreaskarzinomzellen scheint daher nicht nur der basale Expressionsgrad von BAX, sondern auch die zusätzliche Induzierbarkeit des Proteins ein Indikator der Zytostatika-Sensitivität der jeweiligen Zelllinie zu sein.

3. BCL-2 erfüllt bei den Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL-6AC1 eine anti-apoptotische Funktion

In dieser Untersuchung wurde BCL-2 bei den beiden Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL-6AC1 nicht nur auf Proteinebene nachgewiesen, sondern es zeigte sich hier auch inhibierbar durch Taurolidin und Gemcitabine. Bei beiden Tumorzelllinien war die Herabregulierung von BCL-2 mit einer Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 assoziiert. Wie für andere Tumorentitäten nachgewiesen [42], so scheint BCL-2 auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL-6AC1 die Funktion eines Apoptose-Inhibitors zu erfüllen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass beim Pankreaskarzinom zelllinienspezifische Unterschiede hinsichtlich der Funktion von BCL-2 bestehen.

4. Die Senkung der BCL-2/BAX-Ratio ist ein synergistischer Wirkmechanismus von Taurolidin und Gemcitabine

BCL-2 und BAX sind zentrale Regulatoren der mitochondrialen Apoptose. Die mitochondriale Induktion des programmierten Zelltods wurde von verschiedenen Autoren als einer der anti-neoplastischen Wirkmechanismen von Gemcitabine beim Pankreaskarzinom vorbeschrieben [72,74]. In dieser Arbeit wurde bei den Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL-6AC1 eine Taurolidin-vermittelte Senkung der BCL-2/BAX Ratio dargestellt. Mit dem Nachweis der Senkung der BCL-2/BAX Ratio konnte somit ein synergistischer Wirkmechanismus von Taurolidin und Gemcitabine beim Pankreaskarzinom identifiziert werden.

5. Die synergistische Aktivierung der intrinsischen Apoptose durch Taurolidin beim Pankreaskarzinom, führt zur additiven Steigerung der Wirkung von Gemcitabine

Insensitivität für die Induktion von Apoptose gehört beim Pankreaskarzinom zu den Mechanismen der Zytostatikaresistenz [5]. Die funktionelle Wiederherstellung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs gilt als essentiell für die Überwindung von Gemcitabine-Resistenz beim Pankreaskarzinom [74]. In der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, dass bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien die Senkung der BCL-2/BAX Ratio mit der Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 korreliert. Die Senkung von c-Flip allein, d.h. ohne gleichzeitige Beeinflussung von BCL-2 und BAX, war jedoch in dieser Untersuchung nicht mit einer signifikanten Caspase 3/7 Aktivierung assoziiert.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die nachgewiesene additive Steigerung der Caspase 3/7 Aktivität vorangig auf einer synergistischen Aktivierung der intrinsischen Apoptose durch Taurolidin und Gemcitabine in Co-Inkubation beruht.

6. Die Hemmung von c-Flip könnte Pankreaskarzinomzellen für zielgerichtete anti-neoplastische Therapien mit Todesrezeptorliganden sensitivieren

Es wurde vorbeschrieben, dass durch die Senkung der c-Flip-Expression die Sensitivität für ein TRAIL- vermittelte, extrinsische Induktion des programmierten Zelltodes erhöht werden kann [30]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Senkung beider Isoformen von c-Flip durch Taurolidin und Gemcitabine nachgewiesen werden. Klinisch könnte dieser Effekt dazu beitragen (z.B. im Rahmen einer 3-fach Kombinationstherapie mit Taurolidin, Gemcitabine und einem Todesrezeptorliganden), das Ansprechen der Tumorzellen auf die Behandlung mit einem zielgerichtet am Todesrezeptor wirkenden Medikament zu verbessern.

7. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass Taurolidin Proliferation und Viabilität der unterschiedlich differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und AsPC-1 sowie der murinen Zelllinie DSL-6AC1 hemmt. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Co-Inkubation mit Taurolidin, sowohl in Kombinationstherapie mit Gemcitabine als auch in Verbindung mit Docetaxel und Suramin, zu einer additiven Hemmung von Proliferation und Viabilität bei allen hier untersuchten Tumorzelllinien führt.

