

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss des Matrixmetalloproteinaseinhibitors RO-28-2653 auf den
Zellzyklus der Pankreaskarzinomzelllinien
Bx-PC-3, MIAPaCa-2 und DSL-6A-C1.
Eine In-vitro-Untersuchung.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marion Hanel
aus Fulda

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J.M. Müller
2. Prof. Dr. med. Th. Volk
3. Prof. Dr. Dr. h.c. mult. M.W. Büchler

Datum der Promotion: 27.03.2009

Diese Promotion ist
in Liebe und großer Dankbarkeit
meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis.

1. Einleitung.	1
1.1. Das humane Pankreaskarzinom.	1
1.2. Zelllinien humaner und animaler Pankreaskarzinome.	3
1.3. Matrixmetalloproteinasen.	5
1.4. Bedeutung der Matrixmetalloproteinasen beim Pankreaskarzinom.	8
1.5. Matrixmetalloproteinaseninhibitoren.	9
1.6. Bedeutung der Matrixmetalloproteinaseninhibitoren beim Pankreaskarzinom.	11
1.7. RO 28-2653.	12
1.8. Begründung und Erläuterung des Versuchsvorhabens.	12
2. Material und Methoden.	15
2.1. Material.	15
2.2. Haltung und Pflege der Zelllinien.	18
2.3. Inkubationen vor Zellzyklusmessung.	19
2.4. Zellzyklusanalyse.	20
2.5. Biometrische Überlegungen und statistische Auswertungen.	22
3. Ergebnisse.	24
3.1. Bx-PC-3.	24
3.2. MIAPaCa-2.	29
3.3. DSL-6A-C1.	34
4. Diskussion.	39
4.1. Bx-PC-3.	39
4.2. MIAPaCa-2.	41
4.3. DSL-6A-C1.	41
4.4. Vergleichende Diskussion.	42
5. Zusammenfassung.	53

6. Literatur.	56
7. Abkürzungsverzeichnis.	67
8. Erklärung an Eides statt.	70
9. Lebenslauf	71
10. Publikationen	72
11. Danksagungen.	73

1. Einleitung.

1.1. Das humane Pankreaskarzinom.

Das Pankreaskarzinom ist in den amerikanischen und europäischen Sterblichkeitsstatistiken die viert- bzw. sechsthäufigste zum Tode führende Krebsart⁷⁰. Jährlich versterben weltweit ca. 213.000 Menschen am Pankreaskarzinom¹⁴. Trotz der intensiven Forschungen und vielfältigen Therapiemodifizierung und -optimierungen der letzten 10-20 Jahre, die bei anderen Karzinomen deutliche Verbesserungen der Lebensqualität und der Lebenserwartung ermöglichen konnten, haben diese Bemühungen beim Pankreaskarzinom keine zufriedenstellenden klinischen Fortschritte erbracht. Die Gründe für die hohe Letalität sind die späte Diagnosestellung aufgrund der häufig fehlenden frühen Symptomatik, die lokale Aggressivität der Tumorzellen mit schnellem und invasivem Wachstum, die frühe Metastasierung in Lymphknoten und Leber, die Lage des Pankreas in direkter Nähe zu Gefäßen und Darm mit nennenswerten Blutungs- und Perforationskomplikationen, die relative Unempfindlichkeit der Karzinome gegen bekannte Zytostatika und das ausgeprägte konsumierende Verhalten des Tumors mit rapider Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Patienten im Sinne von Kachexie und Asthenie⁶⁰. Die einzige kurative Therapie stellt weiterhin die frühe chirurgische Resektion dar, die bei Erreichen einer R0-Situation eine Fünfjahresüberlebensrate von ca. 20% ermöglicht. Bei 80–85% der Patienten bestehen jedoch zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits entweder ein lokal fortgeschrittenes Tumorleiden oder eine Fernmetastasierung, die keine sinnvolle chirurgische Therapieoption in kurativer Intention mehr zulassen. In diesen Fällen reduziert sich die mittlere Lebenserwartung auf wenige Monate und die Fünfjahresüberlebensrate wird auch unter den unterschiedlichen gängigen palliativen Therapieoptionen mit 5-Fluorouracil (5-FU), Radiatio und Gemcitabine, der Prodrug eines Nukleosidanalogs, das in phosphoryliertem Zustand zum DNA-Kettenabbruch und zur Apoptose führt, mit lediglich 1-5% angegeben¹⁴. Nach der FDA-Zulassung für Gemcitabine beim metastasierten Pankreaskarzinom konnten 1996 erstmals 1-Jahresüberlebensraten von 18% beschrieben werden⁶¹. In Anbetracht dieser sehr begrenzten therapeutischen Fortschritte erlangen neue

Denkansätze unter Einbeziehung der hinzugewonnenen Erkenntnisse - die Karzinogenese, die Angiogenese und die pathophysiologischen und molekularbiologischen Mechanismen des Pankreaskarzinoms betreffend - zunehmende Bedeutung^{62,14}. Wie schon bei anderen Karzinomen ist auch beim Pankreaskarzinom die Entwicklung der Malignität als Resultat mehrerer sich summierender, erworbener Mutationen zu sehen³⁸. Verschiedene Faktoren wie Rauchen, bestimmte Nahrungsgewohnheiten, demografische Faktoren wie hohes Alter, männliches Geschlecht und ethnische Zugehörigkeit sowie einige genetische Störungen und Begleiterkrankungen wie zum Beispiel die chronische Pankreatitis sind mit einem erhöhten Risiko vergesellschaftet⁶⁰. Es besteht ein komplexes Zusammenspiel aus exogenen und endogenen Faktoren. Die Aktivierung von Onkogenen, der Verlust der zellulären Reparaturmechanismen und von Tumorsuppressorgenen und im weiteren das solide Wachstum eines gut vaskularisierten lokalen Tumors, die Infiltration in benachbartes Gewebe und schließlich die Metastasierung werden über eine Vielzahl von Botenstoffen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Enzymen und Rezeptoren gesteuert^{25,38}. Deren Erforschung hat neue Angriffspunkte für die Entwicklung von Medikamenten und Therapieoptionen aufgezeigt^{14,84}. Neben Platinumanaloga wie Cisplatin und Oxaliplatin sind auf diese Weise Topoisomeraseinhibitoren wie Irinotecan und Rubitecan, humane EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erlotinib, Antikörper wie Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den vascular endothelial growths factor VEGF, Farnesyl-Transferaseinhibitoren wie Tipifarnib und Lonafarnib, Taxane wie Paclitaxel oder Docetaxel, Matrixmetalloproteinaseinhibitoren wie Marimastat, Batimastat und BAY 12-9566, aber auch bereits auf dem Markt befindliche Medikamente wie die selektiven COX-2-Hemmer in den Fokus der Forschung gerückt^{39,45}. Nach viel versprechenden Voruntersuchungen haben in klinischen Untersuchungen bisher nur wenige dieser Agenzien wie Oxaliplatin und Erlotinib die in sie gesetzten Erwartungen zumindest partiell erfüllen können⁶¹. Weitere neue Therapieansätze mit Hilfe onkolytischer Viren, gezielter Apoptoseinduktion mittels adenoviraler Vektoren oder auch die immunmodulatorische Gentherapie seien hier als zusätzliche Optionen genannt^{57,62}. Insgesamt waren jedoch in klinischen Studien die Ergebnisse über alle Interaktionsansätze und Stoffgruppen hinweg ernüchternd^{84,61,14}. Nichts desto trotz sind eine große Anzahl von Forschern

unterschiedlicher Fachrichtungen damit beschäftigt ihr Wissen und das Verständnis der pathophysiologischen und molekularen Vorgänge im Bezug auf das Pankreaskarzinom zu erweitern.

1.2. Zelllinien humaner und animaler Pankreaskarzinome.

Die Pankreaskarzinome sind zu 95% duktales Ursprungs und zeichnen sich histologisch als Adenokarzinome aus⁶¹. Im normalen Pankreasgewebe machen duktales Zellen dagegen nur ca. 4% des Gesamtzellenanteils aus³².

Die Etablierung und Untersuchung von Tumorzelllinien wurde und wird mit viel Engagement betrieben, da diese Zelllinien in einer definierten, kontrollierten Umgebung die Erforschung physiologischer, pathophysiologischer sowie genetischer Veränderungen erlauben, die im Mixed-Tissue-Gewebe der In-vivo-Untersuchungen aufgrund der Vielzahl von Interaktionen nicht möglich wäre. Diese Stärke des In-vitro-Verfahrens ist gleichzeitig seine Limitation. Das ideale Modell sollte biologische, morphologische und genetische Veränderungen so weit wie möglich simulieren. Dies ist in den Zellkulturansätzen nur sehr bedingt möglich. Dennoch stellen die in der Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse wesentliche Grundlagen für die weitere Erforschung in Tiermodellen und letztendlich in der Klinik dar. Viele der mittlerweile etablierten Zelllinien sind tumorigen in unterschiedlichen Versuchstierarten, so dass neuerforschte Zusammenhänge mit identischen Zellen auf einem höheren Komplexitätsniveau weiter untersucht werden können. Aber auch der umgekehrte Weg von bereits in klinischen oder tierexperimentellen Studien gezeigten Wirkungen hin zur Isolierung und Bestätigung des jeweiligen Mechanismus in der Zellkultur bedeutet eine sinnvolle und notwendige Erweiterung der wissenschaftlichen Untersuchungsmöglichkeiten⁹¹.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit 3 Pankreaskarzinomzelllinien unterschiedlicher Provenienz.

Die Bx-PC-3 als humane Pankreaskarzinomzelllinie stammt aus dem Pankreastumorgewebe einer 61-jährigen Frau mit einem primären Adenokarzinom. Als zelluläre Produkte werden Mucin, pankreaskarzinomspezifisches Antigen (PCSA) und CEA (carcinoembryonic antigen) synthetisiert. Die Bx-PC-3 zeigt eine epitheliale Morphologie und ist im Nacktmausmodell als gut bis wenig differenziertes Adenokarzinom tumorigen¹⁵.

Die zweite humane Zelllinie ist die MIAPaCa-2, die aus dem undifferenzierten Pankreaskarzinomgewebe eines 65-jährigen kaukasischen Mannes etabliert werden konnte. Als zelluläre Produkte werden der humane colony stimulating-Faktor der Subklasse I (CFS-I) und Plasminaktivator angegeben¹⁶.

Die dritte Zelllinie, die DSL-6A-C1, ist nicht humanen Ursprungs. Sie stammt aus dem Tumorgewebe eines mit Azasarin induzierten Azinuszellkarzinoms der Lewis-Ratte. Diese Zelllinie exprimiert in Folge der durch Wachstum, Passage und Replantation verlorenen strukturellen und immunhistochemischen Azinuszellmarker als Subpopulation Marker des duktales Karzinoms (OV-6, CK-7, CK-19). Dieser Mechanismus der Mutation von Azinuszellen wird auch für die Entstehung des humanen duktales Pankreaskarzinoms diskutiert^{81,36}. Als zelluläres Produkt ist die Expression von CFTR-Protein (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulations-Protein) beschrieben, welches auch bei der hereditären, chronischen Pankreatitis und deren erhöhtem Karzinomrisiko eine wichtige Rolle spielt^{17,83,38}.

1.3. Matrixmetalloproteinasen.

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) stellen eine Untergruppe der körpereigenen Endopeptidasen dar, in der mittlerweile mehr als 25 bekannte Enzyme zusammengefasst werden. Durch ihre proteolytischen Eigenschaften sind die Matrixmetalloproteinasen in der Lage wichtige Schlüsselpositionen bei den unterschiedlichsten physiologischen und pathologischen intra- und extrazellulären Prozessen einzunehmen. Sie beeinflussen das biologische Verhalten von Zellen und sind an der embryonalen Entwicklung und Differenzierung von Geweben, an der Wundheilung, bei verschiedenen akuten wie chronisch entzündlichen Erkrankungen, Gewebeumbauvorgängen und auch bei der Entwicklung und Ausbreitung bösartiger Tumoren beteiligt. Als Ausdruck ihrer Interaktion zeigen sich zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis, bei verschiedenen Gefäß- und Nierenerkrankungen und auch bei einer Reihe von Tumorleiden deutlich erhöhte MMP-Konzentrationen im betroffenen Gewebe selbst, aber auch im peritumoralen Gewebe und teilweise im Serum der Patienten^{53,69,31}. MMPs unterliegen vielschichtigen Regulationsmechanismen, die sie auf Transkriptionsebene, Proteinebene, bei ihrer Sekretion, der Lokalisation und der Degradierung aktivieren und hemmen können. Sie agieren in Verbindung mit Wachstumsfaktoren, Komponenten der Gerinnungskaskade, chemotaktischen Molekülen und körpereigenen Matrixmetalloprotease-Inhibitoren, den sogenannten tissue inhibitors of matrix metalloproteinases oder TIMPs, in einem hochkomplexen System zur Aufrechterhaltung der Zellfunktionen. Insbesondere bei der Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Interaktion spielen sie eine entscheidende Rolle, da nahezu alle strukturellen Proteine der Extrazellulärmatrix durch sie degradiert werden können⁸⁷. Aber nicht nur die Degradation sondern auch die Modifikation des Mikroenviroments einer Tumorzelle mittels proteolytischer Spaltung spezifischer Substrate und damit Hemmung bzw. Aktivierung derselben werden den MMPs mittlerweile zugeschrieben⁷⁸.

Ihren Namen haben die Matrixmetalloproteinasen aufgrund eines Zink-Metallions, das in ihren katalytischen Mechanismus eingebunden ist. Die meisten MMPs werden als inaktive Vorstufen synthetisiert.

Man kann insgesamt 5 Gruppen aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität und ihrer Lokalisation unterscheiden^{8,87,78}:

Gruppen	Nummerierung	andere Bezeichnung oder Protein
Stromelysine:	MMP-3	Stromelysin 1
	MMP-7	Matrilysin
	MMP-10	Stromelysin 2
	MMP-11	Stromelysin 3
	MMP-12	Metalloelastase
Kollagenasen	MMP-1	Kollagenase 1
	MMP-8	Kollagenase 2
	MMP-13	Kollagenase 3
Gelatinasen	MMP-2	Gelatinase A
	MMP-9	Gelatinase B
„Membran-Type“MMPs	MMP-14	MT1-MMP
	MMP-15	MT2-MMP
	MMP-16	MT3-MMP

	MMP-17	MT4-MMP
	MMP-24	MT5-MMP
	MMP-25	MT6-MMP, Leukolysin
„andere“	MMP-18	Xenopus MMP
	MMP-19	RASI
	MMP-20	Enamelysin
	MMP-21	XMMP
	MMP-22	
	MMP-23	CA-MMP
	MMP-26	Matrilysin2, Endometase
	MMP-27	CMMP
	MMP-28	Epilysin

Tab. I: Matrixmetalloproteinasen

Für die Entwicklung und Ausbreitung einer großen Anzahl unterschiedlicher Tumorentitäten konnte in Studien eine Beteiligung von MMP-2 und MMP-9, die auch als Gelatinase A und B bezeichnet werden, gesichert werden^{79,8,34}.

Zusätzlich konnte eine deutliche Assoziation zwischen ihrer erhöhten Expression und einem raschen Tumorprogress sowie einer schlechteren Prognose im Vergleich zu Tumoren, die eine geringere Expression aufweisen, aufgezeigt werden^{31,63}. Dies machte insbesondere diese beiden Gelatinasen für eine weitergehende Untersuchung als mögliche Interaktions- und Interventionspunkte bei malignen Erkrankungen interessant.

1.4. Matrixmetalloproteinasen beim Pankreaskarzinom.

In der aktuellen Literatur findet sich bereits eine ganze Reihe von Veröffentlichungen über die Bedeutung von Matrixmetalloproteinasen beim Pankreaskarzinom^{8,97,47}. Insbesondere für MMP 2, MMP 9 und MT-1MMP werden erhöhte Konzentrationen, die mit einer schlechteren Prognose einhergehen, beschrieben^{63,8,48,94}. Wie bei anderen Malignomen sind auch beim Pankreaskarzinom die beiden Fähigkeiten zum invasiven Wachstum in benachbarte vaskuläre und viszerale Strukturen sowie zum Liberieren von Tumorzellen mit Bildung von Distanzmetastasen wesentliche Merkmale, die ihr aggressives Verhalten bedingen und sie von benignen Neubildungen unterscheiden. Dieses grenzüberschreitende Wachstum erfordert eine Manipulation der extrazellulären Matrix durch die Tumorzellen und die teilweise proteolytische Zersetzung von Barrierestrukturen wie zum Beispiel Basalmembranen oder Gefäßwänden von Lymph- und Blutgefäßen⁸⁵. Die Basalmembranen als erste wichtige Grenzstrukturen bestehen hauptsächlich aus Typ-IV-Kollagen, Laminin und Heparin-Sulfat-Proteoglykanen⁵⁶. Gestörte Basalmembranen in der Nähe von Tumorzellen konnten auch beim Pankreaskarzinom nachgewiesen werden⁵⁸. Für diese Veränderungen werden neben den Serinproteasen (Plasmin/Plasminogen) und Cathepsinproteasen (Cathepsin B, D, E und I) vor allem bestimmte Matrixmetalloproteinasen, insbesondere die Kollagenasen MMP-1, MMP-8, MMP-13, verantwortlich gemacht, deren bevorzugtes Substrat Kollagen Typ IV darstellt⁷⁹. Diese Ergebnisse korrelieren mit der beschriebenen erhöhten Expression von MMP-2, MMP-9 und MT-1MMP im Pankreaskarzinomgewebe und der Nachweis kann zur weiteren Unterscheidung der Karzinomuntergruppen und ihrem Risiko und möglichen spezifischeren Therapieansätzen dienen⁶³. Als möglicherweise sinnvoller Schritt zur verbesserten Diagnostik insbesondere bei kleinen Tumoren mit noch guten Therapieoptionen wurde die Bestimmung der erhöhten Expression und damit Konzentration dieser Matrixmetalloproteinasen aus dem Pankreassaft postuliert^{95,42}.

1.5. Matrixmetalloproteinaseinhibitoren.

Im Rahmen der strengen Regulationsmechanismen der MMPs übernehmen natürliche Inhibitoren (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases TIMPs) eine entscheidende Funktion. Da den MMPs eine Schlüsselrolle in der Tumorentwicklung und -ausbreitung zugeschrieben wird, rückten auch ihre Antagonisten als möglicher therapeutischer Ansatz in den Fokus²⁶. Es werden 4 verschiedene TIMPs unterschieden, die befähigt sind MMPs im stochastischen Verhältnis 1:1 reversibel zu hemmen³⁵. Sie weisen innerhalb ihrer Gruppe aufgrund mehrerer invarianter Disulfidbrücken zwischen Cysteinen mit Ausbildung zweier interaktionsfähiger Domänen eine große strukturelle Ähnlichkeit auf, wobei die N-terminale Domäne in der aktuellen Literatur als häufigere Reaktions- und Bindungsstelle beschrieben ist⁹².

TIMPs sind wie auch die MMPs multifunktionale Proteine, die neben ihrer direkten gegenseitigen Bindungs- und Beeinflussungsmöglichkeit an einer Vielzahl von Gewebeprozessen beteiligt sind. Mit unterschiedlicher Affinität und Selektivität reagieren sie nicht nur mit MMPs, sondern auch diversen anderen Interaktionspartnern^{50,3}. Wachstumsfaktorenaktivität, Modulation der Zellmorphologie, Remodeling von Embryonalgewebe und Beeinflussung der Organogenese zum Beispiel der Nieren, wie Entwicklung der Hoden und Spermatogenese, Beeinflussung von Ovulation und Schwangerschaft, Einbindung in den Knochen- und Knorpelstoffwechsel, Reduktion von Angiogenese und Beteiligung an Erkrankungen der Retina, der Haut, der Blase, des Herzens, der Lunge, Leber und des Darmes sind einige der beschriebenen Funktionen⁶⁵. Für diese Arbeit sind insbesondere ihre nachgewiesene Hemmung von Tumorzellwachstum und Metastasierung und die Beteiligung an bzw. Induktion von Apoptosemechanismen von verstärktem Interesse^{73,35,74}. Die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der TIMPs haben eine große Bedeutung, da sie Entscheidendes zum Verständnis der MMP-Wirkung beigetragen haben und weiterhin beitragen^{65,3}. Sie stellen eine interessante mögliche Interventions- und Manipulationsmöglichkeit des Proteasensystems dar.

Zur weiteren gezielten Untersuchungen der Matrixmetalloproteinasen und zur möglichen therapeutischen Nutzung antitumoröser Effekte ihrer Inhibitoren erfolgte die Entwicklung von synthetischen Matrixmetalloproteinaseinhibitoren. Deren erste Generationen (Marimastat, BAY 12-9566 und Batimastat) wirkten noch als Breitspektrum-inhibitoren relativ unspezifisch gegen unterschiedliche MMPs. Sie zeigten bezüglich einer Reihe von malignen Erkrankungen in In-vitro-Studien und bei Untersuchungen im Tiermodell vielversprechende Ergebnisse. Es konnten eine vermindertes Tumorstadium und Metastasierung beim Melanom, eine Hemmung der Angiogenese bei Hämangiomen, eine Reduktion von Metastasierung und Rezidivraten für das Mammakarzinom im Mausmodell, eine Hemmung des Tumorstadiums und ein verlängertes Überleben ebenfalls im Mausmodell für das Ovarialkarzinom und für das Prostatakarzinom in der Ratte nachgewiesen werden^{18,89,59,86,20}. Ihr letztendliches Versagen in den klinischen Studien war in Anbetracht dieser vielversprechenden Untersuchungen umso überraschender, kann jedoch mit der unspezifischen Wirkung dieser frühen Medikamenten Generationen und dem noch unzureichenden Wissen über genaue Wirkmechanismen und mögliche therapeutische Zeitfenster im Tumorverlauf erklärt werden^{37,12}. Mit dem Pyrimidin-2,4,6-Trion RO 28-2653 steht nun eine Substanz der neuen Inhibitoren-Generation zur Verfügung, die über eine hohe Affinität und Spezifität zu den für die Tumorentstehung und Ausbreitung bedeutenden MMPs 2 und 9 und zur MT1-MMP verfügt³³. Es konnten bereits hoffnungsvolle Ergebnisse bezüglich seiner Wirkung auf das Tumorstadium und die Ausbreitung zum Beispiel beim Prostata-Karzinom gewonnen werden⁵⁹.

1.6. Bedeutung der Matrixmetalloproteinaseinhibitoren beim Pankreaskarzinom.

Angesichts der initial vielversprechenden Ergebnisse bei soliden Tumoren und anderen malignen Erkrankungen weckten die Matrixmetalloproteinaseinhibitoren auch als potentieller Therapieansatz für das Pankreaskarzinom großes Interesse. In einer Reihe von Studien wurden verschiedene Inhibitoren in-vitro und in-vivo getestet und es konnte sowohl bei Zelllinien, im transplantablen Tiermodell, als auch bei chemisch induzierten Pankreaskarzinomen eine Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierungsraten nachgewiesen werden^{45,68,97,52}. In den auf diesen Erfolgen aufbauenden, folgenden klinischen Studien beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom mit Marimastat, Batimastat und BAY12-9566 im Vergleich zur Standardtherapie mit Gemcitabine zeigten sich die Inhibitoren im Bezug auf Anspruchsrate, medianes Überleben und klinischen Vorteil jedoch signifikant unterlegen^{28,10,72}. Diese ernüchternden klinischen Ergebnisse und die nennenswerten, den Einsatz teilweise limitierenden insbesondere muskuloskeletalen Nebenwirkungen führten zur fast vollständigen Einstellung der MMP-Therapie-Studien am Patienten. Die Grundlagenforschung wurde jedoch intensiv weiter betrieben. Es sind in den letzten Jahren für fast alle MMPs und unterschiedliche ihrer Kombinationen hochselektive, synthetische Matrixmetalloproteinaseinhibitoren entwickelt worden, die nun zur weiteren Untersuchung und Anwendung zur Verfügung stehen^{41,5,19,13}. Sie ermöglichen neben ihrer eigenen Prüfung als mögliche Therapieoption vor allem eine sehr gezielte Beobachtung der entscheidenden molekularbiologischen Zusammenhänge, so dass deutliche Fortschritte bezüglich der Entschlüsselung der komplexen Interaktion zwischen der Vielzahl von Signalmolekülen und ihrer Rezeptoren gemacht werden konnten^{38,77,19}.

1.7. RO 28-2653.

In 2001 haben Grams et al. unter der Vorstellung einer zielgenauen Manipulation der MMP-Regulationsmechanismen strukturbasiert einen selektiven MMP-2-, MMP-9- und MT1-MMP-Inhibitor, das RO 28-2653, synthetisiert³³. Dieses Pyrimidin-2,4,6-trione-derivat hat eine gute orale Bioverfügbarkeit. In aktuellen Studien konnten Effekte gegen Tumorinvasion, Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung beim Pankreaskarzinom und anderen malignen Tumoren bereits gesichert werden^{66,59,75,2}. Im Gegensatz zu den unselektiven Breitspektruminhibitoren zeigt sich bei dieser neuen Substanzklasse in den vorliegenden Studien ein einheitlicheres Wirkungsprofil ohne die von Marimastat und Batimastat bekannten paradoxen Aufregulationen bestimmter MMPs wie zum Beispiel der Angiogenese-stimulierenden MMP-9⁶⁶. Des Weiteren wurde bisher nur eine geringe Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität, die Ausdruck einer zytotoxischen und apoptoseinduzierenden Wirkung sein kann, nachgewiesen und ein deutlich selteneres Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen wie zum Beispiel der Affektion von Muskulatur und Gelenken beobachtet⁷⁷.

1.8. Begründung und Erläuterung des Versuchsvorhabens.

Man nimmt an, dass es im Rahmen multifaktorieller Erkrankungen, zu denen auch die malignen Erkrankungen wie das Pankreaskarzinom zählen, 5000-10000 potentielle Ansatzpunkte, so genannte Drug-Targets, für eine medikamentöse Beeinflussung vorhanden sind. Overall et al. postulieren in jenem Nature-Artikel aus dem Jahre 2006 einen bis zu 10%-Anteil von Proteasen an diesen potentiellen Interaktionsstellen. Dies zeigt die große Bedeutung dieser Enzymgruppe. Bisher wird jedoch geschätzt, dass nur etwa die Hälfte der Protagonisten im

hochkomplexen Proteasensystem überhaupt identifiziert sind. Von hinlänglichen Erkenntnissen über ihre jeweilige Position im System und ihre biologische Funktion ist die Forschung noch weit entfernt⁷⁸. Umso notwendiger erscheint es weitere Erkenntnisse über die bereits bekannten Komponenten des Proteasensystems zu gewinnen. Die fortgesetzte Untersuchung der MMPs als große und wichtige Untergruppe, deren Schlüsselpositionen in einer Vielzahl von Erkrankungen bereits nachgewiesen werden konnte, kann dafür wertvolle Ergebnisse liefern. Trotz der ernüchternden Ergebnisse aus klinischen Studien mit den Matrixmetalloproteinaseinhibitoren Marimastat, BAY12-9566 und Batimastat sollten die Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren nicht vorschnell verworfen werden^{11,98,19,30}. Die Unübersichtlichkeit des hochkomplexen Zusammenspiels der MMPs mit einer großen Anzahl von interagierenden Komponenten und die noch teilweise unzureichende Kenntnis entscheidender zeitlicher und kausaler Zusammenhänge erschweren die Interpretation der teilweise paradoxen Ergebnisse. Gerade diese Unzulänglichkeiten machen die Fortführung der Grundlagenforschung zu den MMPs erforderlich.

Insbesondere im Rahmen einer weiteren Subklassifizierung der jeweiligen Tumoruntergruppen und der fortschreitenden Klärung der chronologischen Zusammenhänge der Karzinogenese und Metastasierung könnten die Matrixmetalloproteinaseinhibitoren gegebenenfalls in Kombination mit weiteren Substanzen im Sinne eines multimodalen Therapieansatzes eine größere Bedeutung bekommen¹⁹. Mit der neuen, selektiven Inhibitorengeneration sind deutlich präzisere Eingriffe in das System der vielschichtigen Interaktionsmechanismen der MMPs möglich und die bisherigen vorklinischen Studien mit dieser Substanzgruppe zeigen ermutigende Ergebnisse^{54,77,66}. Vor diesem Hintergrund konnten in eigenen Vorversuche mit RO 28-2653 im Tiermodell des soliden, chemisch induzierten duktales Pankreasadenokarzinoms im Syrischen Hamster sowohl eine Beeinflussung von Tumorwachstum und Metastasierung als auch Veränderungen in den biochemischen Bedingungen (Prostaglandine, Leukotriene, Lipidperoxidation, MMPs) nachgewiesen werden⁵².

Schon früh wurde vermutet, dass Matrixmetalloproteinaseinhibitoren neben ihrer MMP-Hemmung über Interaktionen auch MMP-unabhängige, direkt auf die Tumorzelle wirkende Einflüsse vermitteln, deren exakter Mechanismus bis heute nicht hinreichend geklärt ist²⁷. Da bisher kaum direkte zytotoxische Effekte dieser Substanzgruppe beschrieben wurden und nur wenig Einfluss auf die mitochondriale Aktivität und Zellatmung nachgewiesen wurde, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die Generierung erster Ansätze, ob die beobachteten tumorsuppressiven und antimetastischen Effekte des RO 28-2653 zusätzlich über einen Zellzyklusarrest und Apoptose erklärt werden können^{66,77}. Erste in diese Richtung weisende Ergebnisse konnten Mangoldt et al. bereits 2001 für RO 28-2653 an Dunning Tumorzellen für das Prostatakarzinom aufzeigen⁶⁴. Für Pankreaskarzinomzelllinien liegen in der aktuellen Literatur diesbezüglich noch keine Studien vor. Insbesondere zur Entwicklung multimodaler adjuvanter Therapien mit mehreren Substanzgruppen, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungsmechanismen gegenseitig unterstützen und ggf. sogar verstärken und zur Vermeidung von unerwünschten Medikamentenresistenzen ist die Klärung dieser Grundlagen von großem Interesse⁴⁶.

2. Material und Methoden.

2.1. Material

RO 28-2653

Roche Diagnostics GmbH,
Pharma Research Penzberg, Germany

Medien:

RPMI 1640

Biochrome AG Seromed, Berlin, Deutschland

Waymouth's MB 752/1

MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland

Zusätze:

10% FBS

Biochrome AG Seromed, Berlin, Deutschland

Glutamine

Biochrome AG Seromed, Berlin, Deutschland

Antibiotika:

Penicillin 5000 U/ml

Biochrome AG Seromed, Berlin, Deutschland

Streptomycin 5 mg/ml

Biochrome AG Seromed, Berlin, Deutschland

Neomycin 10 mg/ml

Biochrome AG Seromed, Berlin, Deutschland

Camptothecin	Sigma-Aldrich, Großbritannien
EDTA	Biochrome AG Seromed, Berlin, Deutschland
EDTA-Trypsin	Biochrome AG Seromed, Berlin, Deutschland
Aqua pro injectione	B. Braun, Melsungen, Deutschland
NaCl 0,9%	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Triton X 100	Boehringer Ingelheim, Deutschland
RNAse	Sigma-Aldrich, Großbritannien
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Großbritannien

Puffer:

1l PBS, 5g BSA, 1g NaN ₃	Sigma-Aldrich, Großbritannien
-------------------------------------	-------------------------------

Zelllinien:

Zelllinie MIAPaCa-2	European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisburk, Großbritannien)
Zelllinie Bx-PC-3	European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisburk, Großbritannien)
Zelllinie DSL-6A-C1	European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisburk, Großbritannien)

Well-Platten	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Zellkulturflaschen (75 ml /150ml)	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Kendro, Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Laminar-Flow-Bank Hera-Safe	Heraeus Kendro, Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Zentrifuge JouanBR 3.11	Thermo Scientific Inc., USA
FACScalibur	Becton-Dickinson, New Jersey, USA
DNA-Histogramm CellQuest	Becton-Dickinson, New Jersey, USA

2.2. Haltung und Pflege der Zelllinien.

Alle Zelllinien wurden über die European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisburk, Großbritannien) erworben und entsprechend der Richtlinien der ECACC versandt und aufbereitet.

Als humane Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinien wurden in dieser Untersuchung MIAPaCa-2 and Bx-PC-3 verwandt, deren Herkunft und Eigenschaften bereits vorangegangen im Einleitungsteil der Arbeit genauer ausgeführt wurden. Die verwandten Zelllinien befanden sich zum Zeitpunkt der Lieferung in unterschiedlich fortgeschrittenen Passageanzahlen. Die Bx-PC-3 war in der 14. Passage. Die MIAPaCa-2 befand sich in der 137. Passage. Die beiden humanen Zelllinien wurden unter standardisierten Bedingungen im Wachstumsmedium RPMI 1640 mit Zusatz von 10%-gem hitzeinaktivierten fetalem Kälberserum (FBS), 2 mM Glutamine und antibiotischer Abschirmung mit Penicillin 5000 U/ml, Streptomycin 5 mg/ml und Neomycin 10 mg/ml zur Gewinnung für den Versuch notwendiger höherer Zellzahlen weiter kultiviert.

Die dritte Zelllinie, DSL-6A-C1, einem Adenokarzinom des Pankreas aus der Ratte entstammend, wurde in Waymouth's MB 752/1 Medium ebenfalls mit Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS), 2 mM Glutamine and antibiotischer Abschirmung mit Penicillin 5000 U/ml, Streptomycin 5 mg/ml und Neomycin 10 mg/ml kultiviert. Die DSL-6A-C1 befand sich bei Lieferung in der 27. Passage.

Die Expansionsphase der Zelllinien nahm mehrere Wochen in Anspruch. Alle drei Zelllinien wurden unter standardisierten Bedingungen in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ in 75 bzw. 150cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank inkubiert. Entsprechend des Zellwachstums

erfolgte ein- bis zweimal wöchentlich bei 70-80%iger Konfluenz die Passage der Zellkulturen. Zunächst wurden hierzu die konfluenten Zellrasen jeweils mit EDTA-Trypsin 0,25% für 5 Minuten bis zur Lösung der Zellen vom Boden der Kulturflaschen im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Waschung, Zentrifugation, Abpipettierung der Zellen, die Zählung mit Hilfe einer Neubauerzählkammer und entsprechend die erneute Aussaat in Zellkulturflaschen. Alle zwei bis drei Tage erfolgte zusätzlich bei allen Zelllinien ein Mediumaustausch.

2.3. Inkubation vor Zellzyklusmessung.

Zur Zellzyklusanalyse wurden die Zellen nach Ablösung, Waschung, Zentrifugation, Abpipettierung und Zählung entsprechend dem oben ausgeführten Vorgehen bei der Passage aus den Kulturflaschen mit einer Zellverteilung von 300 µl Zellsuspension mit 10^6 Zellen/Well in 24-Well-Platten transferiert. Zum Nachweis und Vergleich der Auswirkungen des in zwei Dosierungen zugesetzten Matrixmetalloproteinaseinhibitors RO 28-2653 wurden 4 Gruppen unterteilt. In der Kontrollgruppe (Gruppe 1) wurden die Zellen zusätzlich mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) inkubiert. In Gruppe 2, der Positivkontrolle, wurde die Apoptose durch Zusatz von 25 µM des potenten Apoptoseinduktors Camptothecin (CPT) eines DNA-Topoisomerase-I-Inhibitors gelöst in 300µl NaCl. getriggert. Die Gruppen 3 und 4 wurden als Vergleichsgruppen unterschiedlicher Dosierungen mit 45µg bzw. 90µg des Matrixmetalloproteinaseinhibitors RO 28-2653 jeweils gelöst in 300µl NaCl behandelt. Dies entspricht für die niedrig dosierte Gruppe einer Konzentration von 0,15µg/µl und 0,3µg/µl für die höher dosierte Gruppe. Pro Versuchsgruppe wurden entsprechend den zu untersuchenden 3-Zellzyklusphasen und der zusätzlich geplanten Apoptosebestimmung jeweils 4 x 18 Ansätze mittels dieser Methode in den Wellplatten hergestellt. Im Anschluss erfolgte bei allen

Versuchsgruppen eine zwölfstündige Inkubationsphase unter standardisierten Bedingungen in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre bei 37°C unter 5% CO₂.