Erstmals wurde in dieser Studie die Wirkung von Taurolidin auf Schlüsselregulatoren beider Hauptsignaltransduktionswege der Apoptose (BCL-2, BAX und c-Flip) bei unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien komparativ untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Taurolidin das Expressionsprofil aller hier untersuchten Regulatoren des programmierten Zelltods im Sinne eines pro-apoptotischen Effekts beeinflusst. Der pro-apoptotische Effekt von Taurolidin zeigte sich bei den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien quantitativ und qualitativ unterschiedlich ausgeprägt, so dass von einer zelllinienspezifischen Wirkung auszugehen ist. Bei den Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 und DSL-6AC1 induzierte Taurolidin eine gesteigerte Expression des pro-apoptotischen Proteins BAX, während das anti-apoptotisch wirkende BCL-2 inhibiert wurde. Sowohl bei HPAF-2, als auch bei DSL-6AC1 korrelierte die Senkung der BCL-2/BAX Ratio mit dem Umfang der Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7. Wie in der jüngeren Literatur vorbeschrieben [103], so konnte BCL-2 auch in dieser Untersuchung bei der schlecht-differenzierten Tumorzelllinie AsPC-1 auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. BAX war dagegen auf AsPC-1 nachweisbar, das Protein konnte jedoch durch Taurolidin und Gemcitabine (sowohl in Monoapplikation, auch in Kombination) in geringerem Umfang zusätzlich induziert werden, als dies bei HPAF-2 nachgewiesen wurde. Die geringere quantitative Zunahme von BAX bei AsPC-1 korrelierte mit einer relativ zu HPAF-2 schwächeren Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7. Bei der Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-2 konnte die BCL-2/BAX-Ratio durch eine Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine additiv stärker gesenkt werden, als durch die Monotherapie mit den jeweiligen Wirkstoffen.

Die intrinsische Aktivierung des programmierten Zelltods ist ein bekannter Wirkmechanismus von Gemcitabine, dem Standardzytostatikum zur Behandlung des

Pankreaskarzinoms. In dieser Arbeit wurde die Senkung der BCL-2/BAX-Ratio als synergistischer Wirkmechanismus von Taurolidin und Gemcitabine identifiziert, der konsekutiv zu einer sigifikant stärkeren Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 führt, als nach Behandlung mit den Wirkstoffen in Einzelapplikation.

Bei der Tumorzelllinie DSL-6AC1 wurden c-Flip_L und die murine Isoform c-Flip_R konzentrationsabhängig durch Taurolidin in Monotherapie auf Proteinebene inhibiert. Sowohl bei HPAF-2 als auch bei AsPC-1 konnte die Proteinexpression von c-Flip_L durch Taurolidin in Monoapplikation und durch Taurolidin und Gemcitabine in Kombination gehemmt werden. Unter der Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine wurde zusätzlich eine Inhibierung des kleinen Isoenzym c-Flip_S nachgewiesen. Durch die Hemmung von c-Flip könnte die Kombinationstherapie mit Taurolidin und Gemcitabine zu einer Sensitivierung für die Liganden-vermittelten Apoptose führen. Genutzt werden könnte dieser Effekt etwa im Rahmen einer 3-fach Therapie mit Taurolidin, Gemcitabine, und einem zielgerichteten Therapeutikum zur Aktivierung der Apoptose am Todesrezeptor.

Angesichts der schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms besteht eine Notwendigkeit zur Etablierung wirksamer Therapien. Bislang wurde in einer tierexperimentellen Studie die Wirkung von Taurolidin in Monoapplikation auf das Pankreaskarzinom untersucht [61]. Die Substanz wirkte hier anti-neoplastisch, toxische Organschäden wurden nicht nachgewiesen. Während der klinischen Anwendung in der Humanmedizin zeigte Taurolidin bis zum aktuellen Zeitpunkt keine schwerwiegenden Nebenwirkungen. Mit Gemcitabine und Taurolidin könnten zwei klinisch etablierte, relativ gut verträgliche Substanzen kombiniert werden.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit sich die Ergebnisse der vorliegenden molekulargenetischen Untersuchung auf den lebenden Organismus übertragen lassen.

8. Literaturverzeichnis

- 1 Hidalgo M.: *New England Journal of Medicine* (2010); 362:1605-1617
- 2 Jemal A, Siegel R, Xu, Ward E: *Cancer Statistics 2010*; *Cancer Journal for Clinicians* (2010); 60: 277–300
- 3 *Atlas der Krebsinzidenz und Krebsmortalität der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. „Der GEKID Atlas“ 2010*
- 4 S3-Leitlinie „Exokrines Pankreaskarzinom“ 2013
- 5 Schneider G, Schmidt RM: *Pathogenese des Pankreaskarzinoms. Bereits Konsequenzen für künftige therapeutische Ansätze?* *Internist* (2005); 46:157–16
- 6 Wong HH, Lemoine NR: *Pancreatic cancer: Molecular pathogenesis and new therapeutic targets*, *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology* (2009); 6: 412–422
- 7 Schneider G Schmidt RM: *Genetic alterations in pancreatic carcinoma*, *Molecular Cancer* (2003); 2:15
- 8 Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K, Schramm H, Fahlke J, Zuelke C, Burkart C, Gütberlet K, Kettner E, Schmalenberg H, Weigang-Koehler K, Bechstein WO, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Roll L, Doerken B, Riess H: *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of m pancreatic cancer: a randomized controlled trial*, *Jama* (2007); 297: 267-77
- 9 Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassl C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Mente MN, Izbicki JR, Friess , Lerch MM, Dervenis C, Olah A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Vile JW, Palmer DH, Buckles JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Bühler MW, European Study Group for Pancreatic Cancer: *Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial*, *JAMA* (2010); 304: 1073-1381
- 10 Burris HA, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, C.D. Stephens CD, von Hoff DD: *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*, *Journal of Clinical Oncology* (1997); 15: 2403-13
- 11 Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Fige JA, Hecht JR, Steven Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W : *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*, *Journal of Clinical Oncology* (2007); 25:1960-6
- 12 Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche Ó, Guimbaud R, Bécouarn Y, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet J-B, Khemissa-Akouz F, Péré-Verge D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Christine Montoto-Grillot C, Ducreux M, for the Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer and the PRODIGE Intergroup: *FOLFIRINOX vs. Gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*, *New England Journal of Medicine* (2011); 364: 1817-25
- 13 Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP et al Daniel D. Von Hoff, M.D., Thomas Ervin, M.D., Francis P. Arena, M.D., Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Wee Ma W, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, van Cutsem E, Wie X, Iglesias J, Renschler MF: *Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine*, *New England Journal of Medicine* (2013); 369: 1691-703