Gruppe:	Inkubation mit:	Dosierungen und Konzentrationen	Anzahl der geplanten Messungen
1 Kontrolle	NaCl 0,9%		4 x 18 pro Zelllinie
2 Apoptose	Camptothecin	25 µM	4 x 18 pro Zelllinie
3 MMP niedrig	RO 28-2653	45 µg bzw. 0,15µg/µl	4 x 18 pro Zelllinie
4 MMP hoch	RO 28-2653	90 µg bzw. 0,3µg/µl	4 x 18 pro Zelllinie

Tab. II: Versuchsgruppen

2.4. Zellzyklusanalyse.

Der Zellzyklus stellt eine Abfolge von bestimmten Aktivitätszuständen dar, die jede Zelle durchläuft. Es werden 5 Phasen unterschieden und benannt. Die G₀-Phase ist die Ruhephase der Zelle, in der sich alle Zellen befinden, die sich aktuell nicht teilen. In dieser Phase können die Zellen in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen unterschiedlich lange sistieren. Beispielsweise durch Bindung von Wachstumsfaktoren an der Zelloberfläche kann eine Zelle das Signal zur Teilung erhalten. Die G₁-Phase ist durch die Umstellung des Zellstoffwechsels, der Synthese von Enzymen und Proteinen zur Vorbereitung auf die DNA-Synthese zur

angestrebten Zellteilung gekennzeichnet. In der S-Phase erfolgt nun die DNA-Synthese. In der G2-Phase erfolgen weitere Vorbereitungen auf die Zellteilung. Hieran schließt sich nun die Mitosephase (M-Phase) mit der eigentlichen Zellteilung an.

Die Durchflusszytometrie mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren, das mittels Fluoreszenzmarkierung durch spezifische Farbstoffe oder markierte Antikörper die quantitative und qualitative Analyse von Zellen, Oberflächenmolekülen, Proteinen bis hin zu RNA/DNA-Bestandteilen ermöglicht²¹. Diese Partikel werden mit hoher Geschwindigkeit nacheinander an einem Laser mit erwünschter Lichtwellenlänge vorbei geleitet. Anhand der durch Detektoren bestimmten Ablenkung des emittierten Lichtes (Vorwärts und Seitwärtsstreuung) können dann Aussagen zur Größe, Dichte und Beschaffenheit der untersuchten meist zellulären Strukturen gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Anfärbung durch Propidiumjodid, eines mit der Zell-DNA interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffes, die verschiedenen Zellzyklusphasen und die Apoptoseraten der unterschiedlichen Kontroll- und Therapiegruppen der 3 Zelllinien untersucht. Die gemessene Fluoreszenz wird hierzu in Relation zum DNA-Gehalt der Zellen gesetzt, der wiederum dem jeweiligen Zellstatus im Zellzyklus entspricht.

Nach der bereits beschriebenen Vorbereitung der Zellen erfolgte im Anschluss an die zwölfstündige Inkubation mit den Agenzien den einzelnen Versuchsgruppen entsprechend die Messung mittels FACS. Hierzu wurden alle Zellen mit EDTA-Trypsin abgelöst und in Suspension gebracht, um dann entsprechend dem Versuchsprotokoll von Iwadata et al. 1997⁴³ zunächst mit einem Puffer (1l PBS, 5g BSA, 1g NaN₃) inaktiviert, einmalig bei 400U/min für 7 Minuten zentrifugiert und anschließend in Röhrchen mit 400 µl Waschpufferlösung resuspendiert zu werden. Hiernach wurden 600µl Lösung A zugegeben. Diese ist zusammengesetzt aus einem Waschpuffer, dem 0,1%igen Triton X-100, das zu einer Gruppe von Detergenzien gehört, die die Zytoplasmamembran aber nicht die Zellkernmembranen lysieren, dem EDTA als Komplexbildner und der RNase, um

eine Mitanfärbung der noch verbliebenen RNA zu verhindern. Die eigentliche Anfärbung erfolgt durch 50µg/ml einer Stammlösung von 1 mg/ml Propidiumjodid, die zur folgenden dreißigminütigen Inkubation auf Eis zugegeben wird. Die Analyse der in dieser Art vorbehandelten Proben erfolgte nun mittels oben beschriebener Durchflusszytometrie am FACScalibur. Die Exzitation wurde hierbei durch einen Argonlaser bei 488nm gemessen. Die unterschiedlichen Zellzyklusphasen wurden anschließend mittels des DNA-Histogramms CellQuest™, Vers. 3.3 bestimmt und ausgewertet.

2.5. Biometrische Überlegungen und statistische Auswertungen.

Aus den gegebenen Voraussetzungen des Versuchs wurden in Beratung mit dem Institut für Sozialmedizin, Epidemiologie und Gesundheitsökonomie folgende Überlegungen abgeleitet: Bezüglich der durchzuführenden Messungen gab es vor Untersuchungsbeginn keine bekannten Normwerte für die Kontrollgruppe, auf deren Basis eine Fallzahlberechnung möglich gewesen wäre. Basierend auf anderen Studien mit Zelllinien wurde eine Spontanapoptoserate von 10 - 30% angenommen. Es musste zur Sicherheit davon ausgegangen werden, da es sich um einen in-vitro-Versuch handelte, dass die gemessenen Werte nicht der Normalverteilung entsprechen werden. Es erfolgte unter diesen Voraussetzungen ein zweiseitiges Testen. Die Detektion eines Unterschiedes von größer/gleich 15% im Lagemaß war der beabsichtigte Zielbereich. Der Versuch wurde mit 2 Verumprüfgruppen, einer Kontrollgruppe mit NaCl und einer Apoptosekontrollgruppe mit Camptothecin geplant. Eine genaue Fallzahlberechnung war in Anbetracht dieser Versuchsplanung bei fehlender Kenntnis der Merkmalsverteilung in der Grundgesamtheit nicht möglich, so dass auf dem Boden der genannten Überlegungen eine Fallzahlschätzung berechnet wurde, die für den vorliegenden Versuch eine sinnvolle Auswertungsmöglichkeit der Ergebnisse bei 18 Messungen pro Versuchsgruppe und

Dosierung ergab. Zusätzlich wurde die Korrektur zur Vermeidung der α -Fehler-Kumulation beim multiplen Testen berücksichtigt.

Für jede der 4 Versuchsgruppen innerhalb jeder der drei verwendeten Zelllinien wurden die jeweils 18 Meßwerte für Apoptose, G0-/G1-Phase, Synthesephase, Mitosephase auf Normalverteilung durch den Normalverteilungstest nach Shapiro-Francia getestet. Bei angenommener Normalverteilung erfolgte die vergleichende Statistik als Einfaktorielle Multivarianzanalyse (ANOVA) der 18 Meßreihen bei 4 Meßgruppen pro Zelllinie. Bei Nicht-Normalverteilung in der DSL-6A-C1 wurde dementsprechend nicht-parametrisch verglichen, dabei wurde die globale Nullhypothese mit dem Kruskal-Wallis-Test geprüft, die Einzelvergleiche wurden unter Verwendung des Mann-Whitney-Testes für verbundene Stichproben durchgeführt, wobei auch hier zur Vermeidung einer α -Fehlerkumulation die Bonferroni-Korrektur angewandt wurde. Alle statistischen Tests wurden unter Verwendung von SPSS 12.0[®]™ für Windows XP[®]™ durchgeführt.

Angesichts der parametrischen Auswertungen bei der MIAPaCa-2 und der Bx-PC-3 einerseits und der nicht-parametrischen Analyse bei der DSL-6A-C1 andererseits wurden grundsätzlich als Lagemaße sowohl der Mittelwert als auch der Median angegeben, als Streumaße das Minimum, das Maximum und die Standardabweichung verwendet. Auf die Angabe der Varianz wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, dafür erfolgte die graphische Darstellung generell als Boxplot, um Lage und Streuung möglichst genau darzulegen.

3. Ergebnisse.

3.1. Bx-PC-3.

Apoptose.

Die Inkubation mit CPT führte zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate, verglichen mit der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Während die niedrige Dosis des MMP-Inhibitors den Anteil apoptotischer Zellen gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant veränderte ($p > 0,05$), kam es bei der Hochdosisgruppe zur signifikant höchsten Apoptoserate im Vergleich mit allen anderen Gruppen ($p < 0,05$, jeweils) (Tab. 1, Abb. 1).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- abweichung
Kontrolle	18	15,51	16,32	11,08	19,43	3,13
CPT	18	39,65	39,70	37,59	41,71	1,33
90 μ g MMPI	18	62,09	62,11	60,78	63,59	0,89
45 μ g MMPI	18	10,19	10,67	6,19	11,92	1,24

Tab. 1: Apoptoseraten, Bx-PC-3.

Bx-PC-3, Apoptotische Zellen (Zyklusmessung)

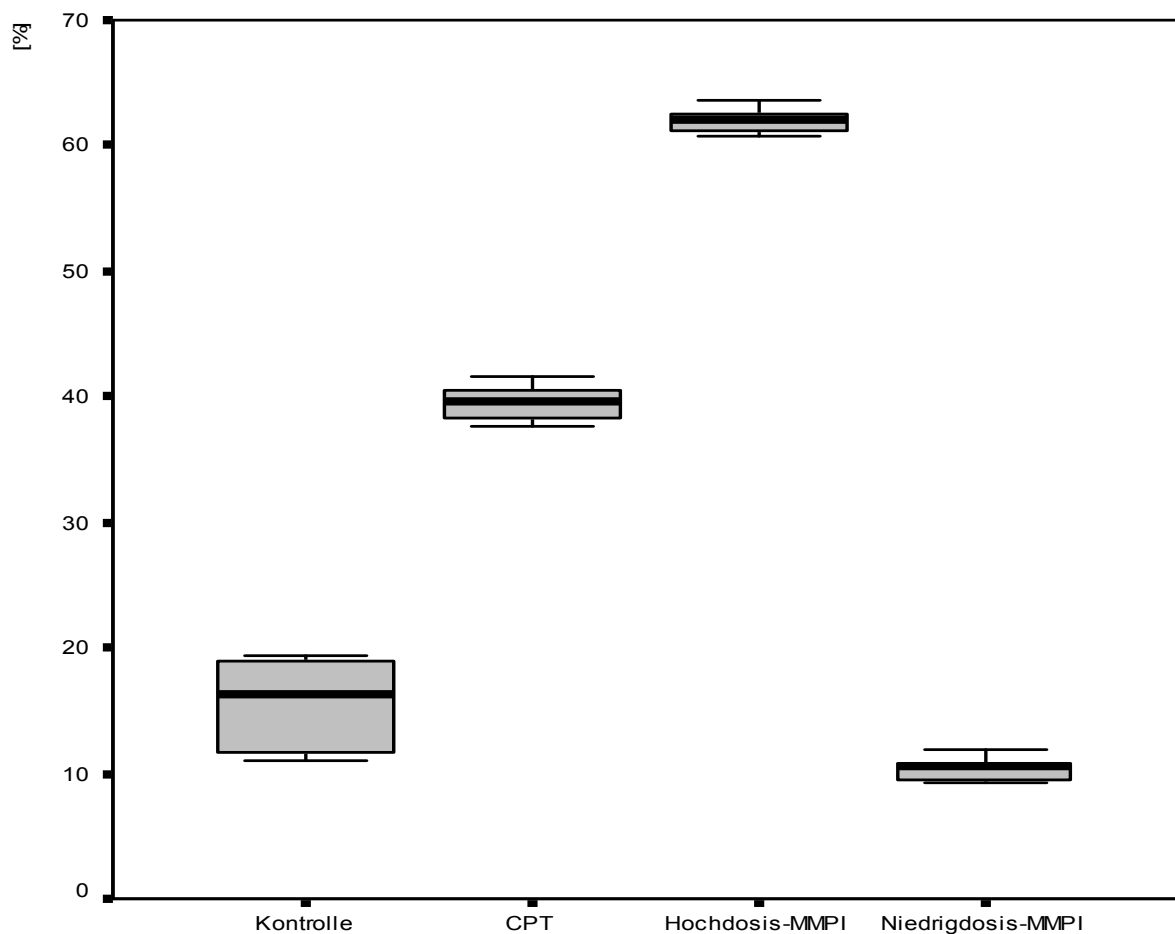


Abb.:1: Apoptoseraten, Bx-PC-3.

G0-/G1-Phase.

Während die Applikation von Niedrigdosis-MMPI keinen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant veränderten Anteil an Zellen in der G0-/G1-Phase hervorrief ($p > 0,05$), kam es durch Camptothecin zu einer signifikanten Erniedrigung ($p < 0,05$, jeweils). Den von allen Versuchsgruppen signifikant niedrigsten Anteil an Zellen in der G0-/G1-Phase wies die Hochdosis-MMPI-Gruppe auf ($p < 0,05$, jeweils)(Tab. 2, Abb. 2).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- abweichung
Kontrolle	18	60,43	60,86	57,09	62,74	1,82
CPT	18	39,26	39,35	37,67	40,66	0,85
90µg MMPI	18	9,08	9,58	7,34	10,35	1,13
45µg MMPI	18	55,29	57,73	47,86	60,51	5,17

Tab. 2: G0-/G1-Phase, Bx-PC-3.

Bx-PC-3, Zellen in der G0-/G1-Phase (Zyklusmessung)

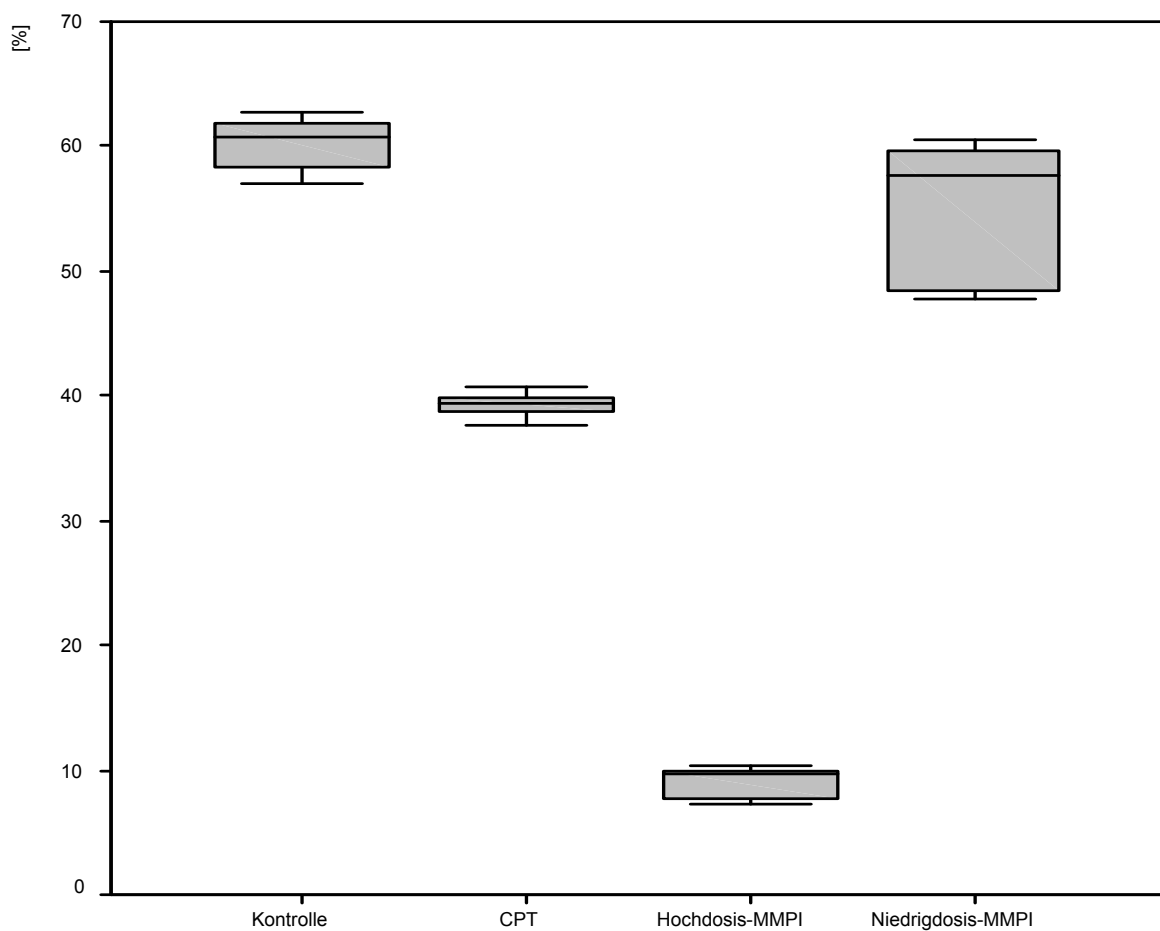


Abb.:2: G0-/G1-Phase, Bx-PC-3.

Synthese.

Den signifikant niedrigsten Anteil von Zellen in der Synthesephase wies die Kontrollgruppe auf ($p < 0,05$, jeweils). Die Behandlung mit Hochdosis-MMPI und Camptothecin führte zu einer signifikanten Erhöhung, wobei jedoch zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied bestand ($p > 0,05$). Der von allen Gruppen höchste prozentuale Anteil wurde nach Niedrigdosis-MMPI gefunden ($p < 0,05$, jeweils)(Tab. 3, Abb. 3).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard-abweichung
Kontrolle	18	9,06	8,76	8,32	10,33	0,71
CPT	18	11,09	11,25	10,11	11,97	0,54
90µg MMPi	18	12,17	12,58	10,37	13,86	1,21
45µg MMPi	18	17,79	15,24	12,82	24,96	5,01

Tab. 3: Synthesephase, Bx-PC-3.

Mitose.

Demgegenüber hatte die Behandlung mit Hochdosis- oder Niedrigdosis-MMPI keinen signifikanten Einfluß auf den Anteil an Zellen in der Mitosephase, verglichen jeweils mit der Kontrollgruppe und miteinander ($p > 0,05$). Andererseits führte Camptothecin zu einem deutlichen Absinken des Anteils mitotischer Zellen ($p < 0,05$, jeweils)(Tab. 4, Abb. 3).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard-abweichung
Kontrolle	18	14,15	13,70	12,79	16,18	1,12
CPT	18	9,06	9,04	8,23	9,63	0,40
90µg MMPI	18	15,18	15,53	10,38	16,00	1,29
45µg MMPI	18	14,22	14,23	13,83	14,73	0,28

Tab. 4: Mitosephase, Bx-PC-3.