- 14 Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging Implications in tissue kinetics*, British Journal of Cancer (1972); 26: 239
- 15 Grimm S: *Chemie in unserer Zeit*, Wiley-VCH (2003); 3:172-178
- 16 Danial NN and Korsmeyer SJ: *Cell Death: Critical control points Review*, Cell (2004); 116: 205–219
- 17 Thompson CB: *Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease*, Science (1995); 267:
- 18 Galante JM, Mortenson MM, Bowles TL, Virudachalam S, Bold RJ: *ERK/BCL-2 Pathway in the resistance of pancreatic cancer to anoikis*, Journal of Surgical Research (2009); 152: 18–25
- 19 Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Schölmerich J: *Apoptotic Signaling during Initiation of detachment-induced apoptosis (“Anoikis”) of primary human intestinal epithelial cells*, Cell Growth & Differentiation (2001); 147,12: 147–155
- 20 Guadamillas MC, Cerezo A and del Pozo MA: *Overcoming anoikis – pathways to anchorage independent growth in cancer*, Journal of Cell Science (2011); 124: 3189-3197
- 21 Majno G, Joris I: *Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death*, American Journal of Pathology (1995); 146:
- 22 Savill J, Fadok V: *Corps clearance defines the meaning of cell death*, Nature (2000); 407: 784-788
- 23 Thornberry NA, Lazebnik Y: *Caspases: Enemies within*, Science (1998); 281:1312
- 24 Boatright KM, Salvesen GS: *Mechanisms of caspase activation*, Current Opinion in Cell Biology (2003); 15: 725–731
- 25 Fischer U, Schulze-Osthoff K: *New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease*, Pharmacology Reviews (2005); 57:187–215
- 26 Ashkenazi A: *Targeting death and decoy receptors of the tumornecrosis factor superfamily*, Nature Cancer Reviews (2002); 2: 421
- 27 Walczak H, Krammer PH: *The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems* Experimental Cell Research (2000); 256: 58–66
- 28 Adams JM and Cory S: *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*, Oncogene (2007); 26: 1324–1337
- 29 Shirley S, Micheau O: *Targeting c-Flip in cancer*, Cancer Letters (2013); 332(2):141-150
- 30 Haag C, Stadel D, Zhou S, Bachem MG, Möller P, Debatin KM, Fulda S: *Identification of c-Flip L and c-Flip s as critical regulators of death receptor-induced apoptosis in pancreatic cancer cells*, Gut (2011); 60: 225-237
- 31 Chang DW, Xing Z, Alegericas-Schimmnich A, Barnhardt BC, Yaish-Oshad S, Peter ME, Yang X : *c-FLIP is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis*, EMBO Journal (2002): 21,14: 3704-3714
- 32 Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, Briand C, Grütter MG: *The long form of FLIP is an activator of Caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex*, Journal of Biological Chemistry (2002); 277, No 47: 45162–45171
- 33 Longley DB, Wilson TR, Mc Ewan M, Allen WL, Mc Dermot U, Galligan L, Johnston PG: *c-Flip inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death*, Oncogene (2006); 25: 838-848

- 34 Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ: *The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy*; Nature Reviews Cancer (2008); 8: 782-798
- 35 Abedini MR, Muller EJ, Brun J: *Cisplatin induces p53-dependent FLICE-like inhibitory protein ubiquitination in ovarian cancer cells*. Cancer Research (2008); 68:
- 36 Llobet D, Llobet, N, Eritja, A, Yeramian, J, Pallares, A, Sorolla, M, Domingo, M, Santacana, F.J, Gonzalez-Tallada, Matias-Guiu X, Dolcet X: *The multikinase inhibitor sorafenib induces apoptosis and sensitises endometrial cancer cells to TRAIL by different mechanisms*, European Journal of Cancer (2010); 46; 836–850.
- 37 Fulda S and Debatin KM: *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*, Oncogene (2006) 25, 34: 4798–4811
- 38 Green DR, Kroemer G: *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. Science (2004); 306: 26
- 39 Fulda S: *Apoptosis pathways and their therapeutic exploitation in pancreatic cancer*, J. Cell Mol Med (2009); 13: 7, 1221-1227
- 40 Van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM Rodriguez I, Alnemri ES, Gevaert K, Vandekerckhove J, Deqlerq W, Vandenbeeke P: *The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces caspase activity*, Cell Death and Differentiation (2002) 9: 20–26.
- 41 Youle RJ, Strasser A: *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nature Reviews Molecular Cell Biology (2008); 9: 47-59
- 42 Cory S, Huang D, Adams JM: *The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis*, Oncogene (2003); 22: 8590–8607
- 43 Scaffidi C, Schmitz I, Zha J, Korsmeyer SJ, Krammer PH, Peter ME: *Differential Modulation of Apoptosis Sensitivity in CD95 Type I and Type II Cells*, Journal of Biological Chemistry (1999); 274, 32: 22532–22538
- 44 Trauzold A, Röder C, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, Martin-Subero JI, Siegmund D, Mürköster S, Raluy LP, Siebert R, Wajant H, Kalthoff H: *CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells*, The FASEB Journal express article 10.1096
- 45 Hamacher R, Schmid RM, Saur D, Schneider G: *Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma*, Molecular Cancer (2008); 7: 64
- 46 Altieri DC: *Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery*, Nature Reviews Cancer (2008); 8: 61-70.
- 47 Muilenburg DJ, Coates JM, Virudachalam S, Bold RJ: *Targeting Bcl-2-mediated cell death as a novel therapy in pancreatic cancer*, Journal of Surgical Research (2010); 163: 276–281
- 48 Magistrelli P, Coppola R, Tonini G, Vincenzi B, Santini D, Borzomati D, Vecchio F, Valeri S, Castri F, Antinori A, Nuzzo G, Caraglia M, Picciocchi A: *Apoptotic index or a combination of Bax/Bcl-2 expression correlate with survival after resection of pancreatic adenocarcinoma*, Journal of Cellular Biochemistry (2006); 97: 98–108
- 49 Fulda S and Debatin KM: *Apoptosis signaling pathways in anticancer therapy*, Current Cancer Therapy Reviews (2008); 4, 1: 14–20
- 50 Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H: *TRAIL signalling: Decisions between life and death*, International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2007); 39: 1462–147

- 51 Wajant H: *TRAIL and NF B Signaling—a Complex Relationship*, Vitamins and Hormones (2004) 67: 101-121
- 52 Igney FH, Krammer PH: *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nature Reviews Cancer (2002); 2: 277-288.
- 53 Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Röder C, Kalthoff H, Wajant H: *TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma*, Oncogene (2006); 25: 7434–7439
- 54 Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF, Gores GJ: *Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells*, American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology (2006); 290: 129–G136
- 55 Pfirrmann RW: *Taurolin in der Anwendung bei chirurgischen Infektionen*, Chirurgische Gastroenterologie (1991); 131
- 56 Calabresi P, Goulette FA, Darnowski JW: *Taurolidine: Cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent*, Cancer Research (2001); 61: 6816.
- 57 Jacobi CA, Menenakos C, Braumann C: *Taurolidine – a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects*, Anti-Cancer Drugs (2005); 16: 917–921
- 58 Bedrosian I, Sofia RD, Wolff SM, Dinarello CA: *Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells*, Cytokine (1991); 3: 568.
- 59 Neary PM, Hallihan P, Wang JH, Pfirrmann RW, Bouchier-Hayes DJ, Redmond HP: *The evolving role of taurolidine in cancer therapy*, Annals of Surgical Oncology (2009);
- 60 Watson RW, Redmond HP, McCarthy J, Bouchier-Hayes D: *Taurolidine, an antilipopolysaccharide agent, has immunoregulatory properties that are mediated by amino acid taurine*, Journal of Leukocyte Biology (1995); 58: 299-306.
- 61 Braumann C, Henke W, Jacobi CA, Dubiel W: *The tumoursuppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis*, International Journal of Cancer (2004); 112: 225.
- 62 McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP: *Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo*, Annals of Surgical Oncology (2000); 7: 685
- 63 Braumann C, Winkler G, Rogalla S, Menenakos C and Jacobi CA: *Prevention of disease progression in a patient with a gastric cancer-re-recurrence. Outcome after intravenous treatment with the novel antineoplastic agent taurolidine. Report of a case*, World Journal of Surgical Oncology (2006); 4: 34
- 64 Stendel R, Picht T, Schilling A, Heidenreich J, Loddenkemper C, Janisch W, Brock M: *Treatment of glioblastoma with intravenous taurolidine. First clinical experience*, Anticancer Research (2004); 24: 1143–1147
- 65 Wenger FA, Kilian M, Braumann C, Neumann A, Ridders J, Peter FJ, Guski H, Jacobi CA: *Effects of Taurolidine and octreotide on port site and liver metastasis after laparoscopy in an animal model of pancreatic cancer*, Clinical and Experimental Metastasis (2002); 19:169.
- 66 Braumann C, Schoenbeck M, Menenakos C, Kilian M, Jacobi CA: *Effects of increasing doses of a bolus injection and an intravenous long-term therapy of taurolidine on subcutaneous (metastatic) tumor growth in rats*, Clinical and Experimental Metastasis (2005); 22: 77.
- 67 Opitz I, Van der Veen H, Witte N, Braumann C, Mueller JM, Jacobi CA: *Instillation of Taurolidine/Heparin after Laparotomy Reduces Intraperitoneal Tumour Growth in a Colon Cancer Rat Model*, European Surgical Research (2007); 39:129–13