Bx-PC-3, Zellen in Synthese vs Mitose (Zyklusmessung)

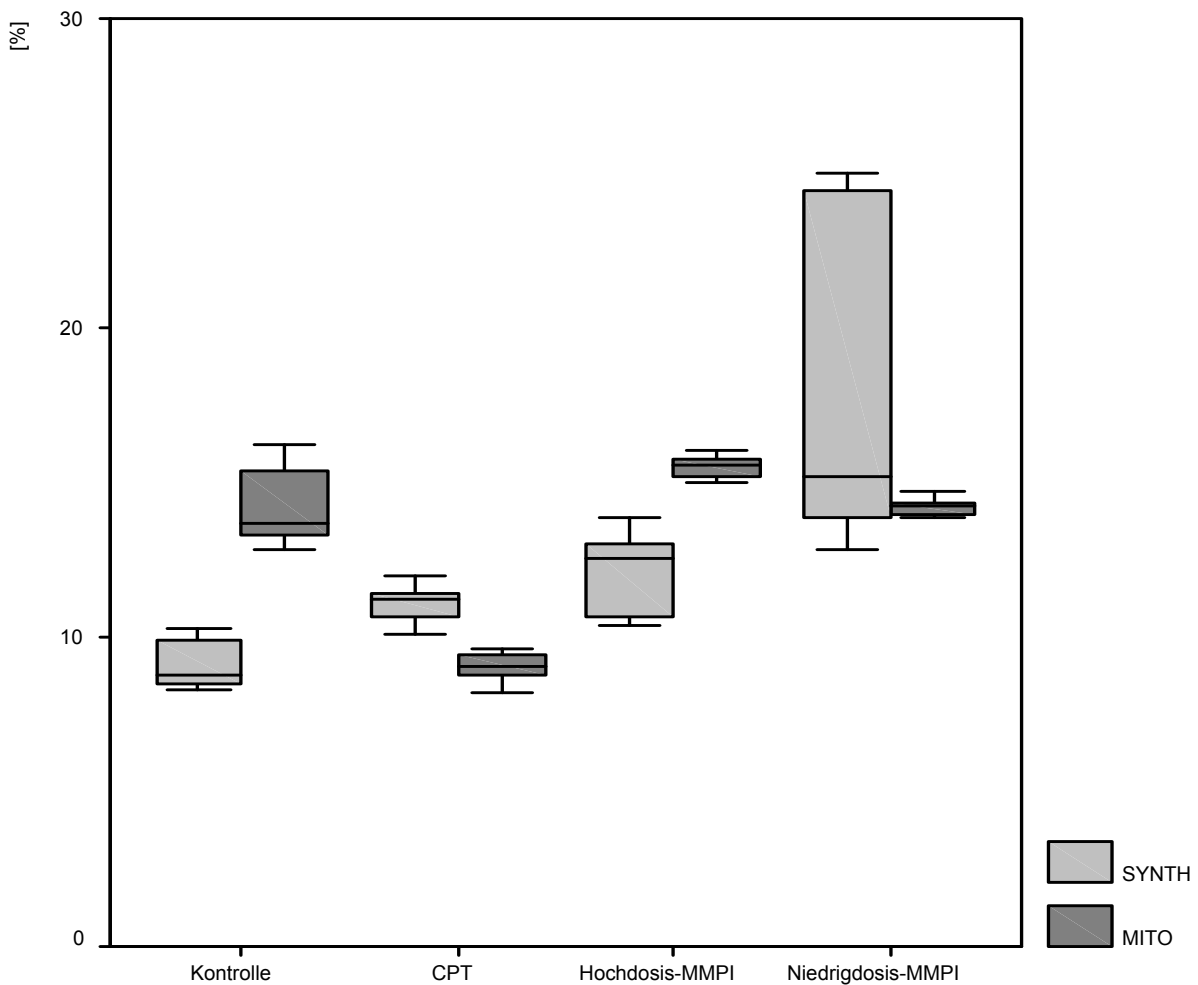


Abb. 3: Synthese und Mitose, Bx-PC-3.

3.2. MIAPaCa-2.

Apoptose.

Die signifikant höchsten Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle und auch zur Camptothecingruppe konnten in den beiden MMPI-Gruppen gemessen werden ($p < 0,05$, jeweils), ohne dass zwischen den beiden Therapiegruppen ein dosisabhängiger signifikanter Unterschied nachzuweisen war ($p > 0,05$) (Tab. 5). Nach Inkubation mit Camptothecin waren signifikant mehr Zellen apoptotisch als in der unbehandelten Kontrollgruppe ($p < 0,05$) (Tab. 5, Abb. 4).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- Abweichung
Kontrolle	18	6,58	6,61	5,79	7,41	0,53
CPT	18	60,36	59,05	57,71	64,32	2,60
90µg MMPI	18	68,13	68,20	67,25	68,96	0,41
45µg MMPI	18	67,45	67,39	66,65	68,57	0,50

Tab. 5: Apoptose, MIAPaCa-2.

MIAPaCa-2, Apoptotische Zellen (Zyklusmessung)

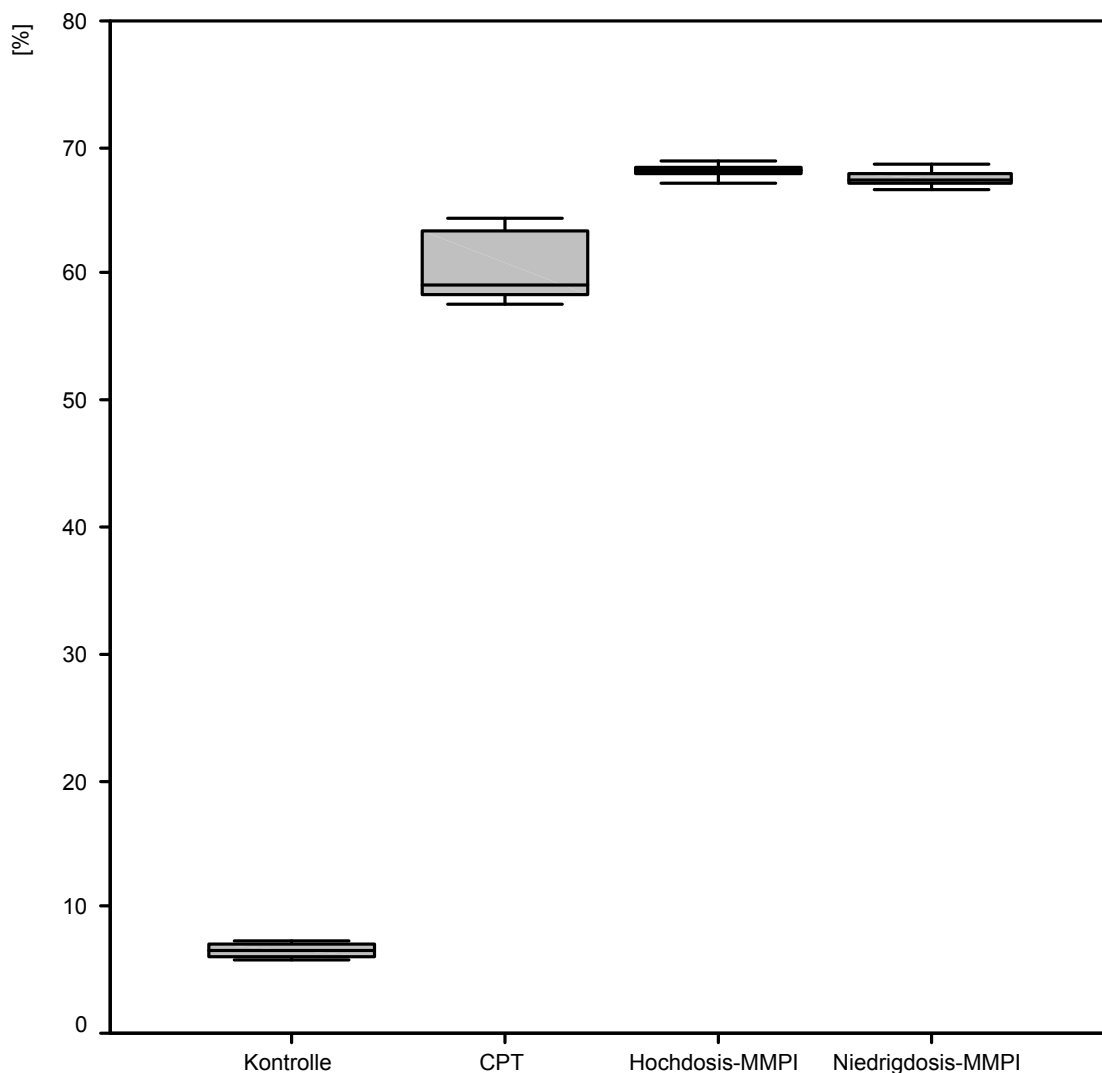


Abb. 4: Apoptose, MIAPaCa-2.

G0-/G1-Phase.

In der unbehandelten Kontrollgruppe konnte bei der MIA-PaCa-2 im Vergleich zu allen anderen Gruppen der höchste Anteil von Zellen in der G0-/G1-Phase bestimmt werden ($p < 0,05$, jeweils). Signifikant niedriger wurden die Werte für die Camptothecingruppe ermittelt. In den MMPI-Therapiegruppen zeigte sich ein weiteres signifikantes Absinken im Vergleich zum Camptothecin ($p < 0,05$, jeweils),

aber innerhalb der beiden Gruppen waren erneut keine signifikanten Unterschiede nachzuweisen ($p > 0,05$) (Tab. 6, Abb. 5).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- abweichung
Kontrolle	18	68,87	68,98	68,07	69,66	0,52
CPT	18	21,57	23,66	15,35	25,94	4,29
90µg MMPI	18	5,92	6,02	5,19	6,63	0,48
45µg MMPI	18	6,50	6,49	6,12	6,85	0,21

Tab. 6: G0-/G1-Phase, MIAPaCa-2.

MIAPaCa-2, Zellen in der G0-/G1-Phase (Zyklusmessung)

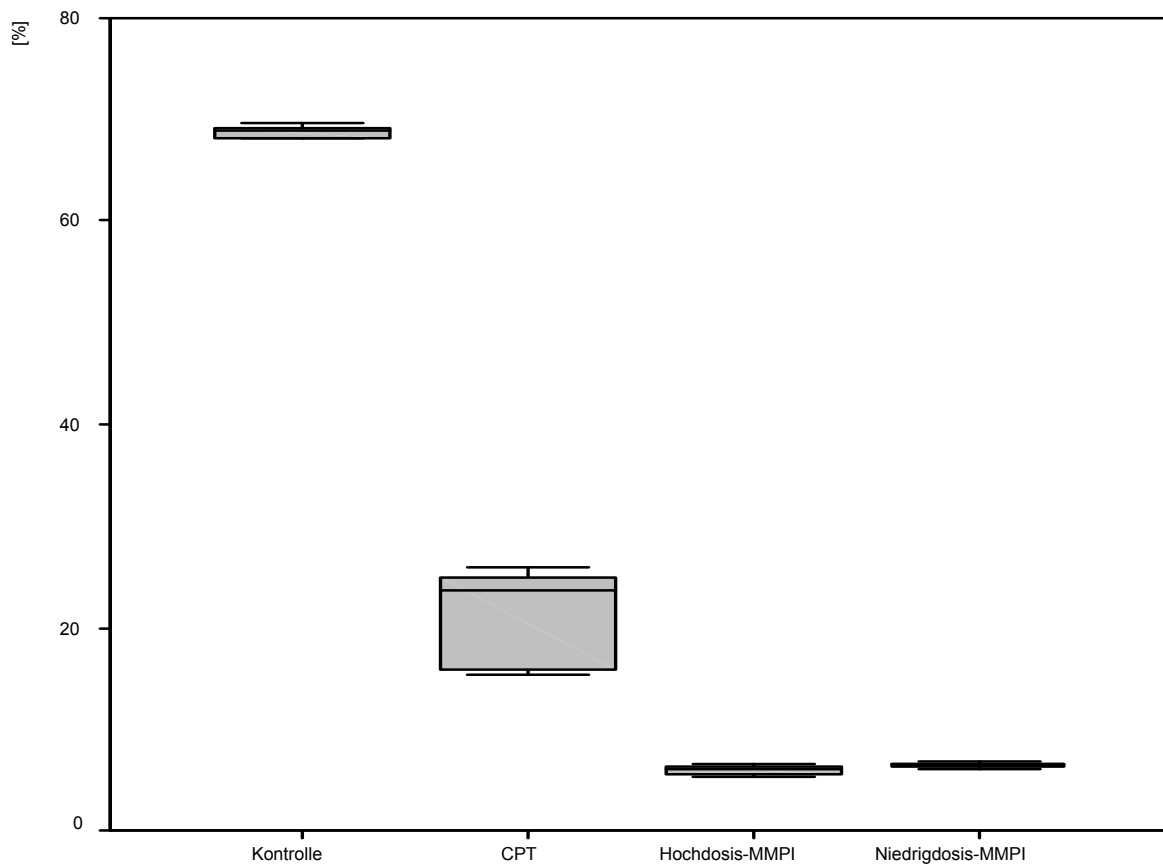


Abb. 5: G0-/G1-Phase, MIAPaCa-2.

Synthesephase.

Der im Vergleich mit allen anderen Gruppen signifikant niedrigste Anteil Zellen in der Sythesephase wurde für die mit Camptothecin behandelten Zellen bestimmt ($p < 0,05$, jeweils). Mehr Zellen in Synthese konnten in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Signifikant zu dieser kam es in den MMPI-Gruppen zu einer weiteren Synthesesteigerung ($p < 0,05$, jeweils), ohne signifikanten Unterschied zwischen der Hoch- und der Niedrigdosisgruppe ($p > 0,05$) (Tab. 7, Abb. 6).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard-abweichung
Kontrolle	18	10,94	11,07	9,89	12,05	0,72
CPT	18	7,29	7,16	6,60	8,18	0,54
90µg MMPI	18	14,17	14,14	13,61	14,89	0,39
45µgMMPI	18	14,33	14,42	13,64	14,88	0,44

Tab. 7: Synthesephase, MIAPaCa-2.

Mitose.

Während die signifikant höchste Mitoserate von allen Gruppen bei der MIAPaCa-2 in der unbehandelten Kontrollgruppe auftrat ($p < 0,05$, jeweils), konnten in allen behandelten Gruppen gegeneinander keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden ($p > 0,05$, jeweils) (Tab. 8, Abb. 6).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- abweichung
Kontrolle	18	13,39	13,27	12,91	14,39	0,36
CPT	18	11,01	10,58	9,67	13,00	1,22
90µg MMPI	18	12,02	11,97	11,64	12,75	0,28
45µg MMPI	18	11,97	11,95	11,56	12,29	0,21

Tab. 8: Mitosephase, MIAPaCa-2

MIAPaCa-2, Zellen in Synthese vs Mitose (Zyklusmessung)

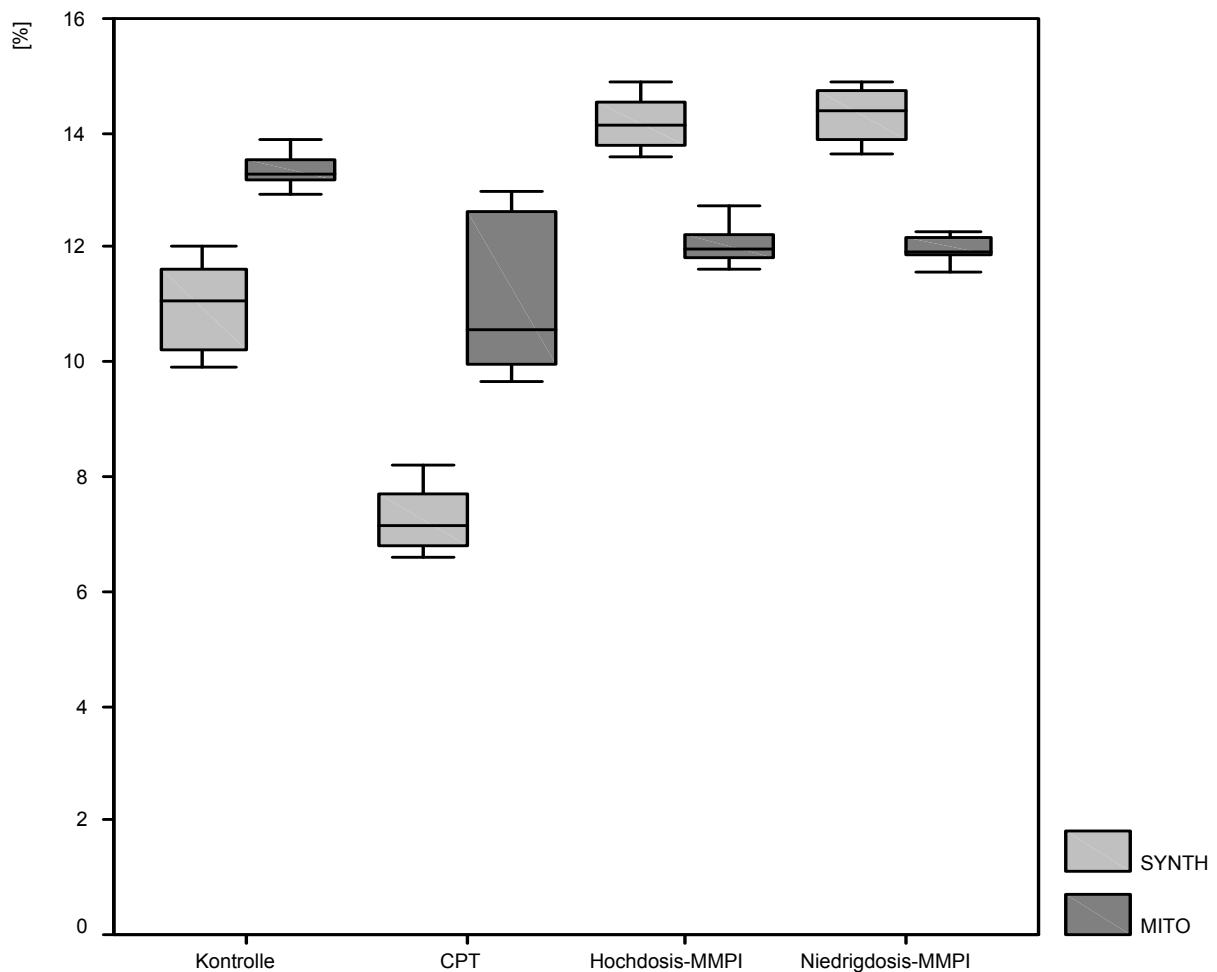


Abb. 6: Synthese und Mitose, MIAPaCa-2.