- 68 Hokschi B, Rufer B, Gazdhar A, Bilici M, Morris Beshay M, Gugger M, Schmid RA: *Taurolidine in the prevention and therapy of lung metastases*, European Journal of Cardio-Thoracic Surgery (2009); 36: 1058–1063
- 69 Bobrich E, Braumann, Opitz I, Menenakos C, Kristiansen G and Jacobi CA: *Influence of Intraperitoneal Application of Taurolidine/Heparin on Expression of Adhesion Molecules and Colon Cancer in Rats Undergoing Laparoscopy*, Journal of Surgical Research (2007); 137: 75–82
- 70 Abramjuk C, Bueschges M, Schnorr J, Jung K, Staack A, Lein M: *Divergent effects of taurolidine as potential anti-neoplastic agent: Inhibition of bladder carcinoma cells in vitro and promotion of bladder tumor in vivo*, Oncology Reports (2009); 22: 409-414
- 71 Daigeler A, Chromik AM, Geisler A, Bulut D, Hilgert C, Krieg A, Klein-Hitpass L, Lehnhardt M, Uhl W, Mittelkötter U: *Synergistic apoptotic effects of taurolidine and TRAIL on squamous carcinoma cells of the esophagus*, International Journal of Oncology (2008); 32:1205-1220
- 72 Bold RJ, Chandra J, McConkey DJ: *Gemcitabine-induced programmed cell death (apoptosis) of human pancreatic carcinoma is determined by Bcl-2 content*, Annals of Surgical Oncology (1999); 6(3): 279–285
- 73 El Maalouf G, Le Tourneau C, Batty GN, Faivre S, Raymond E: *Markers involved in resistance to cytotoxics and targeted therapeutics in pancreatic cancer*, Cancer Treatment Reviews (2009); 35: 167–174
- 74 Schniewind B, Christgen M, Kurdow R, Haye S, Kremer B, Kalthoff H, Ungefroren H: *Resistance of pancreatic cancer to Gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis*, International Journal of Cancer (2004); 109: 182–188
- 75 Diaz JF, Andreu JM: *Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: Reversibility, ligand, stoichiometry and competition*, Biochemistry (1993); 32: 2747-55
- 76 Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA: *Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells*, Molecular Biology of the Cell (1999); 10: 947-59
- 77 Barghava S, Hotz H, Hines J, Reber HA, Buhr HJ, Hotz HG: *Suramin inhibits not only tumor growth and metastasis but also angiogenesis in experimental pancreatic cancer* Journal of Gastrointestinal Surgery (2007) 11:171–178
- 78 Dewson G, Walsh GM, Wardlaw AJ. *Expression of BCL-2 and its Homologues in Human Eosinophils: Modulation by Interleukin-5*, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology (1999); 20: 720-728
- 79 Sipos B, Moeser S, Kalthoff H, Toeroek V, Loehr M, Kloepfel G: *A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform*, Virchows Archive (2003); 442:444–52.
- 80 Deer EL, Gonzalez-Hernandez J, Coursen JD, Shea JE, Ngatia J, Scaife CL, Firpo MA, Mulvihill SJ: *Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines*, Pancreas (2010); 39(4): 425–435
- 81 Lindl T, Steubing R: *Atlas of living cell cultures. First Edition*, Wiley-VCH (2013); 349
- 82 Schneider U, Schwenk H, Bornkamm G: *Characterization of EBV-genom negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma*, Nt Journal of Cancer (1999); 19 (5): 621-6
- 83 Mosmann T: *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay*, Journal of Immunological Methods (1983); 65 (1-2): 55-63
- 84 Mullis KB: *The polymerase chain reacton*, Birkhäuser Boston (1994)

- 85 Lämmli UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4*, Nature (1970); 227: (5259):680-685
- 86 Gorman, SP, McCafferty DF, Woolfson AD, Junes DS: *Reduced adherence of microorganisms to human mucosal epithelial cells following treatment with Taurolin, a novel antimicrobial agent*. Journal of Applied Bacteriology (1987); 62: 315–320
- 87 Van den Tol PM, van Rossen EE, van Eijck C: *Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze leads to less implantation metastasis of spilled tumor cells*. Annals of Surgery (1998); 227: 242-8.
- 88 Braumann C, Gutt CN, Scheele J, Menenakos C, Willems W, Mueller JM and Jacobi CA: *Taurolidine reduces the tumor stimulating cytokine interleukin-1beta in patients with resectable gastrointestinal cancer: a multicentre prospective randomized trial*, World Journal of Surgical Oncology (2009); 7: 32
- 89 Marcinkiewicz J, Kurnyta M, Biedron R, Bobek M, Kontny E, Maslinski W: *Anti-inflammatory effects of taurine derivatives (taurine chloramine, taurine bromamine, and taurolidine) are mediated by different mechanisms*, Advances in Experimental Medicine and Biology (2006); 583: 481-492.
- 90 Grivennikov S, Greten F, Karin M: *Immunity, inflammation and cancer*, Cell (2010); 140: 883–899
- 91 Karin M, Greten FR: *Nf-Kb: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression*, Nature Immunology Reviews (2005); 5: 749
- 92 Chromik AM, Daigeler A, Bulut D, Flier A, May C, Harati K, Roschinsky J, Sülberg D, Ritter PR, Mittelkötter U, Hahn SA, Uhl W: *Comparative analysis of cell death induction by Taurolidine in different malignant human cancer cell lines*, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (2010); 29: 21
- 93 Stendel R, Biefer HR, Dékány GM, Kubota H, Münz C, Wang S, Mohler H, Yonekawa Y, Frei K: *The antibacterial substance taurolidine exhibits anti-neoplastic action based on a mixed type of programmed cell death*, Autophagy (2009); 2: 194-210
- 94 Arlt M, Walters DK, Banke IJ, Steinmann P, Puskas GJ, Bertz J, Rentsch KM, Ehrensperger F, Born W, Fuchs B: *The antineoplastic antibiotic taurolidine promotes lung and liver metastasis and exhibits severe liver toxicity in two syngeneic osteosarcoma mouse models*, International Journal of Cancer (2012): 131(5), E804–E807
- 95 Daigeler A, Brenzel C, Bulut D, Geisler A, Hilgert C, Lehnhardt M, Steinau HU, Flier A, Steinstraesser L, Klein-Hitpass L, Mittelkoetter U, Uhl W, Chromik AM: *TRAIL and Taurolidine induce apoptosis and decrease proliferation in human fibrosarcoma*, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (2008); 27:82
- 96 Chromik AM, Daigeler A, Hilgert C, Bulut D, Geisler A, Liu V, Otte JM, Uhl W, Mittelkötter U: *Synergistic effects in apoptosis induction by taurolidine and TRAIL in HCT-15 colon carcinoma cells*; Journal of Investigative Surgery (2009); 20: 6, 339-348
- 97 Xu, Z.W., H. Friess, M.W. Büchler, M. Solioz: *Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology (2002); 49: 504– 510.
- 98 Evans JD, Cornford PA, Dodson A, Greenhalf W, Foster CS, Neoptolemos JP: *Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas*, Pancreatology (2001);1: 254–262