3.3. DSL-6A-C1.

Apoptose.

Die Inkubation mit CPT, niedrig- oder hochdosiertem MMPI führte bei der DSL-6A-C1 zu einer tendenziellen Steigerung der Apoptoserate, ein signifikanter Anstieg verglichen mit der Kontrollgruppe ($p > 0,05$) konnte nicht ermittelt werden. Auch in den Therapiegruppen untereinander war bei breiter Streuung keine signifikante Differenz zwischen den Werten nachzuweisen ($p > 0,05$) (Tab. 9, Abb. 7).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard-abweichung
Kontrolle	18	28,91	26,84	18,99	39,87	8,06
CPT	18	58,55	72,75	22,61	80,20	26,03
90µg MMPI	18	62,35	67,17	21,43	74,92	14,24
45µg MMPI	18	62,61	65,51	54,75	67,39	5,46

Tab. 9: Apoptose, DSL-6A-C1.

DSL-6A-C1, Apoptotische Zellen (Zyklusmessung)

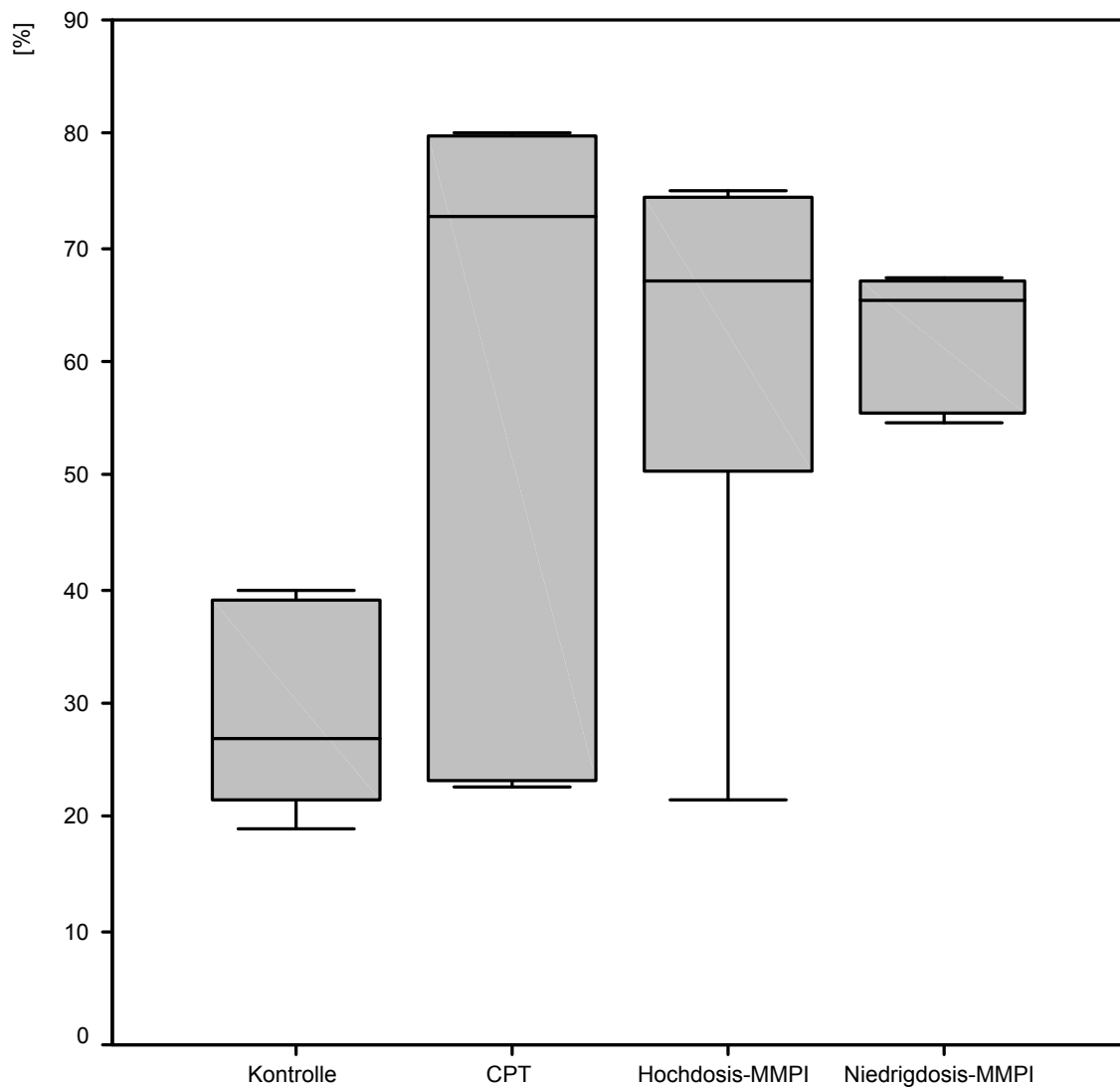


Abb. 7: Apoptose, DSL-6A-C1.

G0-/G1-Phase.

Bei der DSL-6A-C1 waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden MMPI-Gruppen und zwischen der Kontrollgruppe und den mit Camptothecin behandelten Zellen nachzuweisen ($p < 0,05$, jeweils). Ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich waren die Zellanteile zwischen Camptothecin und den beiden MMPI-Gruppen ($p > 0,05$, jeweils). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigten sich aber

signifikant weniger Zellen unter der Therapie mit MMPI in der G0-/G1-Phase ($p < 0,05$, jeweils) (Tab. 10, Abb. 8).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard-abweichung
Kontrolle	18	49,81	52,95	41,00	55,16	5,97
CPT	18	30,34	19,12	13,16	58,99	20,61
90 μ g MMPI	18	19,24	13,07	6,78	66,85	15,73
45 μ g MMPI	18	18,31	15,22	12,66	27,35	6,22

Tab. 10: G0-/G1-Phase, DSL-6A-C1.

DSL-6A-C1, Zellen in der G0-/G1-Phase (Zyklusmessung)

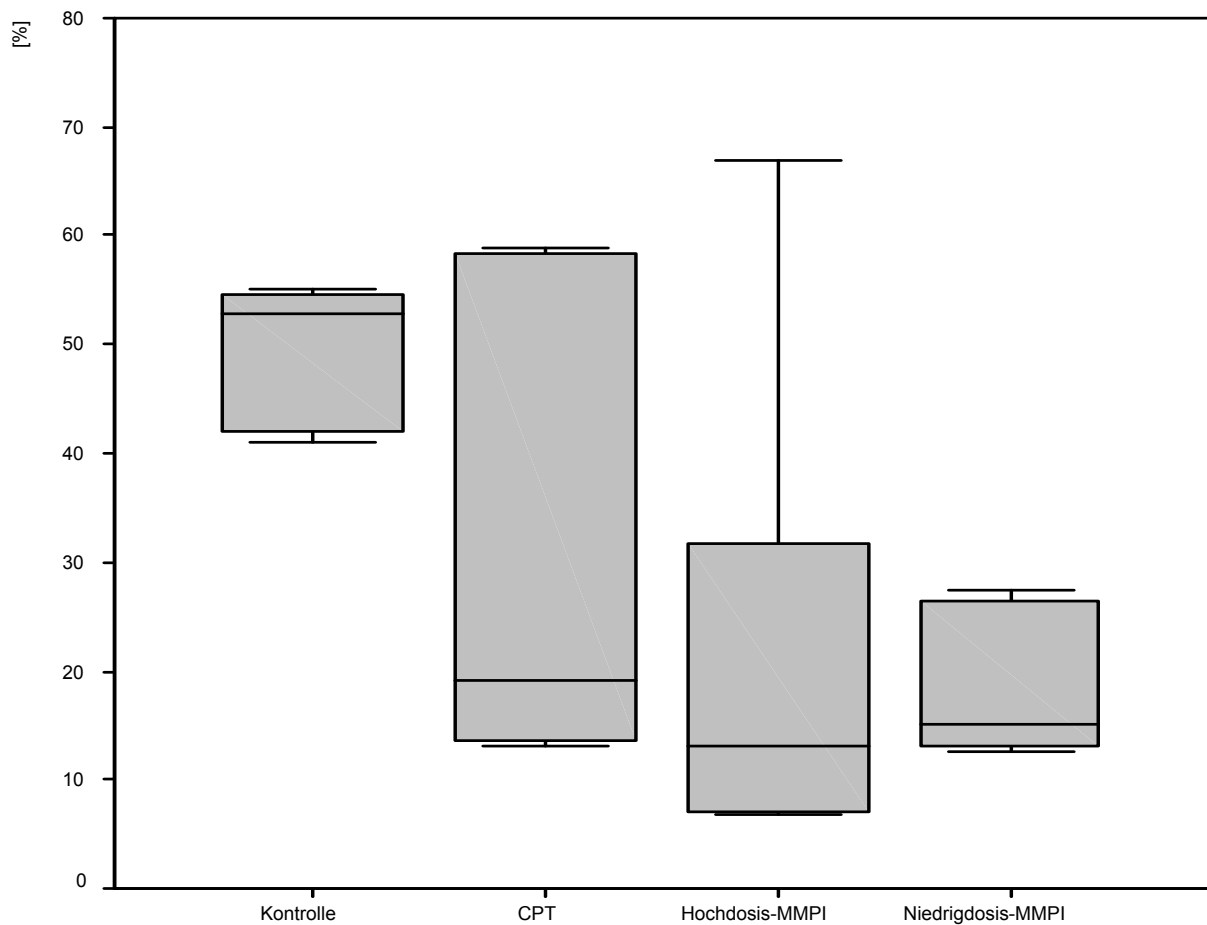


Abb. 8: G0-/G1-Phase, DSL-6A-C1.

Synthese.

Kein signifikanter Unterschied bestand im Bezug auf den Zellanteil in der Synthesephase zwischen Camptothecin und der unbehandelten Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Ebenso lieferten die beiden MMPI-Gruppen untereinander und auch im Vergleich mit der Camptothecingruppe keine signifikant verschiedenen Ergebnisse ($p > 0,05$, jeweils). Vergleicht man den Synthesephase-Zellanteil der MMPI-Gruppen mit denen der Kontrolle, so ließ sich hier eine signifikante Erniedrigung nachweisen ($p < 0,05$, jeweils) (Tab. 11, Abb. 9).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- abweichung
Kontrolle	18	11,46	11,49	10,22	12,22	0,51
CPT	18	7,62	5,99	5,01	12,08	3,01
90µg MMPI	18	8,75	8,80	7,44	10,19	0,99
45µg MMPI	18	9,39	9,50	8,52	10,30	0,48

Tab. 11: Synthesephase, DSL-6A-C1.

Mitose.

Für die Mitose konnten bei der DSL-6A-C1 keine dosisabhängigen signifikanten Unterschiede zwischen den beiden MMPI-Therapiegruppen nachgewiesen werden ($p > 0,05$). Auch unterschieden sich die Werte der MMPI-Gruppen nicht signifikant von denen, die in der Kontrollgruppe gemessen wurden ($p < 0,05$, jeweils). Eine signifikante Erniedrigung zeigte sich jedoch beim Vergleich der Camptothecingruppe mit allen anderen Gruppen ($p > 0,05$, jeweils) (Tab. 12, Abb. 9).

	Anzahl	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard- Abweichung
Kontrolle	18	9,82	8,25	7,48	13,18	2,45
CPT	18	3,32	2,15	1,12	6,40	2,19
90µg MMPI	18	9,63	9,70	8,50	10,81	0,71
45µg MMPI	18	9,46	9,52	8,64	10,05	0,47

Tab. 12: Mitosephase, DSL-6A-C1.

DSL-6A-C1, Zellen in Synthese vs Mitose (Zyklusmessung)

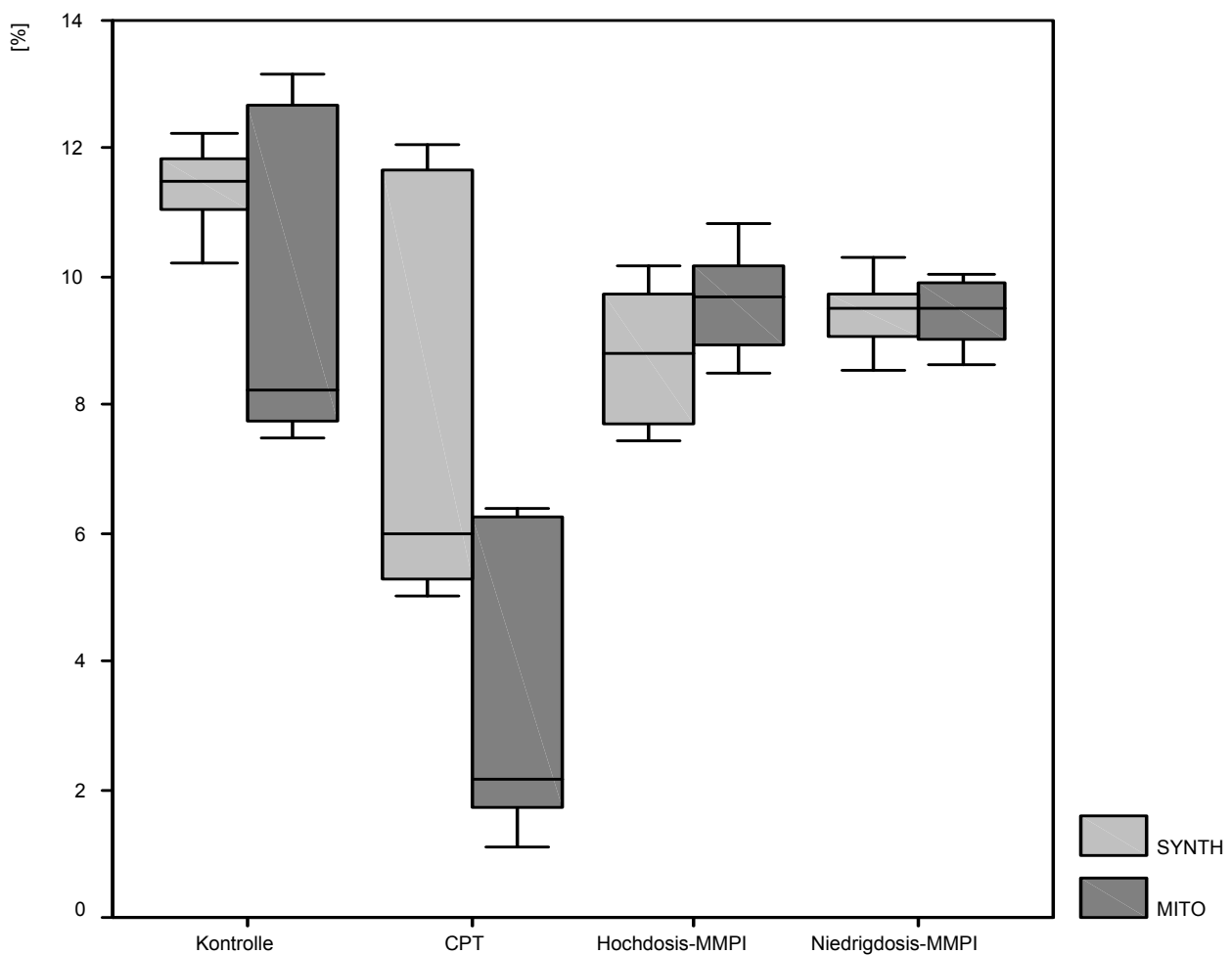


Abb. 9: Synthese und Mitose, DSL-6A-C1.

4. Diskussion.

In der vorliegenden Arbeit erfolgt zunächst die Diskussion der Ergebnisse der 3 Zelllinien gesondert, bevor die beobachteten Effekte in der Zusammenschau in einen größeren Kontext gestellt werden.

4.1. Bx-PC-3.

Die Bx-PC-3 als erste der humanen Pankreaskarzinomzelllinien zeigte in der Kontrolle eine erwartete niedrige Spontanapoptose (<20%). In der Gruppe, die mit dem potenten Apoptoseinduktor Camptothecin behandelt wurde, kam es zu einem deutlichen Anstieg auf über 40%. Unter der niedrigen MMPI-Dosierung zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen, so dass unter 45 µg nicht von einer Apoptoseinduktion ausgegangen werden kann. Anders bei der hohen MMPI-Dosierung mit 90 µg. Hier kam es zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate (>60%) noch weit über die durch Camptothecin erreichten Werte. Im deutlichen Unterschied zwischen den beiden MMPI-Gruppen zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung des RO 28-2653. Ob ein bestimmter Schwellenwert bei 45 µg noch unterschritten war oder ob es dosisabhängig zu einer kontinuierlichen Steigerung der Apoptoseinduktion kam, muss in einer weiteren Untersuchung mit gestaffelten Dosierungen geklärt werden. Entsprechend gegenläufig zur Apoptose zeigte sich das Verteilungsmuster der evaluierten Werte für die G₀-/G₁-Phase. In der unbehandelten Kontrolle und der Niedrigdosis-MMPI-Gruppe befinden sich fast 60% der Zellen in der Ruhephase. In der Hochdosis-MMPI-Gruppe sind es nur knapp 10%. Die Camptothecingruppe nimmt eine Zwischenposition ein. In der Verteilung bei der Synthese bzw. Mitose zeigen sich keine deutlichen Verschiebungen, außer dass es unter der niedrigen Dosierung von MMPI im

Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikant vermehrten Sammlung der Zellen in der Synthesephase kommt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit den vorliegenden, sehr homogen verteilten Ergebnissen nachgewiesen werden konnte, dass RO 28-2653 in der Bx-PC-3-Linie bei einer Dosierung von 90µg signifikant und ausgeprägt apoptose-induzierend wirkt. Da ein großer Prozentsatz der mit hochdosiertem MMPI behandelten Zellen durch den programmierten Zelltod aus dem Zellzyklusgeschehen ausgeschieden war, fanden sich in den Synthese-/Mitose-Phasen und der G0-/G1-Phase nur noch wenige Zellen. Betrachtet man nun die Zellen, die mit 45µg MMPI therapiert wurden, waren hier nur knapp 10% von Apoptose betroffen. Der größte Anteil von Zellen dieser Gruppe befand sich wie die Zellen der Kontrollgruppe in der G0-/G1-Phase. Vom Verteilungsmuster der Werte zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine leichte Verschiebung nach unten im Bezug auf die Zellanteile in der G0-/G1-Phase, die aufgrund ihrer fehlenden Signifikanz jedoch nur als Tendenz gewertet werden kann. Diese Verschiebung könnte zugunsten der Synthesephase erfolgt sein, in der sich nun als einzige der Phasen ein signifikanter Anstieg der prozentualen Anteile in der Niedrigdosis-MMPI-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt. Hieraus einen Niedrigdosis-MMPI-Effekt im Sinne einer Beeinflussung der Zellen zum Eintritt in den Zellzyklus abzuleiten, der gegebenenfalls bei höheren Dosierungen zum Ablauf von Reaktionskaskaden bis hin zur Apoptose läuft, ist ein Ansatz, der durch weitere Studien untersucht werden müsste. Für die Bx-PC-3 sind als Apoptoseinduktoren Sulfasalazine und 5-FU über einen NF-κB (nucleus factor κB) -abhängigen Mechanismus, ERRP (epidermal growth factor receptor-related protein) über eine EGFR-Rezeptor-Blockade, Antagonisten des XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) und eine Reihe anderer Chemotherapeutika und aktiver Moleküle nachgewiesen^{40,96,49}. In der aktuellen Literatur findet sich bisher keine Beschreibung einer Apoptoseinduktion durch Matrixmetalloproteinaseinhibitoren bei der Bx-PC-3.

4.2. MIAPaCa-2.

Diese Zelllinie zeigte mit einem Wert unter 10% eine sehr niedrige Spontanapoptoserate. Durch den Topoisomeraseinhibitor Camptothecin konnte eine Steigerung der Apoptoserate auf etwa 60% erreicht werden. Eine weitere signifikante Zunahme der apoptotischen Zellanteile noch über diesen hohen Wert hinaus wurde bei beiden MMPI-Gruppen ohne dosisabhängigen Unterschied beobachtet. Spiegelbildlich zeigte sich die Werteverteilung in der G₀-/G₁-Phase. Hier waren über 60% der Zellen der Kontrolle im Zell-Zyklus-Arrest, während sich unter der Behandlung mit MMPI nur wenige Zellen (10%) in dieser Phase befanden. Unter RO 28-2653 kam es sowohl zu einer signifikanten Reduktion der Mitose, als auch zu einer signifikanten Steigerung der Synthese, wobei diese Effekte keine Dosisabhängigkeit aufwiesen. Es fand sich auch für die MIAPaCa-2 in der aktuellen Literatur bisher keine Veröffentlichung zur Apoptoseinduktion durch Matrixmetalloproteinaseinhibitoren.

4.3. DSL-6A-C1.

Die DSL-6A-C1 als originär der Ratte entstammende Zelllinie war die Karzinomzelllinie mit der breitesten Streuung der Messergebnisse in den einzelnen Gruppen und einer hohen Standardabweichung, was die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse erschwert. Mit mehr als 25% zeigte DSL-6A-C1 die höchste Spontanapoptoserate aller Zelllinien in dieser Studie, was für eine hohe Empfindlichkeit und Instabilität der Zelllinie spricht. Durch Camptothecin und MMPI-Behandlung konnte in allen drei entsprechenden Gruppen die Apoptoserate weiter gesteigert werden auf etwa 70%. Es ergaben sich in diesen Therapiegruppen keine signifikanten Unterschiede untereinander. Camptothecin senkte die Mitoserate,

während die beiden unterschiedlichen Dosierungen von RO 28-2653 keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe im Bezug auf die Mitose hervorriefen. Bei der DSL-6A-C1 kam es unter der MMPI-Behandlung jedoch zu einer Verringerung der Zellanteile in der Synthesephase verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Es lag auch für die DSL-6A-C1 in der aktuellen Literatur bisher kein Nachweis einer Apoptoseinduktion durch Matrixmetalloproteinaseinhibitoren vor.

4.4. Vergleichende Diskussion.

RO 28-2653 hat sich bei der Bx-PC-3 als potenter Apoptoseinduktor erwiesen. Die MIAPaCa-2 bestätigte mit hohen Apoptoseraten unter MMPI eindrücklich die Ergebnisse der Bx-PC-3; mit dem wesentlichen Unterschied, dass bei der MIAPaCa-2 keine signifikante Dosisabhängigkeit zwischen den beiden MMPI-Gruppen nachzuweisen war. Eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Zelllinien bezüglich der MMP-Dosierung kann daher hier unterstellt werden. Des weiteren kam es bei der MIAPaCa-2 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer in beiden Gruppen signifikanten Verschiebung von Zellen in die Synthesephase, die sich bei der Bx-PC-3 unter der niedrigen MMPI-Dosierung bereits als Tendenz angedeutet hatte und als Wirkung des RO 28-2653 angenommen werden kann. In der DSL-6A-C1 konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden, hier zeigten sich im Gegenteil unter MMPI-Behandlung erniedrigte Syntheseraten.

Die DSL-6A-C1 als Rattenkarzinomzelllinie war die Zelllinie mit den inhomogensten Ergebnissen. Während die Bx-PC-3 und die MIAPaCa-2 eine ausgesprochen konsistente Verteilung mit nur sehr geringen Standardabweichungen und nur kleinen Differenzen zwischen Minimal- und Maximalwerten aufwiesen, waren die Werte der

DSL-6A-C1 in allen FACS-Messungen durch hohe Standardabweichungen gekennzeichnet. Dies schränkt auch die Vergleichbarkeit mit den anderen Zelllinien ein. Über jeden Interpretationszweifel erhaben ist allerdings auch bei der DSL-6A-C1 die signifikante Steigerung der Apoptoseraten unter der Applikation von RO 28-2653. Ein dosisabhängiger Wirkungsunterschied für den MMPI war wie auch in der MIAPaCa-2 in der DSL-6A-C1 nicht nachzuweisen.

In jeder der 3 Zelllinien zeigten sich unter der Therapie mit dem Matrixmetalloproteinaseinhibitor nur geringe Auswirkung auf den Anteil an Zellen in der Mitosephase. Alle drei Gruppen wiesen mit Mitoseraten um 10% in der unbehandelten Kontrolle vergleichbare Ergebnisse auf. Ebenso vergleichbar waren die Ergebnisse unter Camptothecin. Der Topoisomerasehemmer senkte den Anteil von Zellen in der Mitosephase in allen 3 Zelllinien signifikant, während die MMPI-Applikation im Vergleich zu den Kontrollgruppen keine durchgängigen Effekte zeigte. Nur bei der MIAPaCa-2 wurden unter MMPI die Mitoseraten leicht abgesenkt. Ein dosisabhängiger Effekt ließ sich in keiner Zelllinie nachweisen. Die Verteilungen der Zellen in Apoptose und in der G0-/G1-Phase sind in allen 3 Zelllinien gleichförmig. Hohe Apoptoseraten in einer Gruppe sind in jedem Fall mit niedrigen Werten für den Anteil von Zellen in der G0-/G1-Phase vergesellschaftet und umgekehrt. Werden also die Zellen in Richtung einer dieser beiden Zellzyklusphasen beeinflusst, geht diese Umverteilung in allen Fällen zu Lasten der jeweils anderen Phase.

Im Vergleich aller 3 Zelllinien bleibt in der vorliegenden Arbeit die Apoptoseinduktion als die deutlichste und durchgängigste Wirkung von RO 28-2653 zu nennen. Bei zwei Zelllinien, der Bx-PC-3 und MIAPaCa-2, wirkt der Matrixmetalloproteinaseinhibitor sogar als noch potenterer Apoptoseinduktor als das hochwirksame Camptothecin. Und auch in der dritten Zelllinie, der DSL-6A-C1, konnten nach MMPI-Inkubation mit fast 70% sehr hohe Apoptoseraten erreicht werden.

Inwieweit mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit nur apoptotische Zellen und nicht auch potentielle Zellnekrosen dargestellt wurden, muss kritisch diskutiert werden. Die Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose bedarf in Anbetracht der Schwierigkeit der Diskriminierung differenzierter Untersuchungen. Hierzu ist die FACS-Messung nach Anfärbung mit Propidiumjodid ein durchaus adäquates und anerkanntes Verfahren⁵⁵.

In der aktuellen Literatur wird neben Apoptose und Nekrose als dritte Morphologie des Zelltodes der Zelltod mit Autophagie beschrieben. Darüber hinaus ist bekannt dass die Apoptose ohne Autophagie in ihrer Spätphase in Nekrose übergeht oder zumindest, da die relevanten Zellstrukturen und beteiligten Proteine zu diesem Zeitpunkt bereits zerstört, abgebaut oder in beiden Prozessen nachweisbar sind, kaum eine Unterscheidung möglich ist⁵⁵. Um die nun in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse diesbezüglich weiter differenziert diskutieren zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits mittels Flica (Fluorochrome Inhibitors of Caspases) – Markierung nachgewiesen, dass es sich bei den gemessen Veränderungen im hauptsächlichen Anteil tatsächlich um Apoptose der Zellen handelt. Hierbei wurden durch das die Zellmembran passierende Flica die an der Apoptose beteiligten, aktivierten Caspasen 8,9,10 gebunden und somit in der FACS-Messung darstellbar. Zusätzlich erfolgte eine Gegenfärbung mit dem auch in der vorliegenden Arbeit verwandten Farbstoff Propidiumjodid, für den die intakte Zellmembran nicht permeabel ist. Eine Unterscheidung der verschiedenen Prozesse und Stadien ist nun im Vergleich der FACS-Streuungsmuster möglich.

In diesem weiteren Versuch wurde darüber hinaus auch in Früh- und Spätapoptose unterschieden. In der frühen Apoptose ist eine Markierung mit Flica nachweisbar, in der späten Apoptose zeigt sich zusätzlich eine Anfärbung mit Propidiumjodid⁴.

Die Untersuchung ergab auch weitere interessante Verteilungsmuster im Bezug auf die verschiedenen Dosierungen des RO 28-2653. Diese Ergebnisse stehen aktuell zur Veröffentlichung an.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war im Rahmen von Grundlagenforschung neue Aspekte einer Wirkung des RO 28-2653 aufzuzeigen. Welche möglichen toxischen Wirkungen oder Nebenwirkungen im menschlichen Organismus in den durch getesteten Konzentrationen und Dosierungen entstehen könnten, kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht vorhergesagt werden. Erste tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, soweit eine Beurteilung möglich ist unter diesen eingeschränkten Studienbedingungen und ohne eine konkrete Zielsetzungen der Versuche in diese Richtung, zumindest keine offensichtlichen schweren toxischen Effekte für die Organismen^{59,52}. Weitere Versuchsplanungen müssen zu gegebener Zeit vor einem möglichen klinischen Einsatz diesbezüglich folgen.

Für die Behandlung von Tumorzelllinien mit unterschiedlichen Matrixmetalloproteinaseinhibitoren gab es bisher hinsichtlich der Induktion von Apoptose und Auswirkungen auf den Zellzyklus keine einheitliche Datenlage. Einige Studien zeigten insbesondere In-vitro keinen deutlichen Effekt auf die Tumorzellen und ihre Proliferation, so dass von einer hauptsächlichen Wirkungsvermittlung über die MMP-Hemmung und Interaktion im Gewebe und Störung der Degradation der Extrazellulärmatrix ausgegangen wurde. In den Untersuchungen von Abramjuk et al. 2007 und Lein et al. 2002 konnte ein solcher umgebungsabhängiger Unterschied auch bereits für den selektiven Inhibitor RO 28-2653 an Dunningzellen der Prostata nachgewiesen werden. Im orthotopen Rattenmodell gelang mittels Inkubation mit RO 28-2653 eine dosisabhängige Reduktion der Tumorgöße um bis zu 90%⁵⁹. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung der Zellkulturen der gleichen Zellen mit demselben Inhibitor in diesen Studien, entgegen der deutlichen Wirkung in-vivo, kaum einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tumorzellen in-vitro^{59,1}. Diese scheinbare Wirkungslosigkeit ohne den Gewebeverband eines Organismus ist jedoch nicht in allen Untersuchungen zu beobachten. Ebenfalls durch die Arbeitsgruppe um Lein wurde zum Beispiel 2002 durch Mangoldt et al. eine signifikante Apoptoseinduktion bei effektiven Dosierungen zwischen 50-100µg/ml RO 28-2653 mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden durch eine ganze Reihe von weiteren In-vitro-Untersuchungen für unterschiedliche Tumorentitäten und andere Zellen in pathophysiologischen Zusammenhängen

erhärtert. So ist – neben den Zellen des Prostatakarzinoms – auch für Ewingsarkomzelllinien, glomerulomesangionale Zellen der Niere u.a. eine Apoptoseinduktion speziell durch den selektiven Inhibitor RO 28-2653 nachgewiesen worden^{20,71,64}. Eine noch deutlich größere Anzahl von diesbezüglichen Studien liegt für die Vielzahl der anderen, teilweise deutlich älteren und unspezifischeren Matrixmetalloproteinasen vor^{76,3,71,27}. Auch in diesen Untersuchungen konnte eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. Diese Aussagen decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Mögliche Erklärungsversuche für diese deutlichen Wirkungsunterschiede zwischen in-vivo und in-vitro-Versuchen werden in der aktuellen Literatur diskutiert. Es gibt Hinweise, dass die Rolle und Wirkung von MMPs und damit auch die Wirkung ihrer Inhibitoren vom jeweiligen Stadium der Tumorentwicklung und einer bereits stattgefundenen Ausbreitung der malignen Zellen abhängt. Im Endstadium sind für die MMPs sogar protektive Wirkungen beschrieben und sie scheinen den Verlauf einer bösartigen Erkrankung dann eher positiv zu beeinflussen⁸². Diese Ergebnisse könnten neben ihrem Mangel an Spezifität zumindest teilweise das Versagen der ersten und zweiten Generationen von Matrixmetalloproteinaseinhibitoren in den klinischen Studien begründen, da die im Rahmen der Studien behandelten Patienten an einem meist weit fortgeschrittenem Tumorleiden erkrankt waren¹⁷. Vor diesem Hintergrund erscheint die Hemmung durch einen MMPI in bestimmten Stadien der Erkrankung kontraindiziert, da sie das Fortschreiten der Erkrankung in einem solchen Fall unerwünschterweise begünstigen würde. Eine Vorhersage, ab wann und in welchen speziellen Fällen die beschriebene paradoxe Wirkung eintritt und sich somit der Einsatz von MMPs verbietet, kann aber aufgrund der diesbezüglich fehlenden Untersuchungen und Veröffentlichungen bisher nicht gemacht werden. Diese vermuteten stadienabhängigen Faktoren spielen in der Zellkultur keine Rolle. Sie erklären auch nicht die gute Wirkung im Gewebeverband und die schlechte in der Zellkultur. Als zusätzliche, grundsätzlich relevante und noch nicht hinreichend geklärte Faktoren müssen sie jedoch in der Interpretation und im Vergleich zu den in-vivo-Untersuchungen berücksichtigt werden.

Weitere unterschiedliche Wirkungen der Matrixmetalloproteinaseinhibitoren könnten unter anderem auch durch die schon in der Einleitung beschriebene wichtige MMP und TIMP-Balance begründet sein^{3,67,65,8}. Die Hemmung der Matrixmetalloproteinasen mittels selektiver künstlicher Inhibitoren verändert dieses empfindliche Gleichgewicht und beschriebene Veränderungen könnten über einen solchen Umweg letztendlich durch TIMPs vermittelt sein. Sowohl für MMPs als auch für TIMPs sind teilweise paradoxe Einflüsse im Sinne von Wachstumsstimulation und antiapoptotischen Effekten auf das Tumorgeschehen beschrieben^{44,3}. Die jeweiligen TIMPs weisen eine unterschiedliche Affinität und Selektivität zu den verschiedenen MMPs und weiteren beteiligten Interaktionspartnern wie zum Beispiel anderen Mitgliedern der Metzicin-Superfamilie (ADAMs-10 und 17, ADAMTS 1,4 und 5) auf, die wiederum mit TNF- α interagieren^{50,3}. So ist TIMP-3 als potenter Inhibitor der MMP-9 beschrieben, TIMP-2 und 3 hemmen MMP-1, während TIMP-1 an der MMP-1 kaum bindet⁹⁰. Als weitere Variable sind dosisabhängige Unterschiede in der Wirkung der TIMPs beschrieben. Nach Strongin et al. steigern niedrige Konzentrationen von TIMP-2 die Aktivität von MMP-2, wohingegen höhere Konzentrationen über einen Sättigungsmechanismus an MT-MMPs verhindern, dass die Vorstufe von MMP-2 in die aktive Form umgewandelt wird⁸⁸. Kontrovers zeigen sich auch ihre Wirkungen auf die Zellteilung³. Über den Mechanismus der MMP-Hemmung sind antimitotische Effekte beschrieben, aber seit langem sind auch mitogene Eigenschaften zum Beispiel der TIMP-1 bekannt, die initial in der Benennung als EPA (erythroid-potentiating-activity) Beachtung fanden²⁴. Auch nach mutagener Auslöschung der MMP-Hemmung bleiben diese beschriebenen proliferativen Effekte bestehen, so dass diesbezüglich von einem MMP-unabhängigen Mechanismus ausgegangen werden muss⁸⁷. Als weiterer Unterschied ist für die TIMP-3 eine Apoptoseinduktion aufgezeigt worden, die andere TIMPs nicht aufweisen. Dies würde wiederum für einen MMP-unabhängigen Effekt besprechen. Dementgegen zeigte sich in weiteren Versuchen jedoch der Verlust dieser Eigenschaft bei Ausschaltung der MMP-Komponente⁹. Die nachgewiesenen Wirkungen sind damit alles andere als eindeutig und in einigen Fällen sogar paradox. Dies lässt deutlich erkennen mit wieviel Umsicht jede Manipulation dieses komplexen Systems vorgenommen werden muss und wie überaus schwierig theoretische Wirkungsvorhersagen zu treffen sind²⁹.

In wieweit die natürlichen Gewebe- Matrixmetalloproteinaseinhibitoren und ihre Interaktion auch in der Zellkultur eine Rolle spielen ist für Pankreaskarzinomzelllinien noch nicht hinlänglich belegt. Einige Studien konnten jedoch bereits für unterschiedliche Tumorentitäten wie Melanomzellen, Mamma- und Colonkarzinomzelllinien und Burkitt-Lymphom auch in der Zellkultur und nicht nur im Gewebeverband entscheidende Effekte durch TIMPs nachweisen⁶⁵. So wurde beispielsweise von Bian et. al für die TIMP-3 eine Apoptoseinduktion bei Colonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden⁶. Hier wird die Betrachtung der TIMPs-Wirkung losgelöst von möglichen Gegenbeeinflussungen der künstlichen Inhibitoren nun als „natürliches Vorbild“ für eine Wirkungsvermittlung durch zum Beispiel RO 28-2653 interessant. Die Erkenntnisse, die bezüglich der TIMPs bereits gewonnen wurden, sind aufgrund zu erwartender Parallelen und Unterschiede kostbare Denkanstöße zur weiteren Untersuchung und Erklärung der Wirkung der artifiziellen Matrixmetalloproteinaseinhibitoren, weshalb im weiteren auch diesbezügliche Literatur in die Überlegungen mit einfließen soll.

Es stellt sich also die Frage wie der in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte deutliche Effekt der Apoptoseinduktion durch RO 28-2653 in den unterschiedlichen Pankreaskarzinomzelllinien vermittelt sein könnte. Hierzu muss zunächst eine genauere Betrachtung des Mechanismus „Apoptose“ erfolgen. Die Apoptose als „programmierter Zelltod“ stellt eine Antwortmöglichkeit von Zellen auf exogene und endogene Stressfaktoren dar. Im Gegensatz zum Zell-Zyklusarrest in der G0-/G1-Phase, der ein „Einfrieren“ der Zellaktivität bedeutet, das gegebenenfalls wieder aufgehoben werden kann, bedeutet die Apoptose als irreversibler Mechanismus den unwiderruflichen Zelltod und die Auflösung der zellulären Strukturen. Je nachdem mit einer wie großen Zerstörungskraft ein Pharmakon als „Stressfaktor“ eine Zelle trifft, kann der sofortige Zelltod eintreten, oder die Zelle wird je nach Schädigung über bestimmte Reaktionspfade in den Zell-Zyklus-Arrest beziehungsweise in die Apoptose getrieben^{21,46}. Die Apoptose stellt damit einen wichtigen Schutzmechanismus zur Verhinderung des Überlebens und der Ausbreitung von geschädigten und entarteten Zellen dar. Dieses System des programmierten Zelltodes ist bereits seit seiner Entdeckung Gegenstand intensivster Forschung, da

sich hier unzweifelhaft entscheidende Angriffspunkte für neue Therapieansätze in vielfältigen Bereichen ergeben könnten⁵¹. Ganze Zeitschriften beschäftigen sich heute mit den unterschiedlichen Mechanismen der Apoptose⁶⁴. Insbesondere für die Tumorforschung hat dies große Bedeutung, da Reaktionspfade der Apoptose in den meisten malignen Zellen gestört sind und somit die unkontrollierte Teilung der mutierten Zellen und die Ausbreitung der Erkrankung erst ermöglicht wird. Diese gestörten Apoptosemechanismen werden auch für einen nennenswerten Anteil der primären oder erworbenen Chemotherapeutikaresistenzen verantwortlich gemacht⁴⁶. Auch für das Pankreaskarzinom sind Störungen dieses empfindlichen Schutzsystems beschrieben worden. So zeigen diese Karzinome eine Aktivierung des K-ras Onkogens in bis zu 95%; Inaktivierungen oder Störungen von Rezeptoren und Tumorsuppressorgenen (p16/RB1 in >90%, p53 in ca. 75%, DPC4 in bis zu 55%) sind ebenso häufig beschrieben⁵⁷. Neben den diversen Ansatzpunkten zur Apoptoseinduktion gestalten sich zusätzlich auch die Reaktionskaskaden innerhalb der Zelle bis zum Erreichen des tatsächlichen Zelltodes extrem vielseitig, so dass sich ein hochkomplexes Interaktions- und Kontrollsystem ergibt, welches mit der Entdeckung und funktionellen Zuordnung neuer Komponenten immer weiter wächst²¹. Aus diesem Faktoren- und Rezeptoren-Netzwerk ragen einige Komponenten als wichtige Knotenpunkte heraus, wie zum Beispiel das bereits erwähnte p53, das als bedeutender Stresssensor gilt und über die Aktivierung von Caspasen als zentrale Exekutionsfaktoren (insbesondere Caspase 3 und 8) oder einer Vielzahl proapoptotischer Gene (wie zum Beispiel PTEN, Apaf-1, PERP und ROS u.a.) oder auch die Aktivierung von Rezeptoren wie CD95 und TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) einen der wichtigsten Apoptoseinitiatoren überhaupt darstellt. Des Weiteren spielen die TNF-Rezeptoren-Superfamilie, für die durch TIMP-3-bewirkt bereits eine Apoptoseinduktion über die Stabilisierung des TNF- α -Rezeptores an der Zelloberfläche von Colonkarzinomzellen nachgewiesen werden konnte, und Smac als proapoptotische Faktoren und SODD, FLIP und IAP als antiapoptotische Faktoren entscheidende Rollen^{65,76}. In diesen Zusammenhängen ist auch das zeitgleiche Auftreten sich antagonistischer Signalstoffe bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien zu interpretieren. Bei der Bx-PC-3 und der MIAPaCa-2 konnten aus den Apoptosewegen starke Aktivitäten von Caspase 3 und 8 nachgewiesen werden,

ohne dass bei gleichzeitig hoher Aktivität von IAP (inhibitor of apoptosis like XIAP oder Survivin) der programmierte Zelltod ausgelöst würde⁹³.

Betrachtet man nun die bereits vorliegenden Studien zur Apoptoseinduktion durch Matrixmetalloproteinasen im Hinblick auf mögliche Apoptosemechanismen zeigen sich für unterschiedliche Substanzgruppen und verschiedene Tumorentitäten eine Vielzahl von optionalen Interaktionsmechanismen.

Erba et al. haben für Batimastat als eine direkte Wirkung in der Zellkultur einen p53-unabhängigen Zellzyklusarrest bei Ovarialkarzinomzellen nachweisen können²⁷. In der Studie von Mitsiades et al. wurde für eine Ewingsarkomzelllinie ein FAS-vermittelter Apoptosemechanismus durch die Matrixmetalloproteinaseinhibitoren BB-3103 und A-151011 aufgezeigt⁷¹. In einer Arbeit von Nyormoi et al. zeigte 5a-((2R)-2-[(4-biphenylsulfonyl)amino]-3-phenylpropionic acid), ein für MMP-2 und MMP-9 hochselektiver Matrixmetalloproteinaseinhibitor, einen deutlichen synergistischen Effekt mit Apoptoseinduktion über Liganden der TNF-Rezeptor-Superfamilie wie $TNF\alpha$, TRAIL und FAS-cross-linking-Antikörper⁷⁶. Ein alleiniger Effekt für den Inhibitor konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden. In dieser Studie wurden 10 unterschiedliche Zelllinien, darunter Mammakarzinomzellen, Melanomzellen, Leukämiezellen und Osteosarkomzellen untersucht, wobei nur bei den ersten beiden Gruppen dosis- und zeitabhängig die Apoptoseinduktion nachgewiesen werden konnte. Desweiteren zeigte sich im Versuch mit anderen, teilweise sehr strukturähnlichen Matrixmetalloproteinaseinhibitoren mit auf andere MMPs gerichteter oder gleicher Selektivität für MMP-2 und MMP-9 keine TNF-Ligandenvermittelte Apoptose. Im Falle der strukturähnlichen Stoffe (5a und MMP-2/MMP-9-Inhibitor 2) legt dies den Schluss nahe, dass die gezeigte Wirkung nicht über die bei beiden Pharmaka vorhandenen MMP-Bindungen und die Hemmung der Metalloproteinasen zustande kommt⁷⁶. Es wird vielmehr eine ligandenvermittelte Aktivierung der Caspase 8 als Apoptosepfad angenommen, der durch eine der strukturell unterschiedlichen Einheiten des Inhibitors initiiert werden kann⁷⁶. Solche Wirkungen, die nicht über die direkte Hemmung von MMPs vermittelt sind auch für die TIMPs beschrieben, was die Annahme der Möglichkeit einer MMP unabhängigen

Apoptoseinduktion bestärkt⁶⁵. Eine Klärung inwieweit auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht oder nicht nur durch die direkte Hemmung von MMPs bedingt sind, muss in weiteren Untersuchungen versucht werden.

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass die Wirkung der MMPis und des RO 28-2653 zellspezifisch^{76,59}, dosisabhängig^{76,59}, zellspezifisch dosisabhängig⁷⁶ und auch zeitabhängig ist^{59,76}. Die zellspezifische Wirkung zeigt sich in der vorliegenden Arbeit bei unterschiedlichen Zelllinien der gleichen Tumorentität. Eine Dosisabhängigkeit konnte bei nur zwei untersuchten Dosierungen für eine Zelllinie nachgewiesen werden. Eine sequentielle Untersuchung, in der auch zeitliche Einflüsse untersucht werden, könnte folgen.

Des weiteren sollten auch Versuche durchgeführt werden, in denen Kombinationen aus unterschiedlich Stoffklassen mit sich unterscheidenden Wirkmechanismen untersucht werden. Aufgrund des wachsenden Verständnisses können durch sinnvolle Verbindungen Wirkungssteigerungen und gegebenenfalls auch Dosisreduzierungen erreicht werden. Erste Untersuchungen diesbezüglich wurden bereits kürzlich veröffentlicht. Abramjuk et al. konnten 2007 zeigen, dass die Behandlung mit RO 28-2653 im orthotopen Rattenmodell für das Prostatakarzinom in Kombination mit Estramustin und Etoposid als gesteigerten Effekt im Vergleich zu den Einzelgaben das Tumorgewicht um bis zu 92% (gegen 37% bei Etoposid und 62% bei der Kombination Etoposid und Estramustin) senkte¹. Insbesondere die Optimierung möglicher Synergien erfordert eine weitere Evaluation der molekularen Vorgänge⁷¹.

Eine kürzlich beschriebene neue Form der Zubereitung als Galenik mittels liposomaler Kapseln könnte zusätzlich demnächst den Einsatz als Lokal- und i.v.-Therapie für die Matrixmetalloproteinasen ermöglichen⁸⁰. Dies ist eine wünschenswerte Erweiterung der Untersuchungs- und Einsatzmöglichkeiten dieser Substanzgruppe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit ein weiterer Wirkungsaspekt des Matrixmetalloproteinaseinhibitors RO 28-2653 für das Pankreaskarzinom aufgezeigt werden konnte. RO 28-2653 induziert Apoptose in zwei humanen und einer Rattenpankreaszelllinie. Neben der möglichen direkten Wirkung im Sinne einer MMP-vermittelten Reaktion muss auch ein unabhängiger direkter oder indirekter molekularer Mechanismus zur Apoptoseinduktion durch RO 28-2653 diskutiert werden, zu dessen Klärung sich weitere Studien anschließen müssen.

Aufgrund der hohen Komplexität und der multiplen Vernetzung der Matrixmetalloproteinasen kann die vorliegende Arbeit nur einen weiteren Teilaspekt der vielschichtigen Interaktionskaskade beleuchten. Weitere In-vitro- und In-vivo-Studien müssen folgen, um eine aussagekräftige Entschlüsselung der Abläufe und Definierung der Rolle der Matrixmetalloproteinaseinhibitoren und insbesondere des RO 28-2653 als möglichem Teil eines multimodalen Therapiekonzeptes beim Pankreaskarzinom zu gestatten. Viele Fragen in Bezug auf die Rolle der Matrixmetalloproteinasen und ihrer unterschiedlichen Inhibitoren als mögliche Therapie beim Pankreaskarzinom und anderen bösartigen Erkrankungen sind weiterhin ungeklärt. Es fehlen die Erkenntnisse sequentieller Studien, wann welche Tumorentität im Verlauf welches Stadiums ihrer Entwicklung welche MMPs exprimiert, um sinnvolle zeitliche Therapiefenster festzulegen. Es ist noch nicht hinlänglich untersucht, wie sich die Inhibition und hier nun insbesondere auch die selektive Hemmung einzelner MMPs auf das Gesamtgefüge und fragile Gleichgewicht der MMPs, ihrer natürlichen Tissue-Inhibitoren und anderer beteiligter Proteasenklassen sowie Wachstumsfaktoren und Wachstumsrezeptoren, Chemokine, Apoptosemediatoren und andere Interaktionspartner auswirkt. Es fehlen noch gezielte Vorstudien zur Ermittlung relevanter Dosierungen und für die kommenden klinischen Studien müssen adäquate Endpunkte jenseits der Verlängerung des Gesamtüberlebens benannt werden, die eine möglicherweise hohe Effektivität der Medikamente und die spezifische Wirkung gegen bestimmte Tumorstadien besser abbilden. Es bleiben noch zu viele Fragen, um letztendlich entscheiden zu können, welcher Patient tatsächlich von einem therapeutischen

Einsatz der Matrixmetalloproteinaseinhibitoren profitieren könnte, aber insbesondere in Kombination mit klassischen und neuen Chemotherapeutika sind selektive Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen auch weiterhin eine viel versprechende Option für die Zukunft.

5. Zusammenfassung.

Das Pankreaskarzinom stellt aufgrund seiner Häufigkeit und seiner Aggressivität eine Tumorentität mit einer großen klinischen Relevanz und einer bedrückend schlechten Prognose dar. Trotz der intensiven Forschung an diversen oft in Vorversuchen viel versprechenden Substanzgruppen konnten klinisch bislang keine zufriedenstellenden therapeutischen Optionen aufgezeigt werden. Neue mögliche Ansatzpunkte für Chemotherapeutika sind aus diesem Grund von großem Interesse. Das komplexe System der körpereigenen Proteasen stellt in diesem Bemühen einen wichtigen Forschungsfokus dar, da diese in fast allen physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhängen des Körpers eine entscheidende Rolle spielen. Als eine der relevanten Untergruppen in diesem Zusammenspiel wurden Matrixmetalloproteinasen identifiziert und im Verlauf konnten mehr als 25 einzelne Matrixmetalloproteinasen entsprechend ihrer unterschiedlichen Wirkungen und Reaktionspartnern unterschieden werden. Schon früh war offensichtlich, dass jene Proteinasen, denen initial insbesondere die Modulation der extrazellulär Matrix zugeschrieben wurde, bei der Genese, der Infiltration und bei der Metastasierung von malignen Erkrankungen bedeutsam sind. Neben der Degradation der Extrazellulärmatrix und zusätzlichen Auswirkungen auf die Schwellenfunktion der Basalmembran, weiß man mittlerweile um die sehr viel komplexere Interaktion der Matrixmetalloproteinasen mit Wachstumshormonen und ihren Rezeptoren, mit inflammatorischen Mediatoren, und den Zellen des Immunsystems. Für Tumorentitäten wie das Kolonkarzinom, das Mammakarzinom, das Pankreaskarzinom und andere konnten hohe Konzentrationen von bestimmten Matrixmetalloproteinasen (MMP-2, MMP-9) nachgewiesen werden, die auf eine besondere Beteiligung dieser Enzyme hinweisen. Die gezielte Inhibition dieser Gruppen stellt demnach eine sinnvolle Therapieoption dar. Körpereigene, natürliche MMP-Hemmstoffe, sogenannte TIMPs, in ihrer Wirkung als Vorbild oder Modell nehmend konnten erste artifizielle Inhibitoren hergestellt werden. Die erste Generation dieser potentiellen Medikamente zeigten eine relativ unspezifische Wirkung über das breite Spektrum der Matrixmetalloproteinasen. In einer großen

Zahl von vorklinischen Untersuchungen wurden in vivo und in vitro viel versprechende Ergebnisse gewonnen, die eine deutliche Verringerung der Tumorgroße und eine signifikante Erniedrigung der Metastasierungsraten von unterschiedlichsten Tumorentitäten belegten, so dass auf diese Daten gestützt klinische Studien durchgeführt wurden. Hierbei konnten jedoch nicht die erhofften Wirkungen am Patienten nachgewiesen werden, sondern im Vergleich mit etablierten therapeutischen Ansätzen schnitten die MMPis der ersten und zweiten Generation im Bezug auf das Überleben schlechter ab und zeigten zudem bei einer nennenswerten Anzahl von Patienten limitierende Nebenwirkungen. Mit dem RO 282653 steht nun ein neuer hochselektiver Matrixmetalloproteinaseinhibitor zur Verfügung, dessen Wirkung auf das Wachstum und die Metastasierung bereits für einzelne Tumorentitäten beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine signifikante Apoptoseinduktion durch RO 28-2653 für zwei humane Pankreaskarzinomzelllinien (Bx-PC-3 und MIAPaCa-2) und eine Rattenpankreas-karzinomzelllinie (DSL-6A-C1) nachgewiesen werden. Für zwei der untersuchten Zelllinien konnte sogar ein dosisabhängiger Effekt aufgezeigt werden. Die Beschreibung einer Apoptoseinduktion durch einen MMPi bestätigt die Vermutung dass MMPs eine entscheidenden Rolle beim ungehemmten Wachstum, der Invasion und der Ausbreitung von malignen Zellen haben. Verschiedene plausible Reaktionswege und mögliche Interaktionspartner für diese Ergebnisse können bereits detaillierter diskutiert werden. Über welchen exakten Wirkmechanismus im Rahmen der hochkomplexen Interaktionskaskade aus proapoptotischen und antiapoptotischen Faktoren der Zelltod durch das RO 28-2653 induziert wird, muss mit der weiteren Entschlüsselung des Proteasen-Degradoms geklärt werden. Die fortgesetzte Evaluation der Wirkungen des RO 28-2653 und anderer MMPis ermöglicht neben ihrer eigenen Prüfung als Therapeutika auch eine sehr gezielte Beobachtung der entscheidenden molekularbiologischen Zusammenhänge, so dass deutliche Fortschritte im Verständnis der komplexen Interaktion zwischen der Vielzahl von Signalmolekülen und ihrer Rezeptoren zu erhoffen sind. Insbesondere als Bestandteil von zukünftigen multimodalen Therapiekonzepten für aggressive Krebsarten wie das Pankreaskarzinom könnte der gezielte Einsatz von MMPis wie des RO 28-2653 eine wichtige Bedeutung erhalten.

6. Literatur.

1. Abramjuk C, Lein M, et al. Enhanced inhibitory effect of the matrix metalloproteinase inhibitor RO 28-2653 in combination with estramustine and etoposide on the prostate carcinoma in the rat Dunning orthotopic tumor model. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59:275-282
2. Arlt M, Kopitz C, Pennington C, et al. Increase in gelatinase-specificity of matrix metalloproteinase inhibitors correlates with antimetastatic efficacy in a T-cell lymphoma model. *Cancer Res* 2002;62: 5543-50
3. Baker A, Edwards D, et al. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719-3727
4. Bedner E, et al. Activation of caspases measured in situ by binding of fluorochrome labeled inhibitors of caspases (FLICA): correlation with DNA-fragmentation. *Experimental cell research* 2000;259:308-313
5. Bernardo MM, Brown S, et al. Design, synthesis, and characterization of potent, slow-binding inhibitors that are selective for gelatinases. *J Biol Chem* 2002;277(13):11201-11207
6. Bian J, Wang Y, et al. Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-3. *Carcinogenesis* 1996;17:1805-1811
7. Bloomston M, Shafi A, et al. MMP-2 and TIMP-1 are derived from, not in response to, pancreatic cancer. *J Surg Res* 2002;102:35-38
8. Bloomston M, Zervos EE, et al. Matrix Metalloproteinases and Their Role in Pancreatic Cancer: A Review of Preclinical Studies and Clinical Trials. *Ann Surg Oncol* 2002;9:668-674

9. Bond M, Murphy G, et al. Localization of the death domain of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 to the N-terminus. Metalloproteinase inhibition is associated with proapoptotic activity. *J Biol Chem* 2000;275:41358-63
10. Bramhall SR, Hallissey MT, et al. Marimastat as maintenance therapy for patients with advanced gastric cancer: a randomized trial. *Br J Cancer* 2002;86:1864-1870
11. Bramhall SR, Rosemurgy A, et al. Marimastat as first-line therapy for patients with advanced unresectable pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 2001;19:3447-55
12. Brown PD, Giavazzi, et al. Matrix metalloproteinase inhibition: A review of anti-tumor activity. *Annals of Oncology* 1995;6:967-974
13. Brown S, Meroueh SO, et al. Quest for selectivity in inhibition of matrix metalloproteinases. *Curr Top Med Chem* 2004;4:1227-1238
14. Cascinu S, Verdecchia N, et al. New target therapies in advanced pancreatic cancer. *An Oncology* 2006;17Supple5:148-152
15. Cell Line Description BxPC-3 (General Cell Collection). European Collection of Cell Cultures (ECACC) at <http://www.ecacc.org.uk/Detail1.asp?ItemID=62817>
16. Cell Line Description Mia-PaCa-2 (General Cell Collection). European Collection of Cell Cultures (ECACC) at <http://www.ecacc.org.uk/Detail1.asp?ItemID=62217>
17. Cell Line Description DSL6A/C1 (General Cell Collection). European Collection of Cell Cultures (ECACC) at <http://www.ecacc.org.uk/Detail1.asp?ItemID=62853>

18. Chirivi RGS, Garofano A, et al. Inhibition of the metastatic spread and growth of B16BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer* 1994;58:460-464
19. Coussens LM, Fingleton B, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002;295:2387-2392
20. Daniel C, Duffield J, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors cause cell cycle arrest and apoptosis in glomerula mesangial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(1):57-68
21. Darzynkiewicz Z, Juan G, et al. Cytometrie in Cell Necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometrie* 1997;27:1-20
22. Davies B, Brown PD, et al. A synthetic matrix metalloproteinase inhibitor decreases tumor burden and prolongs survival of mice bearing human ovarian carcinoma xenografts. *Cancer Res* 1993;53:2087-91
23. Deryugina EI, Zijlstra A, et al. Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination, *Cancer Res* 2005;65:10959–10969
24. Docherty AJ, Lyons A, et al. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature.* 1985;318(6041):66-9.
25. Doucas H, Garcea G, et al. Chemoprevention of pancreatic cancer: A review of the molecular pathways involved, and evidence for the potential for chemoprevention. *Pancreatology* 2006;6:429-439
26. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-174

27. Erba E, Ronzoni S, et al. The metalloproteinaseinhibitor batimastat (BB-94) causes cell cycle phase pertubations in ovarian cancer cells. *Annals of Oncology* 1999;10:589-591
28. Evans JD, Stark A, et al. A phase II trial of marimastat in advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2001;85:1865-1870
29. Fingleton B. Matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapie: the current situation and future prospects. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7:385-397
30. Fingleton B. MMPs as therapeutic targets – Still a viable option?. *Semin Cell Dev Biol* 2007,doi:10.1016/j.semcdb.2007.06.006
31. Garbisa S, Scagliotti G, et al. Correlation of serum metalloproteinase levels with lung cancer metastasis and response to therapy. *Cancer Res* 1991;52:4548-4549
32. Githens S. The pancreatic Duct Cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation and culture. *J pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7:486-506
33. Grams F, Brandstetter H, et al. Pyrimidin-2,4,6-trions: a new effectiv and selektiv class of matrix metalloproteinase inhibitors. *Biol Chem* 2001;328(8):1277-1285
34. Gress TM, Muller-Pillasch F, et al. Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1995;62:407-413
35. Gomez DE, Alonso DF, et al. Tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases: structure, regulation and biological function. *Eur J Cell Biol* 1997;74:111-122

36. Hall PA, Lemoine NR. Rapid acinar to ductal transdifferentiation in cultured human exocrine pancreas. *J Pathol* 1992;166:97-103
37. Haq M, Shafi A, et al. Addition of matrix metalloproteinase inhibition to conventional cytotoxic therapy reduces tumor implantation and prolongs survival in a murine model of human pancreatic cancer. *Cancer Res* 2000;60:3207-3211
38. Hezel AF, Kimmelman AC, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Dev* 2006;20:1218-1249
39. Hochster HS, Haller DG, et al. Consensus Report of the International Society of Gastrointestinal Oncology on Therapeutic Progress in Advanced Pancreatic Cancer. *Cancer* 2006;107:676-685
40. Huang Z, Guo KJ, et al. Effects of 5-fluorouracil combined with sulfasalazine on human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 proliferation and apoptosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007;6:312-320
41. Ikejiri M, Bernardo MM, et al. Potent mechanism-based inhibitors for matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 2005;280:33992-34002
42. Iki K, Takeo T, et al. Detection of serum MMPs in tumor bearing hamster. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:478-484
43. Iwadate Y et al.: Prediction of Drug Cytotoxicity in 9L Rat Brain Tumor by Using Flow Cytometry with a Deoxyribonucleic Acid-binding Dye. *Congress of Neurological Surgeons* 1997; Apr: 782-788
44. Jiang Y, Goldberg ID, et al. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002;21:2245-2252

45. Jimenez RE, Hartwig W, et al. Effect of matrix metalloproteinase inhibition on pancreatic cancer invasion and metastasis: An additive Strategy for cancer control. *Annals of surgery* 2000;231:644-654
46. Johnstone RW, Ruefli AA, et al. Apoptosis: A Link between cancer genetics and chemotherapie. *Cell* 2002; 108(2):153-64
47. Jones L, Ghaneh P, et al. The matrix metalloproteinases and their inhibitors in treatment of pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999;880:288-307
48. Juuti A, Lundin J, et al. Epithelial MMP-2 Expression correlates with worse prognosis in pancreatic cancer. *Oncol* 2006;71:61-68
49. Karikari C, Roy I, et al. Targeting the apoptotic machinery in pancreatic cancers using small-molecule antagonists of the x-linked inhibitor of apoptosis protein. *Mol Cancer Ther* 2007;6(3):957-966
50. Kashiwagi M, Tortorella M, et al. TIMP-3 ist a potent inhibitor of ADAM-TS3 (aggrecanase 1) and ADAM-TS5 (aggrecanase 2). *J Biol Chem* 2001;276:12501-4
51. Kerr JF, Wyllie AH, et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57
52. Kilian M, Gregor JI, et al. Matrix metalloproteinase inhibitor RO 28-2653 decreases liver metastases by reduction of MMP-2 and MMP-9 concentration in BOP-induced ductal pancreatic cancer in Syrian Hamsters: Inhibition of Matrix metalloproteinases in pancreatic cancer. *Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2006;75:429-434
53. Koshiba T, Hosotani R, et al. Involvement of MMP2 activity in invasion and metastasis of pancreatic tissue. *Cancer* 1998;82:642-650

54. Krüger A, Arlt MJE, et al. Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res* 2005;56(9):3523-3526
55. Krysko DV, Vanden Berghe T, et al. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008;44:205-221
56. Laurie GW, Leblond CP, et al. Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol* 1982;95(1):340-344.
57. Lebedeva I, Sarkar D, et al. Molecular target-based therapy of pancreatic cancer. *Cancer Res* 2006;66(4):2403-13
58. Lee CS, Montebello J, et al. Distribution of Typ IV collagen in pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis. *Int J Exp Pathol* 1994;75:79-83
59. Lein M, Jung K, et al. The new synthetic matrix metalloproteinase inhibitor (Roche 28-2653) reduces tumor growth and prolongs survival in a prostate cancer standard rat model. *Oncogene* 2002;21:2089-2096
60. Li D, Xie K, et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004;363:1049-57
61. Lockhart AC, Rothenberg ML, et al. Treatment for Pancreatic Cancer: Current Therapie and Continued Progress. *Gastroenterology* 2005;128:1642-1654
62. MacKenzie MJ. Molecular therapie in pancreatic adenocarcinoma. *Lancet Oncol* 2004;5:541-549
63. Määttä M, Ylermi S, et al. Differential expression of matrix metalloprteinase (MMP)-2, MMP-9 and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinome: Implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clinical Cancer Research* 2000;6:2726-2734

64. Mangoldt D, Sinn B, et al. The novel synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases RO 28-2653 induces apoptosis in dunning cells. *Apoptosis* 2002;7:217-220
65. Manello F, Gazzanelli G. Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: Conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis* 2001;6:479-482
66. Maquoi E, Sounni NE, et al. Anti-invasive, antitumoral, and antiangiogenic efficacy of a pyrimidine-2,4,6-trione derivate, an orally active and selective matrix metalloproteinases inhibitor. *Clin Cancer Res* 2004;10:4038-4047
67. Masui T, Doi R, et al. RECK Expression in pancreatic cancer: Ist correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin Cancer Res* 2003;9:1779-1784
68. Matsushita A, Onda M, et al. Antitumor effect of a new selectiv matrix metalloproteinase inhibitor, MMI-166, on experimental pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2001;92:434-440
69. Matsuyama Y, Takao S, et al. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 2002;80:105-110
70. Michaud DS. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 2004;59:99-111
71. Mitsiades N, Poulaki V, et al. Fas-mediated apoptosis in ewing's sarcoma cell lines by metalloproteinase inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1678-84
72. Moore M, Hamm J, et al. A comparison between gemcitabine and the matrix metalloproteinase inhibitor BAY12-9566 in patients with advanced pancreatic cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000;19:240a

73. Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Methods Enzymol* 1995;248:496-510
74. Nagase H, Woessner JF, et al. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-21498
75. Noel A, Maquoi E, et al. Antitumor and antiangiogenic activities of RO 28-2653, a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000;6:4524 (Abstr.)
76. Nyormoi O, Mills L, et al. An MMP-2/MMP-9 inhibitor, 5a, enhances apoptosis induced by ligands of the TNF receptor superfamily in cancer cell. *Cell Death and Differentiation* 2003;10:558-569
77. Opalka JR, Gellerich FN, et al. Effect of the new matrix metalloproteinase inhibitor RO 28-2653 on mitochondrial function. *Biochem Pharmacol* 2002;63:725-732
78. Overall CM, Kleinfeld O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Perspectives* 2006;6:227-239
79. Patten LC, Berger DH. Role of Proteases in Pancreatic Carcinoma. *World J. Surg.* 2005;29:258-263
80. Piette M, Castagne D, et al. Preparation and evaluation of liposomes encapsulating synthetic MMP inhibitor (RO 28-2653) – cyclodextrin complexes. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 2007;57:101-103
81. Pour PM, Pandey KK, et al. What is the origin of pancreatic adenocarcinoma. *Mol Cancer.* 2003;22:2-13

82. Pozzi A, Moberg PE, et al. Elevated matrix metalloproteinase and angiostatin levels in integrin α 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;2202-2207
83. Rosendahl J, Bodeker H, et al. Hereditary chronic pancreatitis. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:1
84. Saad ED, Hoff PM, et al. Molecular-Targeted Agents in Pancreatic Cancer. *Cancer Control* 2004;11:32-38
85. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:602-608
86. Sledge GW, Qulali M, et al. Effect of matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1546-1550
87. Sternlicht MD, Werb Z. How Matrix Metalloproteinases regulate Cell Behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516
88. Strongin AY, Collier I, et al. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 1995; 5331-5338
89. Taraboletti G, Garofalo A, et al. Inhibition of angiogenesis and murine haemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:293-298
90. Tortorella MD, Burn TC, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: A member of the ADAMTS family of proteins. *Science* 1999;284:1664-66

91. Ulrich AB, Schmied BM, et al. Pancreatic Cell Lines: A Review. *Pancreas* 2002;24:111-120
92. Willenbrock F, Murphy G. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Am J Resp Crit Care Med* 1994;150:165-170
93. Yang L, Cao Z, et al. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis protein in human tumor cells: Implication for cancer therapy. *Cancer Res* 2003;63:6815-6824
94. Yang X, Staren E, et al. Invasiveness and MMP expression in pancreatic carcinoma. *J Surg Research* 2001;98:33-39
95. Yokoyama M, Ochi K, et al. Matrix metalloproteinases-2 in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer. *Pancreas* 2002;24:344-347
96. Zhang Y, Banerjee S, et al. Epidermal growth factor receptor-related protein inhibits cell growth and induces apoptosis of BxPC-3 pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2005;65(9):3877-3882
97. Zervos EE, Norman JG, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates human pancreatic cancer growth in vitro and decreases mortality and tumorigenesis in vivo. *J Surg Res* 1997;69:367-371
98. Zucker S, Cao J, et al. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene* 2000; 6642-6650

7. Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge:

ADAMs	A-disintegrin and metalloproteinases
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type-1 modules
Apaf-1	Apoptosis protease activating factor 1/ proapoptotischer Regulator
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CD	Cluster of differentiation/Zelloberflächenmarker
CFS-I	Colony Stimulating-Faktor der Subklasse I
CFTR-Protein	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulations-Protein
CK-19	ein Marker des duktales Karzinoms
COX-2-Hemmer	Cyclooxygenase-2-Hemmer
CPT	Camptothecin DNA-Topoisomerase-I-Inhibitor
DPC4	Tumorsuppressorgen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure bzw. Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FBS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FLIP	FLICE-inhibitory protein
IAP	Inhibitor-of-apoptosis protein
K-7	ein Marker des duktales Karzinoms
K-ras	Gen mit häufiger Mutation bei Tumorleiden
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMPI	Matrixmetalloproteinaseinhibitor
OV-6	Marker des duktales Karzinoms
PBS	Phosphat-Puffered Saline
PCSA	Pankreaskarzinomspezifisches Antigen
PERP	Proapoptotisches Gen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog/ Tumorsuppressorgen
p16/RB1	Tumorsuppressorgen
p53	Tumorsuppressorgen
ROS	Reactive oxygene species

SD	Standard Deviation/Standardabweichung
SMAC	Supramolecular activation cluster
SODD	Silencer of Death Domains
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetallo Proteinases
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
5-FU	5-Fluoruracil

8. Erklärung

„Ich, Marion Hanel, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Einfluss des Matrixmetalloproteinaseinhibitors RO-28-2653 auf den Zellzyklus der Pankreaskarzinomzelllinien Bx-PC-3, MIAPaCa-2 und DSL-6A-C1, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 30.09.2008

M. Hanel

9. Lebenslauf

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

Berlin, am 30.09.2008

Marion Hanel

10. Publikationen

Kilian M, Gregor JI, Heukamp I, Hanel M, Ahlgrimm M, Schimke I, Kristiansen G, Ommer A, Walz MK, Jacobi CA, Wenger FA. Matrix metalloproteinase inhibitor RO 28-2653 decreases liver metastasis by reduction of MMP-2 and MMP-9 concentration in BOP-induced ductal pancreatic cancer in Syrian Hamsters: inhibition of matrix metalloproteinases in pancreatic cancer. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006 Dec;75(6):429-34. Epub 2006 Oct 10.

Kilian M, Heukamp I, Gregor JI, Helmecke K, Hanel M, Ahlgrimm M, Cherepnev G, Wenger FA, Jacobi CA Influence of the selective Matrix Metalloproteinase Inhibitor RO 28-2653 on Apoptosis and Cell Cycle in three different Pancreatic Cancer Cell Lines (in review)

11. Danksagungen.

Ich danke meinen wunderbaren Eltern, für ihr Interesse an meiner Promotion. Ich danke für jede ihrer quälenden und unermüdlichen Nachfragen diesbezüglich, die mich abwechselnd in Verzweiflung gestürzt und Rage gebracht haben. Aber ich danke ihnen auch für ihre liebevolle und bedingungslose Unterstützung, die sie mir fraglos mit all ihrer Kraft im Studium, in der Arbeitswelt und im Leben überhaupt geschenkt haben. Ihr Vertrauen in mich hat mir diesen Weg erst ermöglicht. Diese Arbeit ist ihnen mit der größten Dankbarkeit gewidmet.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Müller für seine Geduld und seine Großzügigkeit das eher langsame Werden meiner Promotion an seiner Klinik zu dulden und seine nimmermüde Motivation, diesen Prozess zu beschleunigen. Ich bin ihm für seinen Glauben an mich und für die Unterstützung bei dieser Arbeit und in der Klinik zu großem Dank verpflichtet.

Ich danke meiner Oberärztin, Fr. Dr. Kasper, dafür, dass sie meine ersten und alle weiteren Schritte in der Chirurgie mit so viel Vertrauen und Begeisterung begleitet hat. Ich hoffe, ich wachse in die großen „Schuhe“ hinein.

Ich danke Herrn PD Dr. Wenger für die Unterstützung der Arbeit und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere aber Sophia, Hendrik und Kamil, für ihre Hilfe und die fruchtbare Zusammenarbeit.

Von Herzen danke ich Herrn Dr. Maik Kilian für seine Hilfe und den gemeinsamen Weg. Ohne ihn hätte diese Arbeit keinen Anfang und erst recht kein Ende gefunden. Er hat so manche Flinte wieder aus dem Korn zurückgeholt und ich weiß, es war nicht immer eine Freude. Ich danke ihm für seine unerschöpfliche Geduld und seinen festen Glauben an mich. „Amicus certus in re incerta cernitur. Ex ungue leonem.“