- 99 Mäkinen K, Loimas S, Hakala T, Eskelinen M: *Tumour suppressor protein (p53), apoptosis inhibiting protein (Bcl-2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expressions in a rat pancreatic tumour model*, *Anticancer Research* (2007); 27: 23-26
- 100 Friess H, Lu Z, Graber HU, Zimmermann A, Adler G, Korc M, Schmid RM, Buchler MW: *Bax, but not bcl-2, influences the prognosis of human pancreatic cancer*, *Gut* (1998); 43: 414-421.
- 101 Fujii H, Inagaki M, Kasai S, Miyokawa N, Tokusashi Y, Gabrielson E, Hruban RH: *Genetic progression and heterogeneity in intraductal papillary-mucinous neoplasms of the pancreas*, *American Journal of Pathology* (1999); 151:1447– 1454.
- 102 Miyamoto Y, Hosotani R, Wada M, Lee JU, Koshihara T, Fujimoto K, Tsuji S, Nakajima S, Doi R, Kato M, Shimada Y, Imamura M: *Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 expression in pancreatic cancers*, *Oncology* (1999); 56: 73–82
- 103 Rückert F, Sann N, Lehner AK, Saeger HD, Grützmann R, Pilarsky C: *Simultaneous gene silencing of Bcl-2, XIAP and survivin re-sensitizes pancreatic cancer cells towards apoptosis*, *BMC Cancer* (2010); 10: 379
- 104 Sun BS, Wang JH, Liu LL, Gong SL, Redmond HP: *Taurolidine induces apoptosis of murine melanoma cells in vitro and in vivo by modulation of the Bcl-2 family proteins*, *Journal of Surgical Oncology* (2007); 27: 241-24
- 105 Lange T, Guenther C, Koehler T, Krahl R, Musiol S, Leiblein S, Al-Ali HK, Van Hoomissen I, Niederwieser D, Deininger MW: *High levels of BAX, low levels of MRP-1 and high platelets are independent predictors of response to imatinib in myeloid blast crisis of CML*, *Blood* (2002); 101: 2152-5
- 106 Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Nakatani H, Tsujimoto H, Imanishi T, Ohgaki M, Ohyama T, Yamazaki J, Hagiwara A: *Overexpression of bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis*, *International Journal of Cancer*(1996); 67:101–105.
- 107 Schelwies K, Sturm I, Grabowski P, Scherubl H, Schindler I, Hermann S, Stein H, Buhr HJ, Riecken EO, Zeitz M, Dörken B, Daniel PT: *Analysis of P53/bax in primary colorectal carcinoma: low bax protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors*, *International Journal of Cancer* (2002); 99: 589–596

9. Anhang

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elisabeth Rust, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „ Die Wirkung von Kombinationschemotherapien mit Taurolidin auf Pankreaskarzinomzellen, unter besonderer Berücksichtigung der Induktion von Apoptose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

20.11.2015

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn P.D. Dr. med H.G. Hotz sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und für die stets wohlwollende Forderung und Förderung während der Durchführung dieser Promotionsarbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Birgit Hotz und Herrn Marco Arndt, die mir nicht nur bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, sondern auch bei der wissenschaftlichen Planung. Das Chirurgische Forschungslabor am Campus Benjamin Franklin war mir stets ein besonderer Ort mit besonderen Menschen.

Bei Herrn Prof. Buhr möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir bereits während des Studiums die Möglichkeit gab bei den Chirurgischen Forschungsworkshops und im Rahmen des Chirurgenkongresses zu referieren.

Im Besonderen danke ich meiner Mutter, die mich während der Durchführung dieser Arbeit in jeder Hinsicht unterstützte und die stets an ein gutes Gelingen dieser Arbeit geglaubt hat.

Lebenslauf

”Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht“

Publikationsliste

Rust E, Schellhaas E, Hotz B, Buhr H-J, Hotz HG (2012)

Taurolidine sensitizes pancreatic cancer cells for treatment with gemcitabine by enhancement of apoptosis *Langenbeck's Archives of Surgery* (April 2012), Vol 379:655-656

Schellhaas E, Rust E, Hotz B, Buhr H-J, Hotz HG (2009)

Taurolidine in pancreatic cancer (Poster) *Digestive Disease Week, Chicago 2009*

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Elisabeth Rust hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Rust E, Schellhaas E, Hotz B, Buhr H-J, Hotz HG (2012)
Taurolidine sensitizes pancreatic cancer cells for treatment with gemcitabine by enhancement of apoptosis *Langenbeck's Archives of Surgery (April 2012), Vol 379:655-656*

- Planung der Versuche
- Auswertung der Versuche
- Schreiben der Publikation

Publikation 2: Schellhaas E, Rust E, Hotz B, Buhr H-J, Hotz HG (2009)
Taurolidine in pancreatic cancer (Poster) *Digestive Disease Week, Chicago 2009*

- Versuchsdurchführung
- Versuchsauswertung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin