

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Chirurgischen Klinik I
Direktor Professor Dr. med. H. J. Buhr

**DIE ROLLE VON ENDOTHELIN-1 FÜR DIE
TUMORANGIOGENESE UND DAS WACHSTUM
DES PANKREASKARZINOMS**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Till Stummeyer
aus Steinfurt

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Hubert G. Hotz
Gutachterin: Priv.-Doz. Dr.med. Diana Lüftner

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 25. November 2008

Meinen Eltern.
Und Aşkim.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Vorbemerkung.....	1
1.2	Das exokrine Pankreaskarzinom	1
1.2.1	Ätiologie.....	2
1.2.2	Pathogenese.....	3
1.2.3	Klinik.....	4
1.2.4	Diagnostik	5
1.2.5	Therapie.....	6
1.2.6	Prognose	7
1.3	Angiogenese	8
1.3.1	Tumorangiogenese	8
1.3.2	Antiangiogenese	9
1.3.3	Tumorangiogenese beim Pankreaskarzinom.....	10
1.4	Endothelin	11
1.4.1	Die Entdeckung und Beschreibung von Endothelin	11
1.4.2	Biochemie der Endotheline	11
1.4.3	Rezeptoren.....	13
1.4.4	Rezeptorantagonisten	13
1.4.5	Die Endothelin-Achse und ihre Wirkungen	14
2	Fragestellung	16
3	Materialien	17
3.1	Chemikalien	17
3.1.1	Endothelinrezeptorantagonisten	17
3.1.2	Endothelin-1	17
3.2	Geräte	18
3.3	Zelllinien und Zellkulturbedingungen.....	18
3.4	Software	19
4	Methoden.....	20
4.1	Zellzählung.....	20
4.2	MTT-Assay	20
4.3	BrdU-Assay.....	21
4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
4.4.1	Isolierung der Ribonukleinsäuren (RNA)	23
4.4.2	Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäuren (RNA)	24
4.4.3	Gelelektrophorese.....	24
4.4.4	Prinzip und Durchführung der <i>Reversen Transkription</i>	25
4.4.5	<i>Reverse-Transkriptase-PCR</i> zur Evaluierung des Expressionsverhaltens von ET-1 und seinen Rezeptoren	25
4.4.6	Das Prinzip der <i>Real-time PCR</i>	26
4.4.7	Das LightCycler-System	27
4.4.8	Durchführung der Real-time PCR.....	27
4.4.9	Verfahren zur Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.....	30

4.5	Western-Blot	30
4.5.1	Zellkultur	30
4.5.2	Proteinisolierung	31
4.5.3	Messung der Proteinkonzentration	31
4.5.4	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	31
4.5.5	Transfer	32
4.6	ELISA.....	34
4.6.1	VEGF-ELISA.....	34
4.6.2	Endothelin-1-ELISA	35
4.7	Tierstudien.....	36
4.7.1	Orthotope Implantationstechnik.....	36
4.7.2	<i>In-vivo</i> Therapie mit LU-302146	36
4.7.3	Evaluierung der Therapieresultate	37
4.7.4	Mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD).....	37
4.8	Statistische Auswertung	38
5	Ergebnisse	39
5.1	Ergebnisse der <i>in-vitro</i> Untersuchungen	39
5.1.1	Expressionsverhalten verschiedener Zelllinien für ET-1 und die Rezeptoren ET _A und ET _B	39
5.1.2	Dosisabhängiger Effekt der ET _A -Blockade auf die Zellproliferation bei der Zellzählung.....	40
5.1.3	Dosisabhängiger Effekt der Applikation von ET-1 auf die Zellproliferation bei der Zellzählung.....	42
5.1.4	Untersuchung der zeitabhängigen Wirkung von ET-1 auf die Zellviabilität mit dem MTT-Assay	44
5.1.5	Effekt von Agonist und Antagonist auf die Zellproliferation im BrdU-Assay	47
5.1.6	Quantifizierung der VEGF-Expression nach Stimulation mit ET-1 und nach selektiver ET _A -Blockade mit der Polymerasekettenreaktion (PCR).....	49
5.1.7	Beeinflussung der VEGF-Proteinsekretion humaner Pankreaskarzinomzellen durch das ET-System	57
5.1.8	Qualitativer Nachweis von VEGF im Western-Blot.....	58
5.1.9	Quantifizierung von VEGF nach Inkubation mit ET-1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels ELISA	58
5.1.10	Quantifizierung von ET-1 nach Inkubation mit ET _A -Rezeptorantagonisten im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels ELISA.....	60
5.2	Ergebnisse der <i>in-vivo</i> Untersuchungen	63
5.2.1	Einfluß das ET _A -Blockade auf das Primärtumorvolumen	63
5.2.2	Tumordisseminierung unter ET _A -Blockade	65
5.2.3	Veränderung der Überlebensrate durch ET _A -Blockade	67
5.2.4	Wirkung der ET _A -Rezeptorblockade auf die Mikrovaskuläre Gefäßdichte.....	69
6	Diskussion	71
6.1	Effekte des ET-Systems bei Neoplasien	72
6.2	Eigene Ergebnisse	75
6.2.1	Effekt der ET-1-ET _A -Achse auf das Proliferationsverhalten <i>in vitro</i>	75
6.2.2	Untersuchung des Einflusses der ET-1-ET _A -Achse auf die VEGF-Expression <i>in vitro</i>	78
6.2.3	Untersuchung eines autokrinen Endothelin-Loops	79

6.2.4	Die Rolle der ET-1-ET _A -Achse auf Tumorwachstum und Tumorangiogenese <i>in vivo</i>	80
7	Zusammenfassung	84
8	Literaturverzeichnis	86
9	Anhang	92
9.1	Abkürzungsverzeichnis	92
9.2	Abbildungsverzeichnis	95
9.3	Tabellenverzeichnis	95
9.4	Danksagung	96
9.5	Erklärung	97
9.6	Lebenslauf	98
9.7	Publikationen	99

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Im Jahr 2000 starben weltweit etwa 7 Millionen Menschen an Krebs. Mit einem Anteil von 12% stehen bösartige Neubildungen nach kardiovaskulären und Infektionskrankheiten an dritter Stelle der Todesursachenstatistik in der Welt ^[1]. Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung sowie des Fortschritts bei medizinischer Versorgung und therapeutischen Möglichkeiten wird die Inzidenz für Krebserkrankungen weiterhin deutlich zunehmen.

Die Notwendigkeit einer Mortalitätsreduktion ist damit eindeutig und erfordert die Entwicklung und Prüfung effektiverer multimodaler Therapiekonzepte. In einer Zeit des rasant wachsenden Verständnisses der molekularpathologischen Grundlagen sowie der Perfektionierung bildgebender Diagnostik bieten sich zudem neue und vielversprechende Perspektiven in der Krebstherapie. Krebs durch die Unterbindung der notwendigen Gefäßneubildung „auszuhungern“ (Antiangiogenese) oder zumindest in einer stationären Phase zu fixieren und Malignome dann als chronische Erkrankungen therapeutisch beherrschen zu können, ist eine der neuen Therapiestrategien.

Die Endotheline sind als polyfunktionelle Zytokine noch nicht lange bekannt und zeigen ein komplexes Funktionsspektrum – auch bei Neoplasien ist das Endothelinsystem involviert. Mehreren Forschungsgruppen gelang es, über eine Blockade des Endothelinsystems das Wachstum verschiedener Tumorentitäten und die Tumorangiogenese deutlich zu supprimieren ^[2, 3, 4, 5].

Das exokrine Pankreaskarzinom zählt zu den aggressivsten Malignomen, die Heilungschancen sind bis heute unverändert schlecht. Ob Endothelin auch bei diesem Tumor eine Rolle spielt, ist unbekannt. Die Untersuchung der Funktion von Endothelin beim Pankreaskarzinom ist Thema dieser Arbeit. Die Möglichkeit einer neuen Therapiestrategie soll experimentell geprüft werden.

1.2 Das exokrine Pankreaskarzinom

Vom Gastrointestinaltrakt ausgehende Neoplasien machen ein Fünftel aller Krebserkrankungen aus. Nach kolorektalem und Magenkarzinom ist das Adenokarzinom des Pankreas die dritthäufigste Neoplasie (10%) des Gastrointestinaltraktes mit einer Inzidenz von 10 pro 100.000 Einwohner im Jahr ^[6, 7, 8].

KÜNZLI et al. beschreiben vier charakteristische Grundprobleme des Pankreaskarzinoms, aus denen die frustrierende Prognose dieses aggressiven Tumors resultiert ^[9]:

- die schwierige Diagnose im resektablen Frühstadium,

- die technisch anspruchsvolle Operation mit potentiell hoher Morbidität und Mortalität,
- die hohe Rezidivquote, sowie
- schlechtes Ansprechen und geringe Potenz der konservativen Therapie.

Bei einer mittleren Überlebenszeit von drei bis sechs Monaten liegt die durchschnittliche 1- und 5-Jahresüberlebensrate aller Stadien bei 19-21% resp. 5-7% ^[10; 6], ohne wesentliche Verbesserung in den letzten Jahrzehnten.

Die Mortalität entspricht fast der Inzidenz: jährlich sterben in Deutschland über 12.000 Patienten an Pankreaskarzinomen, das sind ca. 6% der krebsbedingten Todesfälle. Damit steht das Pankreaskarzinom an 9. (Frauen) bzw. 10. (Männer) Stelle der Krebserkrankungen im Jahr 2004 in Deutschland^[6], aber an vierter Stelle der Statistik krebsbedingter Todesfälle in 2005 ^[11].

Epidemiologisch wird das Pankreaskarzinom besonders häufig in Neuseeland, Japan und Nordamerika, selten in Indien, Kuwait und Südamerika beobachtet; in Europa stehen Finnland, Deutschland und Dänemark an den vordersten Stellen der Erkrankungshäufigkeit^[12]. Männer sind 1,5-2 mal häufiger betroffen als Frauen, gehäuft bei afroamerikanischer Ethnik ^[13]. Die Erkrankung manifestiert sich fast immer zwischen dem 40. und 80. Lebensjahr mit einem mittleren Erkrankungsalter von 75 Jahren bei Frauen und 67 Jahren bei Männern.

1.2.1 Ätiologie

Die Ätiologie der Erkrankung ist unklar. Als Risikofaktoren gelten Nikotinabusus; bis zu 30% der Fälle sollen hierdurch verursacht sein ^[14, 15]. Ernährung beeinflusst das Malignomrisiko: die Kalorienzufuhr korreliert direkt mit einem erhöhten Risiko ^[13], bei Diabetikern ist das relative Risiko über 5 Jahre verdoppelt ^[16], Adipositas (BMI > 30 kg/m²) ist ein Risikofaktor ^[17, 18]. Obst und Gemüse könnten protektiv wirken, indem die Zusammensetzung der Gallensäuren und der Cholecystokininspiegel günstig beeinflusst werden. Ein erhöhtes Risiko für Alkohol- und Kaffeekonsum konnte nicht bewiesen werden.

Im Tierexperiment läßt sich das Pankreaskarzinom durch Nitrosaminverbindungen induzieren^[19]. Durch Inhibierung der Nitrosation durch Vitamin C und E haben diese möglicherweise Schutzfunktion^[20].

Als hereditäre Syndrome, die mit einer signifikant erhöhten Erkrankungshäufigkeit einhergehen, sind die hereditäre Pankreatitis (Risiko bis 20%), das Nävusdysplasie-Syndrom (Risiko 22fach erhöht), das Peutz-Jeghers-Syndrom und das Lynch-Syndrom, sowie familiäres Mammakarzinom und das Li-Fraumeni-Syndrom beschrieben ^[21]. Es wird eine familiäre Häufung des Pankreaskarzinoms beobachtet; die hereditären Syndrome sollen jedoch nur in bis zu 8% der Erkrankungsfälle bedeutsam sein ^[22].

Die chronische Pankreatitis stellt ein erhöhtes Risiko dar, es werden ähnliche genetische Alterationen und die Konzentrationserhöhung einiger Chemokine wie beim Karzinom beobachtet^[23]. Die Entzündung wirkt als Tumorpromotor.

1.2.2 Pathogenese

Malignome können vom endokrinen (5% der Fälle) oder vom exokrinen (95%) Pankreasgewebe ausgehen. Meist handelt es sich um Karzinome, die zu über 90% vom Epithel der Ausführungsgänge ihren Ausgang nehmen und daher als duktales Pankreaskarzinom bezeichnet werden^[24, 25]. Differentialdiagnostisch kommen selten Adenome und Lymphome vor, peripapillär auch Karzinome des Gallengangs.

Das exokrine Pankreaskarzinom ist in 2 von 3 Fällen im Caput pancreaticus lokalisiert und imponiert makroskopisch derb-weißlich mit zentralen Nekrosen. Die Tumorränder sind aufgrund perifokaler Bindegewebsproliferation und tumorbedingter Vernarbungsprozesse unscharf. Stenosen infolge des verdrängenden Wachstums bedingen einen Sekretstau und sekundäre Pankreatitis. Es wächst infiltrativ in den Retroperitonealraum, per continuitatem ins Duodenum und in die Leber. Die Tumorzellen infiltrieren die Nervenscheiden des Plexus coeliacus und verbreiten sich perivaskulär; sie ummauern die Splanchnikusgefäße sowie Aorta, Venae cava et portae. Ihre Metastasierungsfreudigkeit sowie die lymphogene Ausbreitung mit Befall coeliacaler, paraaortaler und Leberhiluslymphknoten sind unabhängig von der Primärtumorgröße. Hämatogen filiariert das Pankreaskarzinom über die Leber gelegentlich auch in Lunge, Gehirn und Knochen^[26]. Topographisch unterscheidet man das Papillenkarzinom, das auch klinisch abgegrenzt werden muß, weil die frühere Symptomatik zu einer besseren Prognose führt.

Das Pankreaskarzinom ist eine genetische Erkrankung bei der mehrere Mutationen in einer Zelle vorliegen müssen. Obligatorisch ist die Überexpression von Rezeptor-Liganden-Systemen, Onkogenaktivierung und Verlust der Tumorsuppressorgene^[27]. Hier spielt das *K-ras* Onkogen die wichtigste Rolle, es ist in 90% der Fälle mutiert und zwar bereits in der Frühphase^[28, 21].

Das Tumorsuppressorgen *p53* ist in 40 % der Fälle mutiert. Die Signaltransduktionskette aus *p16* und dem *Cyclin D/ CDK*(Cyclin-abhängige Kinase)-4-Komplex ist in fast 90% der Fälle beeinträchtigt und gilt als *conditio sine qua non*^[29]. Der Transkriptionsfaktor *NF- κ B* ist von zentraler Bedeutung bei der Apoptoseresistenz.

APC und *DPC4* sind häufig inaktiviert. Die Überexpression von *Cyclin D1* korreliert mit einer schlechten Prognose^[28]. Die Mutationen von *K-ras*, *p16*, *DPC4* und *FHIT* gilt als „molekularer Fingerabdruck“ des duktales im Unterschied zum nonduktalen Pankreaskarzinom^[30].

Die Zellproliferation, -invasion, die Metastasierung und die Angiogenese werden durch Sekretion von Wachstumsfaktoren beeinflusst, die parakrin und autokrin als Stimulantien oder als Inhibitoren fungieren. Tabelle 1 (Seite 4) zeigt einige in der Literatur beschriebene Faktoren.

Faktor	Wirkung
Epidermal Growth Factor (EGF)	Proliferation [31]
Fibroblast Growth Factor (FGF)	Angiogenese, Prognoseindex [32, 33]
Transforming Growth Factor- α (TGF- α)	Prognoseindikator[18], VEGF-Expression[34]
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	wichtigster angiogener Faktor, mitogene Wirkung [35, 36, 37]
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	mitogen, Stimulierung von Stromagewebsbildung durch Chemoattraktion: Fibroblasten Endothelzellen u.a.; Prognoseindikator [38, 39]
Nerve Growth Factor (NGF)	assoziiert mit perineuraler Invasion
Insulin-like Growth Factor (IGF)	VEGF-Expression [40]
MMP-2; MMP-9	Abbau der Extrazellulären Matrix u.a.
Endothelin-1	Proliferation, Apoptoseinhibition, Angiogenese [41]
Angiogenin	Angiogenese, Prognoseindex [42]

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren beim Pankreaskarzinom ^[28, 43].

1.2.3 Klinik

Die klinische Symptomatik ist unspezifisch und mit Oberbauchschmerzen, Appetit- und Gewichtsverlust differentialdiagnostisch nicht leicht von der chronischen Pankreatitis zu unterscheiden, zumal die tumorbegleitende Entzündung zur Lipaseerhöhung führen kann. Die Schmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken können insbesondere nachts zunehmen; sie sind oft alleiniges Symptom bei Corpus/Cauda-Lokalisation. Oft tritt ein schmerzloser Ikterus wegen biliärer Obstruktion bei Pankreaskopflokalisation auf. Bei etwa jedem dritten Patienten wird das Courvoisier-Zeichen beobachtet. Weiterhin erscheinen Müdigkeit, Übelkeit und Erbrechen sowie eine B-Symptomatik. Bei Tumoren im Processus uncinatus ist die Symptomatik insgesamt weiter verzögert, oft tritt hier initial ein Aszites oder eine Peritonitis carcinomatosa auf, die sich dann mit dem Bild Obstipation und Subileus präsentieren kann.

In $\frac{3}{4}$ der Fälle sind psychische Veränderungen mit Depression und Persönlichkeitsveränderung beschrieben, die als Folge von Anorexie und Hormonveränderungen zu betrachten sind; sie erscheinen signifikant häufiger als bei anderen Tumorentitäten. Im fortgeschrittenen Stadium manifestiert sich eine pathologische Glukoseintoleranz als Diabetes mellitus bei 80% der Patienten. Es ist aber unklar, ob Diabetes mellitus eine paraneoplastische Folge oder eine Prädisposition für das Pankreaskarzinom darstellt. Möglicherweise treffen beide Thesen zu ^[44].

Eine Assoziation von thrombembolischen Ereignissen mit malignen Erkrankungen ist schon jahrhundertlang bekannt und wurde 1865 von ARMAND TROUSSEAU beschrieben. Neuerdings sieht man einen Zusammenhang der Gerinnungsaktivierung mit Tumorwachstum und Angiogenese. Pankreaskarzinomzellen aktivieren Thrombozyten und exprimieren die koagulogenen Faktoren Thrombin und Tissue factor^[45]. Bei vielen Patienten kommt es zu tiefer Venenthrombose, Lungenembolie, disseminierter intravasaler Gerinnung, Pfortaderthrombose und auch arteriellen Thrombembolien. Durch eine Überexpression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1 (PAI-1) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2) könnte es über die intensivierete Ausbildung von Fibrinnetzen zu einer erleichterten Tumordisseminierung kommen^[46].

1.2.4 Diagnostik

Mit den heute verfügbaren Diagnosemethoden lassen sich Frühstadien des Pankreaskarzinoms nicht erkennen. Bei Diagnosestellung befinden sich nur 15-20% der Patienten im UICC Stadium I^[47], der Tumor im Pankreaskopfbereich ist meist 2-3 cm, bei Corpus/Cauda-Lokalisation 5 cm groß^[24].

Die Standardmethoden umfassen die Sonographie, Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) inklusive Magnetresonanztomographie-Cholangio-Pankreatikographie (MRCP) sowie die MR-Angiographie. Die letzten drei Methoden werden als neues Verfahren kombiniert in einer Untersuchung als sogenannte „One-stop-shopping“-MRT durchgeführt. Als invasives Verfahren ermöglicht die Endosonographie (EUS) die Option einer Feinnadelbiopsie zur histologischen Sicherung, sie ist jedoch aufgrund der Aussagekraft der neuen CT- und MRT-Verfahren nicht mehr obligat.

Die etablierte endoskopisch-retrograde Cholangio-Pankreatikographie (ERCP) stellt nach wie vor ein hochsensitives Verfahren dar und identifiziert über 90% der duktaalen Karzinome. Die definitive Diagnose wird anhand histozytologischer Untersuchung einer Biopsie gestellt. Die Sensitivität liegt hier zwischen 53% und 92%. Für die Gewebsasservierung ist die Indikation zur radikalen Entfernung einer suspekten Läsion im Pankreas großzügig zu stellen. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) kann zur Differenzierung der chronischen Pankreatitis, sowie zur Suche nach Metastasen bzw. Rezidiven eingesetzt werden.

Laborchemisch fallen gegebenenfalls unspezifisch erhöhte Cholestaseparameter auf: Alkalische Phosphatase, γ -Glutamyltransferase (γ GT) und Bilirubin. Lipase und Amylase sind in bis zu 20% erhöht. Eine Reihe von Tumormarkern sind beschrieben: Karzinoembryonales Antigen (CEA), Humanes Choriongonadotropin (HCG) und das α -Fetoprotein (AFP). Nur das CA 19-9 spielt eine diagnostische Rolle. Die Sensivität ist nur jenseits des Schwellenwertes von 100 U/ml

hinreichend für eine Diagnosestellung. Werte über 500 U/ml sind quasi beweisend für ein Pankreaskarzinom ^[48, 49].

1.2.5 Therapie

Die derzeitigen Therapieresultate sind ernüchternd. Die operative Resektion ist die einzige Therapieoption mit kurativer Intention. Bei Diagnosestellung sind jedoch nur 10-15% der Karzino-me resezierbar, in den anderen Fällen ist Wachstum und Metastasierung bereits zu weit fortgeschritten.

Die Anatomie und die charakteristischen Wachstumseigenschaften des Pankreaskarzinoms mit der typischen perineuralen Invasion erschweren die Operation. Die hohe Morbidität und Mortalität in der Pankreaschirurgie konnte in den letzten 20 Jahren deutlich gesenkt werden; die Mortalität liegt in spezialisierten Zentren unter 5% ^[50]. Standardmäßig wird beim Pankreaskopfkarzinom die klassische Kausch-Whipple-Operation durchgeführt, alternativ kann eine Pylorus-erhaltende Operation (Traverso-Longmire) erfolgen, die bei kürzerer Operationsdauer ein potentiell schonenderes Vorgehen darstellt. Hinsichtlich Morbidität und Mortalität unterscheiden sich beide Verfahren aber nicht ^[9]. Bei Caudalokalisation bietet sich die Pankreaslinksresektion mit Splenektomie an. Die totale Pankrektomie wird bei Tumordissemination bzw. Multilokalität durchgeführt, oder falls keine Pankreasanastomose möglich ist. Adjuvante Chemotherapie verlängert die mittlere Überlebenszeit lediglich von 14 auf 19,7 Monate ^[51]. Neoadjuvant kann mit kombinierter Radio-Chemo-Therapie mit 5-Fluorouracil bei bis zu 19% eine sekundäre Operabilität erreicht werden ^[52].

Bei irresektablen Pankreaskarzinomen ist die palliative systemische Chemotherapie mit dem 1996 eingeführten Gemcitabin (2'-Deoxy-2',2'-Difluorocytidin-Monohydrochlorid) etablierter Standard zur Verbesserung der Lebensqualität ohne Verlängerung der Überlebenszeit ^[13]. Palliativ ist die Gallengangsdrainage von erstrangiger Bedeutung, chirurgisch kann bei entsprechender Stenosesymptomatik eine biliodigestive Anastomose oder eine Gastro-Enterostomie erforderlich werden. Eine Thromboseprophylaxe mit niedermolekularem Heparin erscheint sinnvoll. Die Ansprechrate auf Chemotherapie oder Radiatio ist grundsätzlich schlecht; die hohe Widerstandsfähigkeit gegen konventionelle Therapien wird hauptsächlich durch Apoptose-Resistenz verursacht ^[53].

Ermutigende neue Therapieansätze werden mit der Kombination von Gemcitabin und Antagonisten der in Tabelle 1 (Seite 4) aufgeführten Faktoren unternommen. Geringfügig verlängerte Überlebenszeiten konnten erreicht werden mit Bevacizumab (Anti-VEGF-Rezeptor-A-

Antikörper) und Cetuximab (Antagonist des EGF-Rezeptors) mit einer 1-Jahres-Überlebensrate von 29% resp. 32% ^[54].

1.2.6 Prognose

Das duktales Pankreaskarzinom ist in den allermeisten Fällen eine infauste Diagnose mit einer Prognose von nur wenigen Monaten. Bei operativ behandelten Patienten ist die R₀-Resektion der entscheidende Prognosefaktor, der Chirurg ist ein weiterer. Für die postoperative Mortalität berichten spezialisierte Zentren in Heidelberg und Hamburg Zahlen zwischen 2,8-3,8% ^[9]. Bei über der Hälfte der R₀-resezierten Patienten liegt eine Lymphangiosis carcinomatosa oder eine Nerveninfiltration der extrapancreatischen Plexus vor. Bei Resektion im Gesunden und adjuvanter Therapie kann heute an spezialisierten Zentren eine 5-Jahresüberlebensrate von 30% bis 40% erreicht werden ^[55,16], die mittlere Überlebenszeit liegt bei 9-18 Monaten. Bei palliativer Therapie mit Gemcitabin beträgt die mittlere Überlebenszeit 3-6 Monate vs. 1-2 Monate bei unbehandelten Patienten ^[51].

Weniger als 10% der operierten Patienten leben 5 oder mehr Jahre rezidivfrei ^[50]. Bisher wurde somit eine Verbesserung der kurzfristigen Überlebensrate erreicht, nicht aber der längerfristigen. Die systemische Tumorthherapie ist bedeutend für die Prognose; von potentiell kurativ resezierten Patienten stirbt die überwiegende Mehrheit an den Folgen der Metastasierung, nicht am Lokalrezidiv ^[56].

1.3 Angiogenese

Der Begriff der *Angiogenese* als Aussprossung neuer Gefäße aus bereits bestehenden wird unterschieden von der *Vaskulogenese*, mit der die embryonale Gefäßentwicklung aus mesodermalen Vorläuferzellen gemeint ist^[57]. Die physiologische Bildung neuer Gefäße ist essentiell, um den Versorgungsbedarf des Gewebes zu gewährleisten und wird erstens via Angiogenesefaktoren durch den Sauerstoffpartialdruck der metabolischen Situation entsprechend und zweitens durch hämodynamische Faktoren wie der Wandschubspannung reguliert^[58]. Postnatal kommt es in physiologischen (Wachstum, Wundheilung, Training, hormoneller Zyklus) und pathophysiologischen (Arthritis, Psoriasis, diabetische Retinopathie, Krebs) Situationen zur Angiogenese. Es sind mehr als 20 Aktivatoren und Inhibitoren dieses Prozesses beschrieben; aus der Interaktion ihrer Spleißvarianten mit verschiedenen Rezeptortypen resultiert eine unüberschaubare Komplexität. Als prominente Mediatoren sind hier der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)^[59] und sein angiostatischer Gegenspieler *Thrombospondin* zu nennen.

Unter Hypoxie kommt es initial durch Stickstoffmonoxid (*NO*) zur Vasodilatation. Auch andere Mediatoren werden freigesetzt und initialisieren eine Signalkaskade. Die Schlüsselrolle spielt VEGF, indem er zunächst zur erhöhten Permeabilität der Gefäßwände für proteolytische Enzyme führt. Matrixmetalloproteinasen degradieren die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix; Plasmaproteine bilden nach Extravasation eine provisorische Matrix aus. Endothelzellen, stimuliert durch VEGF, können einwandern und proliferieren. Die Gefäße sprießen aus in Richtung des Stimulus^[60]. VEGF stimuliert die Angiogenese streng dosisabhängig^[61].

1.3.1 Tumorangiogenese

Je größer ein Tumor wird, desto mehr hängt er von einer suffizienten Gefäßneubildung ab. Der Proliferationsindex von Tumorzellen sinkt mit steigender Entfernung von der Kapillare. Der Diffusionskoeffizient von Sauerstoff beträgt im Gewebe bis zu 200 µm, daher ist der Tumordurchmesser ohne Induktion von Angiogenese auf 0,5 mm limitiert^[62, 63, 64, 65]. Nach einer initial etwa linearen Größenprogredienz eines Tumors bis zur kritischen Masse wird ein prävasculärer stationärer Zustand (steady state) mit ausgeglichenen Proliferations- und Apoptoseraten erreicht. Erst durch die spontane Aktivierung der Angiogenese schreitet das Tumorwachstum in einem Stadium exponentiellen Wachstums weiter fort^[66]. Dieser sog. *Angiogenetic Switch* wird durch Onkogene und Tumorsuppressorgene vermittelt. Die Angiogenese ist somit ein springender Punkt der Tumorentwicklung^[67] und darüber hinaus auch für die Metastasierung von Bedeutung^[68].

Die Tumorangio-genese unterscheidet sich von der physiologischen Angio-genese; es kommt nicht nur zur Aussprossung neuer GefäÙe aus präexistierenden, sondern auch zur vollständigen Neubildung von GefäÙen (Vaskulogenese), sowie zu PseudogefäÙen (nicht von Endothel ausgekleidet)^[69]. Die aberierende GefäÙarchitektur mit irregulärer Konfiguration und gestörter Zell-Interaktion führt zu oszillierendem BlutfluÙ, erhöhter Permeabilität und verzögerter GefäÙreifung mit kapillärer Dysfunktion. Resultat ist eine chaotische GefäÙstruktur, beschrieben als „wounds that never heal“^[70]. Ursache dieser Differenzen ist wahrscheinlich die unnatürliche Disproportion der wirkenden Faktoren^[66, 71].

Die angio-genen Faktoren werden vom Tumorgewebe sezerniert, ihre Produktion kann aber auch im umliegenden Gewebe induziert werden. Möglicherweise trifft die Vorstellung zu, daß das physiologische Gleichgewicht aus angio-genen und anti-angio-genen Faktoren vom Tumor lokal zu Gunsten der Angio-genese verschoben wird, während peripher und systemisch die Anti-Angio-genese überwiegt. Durch diese Fokussierung auf das Tumorgebiet verbessert der Tumor seine eigene Perfusion. Diese These wird durch Beobachtungen gestützt, daß nach Entfernung des Primärtumors oft ein sprunghafter Anstieg der Metastasierung gesehen wird, entsprechend der peripher wegfallenden Angio-geneseinhibierung^[72, 73].

1.3.2 Antiangiogenese

Beachtenswert sind die diametralen Seiten der Anti-Angio-genese: Für viele häufige Krankheitsbilder könnte die Induktion der GefäÙneubildung therapeutisch bedeutend sein: nicht nur bei allen Erscheinungsformen der arteriellen VerschluÙkrankheit sondern auch bei Frakturheilung, neurodegenerativen Prozessen oder Haarverlust. Andererseits ist GefäÙneubildung in vielen anderen Fällen Teil des Problems. Retinale GefäÙneubildungen sind die häufigste Ursache der Erblindung in westlichen Ländern, Fettgewebe bei Adipositas ist auf die Proliferation des Kapillarnetzes angewiesen. Auch bei Arteriosklerose oder der Endometriose spielen GefäÙaussprossungen eine Rolle. 1971 schlug J. FOLKMAN die Angio-geneseinhibierung als Therapiestrategie bei Krebs vor^[74]. Durch eine antiangiogene Therapie kann das Tumorstadium experimentell in vielen Fällen erheblich verzögert werden, als supportive Therapie in Kombination mit Cytostatika könnten Tumore zerstört, oder zumindest die Prognose deutlich verbessert werden.

2004 wurde die erste erfolgreiche Phase-III-Studie mit einem antiangiogenen Arzneimittel abgeschlossen: Bevacizumab ist ein monoklonaler anti-VEGF-Antikörper und erreicht in Kombination mit 5-FU eine statistisch signifikante und klinisch bedeutsame Verbesserung der Behandlung des Kolonkarzinoms^[75].

1.3.3 Tumorangiogenese beim Pankreaskarzinom

Auch beim Pankreaskarzinom ist die Angiogenese ein entscheidendes Kriterium für Entwicklung und Wachstum. Pankreaskarzinomzellen exprimieren eine Anzahl von angiogenen Faktoren^[42,36], deren Plasmakonzentrationen zumindest teilweise mit der Prognose korrelieren (vgl. Tab. 1, Seite 4). VEGF und PDGF werden nach IKEDA et al.^[38] in 67% resp. 70% der Tumorzellen exprimiert und korrelieren mit einer hohen Mikrogefäßdichte^[39]. Einige Pankreaskarzinomzellen exprimieren außerdem die ansonsten für Endothelzellen typischen VEGF-Rezeptoren. Dies wird als Hinweis für einen autokrinen Loop gesehen^[76, 77] und macht eine multifaktorielle Funktion des VEGF beim Pankreaskarzinom wahrscheinlich^[69]. KARAYIANNAKIS et al.^[78] beschreiben eine Assoziation zwischen VEGF-Serumkonzentration, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Metastasierungsgrad. Der VEGF-Spiegel korreliert mit der Prognose des Pankreaskarzinoms und sinkt nach radikaler Resektion^[79, 80]. Die Balance zwischen angiogenen und inhibierenden Faktoren ist für die Regulierung des Pankreaskarzinomwachstums bedeutend^[81]. Mit anti-VEGF-Antikörpern und Inhibierung der Metalloproteinasen konnte beim Pankreaskarzinom eine deutliche Reduktion von Tumolvolumen, Metastasierung und Mikrogefäßdichte im Tierversuch erzielt werden^[32, 82].

1.4 Endothelin

1.4.1 Die Entdeckung und Beschreibung von Endothelin

In den 1980er Jahren setzte sich die Erkenntnis durch, daß Endothelzellen nicht nur die Diffusionsbarriere der Gefäße darstellen, sondern eine aktive Rolle bei lebenswichtigen Prozessen wie der Kreislaufregulation, der Immunreaktion und der Hämostase spielen. Die Entdeckung des *Prostazyklins* (MONCADA et al. 1976^[83]) und später dann die Identifikation des von FURCHGOTT et al. 1980^[84] beschriebenen *Endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) als Stickstoffmonoxid 1989 durch PALMER et al. sind bekannte Meilensteine in dieser Entwicklung.

Als Gegenspieler wurde 1985 von HICKEY et al. ^[85] ein *Endothelium-derived constriction factor* postuliert, der für die Kontraktilitätsregulation der Glatten Gefäßmuskulatur bedeutend sein könnte. 1988 isolierten YANAGISAWA et al. ^[86] ein Peptid aus Kulturüberständen von Endothelzellen der Schweineaorta, nachdem sie einen vasokonstriktorisches Effekt aus Extrakten beobachtet hatten. Dieses aus 21 Aminosäuren bestehende Molekül wurde *Endothelin* (ET bzw. ET-1) genannt und gewann das Interesse internationaler Forschung. Innerhalb eines Jahres wurden zwei weitere Isoformen entdeckt und als Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) bezeichnet. Endothelin wird nicht nur von Endothelzellen, sondern in vielen verschiedenen Geweben produziert und ist ein polyfunktionelles Zytokin, das bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen involviert ist. Es ist zehnfach potenter als Angiotensin II^[87] und der zweitstärkste bekannte Vasokonstriktor nach Urotensin-II^[88].

1.4.2 Biochemie der Endotheline

Die Isoformen der Endotheline werden von drei eigenen Genen kodiert^[89] und sind strukturell und pharmakologisch verschiedene Peptide aus einer Sequenz von 21 Aminosäuren mit einem C-terminalem Tryptophanrest (Abbildung 1, Seite 11) und einer charakteristische Haarnadelform, die u.a. durch zwei Disulfidbrücken entsteht. Diese Strukturmerkmale sind bedeutend für die biologische Aktivität^[90, 91].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ET-1	Cys	Ser	Cys	Ser	Ser	Leu	Met	Asp	Lys	Glu	Cys	Val	Tyr	Phe	Cys	His	Leu	Asp	Ile	Ile	Trp
ET-2						Trp	Leu														
ET-3		Thr		Phe	Thr	Tyr	Lys														

Abbildung 1: Aminosäuresequenz der Endotheline. ET-2 unterscheidet sich in nur zwei, und ET-3 in sechs Aminosäuren von der dargestellten ET-1-Sequenz. Die Cystine der Disulfidbrücken sind fett-kursiv dargestellt.

Die Endotheline weisen eine hohe Strukturähnlichkeit zu Neurotoxinen (Bienengift *Apamin*, *a-Skorpionotoxin*) und zu den Sarafotoxinen auf, die als Schlangengifte wegen ihrer letalen Wirkung durch Koronarkonstriktion gefürchtet sind. Die Biosynthese von ET-1 erfolgt aus dem 212 Aminosäuren-langen Vorläufermolekül Präpro-ET-1. Durch proteolytische Spaltung entsteht Big-ET-1 (38 AS), das dann durch Endothelin converting enzyme (ECE), einer membrangebundenen Metalloproteinase, in ET-1 gespalten und damit biologisch aktiviert wird (Abbildung 2, Seite 12). Es sind mehrere Isoformen von ECE beschrieben. ET-2 und ET-3 werden analog synthetisiert. Die ET-Synthese wird maßgeblich auf der Ebene der Genexpression reguliert und wird dabei von vasokonstriktorisches Peptiden, inflammatorischen Cytokinen und physikalischen Faktoren wie Hypoxie und Shearstress beeinflusst.

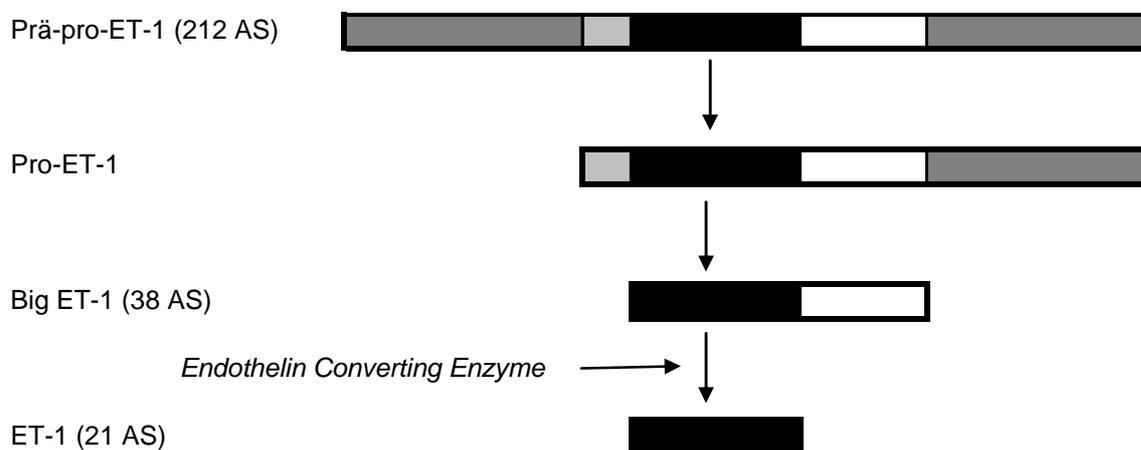


Abbildung 2: Biosynthese des ET-1 beim Menschen. Das Vorläuferpeptid Prä-pro-ET-1 wird von basenspezifischen Endopeptidasen in Pro-ET-1 und dann in Big-ET-1 gespalten. Das Endothelin Converting Enzyme (ECE) spaltet dieses in reifes ET-1^[92].

ET-1 hat eine Molekülmasse von 2.492 Da und wird als einziges Endothelin in Endothelzellen produziert, ferner in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und zahlreichen anderen Geweben, unter anderem in Neuronen und Astrocyten, im Endometrium, in Hepatocysten und im Mesangium der Nieren. Durch Stimuli wie Hypoxämie, Ischämie und Scherstress wird die ET-Transkription, Proteinsynthese und Sekretion innerhalb von Minuten angeregt; an der Gefäßmuskulatur wirkt es vasokonstriktiv. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 4-7 Minuten, die Clearance erfolgt hauptsächlich in der Lunge. Die Plasmakonzentration liegt im Bereich von ca. 1 pmol/l, das sind zwei Zehnerpotenzen unterhalb des pharmakologisch wirksamen Bereichs – Endotheline sind also offenbar keine zirkulierenden Hormone. Man postuliert eher eine para- und autokrine, als eine endokrine Wirkungsweise^[93]. ET-1 wird von Endothelzellen vor allem nach abluminal sezerniert^[94]. Die Plasmakonzentration von ET-1 korreliert allerdings mit der Schwere verschiedener

Erkrankungen, insbesondere bei Herzinsuffizienz und wird daher als ein Prognosefaktor gesehen^[95].

ET-2 wird vornehmlich in Niere und Darm gebildet, in geringerem Maße im Myokard, in Plazenta und Uterus. Der Bildungsort von **ET-3** ist unbekannt, hohe Konzentrationen finden sich u. a. im Gehirn und im Gastrointestinaltrakt. Die Funktionen von ET-2 und ET-3 sind noch unklar und scheinen untergeordnet zu sein.

1.4.3 Rezeptoren

Für die drei beschriebenen Endotheline sind bisher zwei Rezeptorsubtypen bekannt, beide sind G-Protein gekoppelt aus der Familie der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren. Der Endothelin-A-Rezeptor (**ET_A**) zeigt eine erhöhte Affinität für ET-1 und ET-2 und findet sich in Myokard und glatter Gefäßmuskulatur, nicht auf Endothelzellen. Über Aktivierung der Phospholipase C steigt die intrazelluläre Konzentration von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Von IP₃ ist über eine Konzentrationssteigerung intrazellulären Calciums ein Antagonismus zu NO bekannt: es kommt zur Vasokonstriktion. DAG stimuliert zusammen mit Calcium die Proteinkinase C. Die Aktivität der Proteinkinase C sowie der Protein-Tyrosinkinase moduliert über eine Transkriptionsregulation den mitogenen Effekt des ET-1^[95, 96].

Der Endothelin-B-Rezeptor (**ET_B**) mit Affinität für alle drei Isoformen des Endothelin ist zusätzlich zu einer ET_A-analogen Wirkung mit inhibitorischen G-Proteinen gekoppelt und supprimiert die cAMP-Synthese sowie die Aktivierung des Na⁺/H⁺-Antiporters. Für ET-3 wird eine vasodilatierende Wirkung beschrieben. Prinzipiell hat ET_B physiologisch die größere Bedeutung und dominiert bei quasi ubiquitärem Vorkommen. ET_A ist dagegen deutlich häufiger bei malignen Zellen (Primärtumor und Metastasen) exprimiert; hier wird sogar eine Suppression von ET_B beschrieben^[92].

1.4.4 Rezeptorantagonisten

Inzwischen wurde eine ganze Palette von Antagonisten der ET-Rezeptoren entwickelt, sie sind entweder selektiv für den A- oder B-Typ oder gemischt aktiv (Tabelle 2, Seite 14). Aufgrund des komplexen ET-Systems mit teilweise antagonistischen Effekten und der parakrinen Wirkungsweise kann ET zur gleichen Zeit in unterschiedlichen Körperregionen verschiedene Wirkungen hervorrufen. Die Therapie mit einem systemisch wirkenden Antagonisten ist daher potentiell schwierig.

Klinisch werden ET-Antagonisten gegen Hypertension, Herzversagen und Nierenerkrankungen eingesetzt. Der gemischte Antagonist Bosentan ist zugelassen zur Therapie der pulmonalen arte-

riellen Hypertension. Bereits in Phase I und II eingesetzte ET_A-Antagonisten sind p.o. applizierbar und haben eine gute therapeutische Breite.

ET _A -Antagonist	ET _B -Antagonist	ET _{A+B} -Antagonist
ABT-627 (Atrasentan)	BQ-788	TAK-044
BMS-182874	IRL 1038	50-235
BQ-123	RES-701-1	LU302872
BQ-485		PD 142893
EMD-94246		Ro 46-2005
FR139317		Ro 47-0203 (Bosentan)
LU135252		SB 217242
LU302146		
PD156707		
ZD4054		

Tabelle 2: Antagonisten der ET-Rezeptoren in klinischer Forschung und Therapie^[93]. Fettgedruckte Substanzen sind im Gegensatz zu den anderen keine Peptide und daher peroral applizierbar. Bosentan (Tracleer[®]) ist bereits zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie zugelassen; für Atrasentan und ZD4054 laufen Phase II und III-Studien.

1.4.5 Die Endothelin-Achse und ihre Wirkungen

Für den Komplex der Endotheline, der ET-Rezeptoren und der Signalwege wurde der Begriff der Endothelin-Achse geprägt. ET-1 ist ein hochpotenter Vasokonstriktor und gilt als Feinregulator für den Gefäßtonus. Als Wirkungen werden zudem eine Sympathikusaktivierung und eine Myokardhypertrophie angegeben. ET-1 steigert das kardiale Output durch eine positive chronotrope und inotrope Wirkung; die Vasokonstriktion an den Koronargefäßen limitiert diesen Effekt aber in hohen Dosen und es kommt zu Ischämie und Arrhythmien. Die 1-Jahres-Mortalität bei Myokardinfarkt korreliert mit der ET-1-Konzentration im Plasma, gemessen drei Tage nach dem Ereignis^[95]. An der Niere reduziert ET-1 die Salzexkretion, die glomeruläre Filtrationsrate und verengt sowohl das Vas afferens als auch das Vas efferens. Durch die Salz- und Wasserretention und eine Interaktion mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (Anstieg von Aldosteron, ADH, ACTH, Cortisol, Renin, Catecholamine) kommt es durch ET-1 zu einer Zunahme des intravasalen Volumens.

In knock-out Tierstudien wurde erkannt, daß die Endotheline für die normale embryonale Entwicklung essentiell sind. Ein Defekt der ET-1–ET_A-Achse führt zu craniofacialen Malformationen, die ET-3–ET_B-Achse ist relevant für die physiologische Bildung des enterischen Nervensy-

stems. Bei transgenen Tieren wurden Fehlbildungen beobachtet, die dem velocardiofacialen Syndrom (CATCH22) bzw. dem M. Hirschsprung gleichen^[97].

Neben zahlreichen physiologischen Funktionen wurden außerdem Wirkungen von Endothelin auf die Gewebsdifferenzierung und Proliferation beobachtet. Desweiteren konnte für das Endothelinsystem eine angiogene Wirkung nachgewiesen werden. Ähnlich wie VEGF – und mit diesem Faktor additiv – stimuliert ET-1 die Gefäßneubildung. Für mehrere Neoplasien wurde eine Steigerung der Tumorangiogenese beschrieben. Die ET-Achse ist offenbar durch verschiedene Mechanismen an der Tumorprogression beteiligt. Eine Aktivierung des ET_A durch ET-1 führt zu gesteigertem Tumorwachstum und beschleunigter Progression. Eine Inhibierung des ET_A könnte daher bei der Krebstherapie Erfolg haben. Dies wird bisher in der Literatur für das Ovarialkarzinom^[98, 99, 100], das Prostatakarzinom^[2, 101, 102] und das Kaposi-Sarkom^[103] sowie für Knochenmetastasen belegt^[104].

1994 beschrieben OIKAWA et al.^[41] die Produktion von ET-1 durch humane Pankreaskarzinomzellen. Die Rolle des ET-1 bei der Tumorprogression sowie der Tumorangiogenese ist für das Pankreaskarzinom bisher noch nicht untersucht worden.

2 Fragestellung

Das polyfunktionelle Zytokin Endothelin-1 (*ET-1*) beeinflusst die Tumorgenese und Tumorprogression durch verschiedene Mechanismen einschließlich der Tumorangio-genese. Eine Rolle der sog. ET-Achse wird in der Literatur für mehrere solide Tumore, teilweise als dosis- und zeitabhängig beschrieben. Hieraus wird eine potentiell neue Therapiestrategie abgeleitet.

OIKAWA et al.^[41] haben 1994 die Produktion von ET-1 in 11 von 12 untersuchten Zelllinien humaner Pankreaskarzinome beschrieben. Welche Rolle ET-1 beim Pankreaskarzinom spielt und auf welchen Mechanismen die Modulation dabei beruht, wurde bisher noch nicht untersucht.

Das Ziel dieses Projektes ist es, die Bedeutung von ET-1 und seinem Rezeptor-Mechanismus beim humanen Pankreaskarzinom zu evaluieren. Dazu wird der Effekt von ET-1 einerseits auf die Tumorzellproliferation und andererseits auf die Tumorangio-genese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* qualitativ und quantitativ untersucht. Konkret stellen sich dabei folgende Fragen:

1. Welcher Rezeptormechanismus ist für die Wirkung von ET-1 beim humanen Pankreaskarzinom entscheidend?
2. Hat das Endothelin-System beim Pankreaskarzinom eine relevante Bedeutung? Durch eine selektive Blockade der Endothelin-Achse soll *in vitro* und *in vivo* untersucht werden, ob eine Hemmung der Tumorproliferation sowie der Angiogenese erreicht werden kann und so die Aussicht einer neuen Therapiestrategie getestet werden.
3. Kann die hypothetische Rolle von ET-1 beim Pankreaskarzinom durch eine zusätzliche Stimulierung mittels exogener Applikation untermauert werden? Für die Analyse der ET-Achse beim Pankreaskarzinom soll die Wirkung von exogen appliziertem ET-1 auf die Proliferation sowie auf die VEGF-Sekretion als Parameter der Tumorangio-genese zeit- und dosisabhängig untersucht werden.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Sigma (München) und Merck (Darmstadt) in analytischer Qualität bezogen.

3.1.1 Endothelinrezeptorantagonisten

Zur Inhibierung der Endothelin-Achse wurden zwei verschiedene Endothelinrezeptorantagonisten verwendet, beide mit einer Selektivität für den A-Typ:

BQ485 (Hexahydro-1H-azepinylcarbonyl-Leu-D-Trp-D-Trp-OH, Na) von Calbiochem (Merck KGaA, Darmstadt) mit einer IC_{50} von 3,4 nM. BQ485 inhibiert die Endothelin-1-induzierte Produktion von cAMP und IP_3 [105, 106].

LU302146 (3,3-Diaryl-Propionsäure) von Knoll AG (ehemals BASF Gruppe, Ludwigshafen) ist ebenfalls ein selektiver Antagonist des Endothelin-A-Rezeptors mit 78-facher Selektivität.

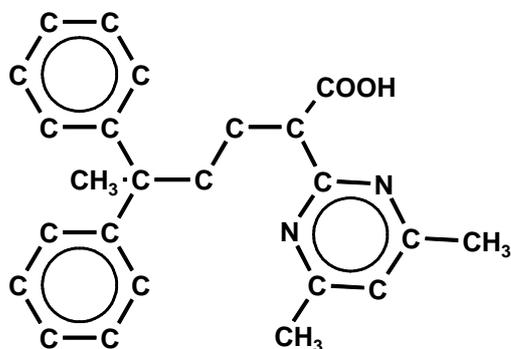


Abbildung 3: Molekularstruktur von LU302146^[188].

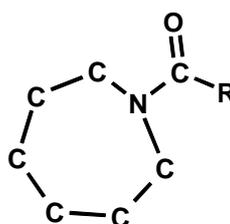


Abbildung 4: Molekularstruktur von BQ485.
R = L-Leu-D-Trp-D-Trp-ONa.

Beide Rezeptorantagonisten wurden in 0,9% NaCl (pH 7,5) gelöst und auf Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} mol/l verdünnt.

3.1.2 Endothelin-1

Endothelin-1 wurde von BioTrend (Köln) bezogen und mit PBS (pH 7,5) auf Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} mol/l verdünnt.

3.2 Geräte

Brutschrank: Funktion Line; Heraeus Instruments, Hanau

Zentrifuge: Megafuge 1.0; Heraeus Sepatech, Hanau

Lamina-Air flow-Bench: Hera Safe; Heraeus, Hanau

Wasserbad: JB5; Grant Instruments (Cambridge) Ltd., Shepreth, Cambridgeshire, UK

Vortexer: Vortexgenie 2; Scientific Industries Inc, Bohemia NY, USA

Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 D, Eppendorf AG, Hamburg

Kühlzentrifuge: Biofuge primo R; Heraeus, Hanau

Heizblöcke: Thermomixer 5436 und ThermoStat Plus; beide Eppendorf, Hamburg

Photometer: BioPhotometer; Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfen: 1,5; 10; 100; 1000 µl; Eppendorf, Hamburg

Waage: BP 310S; Sartorius, Göttingen

ELISA-Reader: EL808; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA

Neubauer Zählkammer N-Improved, Fein-Optik, Bad Blankenburg, Deutschland

pH-Meter: CG840; Schott, Mainz

Magnetrührer: MR 3001; Heidolph, Kelheim

96-Well Mikrotest Zellkultur-Platten Falcon; Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Pipettenspitzen; Eppendorf, Hamburg

Sterican Kanülen 20 G Luer Lock Gr. 1, B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland

Zellkulturflasche 250 ml Primaria Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

3.3 Zelllinien und Zellkulturbedingungen

Die Laborarbeiten an Zellkulturen erfolgten in einer Reinraumwerkbank unter sterilen Bedingungen. Alle Zellen wurden im Begasungsbrutschrank Funktion Line (Heraeus Instruments, Hanau) bei 37°C und angefeuchteter Luft mit 5% CO₂ inkubiert.

Allen Medien wurde 10% hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS, Grand Island, New York, USA) zugegeben, außerdem Penicillin G (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und 0,1% Amphotericin B (Fungizone, Gibco). Der Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche. Die Zellpassage erfolgte seriell nach Lösung mit 0,1% Trypsin.

Alle Zelllinien wurden von American Type Culture Collection (Rockville, USA) bezogen.

MiaPaCa-2 sind ET_A-positive undifferenzierte humane Pankreaskarzinomzellen.

Die Zelllinie MiaPaCa-2 wurde 1975 von A. YUNIS et. al.^[107] aus Tumorgewebe eines 65-jährigen Mannes etabliert. Sie hat eine Verdopplungszeit von 40 Stunden und eine colony-forming-efficiency von ca. 19% in weichem Agar.^[108]

Anzucht: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEN; Gibco, Grand Island, New York, USA) mit 4 mM L-Glutamin mit 1,5 g/l NaBicarbonat und 4,5 g/l 87,5% Glucose. Fetales Rinderserum 10%, Pferdeserum 2,5%.

HPAF-2 ist eine ebenfalls ET_A-positive humane Pankreaskarzinomzelllinie vom duktaalen Typ und mittelgradig differenziert.

Sie wurde aus Aszites eines 44 Jahre alten männlichen Patienten gewonnen, bei dem das primäre Karzinom in Leber und Zwerchfell metastasiert hatte und Lymphknoten befallen waren.

HPAF-2 ist eine Spontanvariante einer statischen HPAF-1-Zellkultur mit unlimitierter Replikationsfähigkeit. Die Zellen exprimieren Muc 1 und Muc 4 – Muzingene und sezernieren hohe Raten an Muc 1 Muzin. Sie sind pleomorph und unterliegen möglicherweise spontanen Differenzierungen in der Zellkultur. Die Zellen bilden in athymischen Mäusen mittelgradig differenzierte Adenokarzinome.^[109]

Anzucht: Minimal essential Medium (Eagle) mit 2 mM L-Glutamin und Earle's BSS mit NaBicarbonat 1,5 g/l. 0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren, 1,0 mM NaPyruvat 90%, fetales Rinderserum 10%.

AsPC-1 sind schlecht differenziert und positiv für den ET_A.

Die Zelllinie stammt von Xenografts in Nacktmäusen, die durch Zellen aus Aszitespunktat von Patienten mit Pankreaskarzinom induziert wurden.^[110, 111]

Kultiviert in RPMI-1640 Medium (Gibco, Grand Island, New York, USA).

PANC-1 sind schlecht differenzierte Karzinomzellen, die ET_A-negativ sind.

Sie weisen eine Verdopplungszeit von 52 Stunden auf.^[112]

Anzucht: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEN; Gibco, Grand Island, New York, USA).

3.4 Software

Microsoft Office Word 2003, Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Corp. (USA),

Adobe Photoshop CS, Adobe Systems Inc. (USA),

WebLab ViewerPro 3.12, Molecular Simulations Inc. (USA),

LightCycler Data Analysis Vers. 3.5.28, Roche Diagnostics (Mannheim),

RelQuant Vers. 1.01, Roche Diagnostics (Mannheim).

4 Methoden

4.1 Zellzählung

Zur orientierenden Untersuchung über die Wirkung von Endothelin-1 bzw. der Endothelin-Achse und einer eventuellen Dosisabhängigkeit auf das Proliferationsverhalten von Pankreaskarzinomzellen wurde die Zellzählung durchgeführt.

Zellen der in 3.3 genannten Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, AsPC-1 und Panc-1 wurden kultiviert. In 6er-Makrotiterplatten wurden dann 100.000 Zellen pro Kammer pipettiert und diese in einem ersten Versuchsansatz mit dem selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten LU302146 in den Konzentrationen 1; 10; 100; 1000 nmol/l sowie in einem weiteren Experiment mit Endothelin-1 in den Konzentrationen 1; 10 und 100 µmol/l inkubiert.

Die Inkubation erfolgte jeweils über ein Zeitintervall von 72 h; als Referenz diente eine unbehandelte Zellkultur, die in beiden Versuchen bei gleichen Bedingungen inkubiert wurde. Der Antagonismus mit LU302146 wurde zunächst unter normoxischen Bedingungen (angefeuchtete Luft bei 37°C mit 5% CO₂) durchgeführt, anschließend unter Hypoxie (0% O₂, 95% N₂, 5% CO₂) wiederholt.

Nach der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche gelöst und in äquivalenten Volumina PBS suspendiert. Nach Homogenisierung des Zellsuspensates wurde die Zellanzahl unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors mit der Neubauer Zählkammer bestimmt.

4.2 MTT-Assay

Der nicht-radioaktive, kolorimetrische MTT-Assay ist ein gut anwendbares Verfahren zur Überprüfung der Viabilität, Proliferation und Aktivität von Zellen in Zellkulturen und wurde 1983 von MOSMANN^[113] beschrieben. Die Methode beruht auf der Fähigkeit mitochondrialer Dehydrogenasen die Tetrazoliumringe des hellgelben MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid, C₁₈H₁₆N₅SBr) zu spalten. Dabei werden violette wasserunlösliche Formazankristalle gebildet, die nicht durch die Zellmembran permeieren können und intrazellulär akkumulieren. Erst durch ein Detergens werden die Zellen lysiert und das solubilisierte Formazan kann photometrisch quantifiziert werden. Da die enzymatische Reduktion des MTT nur in metabolisch aktiven Zellen stattfinden kann, ist die Menge der gebildeten Kristalle direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Untersucht wurden die in 3.3 genannten Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, HPAF-2 und AsPC-1. Sie wurden mit und ohne Endothelin-1 sowie mit den Endothelinrezeptor-A-Antagonisten (ET_A) LU-302146 und BQ485 (je 1 µM) für 1; 3; 6; 12; 24; 48 und 72 Stunden inkubiert.

Es wurde der Cell Proliferation Kit I (MTT) von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Für die Zellkulturen wurden 96er Mikrotiterplatten benutzt, deren Kammern mit 100 µl Medium gefüllt waren. Pro Kammer wurden 10 µl der auf 37°C aufgewärmten MTT-Lösung gegeben. Anschließend wurde für vier Stunden bei 37°C und 5,0% CO₂ inkubiert, wobei sich in den Zellen die Formazankristalle bilden.

Zur Lyse der Zellen und Solubilisierung der Kristalle wurden 100 µl SDS-Lösung dazugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 5,0% CO₂ wurde dann die Absorption mit dem Spektrophotometer EL808 von Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA) bei 550 nm gemessen.

MTT-Reagenz 1x MTT 5 g/l in 5 ml PBS Sterilfiltriert bei 4°C im Dunkeln bis zu 4 Wochen haltbar.

SDS-Lösung 100 g/l SDS in 0,01 M HCl Aufbewahrung bei Raumtemperatur

4.3 BrdU-Assay

Mit BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin) gelingt die Quantifizierung der Zellproliferationsrate über die Bestimmung der DNA-Replikation indem ein markiertes Nukleotid in die Nukleinsäuresequenz eingebaut wird. Der Assay ist eine nicht-radioaktive Alternative des [³H]-Thymidin-Assays und verwendet BrdU als Analogon zu Thymin^[14]. Bei der DNA-Synthese wird zu Beginn der S-Phase BrdU anstatt Thymin in die Sequenz eingebaut und kann dann immunochemisch dargestellt werden. Dafür müssen die Zellen fixiert, die Zellmembran aufgelöst und die DNA denaturiert werden. Zur Detektion wird ein hochspezifischer anti-BrdU-Antikörper eingesetzt, der mit einem Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Die Quantifizierung der Zellproliferationsrate erfolgt durch photometrische Extinktionsmessung.

Verwendet wurde der BrdU Cell Proliferation Assay X1327 von Exalpa Biological, Inc. (Wartertown, MA, USA), dessen Anleitung als Vorlage für die Durchführung diente:

Es wurden die in 3.3 beschriebenen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, HPAF-2 und AsPC-1 24 Stunden mit und ohne Endothelin-1 sowie den ET_A-Rezeptorantagonisten LU-302146 und BQ485 (je 1µM) auf einer 96er-Mikrotiterplatte inkubiert. Pro Kammer wurden dabei 6000 Zel-

len eingesetzt. 4 Stunden nach Inkubationsstart wurde 8 µl BrdU pro 4 ml Kulturmedium hinzugegeben und somit 20 Stunden inkubiert, in denen BrdU anstelle von Thymidin bei der Replikation in die DNA eingebaut wurde. Zur Fixierung der Zellen und DNA-Denaturierung wurden 200 µl Fixans appliziert und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Platte getrocknet. Vor und nach Zugabe des monoklonalen anti-BrdU-Detektions-Antikörpers wurde dreimal mit Waschlösung gespült. Mit dem Primärantikörper wurde 1 Stunde, mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase anti-Maus-IgG 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschvorgang wurde pro Well 100 µl Peroxidase hinzugegeben und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde die mitgelieferte Stop-Lösung hinzugegeben. Sofort anschließend erfolgte die photometrische Extinktionsmessung im Spektrophotometer EL808 von Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA) bei 450 nm.

4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein wesentliches Verfahren sowohl in der medizinischen Grundlagenforschung als auch in der klinischen Diagnostik, da mit dieser Methode kleinste Mengen an DNA *in vitro* innerhalb kürzester Zeit millionenfach kopiert werden können. Nachdem zunächst nur die Klonierung von Genen in lebenden Organismen möglich war, revolutionierte die von Kary B. MULLIS^[115] 1984 entwickelte PCR die molekularbiologischen Laborverfahren.

Das Prinzip der PCR beruht auf der Temperaturstabilität bestimmter DNA-kopierender Enzyme: die Taq-DNA-Polymerase wurde aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und hat sein Aktivitätsmaximum bei 74°C. Nach Adhäsion einer spezifischen Oligonukleotidsequenz (*Primer*) an einen DNA-Einzelstrang synthetisiert die DNA-Polymerase den Komplementärstrang mit Desoxyribonukleinosid-5'-triphosphaten (*dNTPs*).

Bei der PCR werden drei Phasen periodisch wiederholt: (1 – *Denaturierung*) Im ersten Schritt wird die DNA-Probe (*Template*) zur linearen Auftrennung der Doppelstränge auf 94°C erhitzt; (2 – *Annealing*) nach Abkühlung auf 55°C lagern sich die Primer an die komplementäre DNA an. (3 – *Elongation*) Bei 72°C verlängert die DNA-Polymerase durch Einbau der dNTPs die Primer bis zum 5'OH-Ende des DNA-Strangs, so daß schließlich eine exakte Kopie des Originalstranges existiert.

Mit jedem weiteren Zyklus wird die DNA-Menge verdoppelt, so daß nach n Zyklen theoretisch 2^{n-1} Kopien vorhanden sind. In praxi liegt der durchschnittliche Kopierfaktor bei ca. 1,6 pro Zyklus, ist auf Grund multipler Faktoren aber sehr variabel.

Das Verfahren der PCR, ursprünglich zur Vervielfältigung von Sequenzabschnitten benutzt, kann durch Anwendung spezieller Fluoreszenstechnik bei Echtzeitmessung (*real time*) auch zur Quantifizierung der initial eingesetzten Probenmenge eingesetzt, und damit für Expressionsanalysen verwendet werden.

In dieser Arbeit sollte das Expressionsverhalten des VEGF-Gens auf der Basis der Boten-RNA (mRNA) in humanen Pankreaskarzinomzellen quantifiziert werden. Nach Transkribierung der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) kann erstere mit der PCR zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung indirekt ermittelt werden. Zu untersuchen waren die in 3.3 beschriebenen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, HPAF-2 und AsPC-1, die über 24 Stunden mit entweder Endothelin-1 (ET-1), LU-302146 oder BQ485 inkubiert wurden (je 1 $\mu\text{mol/l}$). Zusätzlich wurde bei jeder Zelllinie eine Kontrolle untersucht, der unter gleichen Bedingungen keine Substanzen appliziert wurden.

4.4.1 Isolierung der Ribonukleinsäuren (RNA)

Zur Isolierung der gesamten RNA aus den Zellen wurde TRIzol (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) verwendet, das eine Modifizierung der Methode von CHOMCZYNSKI und SACCHI^[116] mit einer monophasischen Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat darstellt.

Die Zellen wurden in den Zellkulturflaschen für ein bis fünf Minuten mit Trypsin (1 ml / Flasche) bei 37°C inkubiert. Nach Waschen mit kaltem PBS konnten die Zellen dann abgeschabt und in ein 10 ml-Falcon-Röhrchen transferiert werden. Durch Zentrifugation bei 1.000 RPM über fünf Minuten konnte das so gewonnene Zellpellet dann in ein neues Eppendorf-Röhrchen mit 1 ml PBS und 1 ml TRIzol gegeben und homogenisiert werden. Zur vollständigen Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe wurde fünf Minuten inkubiert und dann mit 0,2 ml Chloroform geschüttelt und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min bei 12.000 RPM und 4°C) lassen sich drei Phasen abgrenzen, deren oberste wässrig-farblos ist und die RNA enthält; in der mittleren ist die DNA, in der untersten die Proteinfraction enthalten.

Zur Fällung der RNA wurde die RNA-Fraktion in einem neuen Eppendorf-Röhrchen mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert, geschüttelt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation von 10 Minuten bei 12.000 RPM und 4°C war ein weißes RNA-Pellet erkennbar, das in 75% Ethanol gewaschen und dann 10 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet wurde. Anschließend wurde 1 μl RNasin (Promega GmbH, Mannheim) und 1 μl RNase-freie DNase I (Sigma, München) zugegeben, um einerseits die Destruktion der isolierten RNA durch Ribonukleasen zu verhindern und zweitens unerwünschte DNA zu entfernen. Schließlich wurde die

RNA dann je nach Pelletgröße in 30-50 μl DMPC-Wasser resuspendiert und für 5 min auf 70°C erhitzt. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Zum Schutz vor RNAsen wurden stets unbenutzte Einmalinstrumente oder autoklaviertes Material verwendet. Die Präparation erfolgte mit Handschuhen unter sterilen Bedingungen, die Arbeitsflächen wurden zuvor mit RNase AWAY (Molecular BioProducts, Inc., San Diego, CA, USA) gereinigt.

4.4.2 Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäuren (RNA)

Für die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA wurde 1 μl Probe in 99 μl DMPC-Wasser suspendiert und die Extinktion bei 260 nm gemessen (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg). Nur Werte zwischen 0,1 und 1 wurden zur Berechnung der Konzentration herangezogen.

4.4.3 Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA wurde ein denaturierendes 1,4%iges Formamidgel angefertigt. Es wurden 5 μg RNA eingesetzt und mit DMPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt, dann 6 μl Sample-Buffer zugefügt und 5min bei 65°C inkubiert. Danach wurden in jede Probe 4 μl Loading-Buffer und 0,4 μl Etidiumbromid gegeben.

Es wurde eine Spannung von 80 V über 60 min angelegt, anschließend wurde die RNA mit UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

Formamidgel	
für 50 ml	
Agarose	0,7 g
DMPC-H ₂ O	41 ml
10x MOPS	5,2 ml
Formaldehyd	8,2 ml

10x Loading Buffer	
für 20 ml; 50% Glycerol (v/v), 0,4% Bromophenol Blue (w/v)	
Glycerol 87%	14,5 g
1,6% Bromophenol Blau	5,0 ml
DEPC- H ₂ O	ad 20ml
Lagerung bei 4°C	

Sample Buffer	
für 15 ml; 1,3x MOPS, 7,4% Formaldehyd, 67% Formamid	
10x MOPS	2,0 ml
37% Formaldehyd	3,0 ml
Formamid	10,0 ml

4.4.4 Prinzip und Durchführung der *Reversen Transkription*

Bei der PCR wird als Ausgangsmaterial DNA und nicht RNA verwendet. Daher muß die isolierte RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus RT) in cDNA umgeschrieben werden. Alle Zusätze wurden von der Firma Promega (Madison, WI, USA) bezogen, soweit nicht anders angegeben.

Es wurden jeweils 2 µg der isolierten RNA eingesetzt und nach Zugabe von 1 µl oligo-dT-Primer und Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (1 µl 10nM dNTPs; Sigma, München) mit DMPC-Wasser auf 18 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Inkubation über 5 min bei 65°C wurden die Ansätze auf Eis gestellt und je 5 µl 5x ReactionBuffer und 1 µl RNAsin zugefügt, dann für 2 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde die Reverse Transkriptase bei 70°C über 15 min inaktiviert. Die cDNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

4.4.5 *Reverse-Transkriptase-PCR* zur Evaluierung des Expressionsverhaltens von ET-1 und seinen Rezeptoren

Zum qualitativen Nachweise von ET-1 sowie ET_A und ET_B in den zu untersuchenden humanen Pankreaskarzinomzellen wurde initial eine RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) durchgeführt.

Die gesamte zelluläre RNA wurde aus den in 3.3 beschriebenen Zelllinien MiaPaCa-2, AsPC-1 und Panc-1 isoliert. Die Isolierung der zellulären RNA nach der TRIzol-Methode und die Generierung der komplementären DNA (cDNA) erfolgte nach dem oben ausführlich dargestellten Prozedere. Tabelle 3 (Seite 26) zeigt die Sequenzen der verwendeten Primer; sie wurden von TIB MOLBIOL Syntheselabor (Berlin) bezogen. β-Aktin diente als Positivkontrolle.

Die PCR-Produkte sowie ein Marker (1 kb DNA) wurden dann in einem 1% Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt (80V über 60 min). Mittels UV-Licht wurde die cDNA dargestellt und photographiert.

Primer	Sequenz (5' → 3')
ET-1 Sense	TGC TCC TGC TCG TCC CTG ATG GAT AAA GAG
ET-1 Antisense	GGT CAC ATA ACG CTC TCT GGA GGG CTT
ET _A Sense	CAC TGG TTG GAT GTG TAA TC
ET _A Antisense	GGA GAT CAA TGA CCA CAT AG
ET _B Sense	TGA ACA CGG TTG TGT CCT GC
ET _B Antisense	ACT GAA TAG CCA CCA ATC TT

Tabelle 3: Sequenzen der Primer für ET-1, ET_A und ET_B, die in der RT-PCR verwendet wurden.

4.4.6 Das Prinzip der *Real-time* PCR

Bei der Amplifikation der Nukleinsäuren handelt es sich prinzipiell um eine exponentielle Funktion und daher kann die initial eingesetzte Templatemenge mathematisch berechnet werden. Allerdings folgt die DNA-Vermehrung sowohl in der Start- als auch in der Endphase nicht einer exponentiellen, sondern einer linearen Funktion. Folglich muß die exponentielle Phase der Amplifikation ausgemacht werden. Dies gelingt durch eine Registrierung der Produktakkumulation in Echtzeit, *real time*: Der exponentielle Graph der Produktakkumulation stellt sich bei logarithmischer Skalierung linear dar.

Bei dieser Messung der Produktzunahme stellt sich wiederum das Problem der spezifischen Detektion. Dieses wird durch das als FRET abgekürzte Prinzip gelöst: *fluorescence resonance energy transfer* (vgl. Abbildung 5, Seite 27). Es handelt sich um ein SONDENSYSTEM, bei dem zwei Hybridisierungs sonden mit einem Fluorochrom markiert sind und deren Bindungsorte auf der Ziel-DNA nur wenige Nukleotide voneinander entfernt sind. Die Fluorochrome der Sonden haben charakteristische, jeweils verschiedene Anregungs- und Emissionsspektren, allerdings entspricht das Emissionsspektrum des ersten Fluorochroms (*Donator*) dem des Anregungsspektrums vom zweiten Fluorochrom (*Akzeptor*). Sind beide Fluorochrome in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert – wie das in hybridisierter Form der Fall ist – regt das vom Donator emittierte Licht den Akzeptor zur Emission seines spezifischen Spektrums an, ohne daß dieser primär angeregt wurde.

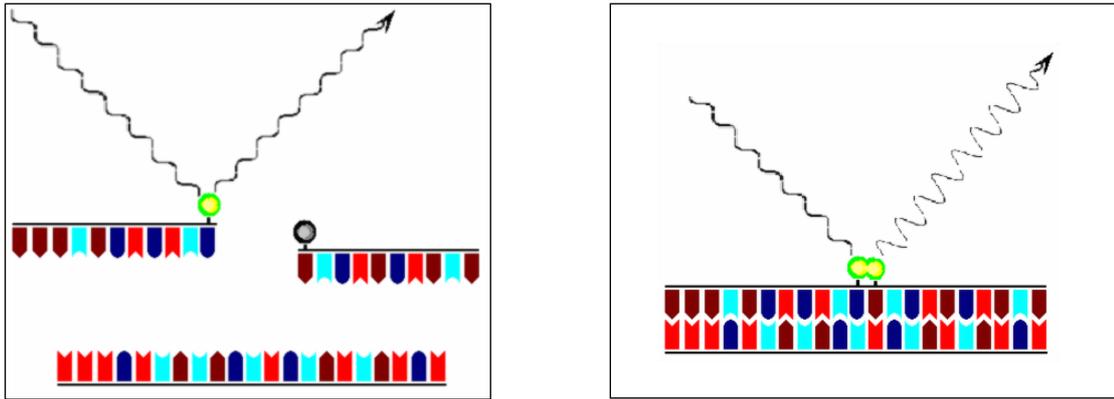


Abbildung 5: Anlagerung der Sonden an die Ziel-DNA. Nur in hybridisierter Form sind beide Fluorochrome nah genug lokalisiert, so daß der Akzeptor vom Donator angeregt wird.

Die Signalintensität in toto korreliert dann mit der Quantität an Ziel-DNA und wird beim Annealing einmal pro Zyklus gemessen.

4.4.7 Das LightCycler-System

Die Real-time-PCR wurde mit dem LightCycler von Roche Diagnostics, Mannheim, durchgeführt. Das Gerät besteht aus einer oberen Einheit mit Heizspirale und einer unteren, welche die thermostatisierbare Reaktionskammer, das Fluorimeter und das Probenkarussell enthält. Die Konstruktion (Widerstandsheizung und Ventilator) und das Material mit geringer Wärmekapazität ermöglichen relativ schnelle Aufheiz- und Abkühlungsraten, so daß die PCR in kurzer Zeit durchgeführt werden kann.

Beim Meßvorgang werden die Fluorochrome durch eine Leuchtdiode angeregt und die optische Emission via Filter-Spiegel-Kombination von drei Photohybriden mit Detektionskanälen von 530 nm, 640 nm und 710 nm in ein elektrisches Signal umgewandelt, das dann gleich zum angeschlossenen PC übermittelt wird. Der Ablauf der PCR kann als Fluoreszenzkurvenschar online am PC beobachtet werden.

In einem Lauf können maximal 32 Proben á 20 µl Volumen untersucht werden.

4.4.8 Durchführung der Real-time PCR

Bei der reversen Transkription wurde cDNA aus den RNA-Proben von insgesamt vier Zelllinien gewonnen, die mit einer von drei Substanzen inkubiert oder nativ waren. Daraus ergaben sich 16 zu untersuchende cDNA-Proben, die jeweils in Doppelbestimmungen untersucht wurden.

Da insbesondere wegen der ungewissen Ausbeute der Reversen Transkription die quantitative Korrelation zwischen RNA und cDNA völlig unklar ist und somit die Ermittlung der cDNA-Konzentration keinen Rückschluß auf die ursprüngliche RNA-Konzentration und damit auf die

Expression von VEGF-mRNA zuliebe, wurde als Abgleich das *housekeeping gene* β_2 -Mikroglobulin (B2M) benutzt. β_2 -Mikroglobulin ist ein ubiquitäres Molekül, das als Teil des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (MHC-I) in der Membran aller menschlichen Zellen vorkommt. Für alle untersuchten Proben erfolgte parallel eine Real-time-PCR für VEGF und für β_2 -Mikroglobulin, jeweils in Doppelbestimmung. Die sich daraus ergebenden 64 Messungen wurden auf vier Läufe aufgeteilt, die jeweils unter gleichen Bedingungen stattfanden:

Es wurden von jeder Probe 2 μ l cDNA eingesetzt. Als Referenzwert diente in allen Meßreihen native cDNA aus HPAF-2-Zellen, zusätzlich wurde Aq. dest. als Negativkontrolle eingesetzt.

Zur Minimierung von Pipettierfehlern wurde ein Mastermix wie in Tabelle 4 (Seite 28) aufgeführt angesetzt, von dem 18 μ l für jede Probe eingesetzt wurden. Als DNA-Polymerase wurde HotStar Taq (Qiagen, Hilden) benutzt. Der LightCycler wurde für 45 Zyklen mit den in Tabelle 5 (Seite 29) gezeigten Parametern programmiert. Sowohl die Primer für VEGF und β_2 -Mikroglobulin als auch die Sonden wurden von TIB MOLBIOL Syntheselabor (Berlin) gefertigt; ihre Sequenzen sind in den Tabellen 6 und 7 (Seite 29) aufgeschlüsselt.

Komponente	Volumen* [μ l]
10x Hot Star Taq Puffer	2
MgCl ₂	2
dNTP's 10mM	0,4
Primer Sense	1
Primer Antisense	1
Sonde FL	1
Sonde LC	1
Hot Star Taq Polymerase	0,5
DMPC-H ₂ O	9,1

Tabelle 4: Pipettierschema für den Mastermix (18 μ l). Nach Zugabe von 2 μ l cDNA beträgt das Gesamtvolumen je Probe 20 μ l. * Die Volumenangaben beziehen sich auf eine Probe.

Programm	Phase	Zieltemp [°C]	Dauer [s]	TempDiff [°C/s]
Aktivierung	1	95	900	20
Amplifikation	2	94	15	20
	3	58	30	20
	4	72	30	20
Kühlung	5	40	30	20

Tabelle 5: PCR-Programm. Die Phasen 2 bis 4 wurden in 45 Zyklen wiederholt.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Position	Annealing- Temp. [°C]
VEGF Sense	TTG CCT TGC TGC TCT ACC T	1073-1091	55,9
VEGF Antisense	CTG CAT GGT GTAT GTT GGA CT	1353-1334	55,6
B2M Sense	CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC	113-132	53,4
B2M Antisense	GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG	331-362	52,7

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer für VEGF und β_2 -Mikroglobulin (B2M).

Sonde	Sequenz (5' → 3')	Position	Annealing- Temp. [°C]
VEGF FL	GCA GTA GCT GCG CTG ATA GAC ATC C - FL	1194-1170	63,2
VEGF LC	640 - GAA CTT CAC CAC TTC GTG ATG ATT CTG C p	1167-1140	65,1
B2M 3FL	TTC TTC AGT AAG TCA ACT TCA ATG TCG GA X	198-170	61,0
B2M 5LC	ATG AAA CCC AGA CAC ATA GCA ATT CAG p	166-140	60,3

Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Sonden für VEGF und β_2 -Mikroglobulin (B2M).

4.4.9 Verfahren zur Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Der LightCycler übermittelt während der Real-time PCR die Meßwerte online an einen eigenen PC. Dort werden sie von spezieller Software (*LightCycler Data Analysis* Version 3.5.28 und *RelQuant* Version 1.01) interpretiert:

Für die Analyse der Daten können nur Meßwerte aus der log-linear-Phase verwendet werden; bei logarithmischer Skalierung stellt sich die Fluoreszenzkurve hier linear dar, die Amplifikation ist in der exponentiellen Phase. Nur dann finden die PC-Reaktionen der verschiedenen Proben unter vergleichbaren Bedingungen statt.

Diejenigen Zyklusnummern, bei der die Fluoreszenzwerte aller Proben gleich sind, sind als sogenannte Crossing points (Cp) definiert. Um diese Cp quantitativ auszuwerten, muß zuvor eine Real-time PCR mit Standardkonzentrationen durchgeführt werden. Die Cps dieser Standardreihe werden im Diagramm gegen den Logarithmus ihrer (bekannten) Konzentration aufgetragen. Die VEGF-Quantifizierung mit dem LightCycler war im Labor bereits etabliert, so daß der Computer schon entsprechend programmiert war. RelQuant errechnet schließlich aus den Cp der Proben unter Zuhilfenahme der gespeicherten Standardkurve das Verhältnis der cDNA gegenüber der Referenz, nativer HPAF-2-cDNA.

4.5 Western-Blot

Im Western-Blot sollte das von Pankreaskarzinomzellen in Zellkultur produzierte VEGF qualitativ nachgewiesen werden. Die Methode gründet auf dem 1979 von TOWBIN et al. entwickelten Verfahren^[117]. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die zuvor aus Kulturen isolierten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anhand eines mitlaufenden Proteinstandards konnte am Ende die VEGF-spezifische Bande identifiziert werden.

4.5.1 Zellkultur

Zu untersuchen waren auch hier die in 3.3 beschriebenen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, HPAF-2 und AsPC-1. Die Zellen wurden 24 Stunden entweder mit Endothelin-1 (ET-1), LU-302146 oder BQ485 inkubiert, je 1 mmol/l. Zusätzlich wurde bei jeder Zelllinie eine Kontrolle untersucht, der unter gleichen Bedingungen keine Substanzen appliziert wurden.

4.5.2 Proteinisolierung

Zum Nachweis des Proteins VEGF wurde zuerst das Protein der Zellkulturen von allen anderen Bestandteilen getrennt. Danach wurde das Zellkulturmedium aus den Kulturflaschen aspiriert und die verbleibenden Zellen in 10 ml kaltem PBS durch Abschaben suspendiert. Im Röhrchen wurde das Suspensat 5 min bei 1000 RPM zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 300 µl Lysepuffer mit Proteasen gelöst. Zur Optimierung der Zelllyse wurde die Lösung mehrmals mit einer Kanüle aspiriert und das Lysat danach 5 min ins Ultraschallbad gestellt. Nach 15 min Zentrifugation bei 10.000RPM und 4°C ist das gesamte Einweiß im Überstand gelöst. Dieser wurde bei -20°C gelagert.

Lysepuffer	
für 1000 ml	
Triton X-100	10 ml
Deoxycholsäure	5 g
SDS	1 g
in 0,1M Phosphatpuffer pH 7,3 ad 1000 ml	
sterilfiltriert. Lagerung bei 4°C.	

Lysepuffer + Proteaseinhibitoren	
für 10 ml	
0,5 M EDTA pH 8,0	20 µl
Leupeptin 1 mg/ml	5 µl
Pepstatin 1 mg/ml	10 µl
0,1M Phenylmethylsulfonylfluorid	20 µl
Lagerung bei 4°C.	

4.5.3 Messung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die BCA-Methode gewählt und der BCA Assay-Kit QuantiPro von Sigma verwendet. Basis der Methode ist die Reduzierung von Cu^+ , das mit Bicinchoninsäure (BCA) einen Farbkomplex bildet, dessen Extinktion bei 562 nm gemessen werden kann (BioPhotometer Eppendorf). Hierbei wirken die Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin reduzierend.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Proteinstandardreihe mit den Konzentrationen 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µg/ml angefertigt. Anschließend wurde die Extinktion der Proben gemessen und ihre Proteinkonzentration anhand der Eichkurve berechnet. Um dabei zuverlässige Messwerte zu erhalten, wurden die Proteinproben in verschiedenen Verdünnungen von 1:25 bis 1:100 gemessen.

4.5.4 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Das Verfahren der Elektrophorese dient zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen^[118]. Dazu wurde eine vertikale Apparatur von BioRad verwendet (mighty-small, 950 x 80 x 1 mm).

Es wurden jeweils 20 µg Protein von jeder Probe eingesetzt; sie wurden mit 4x Lämmli-Puffer 5 min bei 95°C aufgeköcht und dann auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Referenz wurde zusätzlich BioRad Precision Plus Protein (Dual Color Standards) aufgetragen.

Die Proben durchliefen dabei zunächst ein Sammelgel, für das eine Acrylamidkonzentration von 3% gewählt wurde, dann das eigentliche Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 12%, welches $\frac{3}{4}$ des Gesamtgels ausmacht. Durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und Temed unmittelbar vor dem Gießen wurde der Polymerisation ausgelöst. Bis zum Auspolymerisieren des Trenngels wurde dieses mit 70% Ethanol beschichtet, danach das Sammelgel über dem Trenngel gegossen. Die Gelkammer ist mit Laufpuffer (5x Elektrodenpuffer) gefüllt.

Anschließend wurde eine elektrische Spannung von 80 V angelegt, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, dann bei 120 V aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in der Regel beendet, wenn der durch Bromphenolblau sichtbare Probenpuffer nach etwa 1 Stunde der Ende des Gels erreicht hatte.

4.5.5 Transfer

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden dann im gleichen System von BioRad unter Anlegung einer 100 V-Spannung über 60 min bei 4°C auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Blot-Sandwich wurde standardmäßig in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale zusammengesetzt: Gitter, Schwamm, Whatman-Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel mit Proteinen, Whatman-Filterpapier, Schwamm, Gitter (in dieser Reihenfolge von der Anode zur Kathode). So wurden die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode auf die Membran transferiert.

Nach dem Blotten wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen die Membran über Nacht im Kühlschrank in Blocking-Medium inkubiert. Dann erfolgt nach zweimaligem Waschen über 10 min in TBS-Tween eine einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper, polyclonales VEGF-IgG vom Kaninchen (Fa. Santa Cruz, USA), bei Raumtemperatur und unter Schütteln. Anschließend wurde nach wiederholtem Waschen mit TBS-Tween der Sekundärantikörper, ein mit Alkalischer Phosphatase konjugiertes anti-Kaninchen-IgG (Santa Cruz), hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte mit einer Konzentration von 0,2 µl/ml bei Raumtemperatur und Schütteln. Danach wurde dreimal 10 min mit TBS gewaschen.

Schließlich erfolgte die Farbentwicklung mit BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat) und NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid; NBT/BCIP-Stammlösung, Fa. Roche, Penzberg): BCIP fungiert als Substrat der an den Sekundärantikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase. Durch Dephosphorylierung entsteht ein blauer Indigofarbstoff. Mit einer Redox-Reaktion verstärkt

4. Methoden

NBT den Farbeffekt. Bei Auftreten von Banden wurde die Membran herausgenommen, kurz mit Wasser gespült und luftgetrocknet.

Trenngel, 12%

ddH ₂ O	4,4 ml
1,5M Tris pH8.8	2,5 ml
40% Acrylamid	3 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	50 µl
Temed	15 µl

Transfer Puffer

für 1000 ml	
Tris Base (Trizma)	3 g
Glycin	14,4 g
Methanol	200 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Sammelgel, 3%

ddH ₂ O	6,1 ml
0,5M Tris pH8.8	2,5 ml
40% Acrylamid	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	50 µl
Temed	12 µl

4x Laemmli Buffer (Sample-Buffer)

für 8 ml	
ddH ₂ O	3 ml
0,5M TRIS-HCl pH 6,8	1 ml
Glycerol	1,6 ml
10% SDS	1,6 ml
beta-Mercaptoethanol	0,4 ml
0,5% Bromphenolblau in Wasser	0,4 ml

5x Elektrodenspuffer (Running Buffer)

für 1000 ml	
Tris Base (Trizma)	15 g
Glycin	72 g
SDS (Lauryl Sulfat)	5 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Blocking-Medium

PBS	45 ml
NSS 10%	5 ml
Tween 0,5%	0,250 ml
TopBlock 0,1%	0,05 g

4.6 ELISA

Mit dem Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) können Proteine nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung quantitativ determiniert werden. Das zu bestimmende Protein wird von einem spezifisch bindenden Antikörper gebunden, der auf einer Oberfläche fixiert ist. Ein sekundärer Antikörper mit Spezifität für das Targetprotein ist mit einem Enzym gekoppelt, das eine Farbreaktion katalysiert. Durch Zugabe eines geeigneten Substrates wird eine Farbreaktion in Gang gesetzt. Nach Inhibition der enzymatischen Reaktion wird dann die Farbintensität kolorimetrisch quantifiziert. Die Farbentwicklung verhält sich proportional zum gebundenen Protein und kann anhand einer Standardreihe mit definierten Konzentrationen die spezielle Proteinkonzentration der Proben exakt errechnet werden.

Für sämtliche ELISAs wurden kommerzielle Systeme im Mikrotiterplattenformat verwendet, die bereits mit dem Primärantikörper beschichtet waren. Die photometrische Extinktionsmessung erfolgte mit dem ELISA-Reader EL808 von Bio-Tek Instruments, Inc. (Winooski, VT, USA) und der Software KC4 Kineticalc.

4.6.1 VEGF-ELISA

Beim VEGF-ELISA wurde die zeitabhängige VEGF-Sekretion von Pankreaskarzinomzellen ins Zellkulturmedium gemessen. Die in 3.3 genannten Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, HPAF-2 und AsPC-1 wurden entweder mit oder ohne Endothelin-1 (1 μ M) für 1, 3, 6, 12, 24, 48, und 72 Stunden inkubiert, so daß 42 verschiedene Proben zu untersuchen waren. Auch dieser ELISA wurde zweifach und jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt. Dabei wurde das ELISA-Set Quantikine Human VEGF Immunoassay von R&D Systems Inc., (Minneapolis, MN, USA) verwendet.

Für die Standardreihe wurde ein VEGF₁₆₅-Standard (Sf21-exprimiertes, rekombinantes humanes VEGF₁₆₅; 2000 pg/ml) auf die Konzentrationen 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; und 15,6 pg/ml verdünnt. Nach Spülen der Kammern mit je 50 μ l Assay-Lösung wurde die Mikrotiterplatte mit der Standardreihe und den 42 Proben beladen. Es wurden 200 μ l pro Well eingesetzt und dann für zwei Stunden mit monoklonalem anti-VEGF-Antikörper von der Maus bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Aspiration erfolgte eine dreifache Waschprozedur mit Waschlösung. Dann wurden 200 μ l Sekundärantikörper gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase in jede Kammer pipetiert und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Zum Anhalten der enzymatischen Substratumsetzung wurde 50 μ l 2N-Schwefellösung als Stopplösung gegeben. Schließlich wurde die Extinktion bei 450 nm ge-

messen und der Meßwert des Nullwertes von allen anderen Meßwerten subtrahiert um dann die VEGF-Konzentration der Proben zu errechnen

4.6.2 Endothelin-1-ELISA

Im Endothelin-1-ELISA wurde die Konzentration von Endothelin-1 in Zellüberständen von Pankreaskarzinomzellen in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Es wurden die in 3.3 beschriebenen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, HPAF-2 und AsPC-1 verwendet. Die Zellen wurden 6, 24 oder 72 Stunden mit und ohne Endothelinrezeptorantagonisten inkubiert. Als Antagonisten des Endothelinrezeptors A wurden LU-302146 und BQ485 jeweils in 1µM-Konzentration verwendet. Auf diese Weise ergaben sich 27 verschiedene Proben.

Es wurde der human Endothelin-1 Enzyme Immunometric Assay Kit TiterZyme EIA der Firma Assay Design, Inc. (Ann Arbor, MI, USA) verwendet, der einen gegen humanes Endothelin-1 gerichteten Primärantikörper vom Kaninchen verwendet.

Zur Erstellung der obligaten Standardreihe wurde mit Hilfe von humanem Endothelin-1-Standard acht Konzentrationen mit 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 und 0,78 pg/ml erstellt.

Nach zweifachem Spülen der Kammern mit einer phosphatgepufferten Salzlösung wurde die Platte mit einem Nullwert, der Standardreihe und den 27 Proben beladen. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C über 60 Minuten. Dann wurden die Kammern siebenmal gewaschen und mit gelabeltem Sekundärantikörper (Antikörper vom Kaninchen gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase, 100 µl / Well) 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antigen-Antikörper-Komplexe wurde neunfach mit einer phosphatgepufferten Salzlösung gewaschen, die Substratlösung hinzugefügt und bei Raumtemperatur 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl 1N-Schwefellösung wurde die Reaktion angehalten und die Farbintensität bei 450 nm gemessen. Der Meßwert vom Leerwert wurde von allen anderen Meßwerten subtrahiert. Anhand der Standardkurve konnte aus den Extinktionswerten dann die Endothelin-1-Konzentration errechnet werden.

4.7 Tierstudien

4.7.1 Orthotope Implantationstechnik

Vier Wochen alte Nacktmäuse (CrI:NU/NU-nuBR) mit einem initialen Gewicht von 20-22 g wurden von der Firma Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) bezogen und in Mikroisolierkäfigen bei einem Tag-Nachtzyklus von jeweils 12-Stunden untergebracht. Alle Materialien, sowie Futter und Wasser wurden autoklaviert.

Die Technik der orthotopen Implantation von Pankreastumoren wurde von HOTZ et al.^[119] beschrieben und etabliert. Es wurden 5×10^6 Zellen der jeweiligen Pankreaskarzinomzelllinie s.c. in die Flanke der Spendertiere injiziert. Nach 4 Wochen erreichten die subkutanen Tumore eine Größe von 1 cm Maximaldurchmesser und die Spendertiere wurden dann durch eine letale Dosis Pentobarbital (50 mg i.p.) getötet. Die Donortumore wurden mit dem Skalpell (Nr. 11) in Fragmente mit einem Volumen von 1 mm³ zerkleinert. Wegen zentraler Nekrosen wurden anschließend nur periphere, vitale Fragmente transplantiert.

Für die orthotope Implantation wurde das Abdomen der Empfängertiere durch mediane Inzision eröffnet und Pankreas mit Milz vorsichtig exponiert. Mit einer Mikroschere (RS-5610 VANNAS; Roboz, Rockville, MD, USA) wurden zwei Implantationstaschen ins Parenchym präpariert. In diese Taschen erfolgte dann die Implantation eines Tumorfragmentes, so daß es allseits von Pankreasgewebe umgeben war. Es erfolgte keine Fixierung mittels Naht oder Fibrinkleber. Nach regelrechter Reposition von Pankreas und Milz in das Abdomen wurde dieses in zweischichtiger Naht mit 5-0 resorbierbarem Material (DEXON „S“, Davis&Geck, Manati, Puerto Rico) geschlossen. Die Operation fand unter aseptischen Bedingungen bei laminärem Luftstrom statt. Die Narkose wurde mit Pentobarbital (Nembutal; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA; 40 mg/kg KG) durchgeführt.

4.7.2 *In-vivo* Therapie mit LU-302146

Es wurden die humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und AsPC-1 (beide ET_A-positiv) sowie Panc-1 (ET_A-negativ) untersucht. Pro Pankreaskarzinomzelllinie wurden acht Nacktmäuse plus acht Tiere für eine Kontrollgruppe randomisiert. Die Applikation von LU-302146 erfolgte ab drei Tagen nach Tumorimplantation per Schlundsonde mit einer täglichen Dosis von 30 mg/kg KG über 14 Wochen bzw. bis zum Tod der Tiere. Die Kontrollgruppe erhielt die Trägersubstanz, 0,9% NaCl. Nach täglicher klinischer Beobachtung und Wiegung wurden die Tiere nach 14 Wochen durch letale Dosis von Na-Pentobarbital (0,5 mg/g KG) getötet.

4.7.3 Evaluierung der Therapieresultate

Bei der Obduktion wurden die maximalen Längsdurchmesser der primären orthotopen Tumore in den drei Raumdimensionen gemessen und das Volumen nach folgender Formel berechnet:

Volumen = Länge x Höhe x Tiefe / 2.

Sämtlichen Tumorfunde wurden asserviert, in Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin gebettet. Schnitte von 5 µm wurden mit Hämatoxylin und Eosin für die mikroskopische Untersuchung gefärbt.

Lokale Infiltration trat in folgenden Organen auf: Milz, Magen, Leber(hilus), Nieren(hilus), Retroperitoneum, Zwerchfell, Mesenterium, Darmschlingen und Bauchwand. Alle weiter festgestellten Tumore ohne Beziehung zum Primarius wurden als Fernmetastasen gezählt. Untersucht wurden Leber, Nieren, Milz, Lunge, Zwerchfell, Mesenterium, Retroperitoneum, Mediastinum sowie die Operationswunde.

Die Tumor-Disseminierung wurde mit einem Score quantifiziert: Für jede Tumormanifestation oder -infiltration wurde je ein Punkt gezählt, weitere Punkte wurden gegeben für eine massive Lokalinfiltration (Definition: mehr als der halbe Organumfang), für multiple Metastasen (> 1 in den parenchymatösen Organen; > 10 in Zwerchfell, Mesenterium oder Retroperitoneum) und für Metastasen größer als 50 mm³. Klinisch wurden Aszites (falls > 5 ml: zwei Punkte), Ikterus, Ileus und Kachexie erfaßt.

4.7.4 Mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD)

Zur Markierung der mikrovaskulären Gefäße im Tumor wurde ein anti-CD31-Antikörper benutzt. Gewebeschnitte (3 µm) aus der beschriebenen orthotopen Implantation wurden deparaffiniert, rehydriert und bei 95°C 15 min lang in 0,01% EDTA (pH 8,0) gekocht. Anschließend wurde durch 5 minütige Behandlung mit 3% H₂O₂ die endogene Alkalische Phosphatase blockiert. Dann wurde der aufbereitete anti-Maus-CD31 (PECAM-1) Antikörper (Santa Cruz, San Diego, CA, USA) in 1:1000 Verdünnung aufgetragen und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Nach Spülen in PBS-Tween wurde 20 min mit dem biotiniliertem Sekundärantikörper inkubiert, weitere 20 min mit Streptavidin-Peroxidase. Die Farbe wurde mit DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) nach 2 min Inkubtion entwickelt.

Die MVD wurde nach der Methode von WEIDNER et al^[120, 121] quantifiziert. Bei schwacher Vergrößerung (40x bis 100x) wurden die Areale mit höchster Neovaskularisationsdichte bestimmt. Die Zählung erfolgte dann bei 200x Vergrößerung (0,74 mm² pro Feld) auf 10 Feldern.

4.8 Statistische Auswertung

Alle Angaben sind Mittelwerte und mit der Standardabweichung (STAB) angegeben. Normalverteilte kontinuierliche Messwerte wurden mit dem Student-t-Test analysiert; diskontinuierliche mit dem Mann-Whitney rank sum test.

Als signifikant gilt ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der *in-vitro* Untersuchungen

5.1.1 Expressionsverhalten verschiedener Zelllinien für ET-1 und die Rezeptoren ET_A und ET_B

Als erster Schritt sollte das Expressionsverhalten von verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien für ET-1 sowie die Rezeptoren ET_A und ET_B verifiziert bzw. evaluiert werden. Mittles RT-PCR wurde die mRNA-Expression von ET-1, ET_A, ET_B in drei verschiedenen humanen Pankreaskarzinomzelllinien (MiaPaCa-2, AsPC-1, Panc-1) dargestellt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Zur Kontrolle diente β -Aktin in allen drei Proben.

Alle drei Zelllinien exprimierten ET-1 in etwa gleicher Stärke. ET_A wurde nur von MiaPaCa-2 und AsPC-1 exprimiert; Panc-1 erwies sich als eindeutig negativ für ET_A. ET_B wurde von keiner der untersuchten Zelllinien produziert. Die β -Aktin-Banden bestätigen die Gleichwertigkeit der eingesetzten Probemengen. Das Ergebnis ist dargestellt in Abbildung 6 (Seite 39).

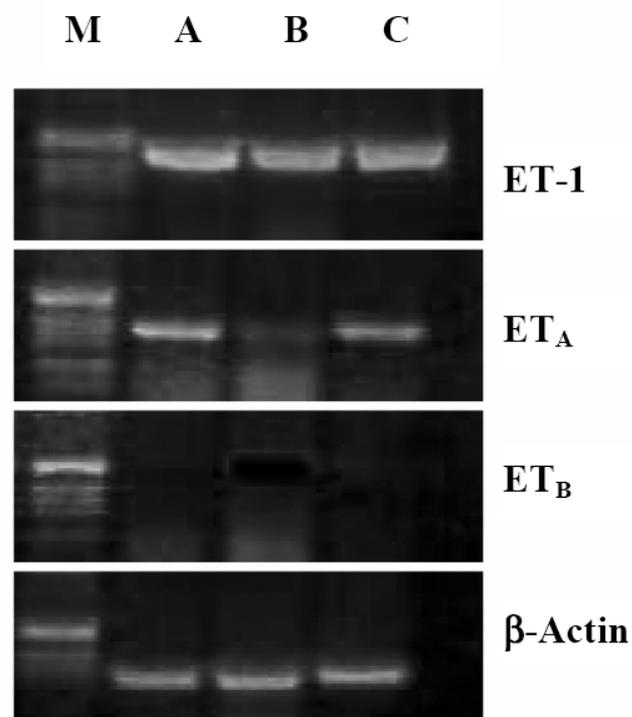


Abbildung 6: Expression von ET-1 und seinen Rezeptoren in humanen Pankreaskarzinomzelllinien. M = Marker; A = MiaPaCa-2; B = Panc-1; C = AsPC-1. β -Actin diente als Positivkontrolle. ET-1 ist in allen 3 Zelllinien identifizierbar, ebenso ET_A bei MiaPaCa-2 und AsPC-1. Panc-1 sind negativ für ET_A, für ET_B sind alle 3 Linien negativ.

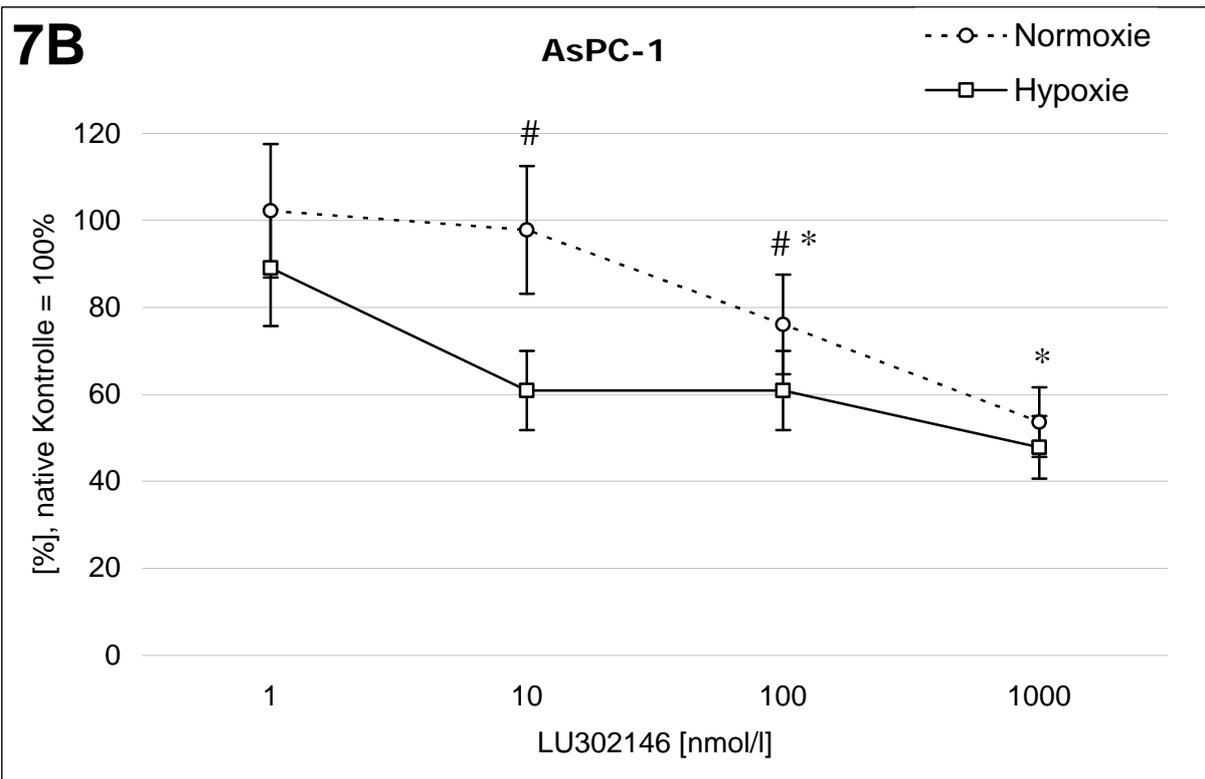
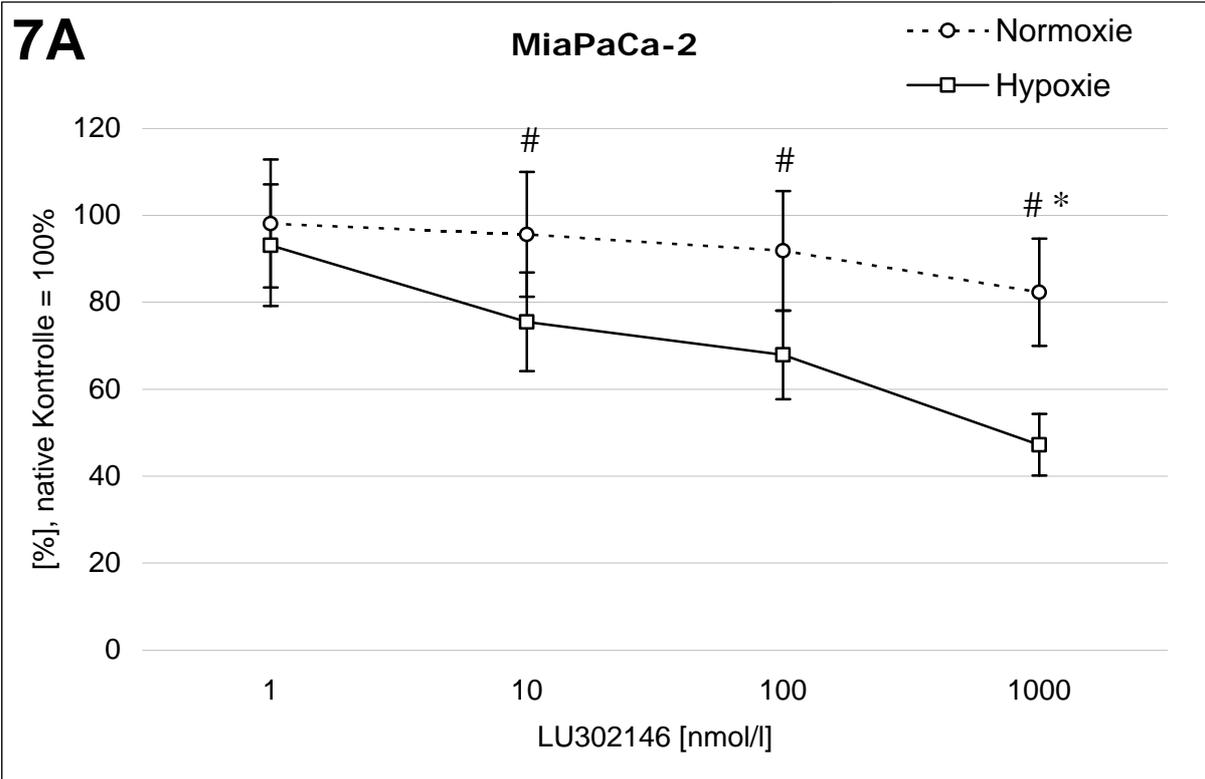
5.1.2 Dosisabhängiger Effekt der ET_A-Blockade auf die Zellproliferation bei der Zellzählung

Die Zellzählung diente als erste orientierende Untersuchung zur Wirkung der Endothelinachse auf das Proliferationsverhalten von humanen Pankreaskarzinomzellen. Zunächst wurde der Antagonismus des Ligand-Rezeptor-Systems durch Blockierung der nachgewiesenen ET_A-Rezeptoren untersucht, anschließend wurde eine exogene Stimulierung versucht.

Zur selektiven Blockade der ET_A wurde LU302146 verwendet und die ET_A-positiven Zelllinien MiaPaCa-2 und AsPC-1 sowie als Negativkontrolle ET_A-negative Panc-1-Zellen über ein Zeitintervall von 72 Stunden inkubiert. Für die Untersuchung einer Dosisabhängigkeit wurden Konzentrationen zwischen 1-1.000 nmol/l LU302146 eingesetzt, und zwar unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Die Ergebnisse wurden mit den entsprechenden unbehandelten Kulturproben, die gleichzeitig bei identischen Bedingungen inkubiert wurden, korreliert und sind für jede der untersuchten Zelllinien in den Abbildungen 7 A-C (Seite 41-42) dargestellt. Bei den ET_A-positiven Zellen war eine Reduktion der Zellzahlen mit steigender Konzentration des Antagonisten erkennbar. Unter Applikation von 1.000 nmol/l wurde die Proliferation von MiaPaCa-2 um 17,7%, die von AsPC-1 um 46,4% signifikant reduziert.

Die beschriebenen Wirkungen waren unter Hypoxie zum Teil signifikant stärker ausgeprägt; bei maximaler Dosierung wurden bei beiden ET_A-positiven Zelllinien Suppressionen um über 50% erreicht.

Bei den ET_A-negativen Panc-1 zeigte der Antagonist keinen Effekt, weder unter Normoxie noch unter Hypoxie.



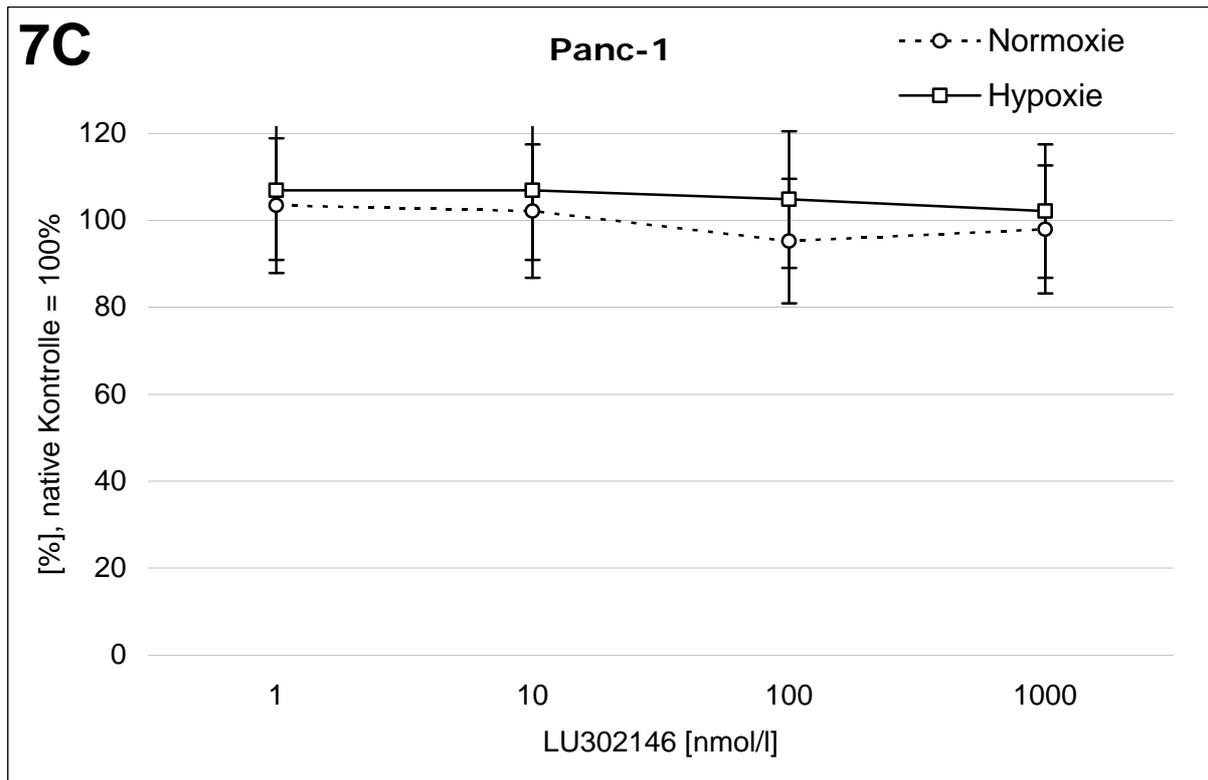


Abbildung 7: Ergebnisse der Zellzählung bei ET_A -Blockade. Die Graphen zeigen für die beiden ET_A -positiven Zelllinien MiaPaCa-2 (A), AsPC-1 (B) sowie die ET_A -negativen Panc-1 (C) die ermittelten Zellzahlen nach Applikation von LU302146 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen nach 72stündiger Inkubation. Die Konzentration von LU302146 wurde in den auf der Abszisse angegebenen Konzentrationen variiert. Die Versuche erfolgten parallel unter normoxischen (durchgehender Graph) oder hypoxischen (punktierter Graph) Bedingungen. Signifikante Differenzen sind gekennzeichnet (* = $p = 0,05$ vs. Kontrolle; # = $p = 0,05$ vs. Normoxie; $n = 5$).

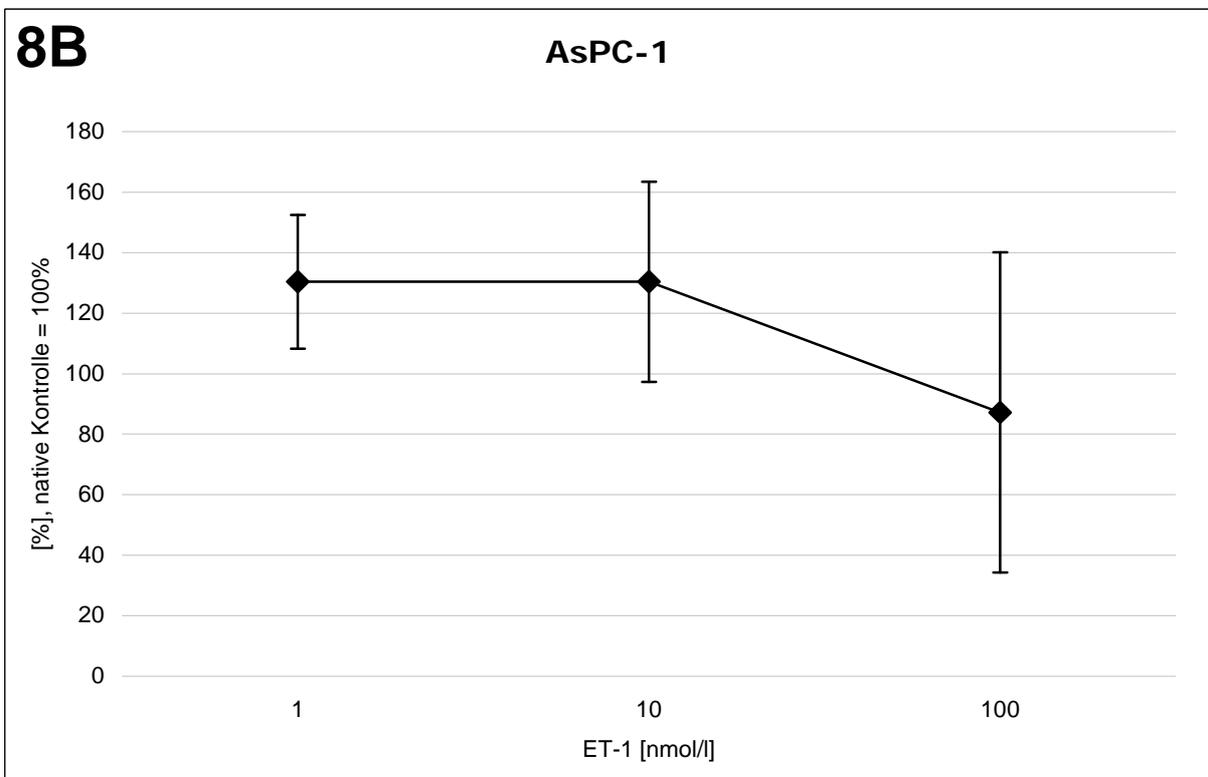
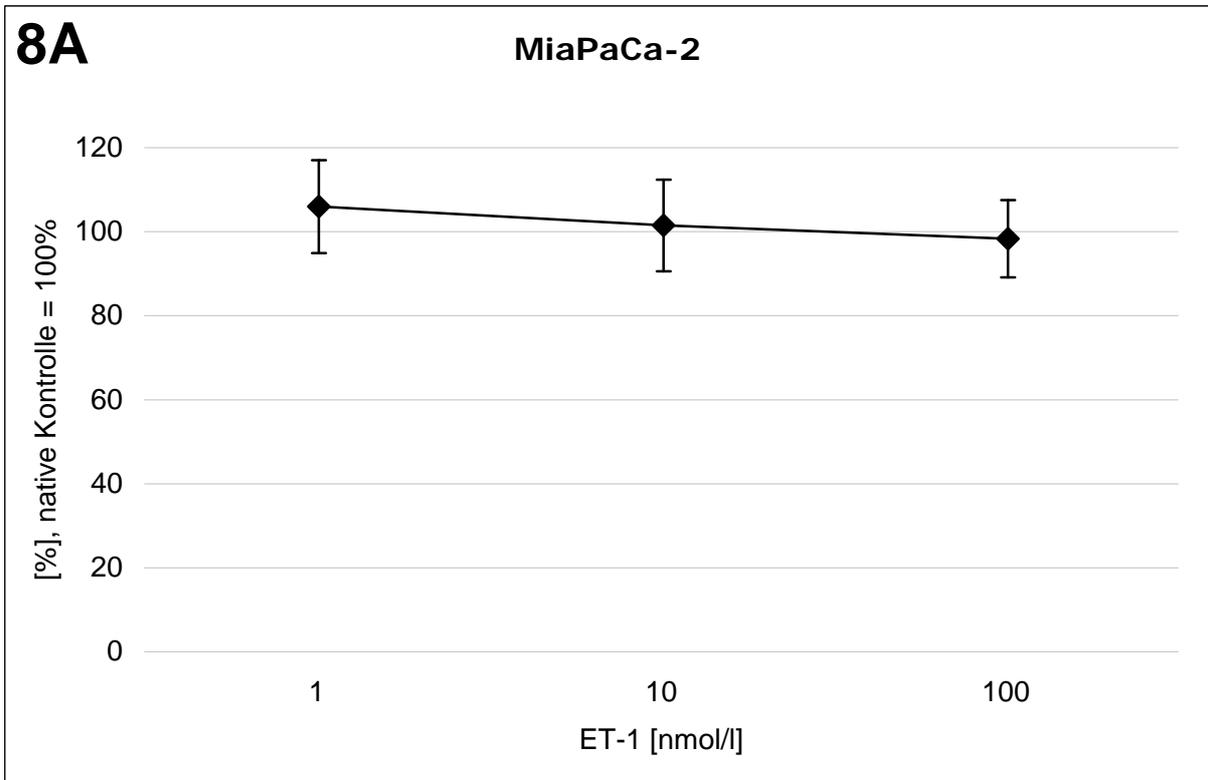
5.1.3 Dosisabhängiger Effekt der Applikation von ET-1 auf die Zellproliferation bei der Zellzählung

In einer weiteren Untersuchung sollte die postulierte Stimulation der Proliferation durch exogene Applikation des Agonisten, ET-1, gezeigt werden.

Die gleichen Zelllinien wurden ebenfalls in einem Zeitintervall von 72 h unter normoxischen Bedingungen mit ET-1 in Konzentrationen von 1-100 nmol/l inkubiert und mit unbehandelten Zellkulturen verglichen.

Bei MiaPaCa-2 waren nach 72 h keine relevanten Unterschiede unter Stimulation mit ET-1 erkennbar, die Werte entsprachen alle der Nativprobe. Die Proliferation von AsPC-1 wurde im Mittelwert bei exogener Applikation im Konzentrationsbereich von 1-10 nmol/l stimuliert, die gezählte Zellzahl war um 30,4% höher als bei der nativen Kontrollprobe. Unter höherer ET-1-Konzentration (100 nmol/l) fand eine Stimulierung statt. Aufgrund einer hohen Streuung und der resultierenden hohen Standardabweichung war dieses Ergebnis aber nicht signifikant. Bei Panc-1

wurden ebenfalls keine signifikanten Differenzen beobachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 (Seite 43-44) detailliert dargestellt.



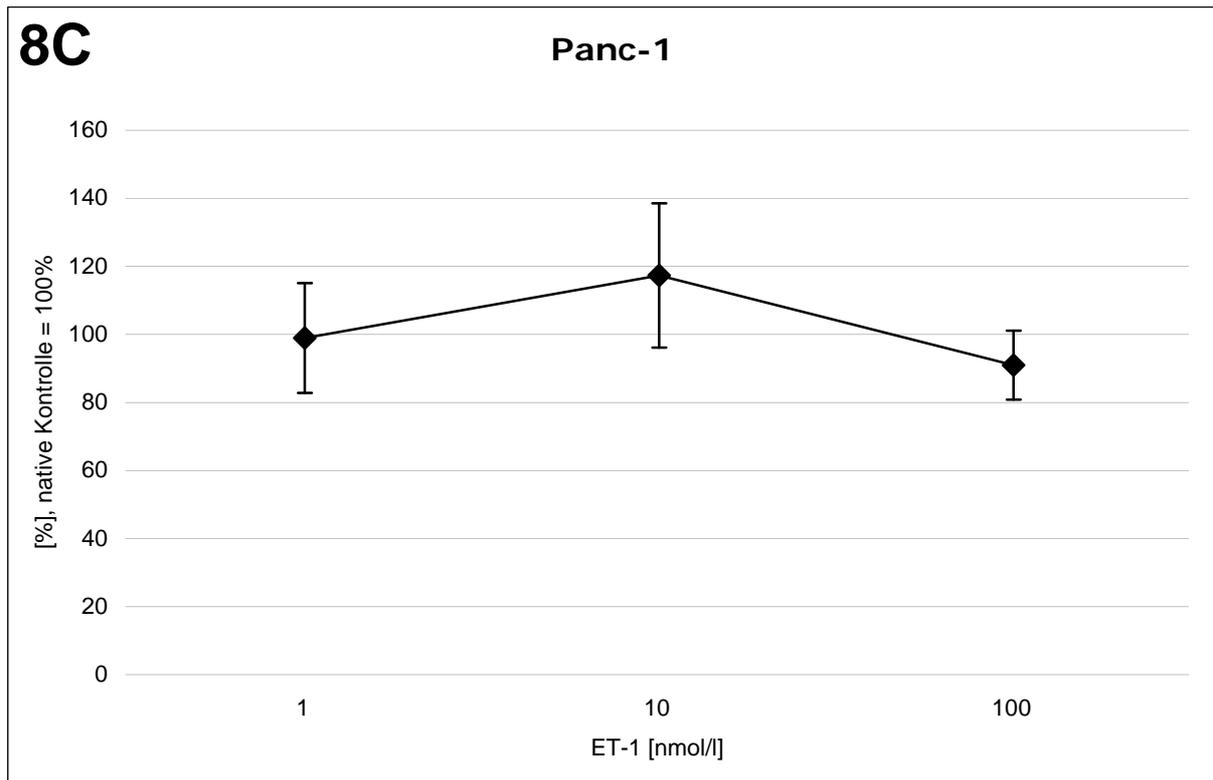


Abbildung 8: Ergebnisse der Zellzählung unter Applikation von ET-1. Die Diagramme A-C zeigen für die beiden ET_A-positiven Zelllinien MiaPaCa-2 (A) und AsPC-1 (B) sowie die ET_A-negativen Panc-1 (C) die ermittelten Zellzahlen nach Applikation von ET-1 in steigenden Konzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen nach 72stündiger Inkubation (n = 5).

Zur Untersuchung einer postulierten Proliferationsstimulation durch ET-1 konzentrierten sich die folgenden *in vitro* Arbeiten nun auf die ET_A-positiven Zelllinien MiaPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 anstelle der ET_A-negativen Panc-1-Zellen.

5.1.4 Untersuchung der zeitabhängigen Wirkung von ET-1 auf die Zellviabilität mit dem MTT-Assay

Im MTT-Assay wurde die Wirkung von ET-1 auf die ET_A-positiven Zelllinien MiaPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 in Abhängigkeit von der Zeit gemessen: Die Zellen wurden mit 1 μM ET-1 in Zeitintervallen von 1 bis 72 Stunden inkubiert (Abbildung 9 A-C, Seite 45-46). Die gemessenen optischen Dichtewerte sind in den Diagrammen relativ zu den Meßwerten unbehandelter Kontrollzellkulturen dargestellt. Die gemessene optische Dichte der Kontrollzellkultur nach dem ersten Zeitintervall (1 Stunde) ist als 100% definiert.

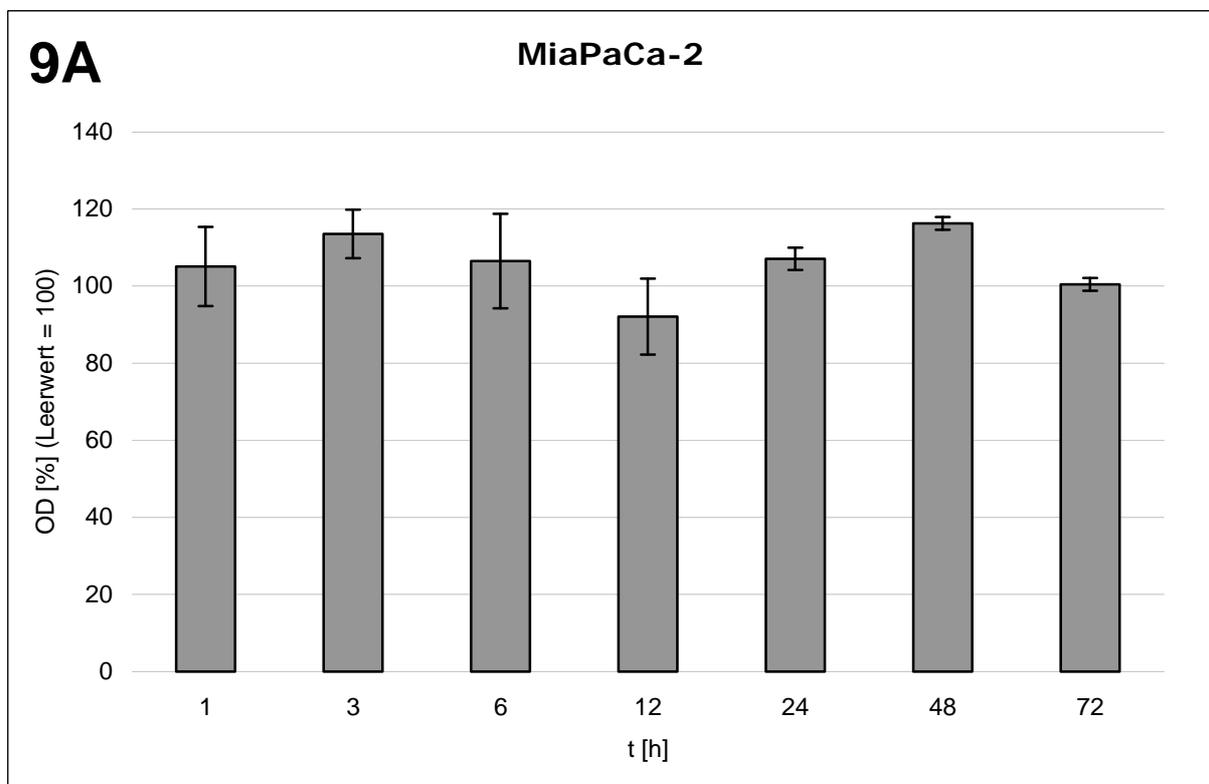
Die Meßwerte bei MiaPaCa-2-Zellen schwankten zwischen -7,9% und +16,3% verglichen mit unbehandelten Zellen der entsprechenden Zeiträume, nach dem maximalen Intervall von 72

Stunden unterschied sich der Wert (100,5%) nicht von unbehandelten Zellen (Abbildung 9A, Seite 45).

Bei AsPC-1 zeigte sich unter ET-1-Applikation zwar eine kontinuierliche Zunahme bis zum 12 Stunden-Intervall (+13,6%), anschließend aber eine Annäherung an die Zahlen der Kontrollkulturen (-5,5% nach 72 h). Die Differenzen waren nicht signifikant (Abbildung 9B, Seite 46).

Die Untersuchung von HPAF-2-Kulturen lieferte uneinheitliche Ergebnisse, die Zahlen verliefen in einem Korridor zwischen -7,9% und +35,5%; sie erlaubten ebenfalls keine positive Aussage zur Stimulation durch ET-1 (Abbildung 9C, Seite 46).

Sämtliche Ergebnisse beruhen auf vierfachen Messungen pro Zeitpunkt.



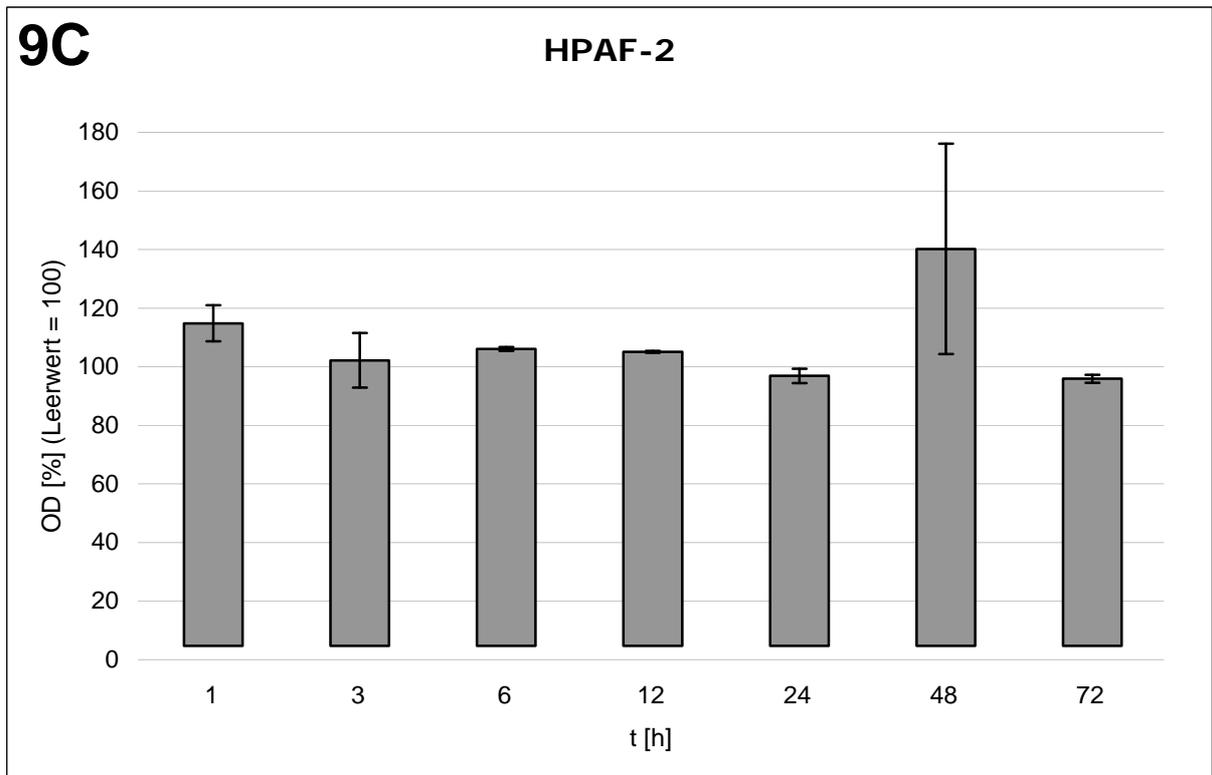
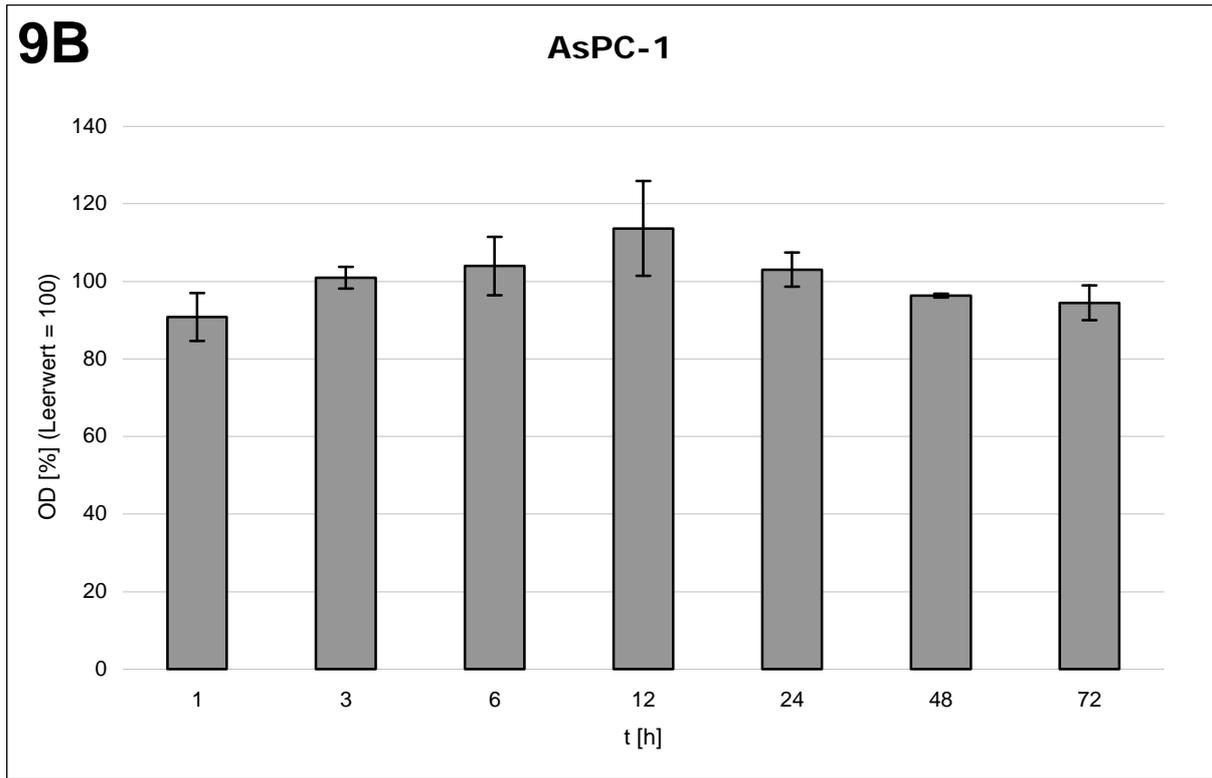


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Zell-Viabilität (MTT-Assay) von Zellen der ET_A-positiven Linien Mia-PaCa-2 (A), AsPc-1 (B) und HPAF-2 (C) nach Inkubation mit ET-1 (1 µmol/l) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen (= 100%). n = 4.

5.1.5 Effekt von Agonist und Antagonist auf die Zellproliferation im BrdU-Assay

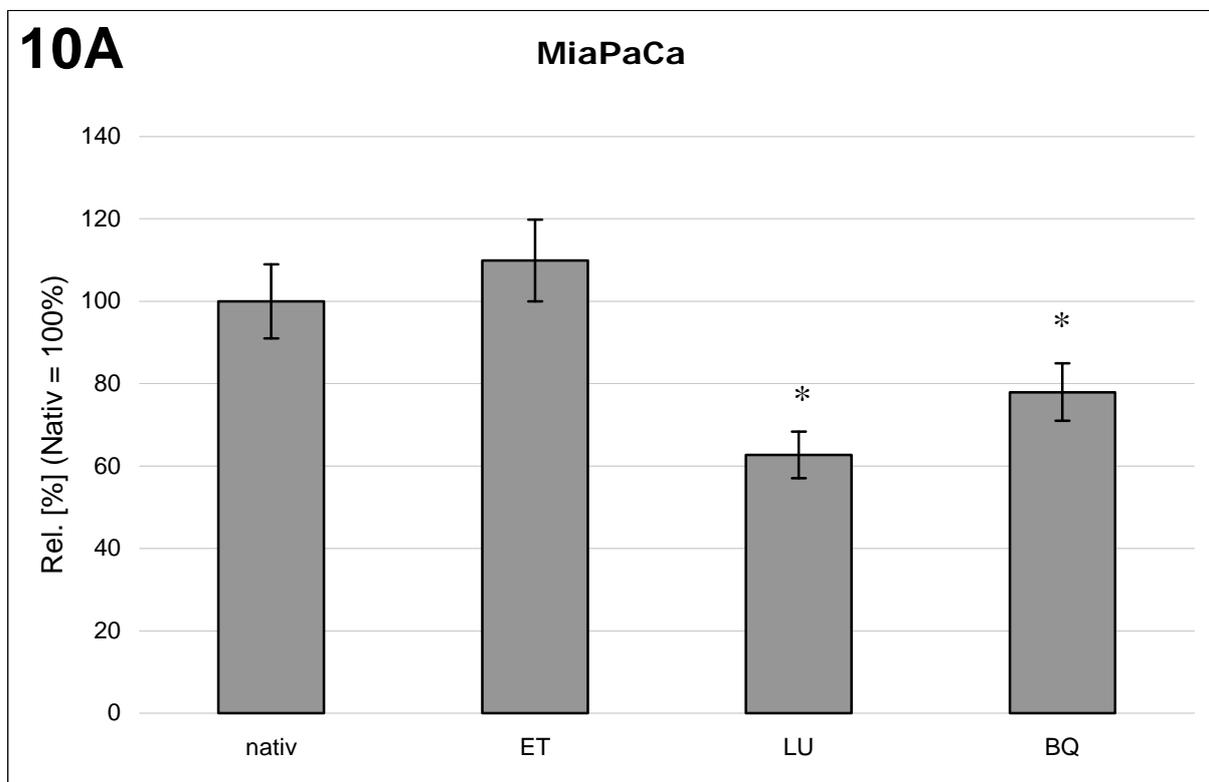
Die Inkubation der ET_A-positiven Zelllinien MiaPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 mit ET-1 im BrdU-Assay über 24 Stunden zeigte wie in der Zellzählung und dem MTT-Assay keinen proliferationssteigernden Effekt des Agonisten. Die ET_A-Rezeptorantagonisten LU-302146 und BQ485 (jeweils 1 µM) wiesen allerdings für zwei Zelllinien eine signifikante Proliferations-suppression auf (Abbildung 10 A-C, Seite 47-48).

Bei MiaPaCa-2 hatte die Applikation von ET-1 keinen Effekt. Mit LU-302146 und BQ485 konnten die Proliferationsraten um 37,3% resp. 22,0% signifikant gesenkt werden.

AsPC-1 wurden weder stimuliert durch den Agonisten noch inhibiert durch den Antagonisten: mit ET-1 war die Proliferation um 7,3 % reduziert, mit den ET_A-Rezeptorantagonisten um 11,3 % (LU-302146) resp. 8,1 % (BQ485) vermindert; die Zahlen sind nicht signifikant.

Bei HPAF-2 zeigte die exogene Applikation von ET-1 keinen signifikanten Effekt; mit LU-302146 wurde eine Proliferationsreduktion um 62,3 % und mit BQ485 um 31,2 % erreicht.

Die Ergebnisse beruhen auf Vierfachbestimmungen (n = 4).



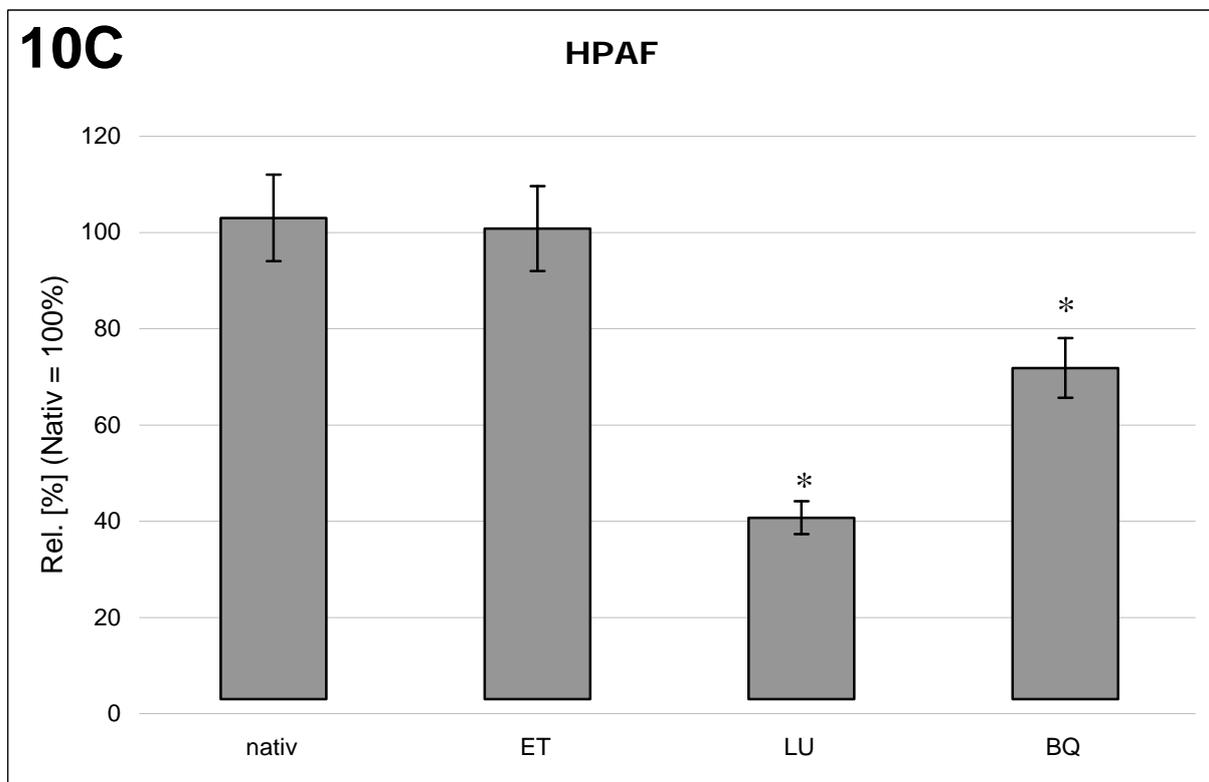
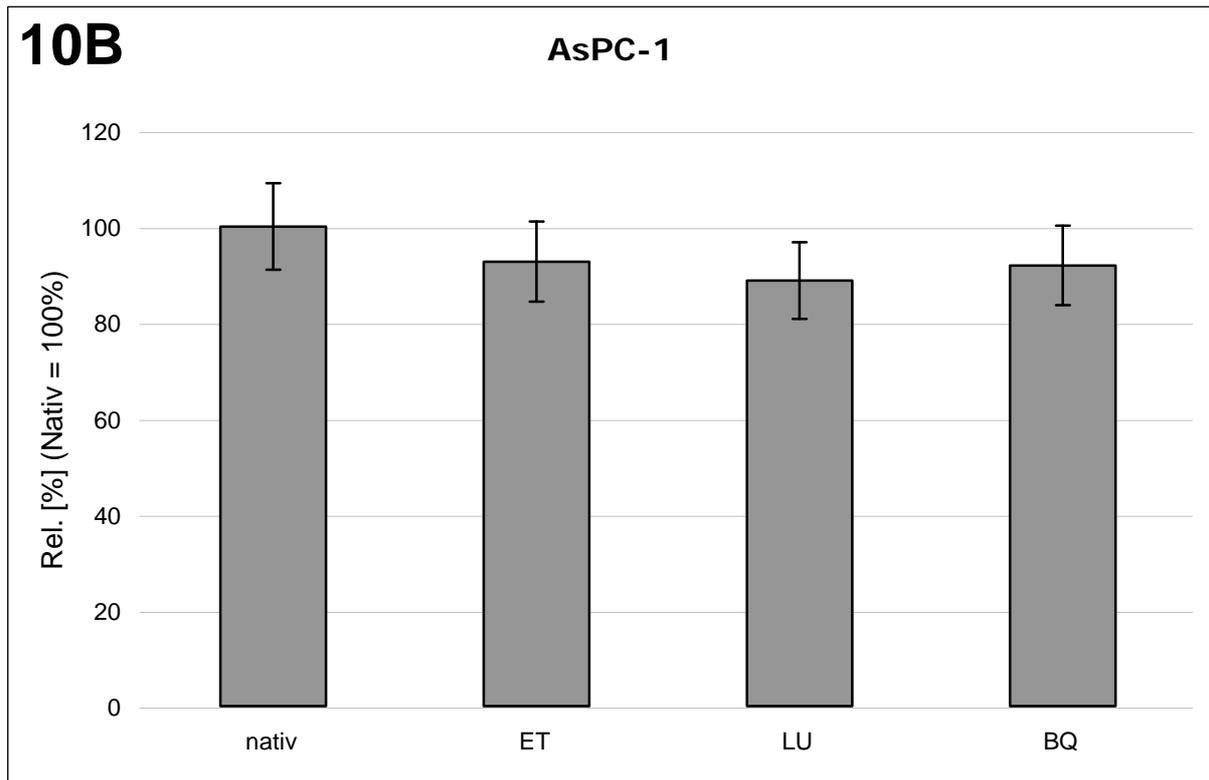


Abbildung 10: Zellproliferation im Stimulations- und Suppressionsversuch. Im BrdU-Assay wurden Zellen der Linien MiaPaCa-2 (A), AsPC-1 (B), HPAF (C) entweder mit ET-1 (ET) oder mit den ET_A-Rezeptorantagonisten LU302146 (LU) oder BQ-485 (BQ) über 24 Stunden inkubiert. Bei MiaPaCa-2- und HPAF-Zellen konnte eine signifikante Proliferationssuppression unter LU302146 und BQ-485 erreicht werden (* = $p = 0,05$).

5.1.6 Quantifizierung der VEGF-Expression nach Stimulation mit ET-1 und nach selektiver ET_A-Blockade mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)

5.1.6.1 Konzentration von RNA im Zellysat

Für die molekularbiologische Untersuchung der ET-1-Wirkung auf die VEGF-Expression wurden die ET_A-positiven Zelllinien MiaPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 in drei Serien kultiviert und mit ET-1 bzw. den ET_A-Antagonisten LU-302146 und BQ485 inkubiert. Nach Isolierung der RNA aus dem Zellysat wurde deren Konzentration photometrisch bestimmt, um in folgenden Untersuchungen äquivalente Mengen einsetzen zu können. Tabelle 8 (Seite 50) zeigt die Meßwerte für alle Proben, die anschließend für die RT-PCR verwendet wurden.

Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von je 5 µg RNA im Formamidgel um die Integrität der RNA zu überprüfen. Intakte RNA zeigt im Gel ein typisches Muster von zwei Banden, welche die 18S rRNA und die 28S tRNA darstellen (Abbildung 11 Seite 51).

Tab. 8: RNA-Gehalt

Zellstamm	Behandlung	Zellpassage	RNA-Gehalt [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
MiaPaCa-2	-	6	16,2
	-	11	0,5
	-	11	60,0
	ET	6	11,7
	ET	11	2,9
	ET	11	1,9
	LU	6	23,8
	LU	11	2,3
	LU	11	1,0
	BQ	14	11,0
	BQ	11	3,5
	BQ	11	0,9
AsPC-1	-	14	11,8
	-	16	4,8
	-	16	1,2
	ET	14	8,5
	ET	16	1,5
	ET	16	1,8
	LU	12	1,0
	LU	16	1,4
	LU	16	1,8
	BQ	14	9,0
	BQ	16	2,4
	BQ	16	2,4
HPAF-2	-	13	3,5
	-	7	2,7
	-	7	1,6
	ET	13	11,3
	ET	12	0,7
	ET	12	1,4
	LU	13	10,6
	LU	12	1,3
	LU	7	1,3
	BQ	13	10,1
	BQ	12	1,9
	BQ	7	1,6

Tabelle 8: photometrisch bestimmte Konzentration der isolierten RNA in den für die RT-PCR verwendeten Proben. Das Probenvolumen betrug jeweils 50 μl . Eingesetzt wurden die Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, AcPC-1 und HPAF-2 und jeweils mit entweder ET-1 (ET), LU-302146 (LU), oder BQ485 (BQ) behandelt. Außerdem wurde von jeder Zelllinie eine Kontrollprobe (-) eingesetzt. Es erfolgten jeweils drei Kulturansätze.

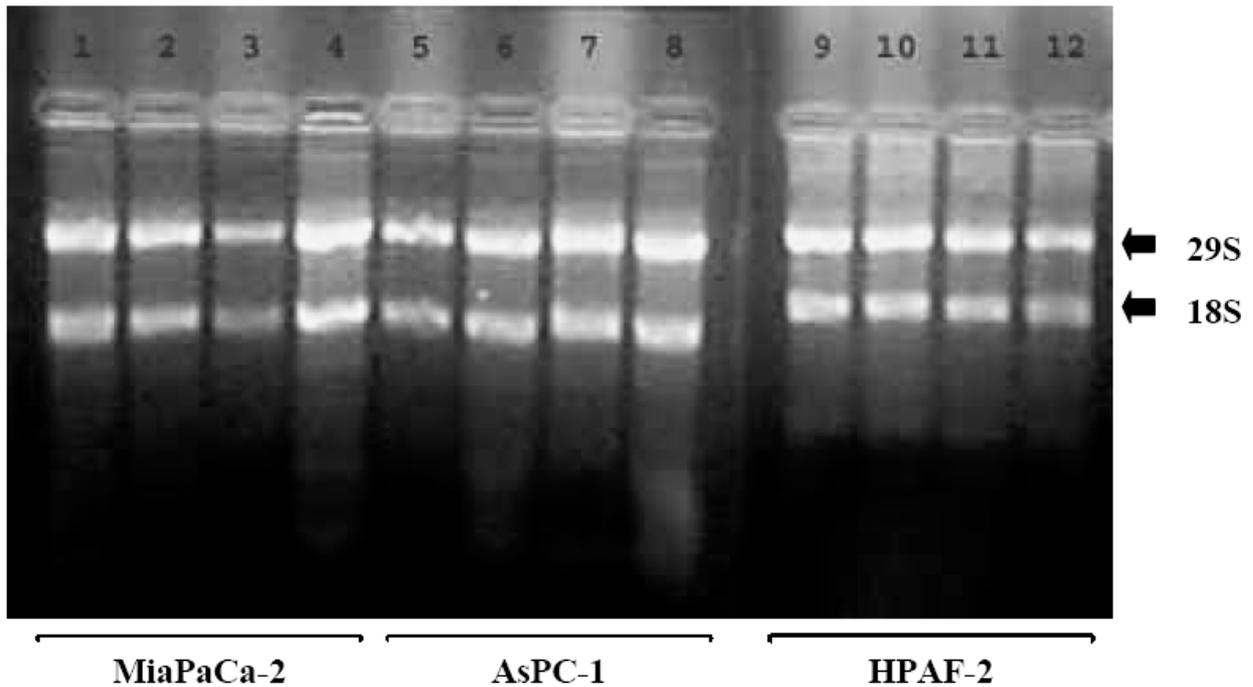


Abbildung 11: Fotografie einer Gelelektrophorese zur Qualitätskontrolle der RNA-Präparation. Je 5 μg Gesamt-RNA der Proben von den drei Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 (Spur 1-4), AsPC-1 (Spur 5-8) und HPAF-2 (Spur 9-12) wurden nach Behandlung (jeweils in der Reihenfolge: Kontrolle; Endothelin-1; LU-302146; BQ485) in einem 1,4% Formamidgel aufgetragen. In allen Proben sind die 28S und die 18S-RNA-Bande erkennbar.

5.1.6.2 Real-time PCR mit dem LightCycler-System

Der LightCycler misst bei der Real-time PCR die Produktakkumulation mit einer spezifischen Fluoreszenstechnik.

Daraus ergibt sich eine Kurvenschar wie exemplarisch in Abbildung 12 (Seite 52) dargestellt. Für jede Kurve errechnet die Software LC Run die Crossing Points (Delta CP), ihren Mittelwert sowie die Standardabweichung (STAB). Die Daten sind in Tabelle 9 (Seite 52ff.) aufgelistet.

Das Programm RelQuant übernimmt diese Ergebnisse und wertet sie aus; RelQuant rechnet dabei mit einem definierten Standard. In dieser Arbeit wurde als Standard in allen PCR-Läufen native HPAF-2-cDNA verwendet. Das Programm errechnet die Quotienten Standard zu Probe unter Berücksichtigung eines Leerwertes (DMPC-H₂O) sowie der Differenz zwischen VEGF-cDNA und β_2 -Mikroglobulin-DNA. Auf diese Weise ergeben sich relative Konzentrationsdifferenzen, die in Abbildung 13 (Seite 55-56) für die drei untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien aufgelistet sind. Die Ergebnisse zeigen somit das Verhältnis der Menge an Boten-RNA codierend für VEGF in einer Probe im Vergleich zum Standard.

Die Messungen wurde für alle drei Zelllinien in drei Serien mit Doppelbestimmungen durchgeführt (n = 6).

5. Ergebnisse

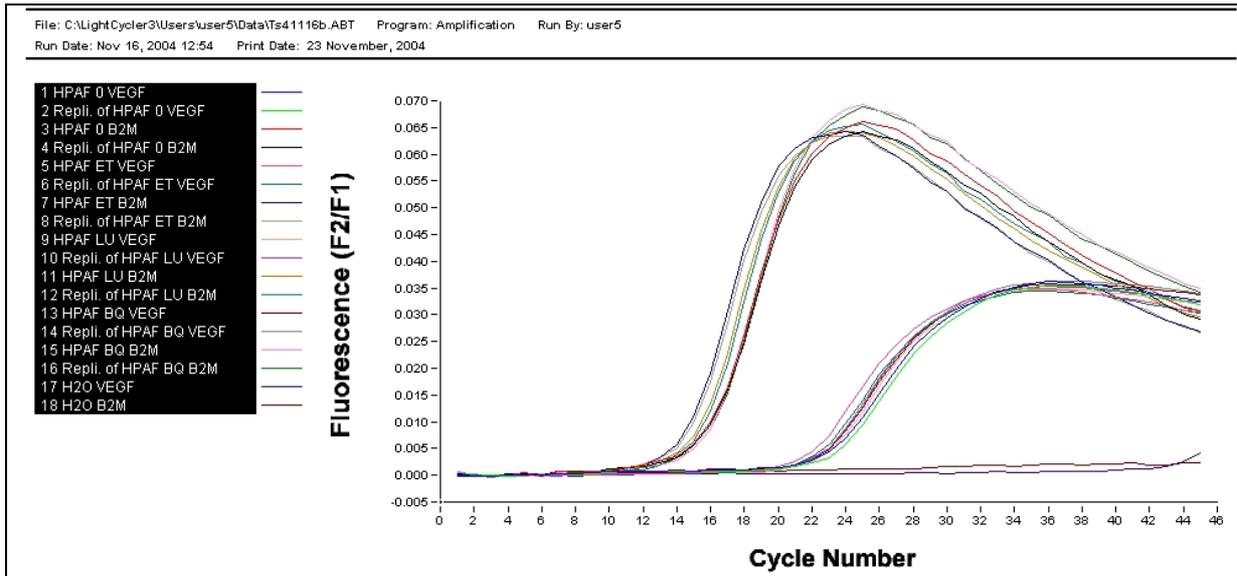


Abbildung 12: Exemplarische Real-time PCR-Fluoreszenzkurven (vgl. Text).

Tab. 9a: MiaPaCa-2

	1. Messung	2. Messung	Mittelwert	STAB	Delta CP
nativ	22,04	22,09	22,07	0,04	5,00
	17,05	17,07	17,06	0,01	
	21,97	22,03	22,00	0,04	5,30
	16,73	16,86	16,80	0,09	
	24,79	24,62	24,71	0,12	6,13
	18,49	18,67	18,58	0,13	
ET-1	22,94	22,09	22,52	0,60	5,58
	17,63	17,44	17,54	0,13	
	21,87	21,72	21,80	0,11	6,29
	15,44	15,58	15,51	0,10	
	23,06	22,96	23,01	0,07	6,44
	16,50	16,64	16,57	0,10	
LU	19,13	19,46	19,30	0,23	4,39
	14,88	14,93	14,91	0,04	
	19,82	19,74	19,78	0,06	4,61
	14,87	15,47	15,17	0,42	
	22,98	22,71	22,85	0,19	5,74
	17,00	17,20	17,10	0,14	
BQ	18,93	19,68	19,31	0,53	4,04
	15,29	15,23	15,26	0,04	
	19,62	19,54	19,58	0,06	4,35
	14,35	14,76	14,56	0,29	
	24,71	25,01	24,86	0,21	5,08
	19,94	19,62	19,78	0,23	

Tab. 9b: AsPC-1

	1. Messung	2. Messung	Mittelwert	STAB	Delta CP
nativ	23,63	24,19	23,91	0,40	7,88
	16,04	16,03	16,04	0,01	
	23,99	23,46	23,73	0,37	6,26
	17,47		17,47		
	21,53	21,59	21,56	0,04	6,28
	15,25	15,32	15,29	0,05	
ET-1	24,27	24,68	24,48	0,29	8,39
	16,04	16,13	16,09	0,06	
	22,63	22,80	22,72	0,12	5,94
	15,94	17,61	16,78	1,18	
	23,82	24,01	23,92	0,13	7,88
	16,07	16,01	16,04	0,04	
LU	22,86	23,10	22,98	0,17	6,61
	16,23	16,50	16,37	0,19	
	22,97	23,12	23,05	0,11	5,90
	16,49	17,81	17,15	0,93	
	23,77	23,78	23,78	0,01	7,58
	16,15	116,24	66,20	70,77	
BQ	22,11	22,09	22,10	0,01	6,88
	15,13	15,31	15,22	0,13	
	25,95	25,88	25,92	0,05	7,70
	18,24	18,20	18,22	0,03	
	24,14	24,50	24,32	0,25	7,73
	16,59	16,58	16,59	0,01	

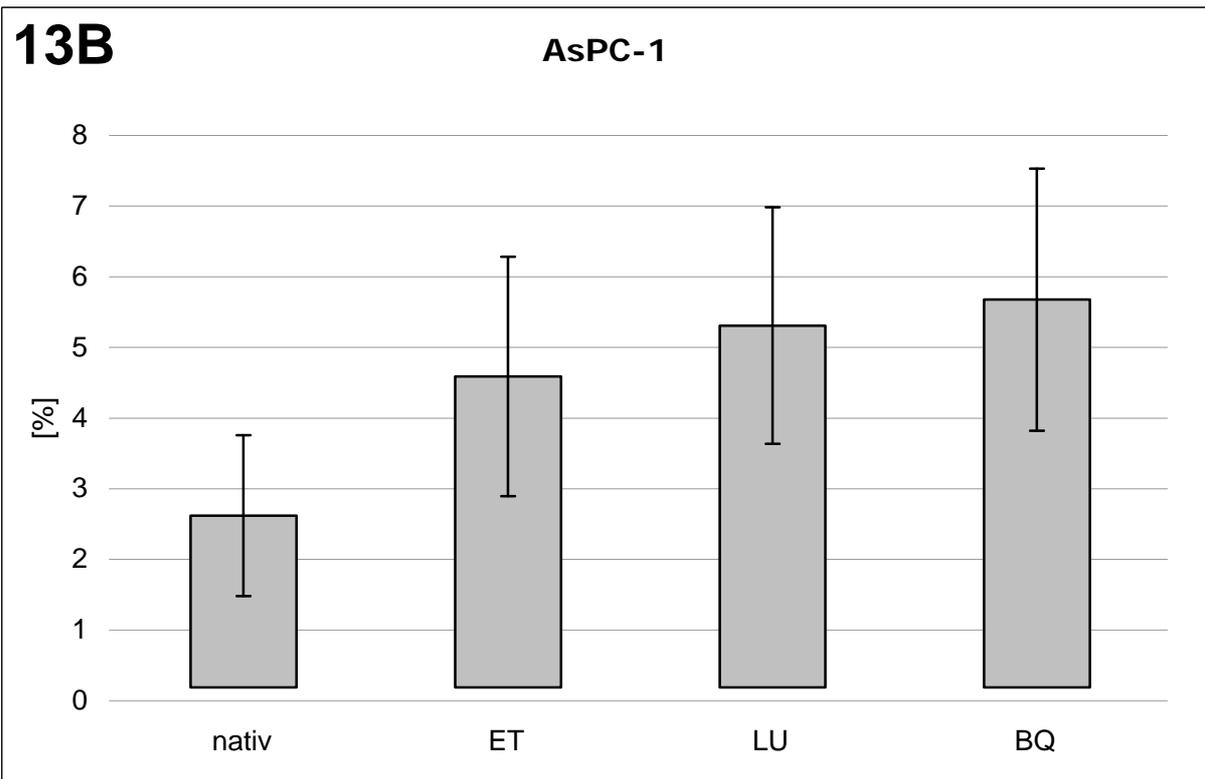
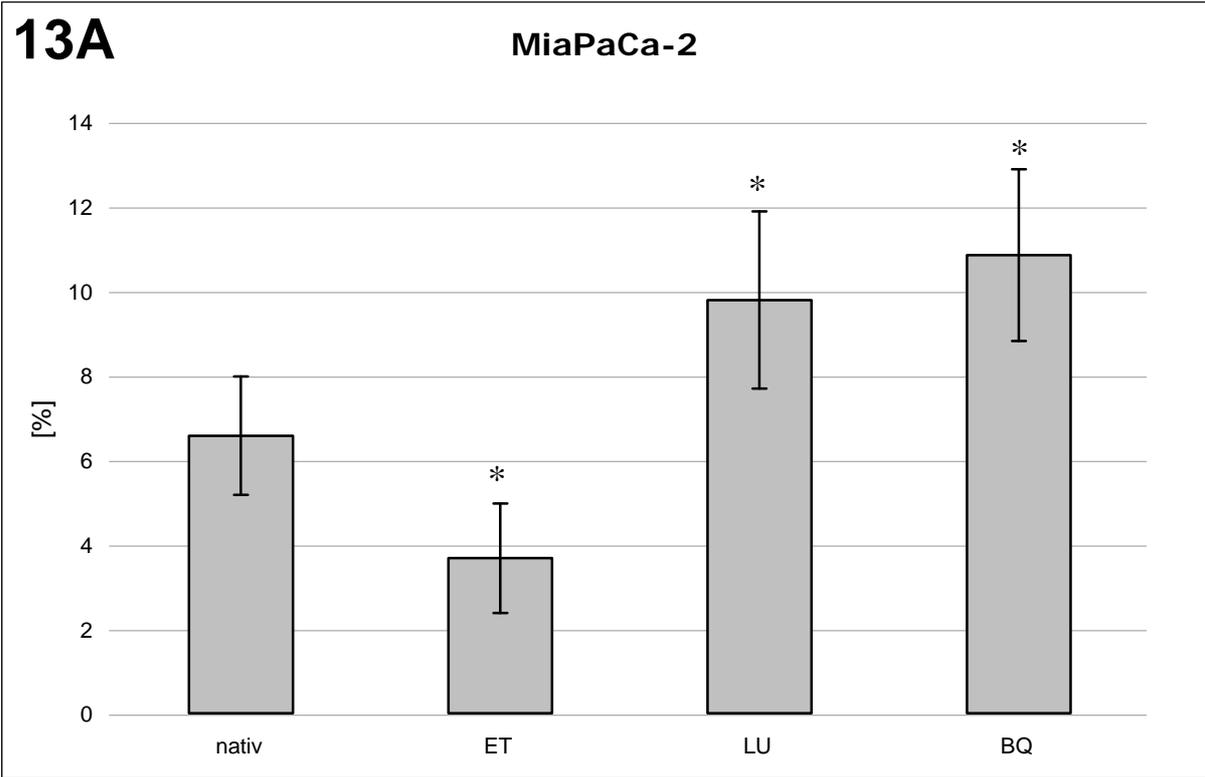
Tab. 9c: HPAF-2

	1. Messung	2. Messung	Mittelwert	STAB	Delta CP
nativ	22,77	23,04	22,91	0,19	7,41
	15,48	15,51	15,50	0,02	
	20,19	20,50	20,35	0,22	7,23
	13,02	13,20	13,11	0,13	
	20,35	20,66	20,51	0,22	6,87
	13,65	13,62	13,64	0,02	
ET-1	21,45	21,91	21,68	0,33	7,61
	13,99	14,15	14,07	0,11	
	21,66	21,50	21,58	0,11	6,55
	14,95	15,11	15,03	0,11	
	22,01	22,31	22,16	0,21	7,33
	14,82	14,84	14,83	0,01	
LU	22,48	22,18	22,33	0,21	7,54
	14,71	14,87	14,79	0,11	
	22,51	22,57	22,54	0,04	7,13
	15,31	15,52	15,42	0,15	
	23,20	23,13	23,17	0,05	8,41
	14,73	14,77	14,75	0,03	
BQ	22,23	22,15	22,19	0,06	6,58
	15,57	15,64	15,61	0,05	
	22,29	22,51	22,40	0,16	7,85
	14,42	14,68	14,55	0,18	
	21,96	21,63	21,80	0,23	8,55
	13,12	13,38	13,25	0,18	

Tabelle 9: Quantifizierung der Expression von VEGF-mRNA im Zellysatz nach Behandlung mit ET-1 (ET) oder den ET_A-Antagonisten LU302146 (LU) oder BQ-485 (BQ) sowie bei unbehandelten Zellkulturen. Die Ergebnisse sind getrennt dargestellt für die drei untersuchten ET_A-positiven Zelllinien MiaPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2. Eine Doppelzeile gibt jeweils die Messwerte für VEGF (1. Zeile) und b₂-Mikroglobulin (B2M; 2. Zeile) als Doppelbestimmungen (1. und 2. Messung) wieder. Die Software errechnet den Mittelwert, die Standardabweichung (STAB) und den Crossing Point (Delta CP). Für jeden Studienarm (nativ, ET, LU, BQ) wurden Zellkulturen in drei Serien angesetzt. Die RNA nativer HPAF-2-Zellen der ersten Serie wurde als Standard für sämtliche Messungen benutzt (fett-kursiv gedruckt).

Die in der Tabelle 9 (Seite 52-54) dargestellten Ergebnisse der Real-time-PCR sind nach Auswertung durch die Software RelQuant in Abbildung 13 (Seite 55-56) zusammengefasst.

Bei MiaPaCa-2 war die für VEGF codierende mRNA nach ET-1-Applikation signifikant reduziert, nach Gabe der Antagonisten signifikant gesteigert. Bei AsPC-1 zeigten sich nach Zugabe von ET-1 bzw. den Antagonisten keine signifikanten Differenzen, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen waren die Werte allerdings erhöht (nicht signifikant). Bei HPAF-2 wurde unter Applikation von LU302146 eine signifikante Reduktion der VEGF-mRNA-Konzentration gesehen, unter ET-1 und BQ485 keine signifikanten Unterschiede.



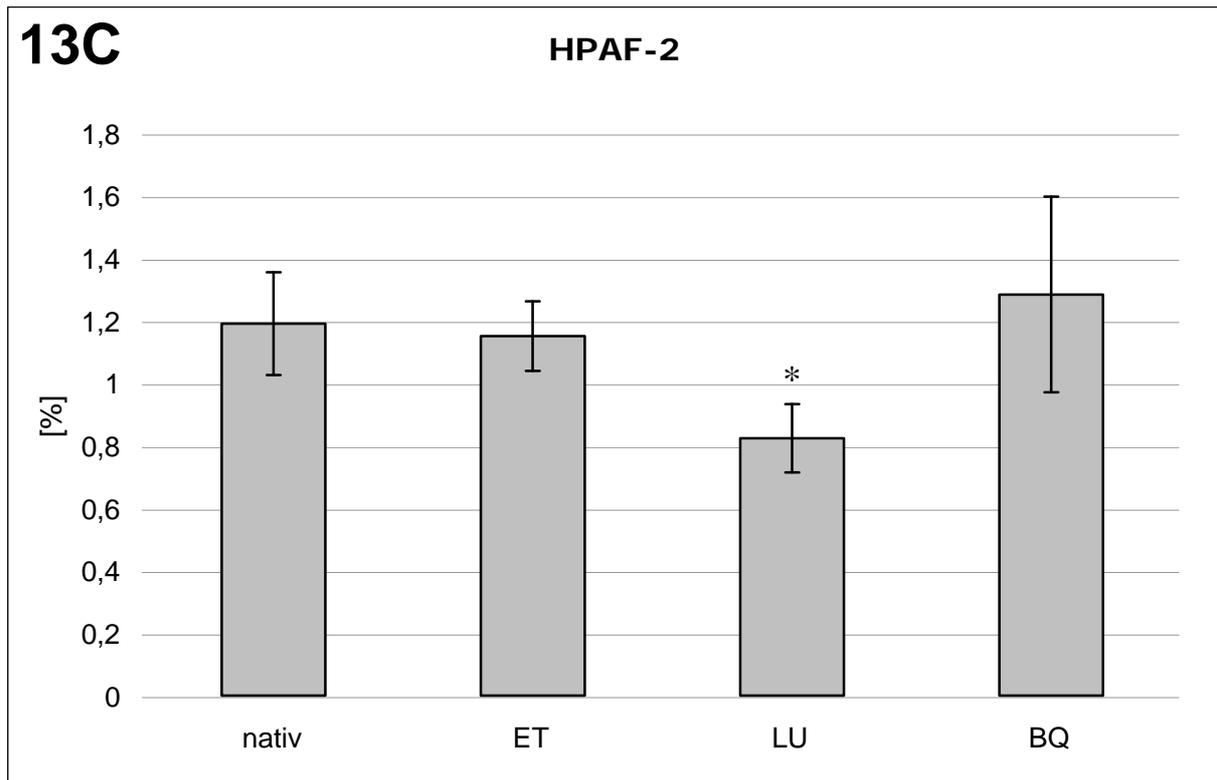


Abbildung 13: Ergebnisse der Real-time-PCR bei MiaPaCa-2 (A), AsPC-1 (B), HPAF-2 (C) nach Applikation von ET-1 (ET) oder den ET_A-Antagonisten LU302146 (LU) oder BQ-485 (BQ). Die Säulen stellen die errechneten Konzentrationen von mRNA codierend für VEGF in den Proben relativ zum Standard dar. Als Standard wurde native HPAF-RNA definiert; (* = signifikant).

5.1.7 Beeinflussung der VEGF-Proteinsekretion humaner Pankreaskarzinomzellen durch das ET-System

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode wurde zunächst eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen der Proteinstandardreihe erstellt. Diese ist in Abbildung 14 (Seite 57) dargestellt. Anschließend konnte so die Gesamtproteinkonzentrationen in den einzelnen Proben bestimmt werden, um dann im Western Blot äquivalente Mengen einzusetzen. Die gemessenen Konzentrationen sind in Tabelle 10 (Seite 57) angegeben.

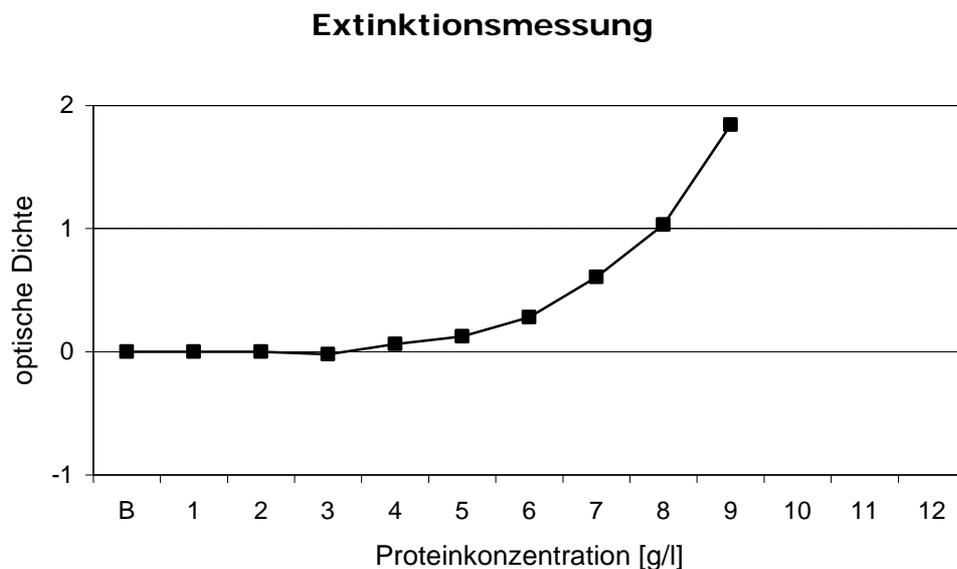


Abbildung 14: Eichkurve mit definierten Gesamtproteinkonzentrationen (B = Leerwert).

Zell-Linie	Applika- tion	Proteinkonzentra- tion [$\mu\text{g/ml}$]
MiaPaCa-2	0	5.062
	ET	3.945
	LU	4.754
	BQ	3.970
AsPC-1	0	726,03
	ET	609,65
	LU	574,00
	BQ	1.404,90
HPAF-2	0	2.941,60
	ET	3.020,20
	LU	3.297,00
	BQ	4.420,20

Tabelle 10: Gesamtproteingehalt in den Proben der drei Pankreaskarzinomzelllinien nach Inkubation mit dem Agonisten ET-1 und den ET_A-Antagonisten. 0 = native Zellen; ET = ET-1; LU = LU-302146; BQ = BQ485.

5.1.8 Qualitativer Nachweis von VEGF im Western-Blot

Der Westernblot diente zur qualitativen Bestätigung von VEGF-Protein in Pankreaskarzinomzellen, bevor die Quantifizierung mittels ELISA (siehe 5.1.9) erfolgte.

Anhand des Dual Color Markers ließ sich die untere Bande als die prädominante VEGF-Isoform (VEGF₁₆₅) identifizieren. Im Westernblot konnte VEGF-Protein in allen hier verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden, sowohl bei nativen als auch bei behandelten Zellen. Die Abbildung 15 (Seite 58) zeigt die Ergebnisse exemplarisch für MiaPaCa-2 und HPAF-2.

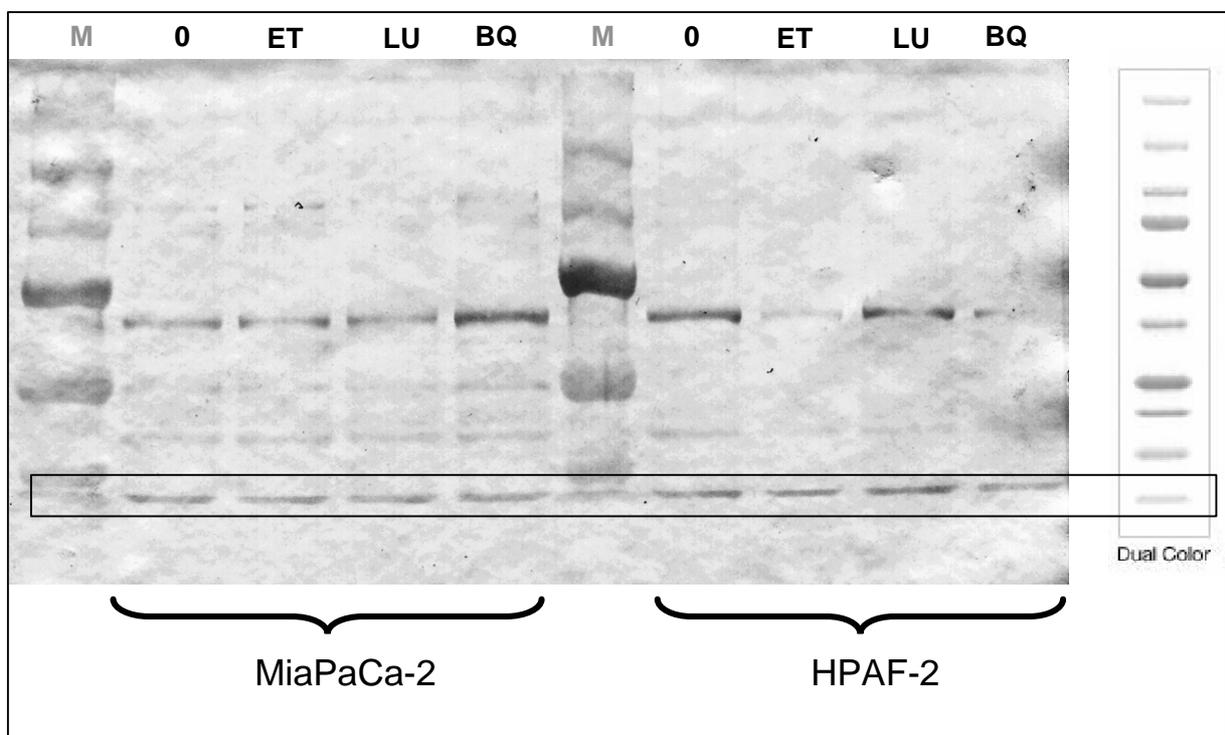


Abbildung 15: Im Western Blot werden die VEGF₁₆₅-spezifischen Banden exemplarisch bei den Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und HPAF-2 dargestellt. M = Dual Color-Marker; 0 = native Zellen; ET = Endothelin-1; LU = LU-302146; BQ = BQ485. Im Kasten: die untere Bande indiziert VEGF₁₆₅. In allen untersuchten Zelllinien wird VEGF-Protein sezerniert.

5.1.9 Quantifizierung von VEGF nach Inkubation mit ET-1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels ELISA

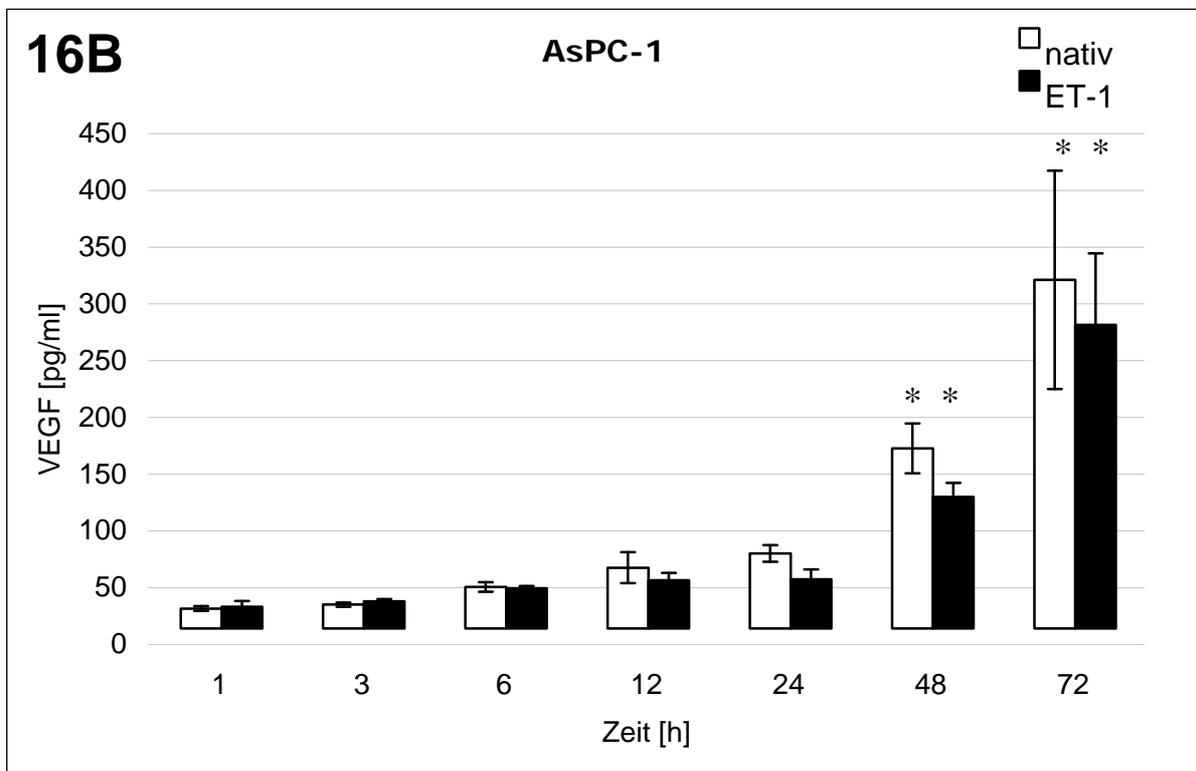
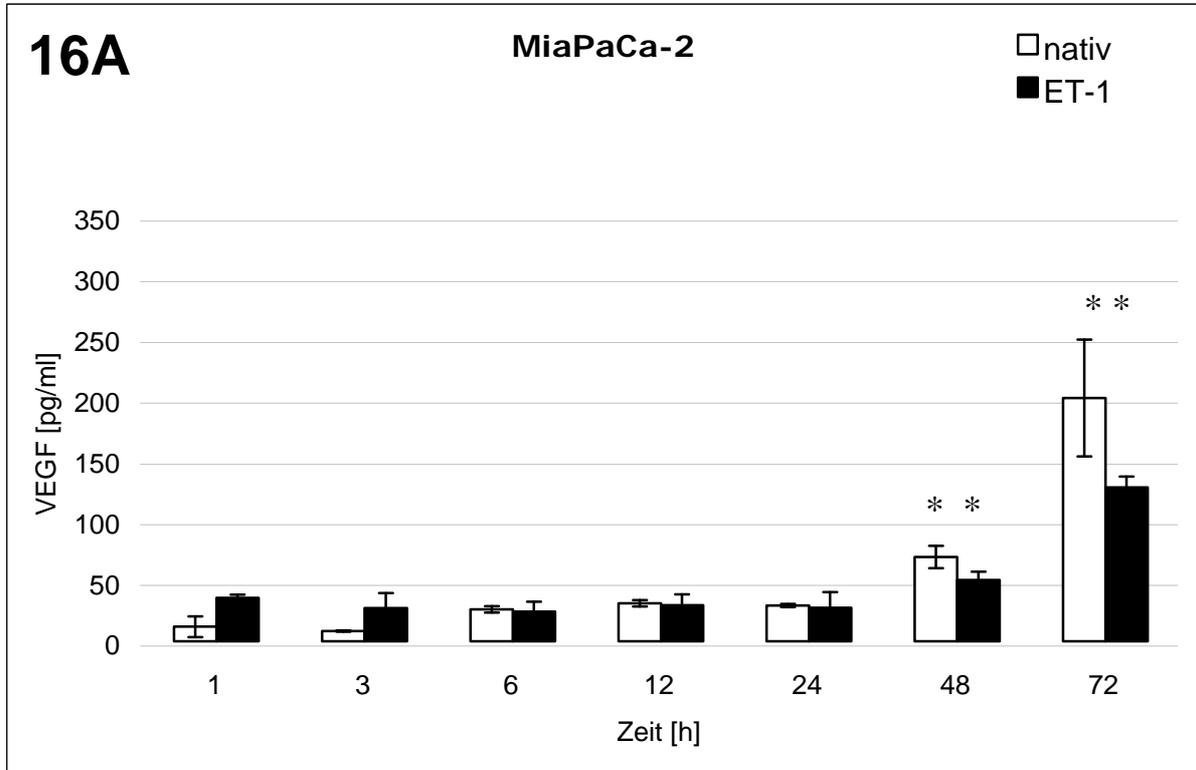
Im VEGF-ELISA wurde die Sekretion von VEGF in das Zellkulturmedium zeitabhängig in Intervallen von 1 bis 72 Stunden quantitativ untersucht. Es wurden native Zellkulturen mit Kulturen nach Applikation von 1 μ M ET-1 verglichen.

Die Ergebnisse (Abbildung 16, Seite 59-60) zeigten eine kontinuierliche Zunahme der VEGF-Konzentration über die Zeit bei allen untersuchten Zelllinien. Die Vergleiche von nativen mit

5. Ergebnisse

behandelten Zellen, zeigten keine klaren Differenzen. Die VEGF-Sekretion wurde offensichtlich nicht durch exogene Zugabe von ET-1 beeinflusst.

Die Ergebnisse beziehen sich auf Vierfachbestimmungen (n = 4).



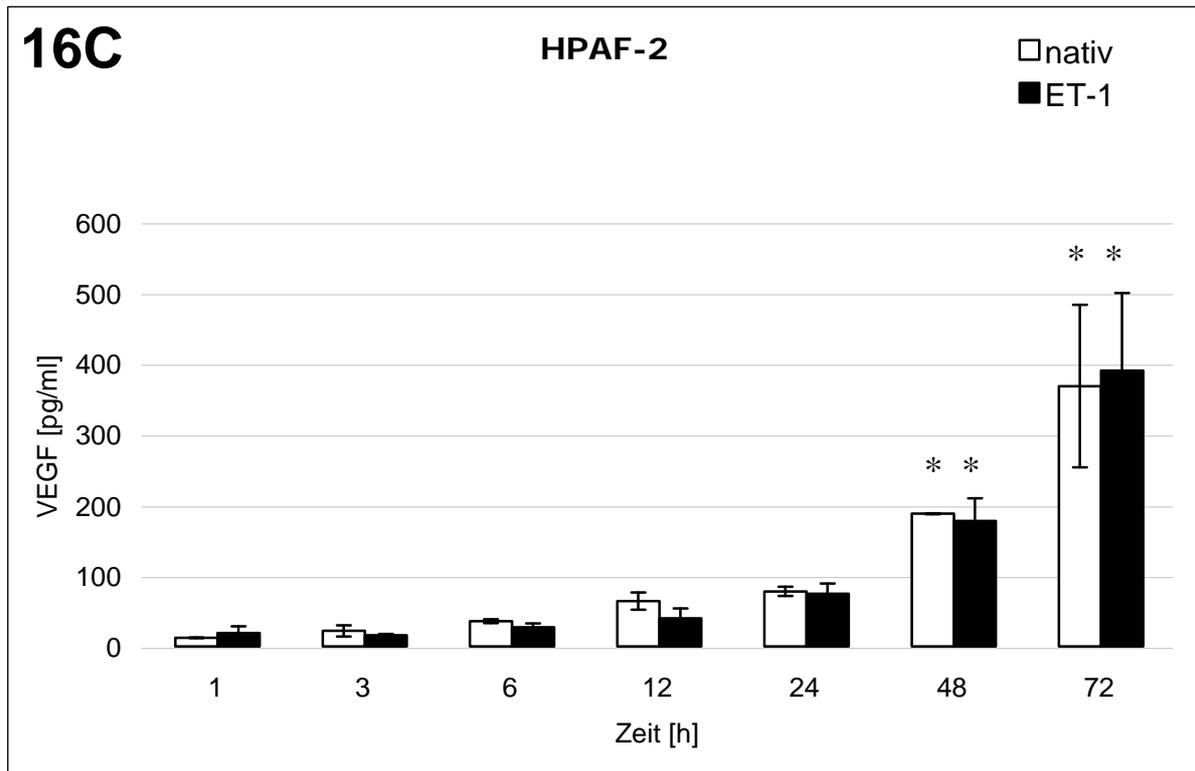


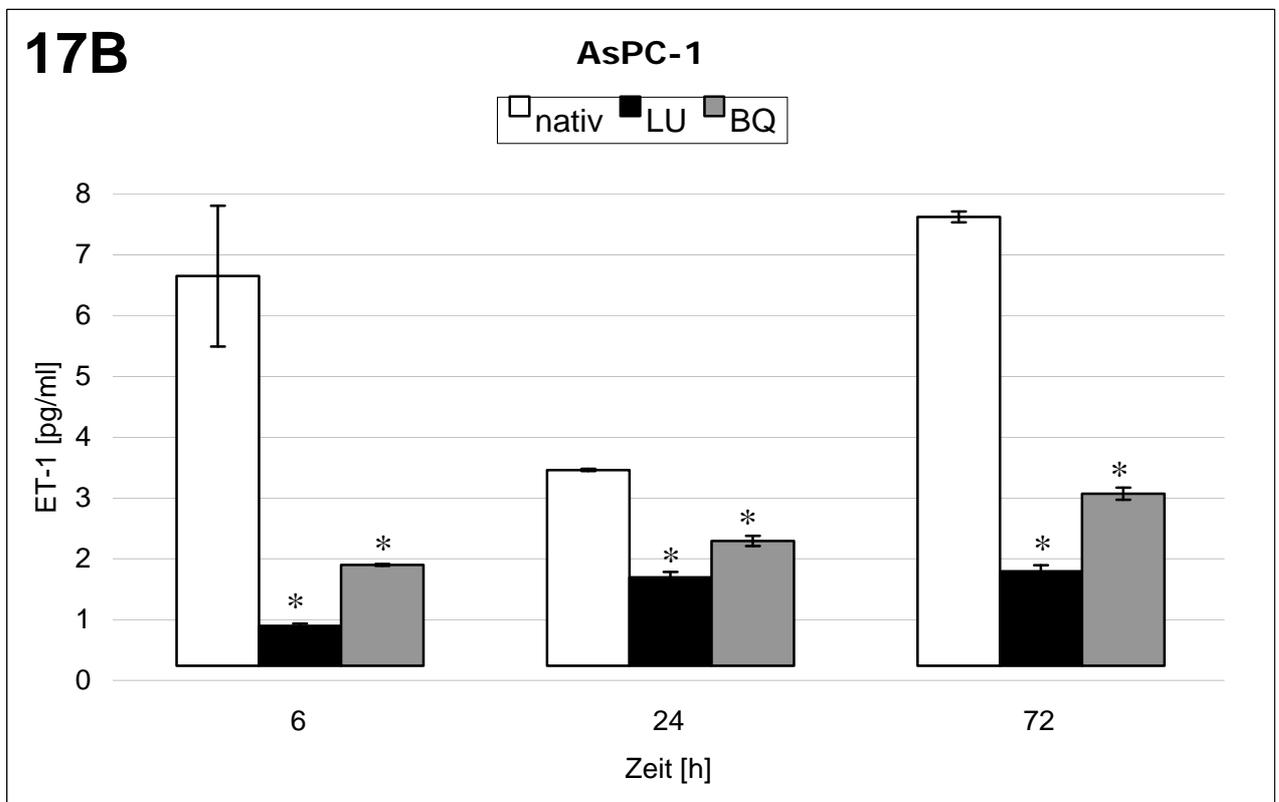
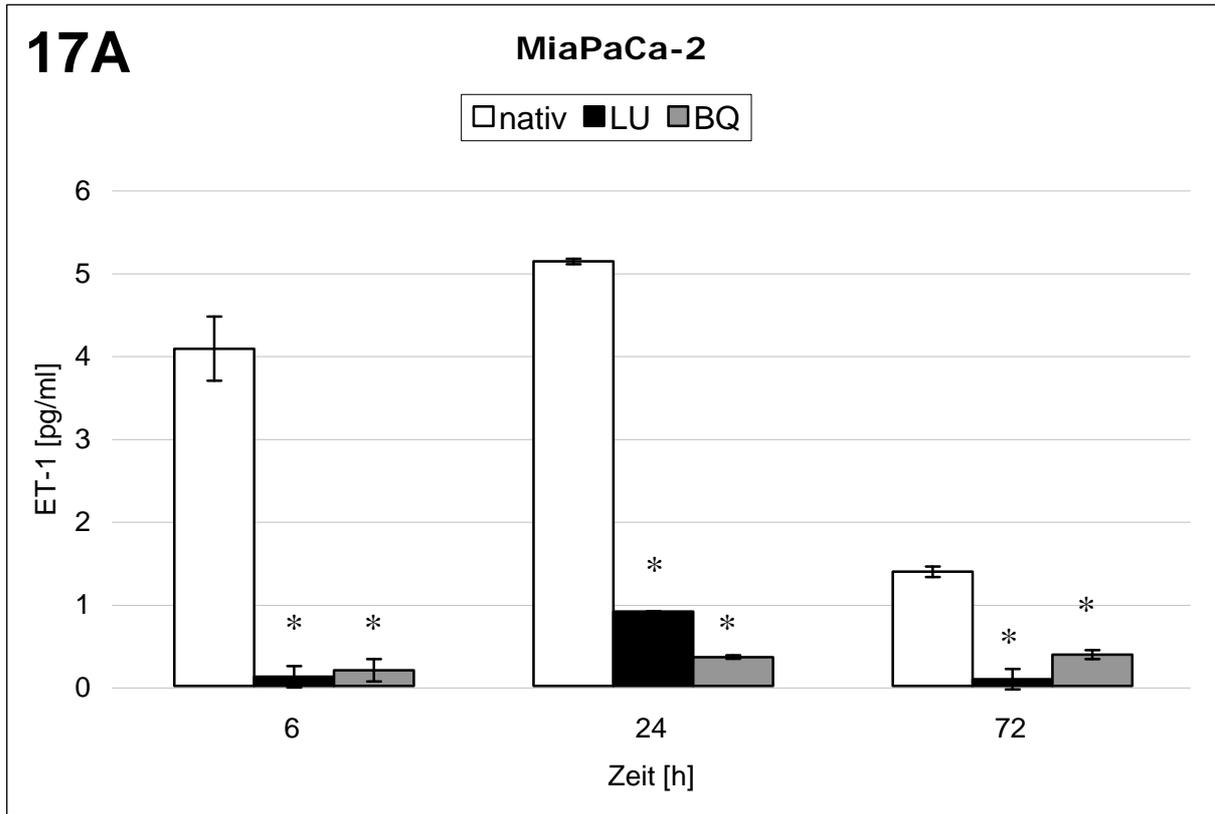
Abbildung 16: Im VEGF-ELISA wurde die Sekretion von VEGF der drei ET_A -positiven Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 in das Zellkulturmedium zeitabhängig registriert. Verglichen wurden Zellen nach Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ ET-1 (■) mit nativen Kontrollzellen (□). Mit der Zeit nimmt die VEGF-Konzentration zu; sie wird nicht von exogener ET-1-Applikation beeinflusst. (* = signifikante Differenz im zeitlichen Verlauf versus Vorwert.)

5.1.10 Quantifizierung von ET-1 nach Inkubation mit ET_A -Rezeptorantagonisten im Vergleich zu unbehandelten Zellen mittels ELISA

In dieser Untersuchung wurden die Zelllinien in den Intervallen 6, 24, 72h mit den ET_A -Antagonisten LU-302146 bzw. BQ485 inkubiert und die ET-1-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA quantifiziert und mit nativen Zellen verglichen.

Bei MiaPaCa-2 konnte eine signifikante Supprimierung der ET-1-Sekretion in das Kulturmedium durch beide ET_A -Antagonisten erzielt werden. Der maximale Effekt wurde nach 24 Stunden erreicht. Bei AsPC-1 war die Wirkung der Antagonisten geringer, dennoch signifikant. Bei HPAF-2 konnte keine signifikante Suppression gezeigt werden.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 (Seite 61-62) dargestellt und beziehen sich auf Vierfachbestimmungen ($n = 4$).



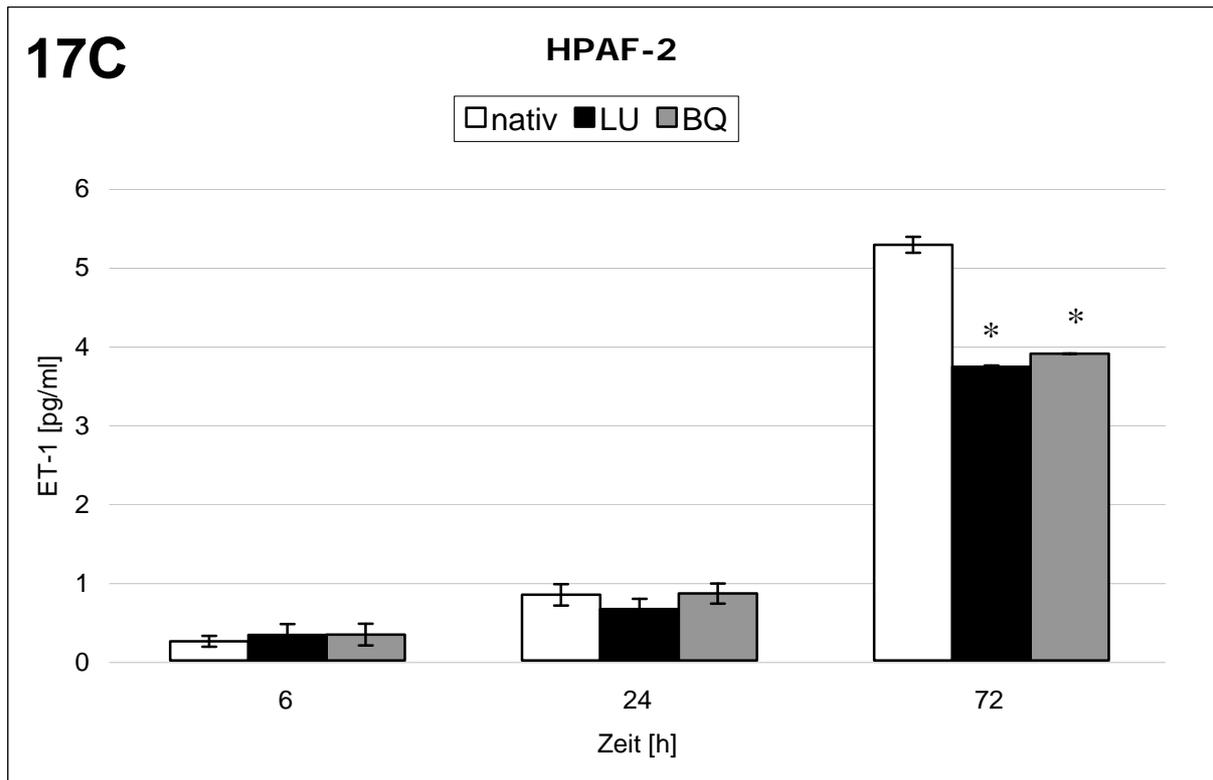


Abbildung 17: Darstellung der Ergebnisse des ET-1-ELISA. Auf der Ordinate sind die ermittelten Konzentrationen an ET-1 in pg/ml im Zellkulturmedium angegeben. Unter Applikation von ET_A -Antagonisten wurde die ET-1-Konzentration bei MiaPaCa-2 und AsPC-1 zu allen bestimmten Zeitpunkten signifikant reduziert; bei HPAF-2 wurde eine signifikante Konzentrationsminderung im 72-Stundenintervall gesehen; (* = signifikant zum Nativwert).

5.2 Ergebnisse der *in-vivo* Untersuchungen

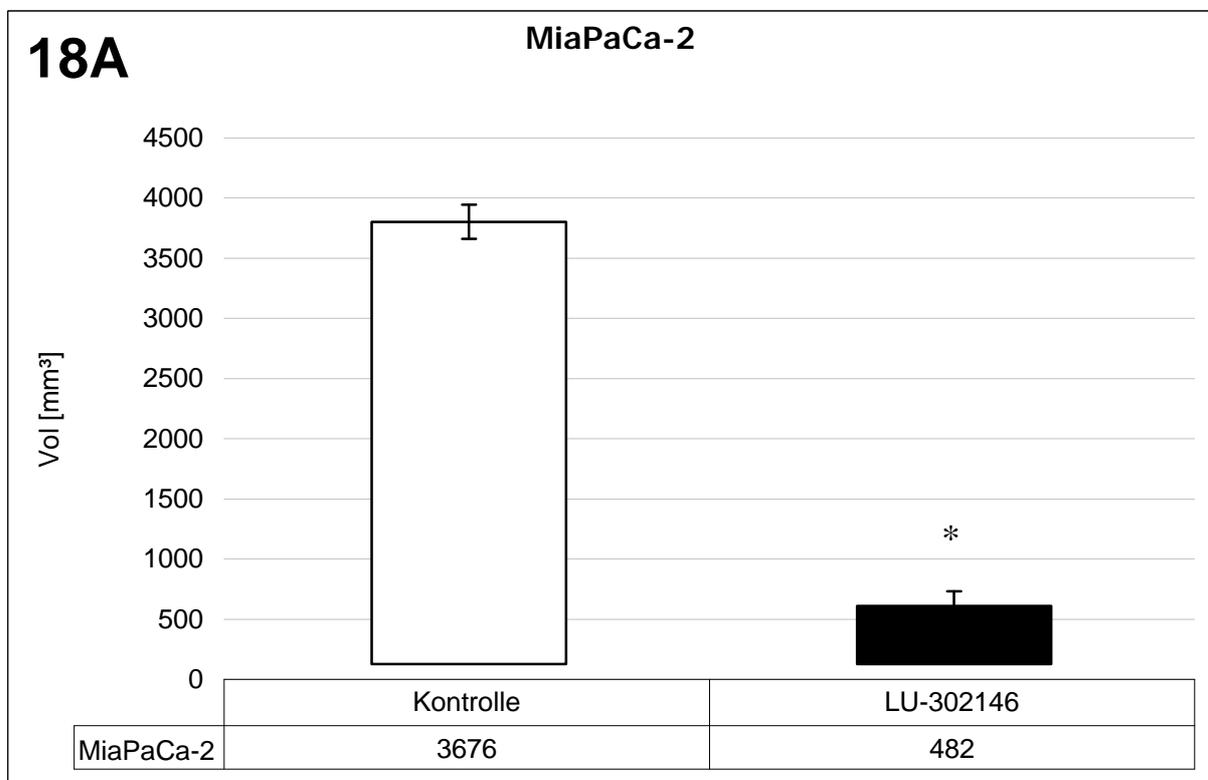
Zur Evaluierung der ET-1–ET_A-Achse *in vivo* wurde ein klinisch relevantes Nacktmausmodell verwendet[119]. Nach orthotoper Implantation von entweder ET_A-positiven Tumoren (MiaPaCa-2, AsPC-1) oder ET_A-negativen Panc-1-Tumoren wurde ET_A selektiv durch orale Applikation von LU-302146 inhibiert.

5.2.1 Einfluß das ET_A-Blockade auf das Primärtumorvolumen

Unter Behandlung mit dem selektiven ET_A-Antagonisten LU-302146 *in vivo* wurde das Primärtumorvolumen der ET_A-positiven Gruppen (MiaPaCa-2 und AsPC-1) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen signifikant vermindert.

Der maximale Effekt in der Reduzierung des Tumorwachstums wurde bei MiaPaCa-2 beobachtet: $3676 \pm 285 \text{ mm}^3$ vs. $482 \pm 247 \text{ mm}^3$ ($p < 0,05$), das entspricht einer Reduktion um 86,8% (Abbildung 18A, Seite 63). Bei AsPC-1 wurde eine geringere, dennoch signifikante Wirkung gesehen: $1733 \pm 213 \text{ mm}^3$ vs. $1248 \pm 152 \text{ mm}^3$ ($p < 0,05$), -27,9% (Abbildung 18B, Seite 64).

In Experimenten mit ET_A-negativen Panc-1-Zellen war das Tumorvolumen nicht beeinträchtigt ($2629 \pm 484 \text{ mm}^3$ vs. $2732 \pm 415 \text{ mm}^3$; +1,0%, Abbildung 18C, Seite 64).



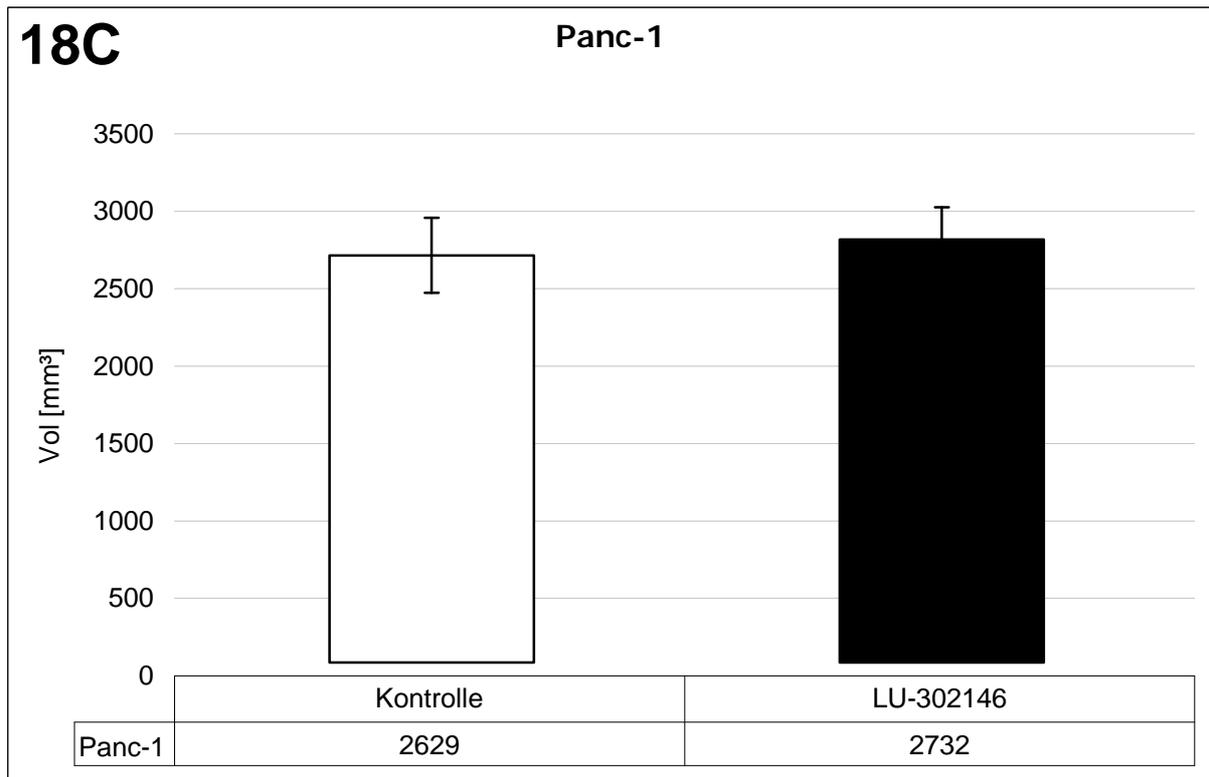
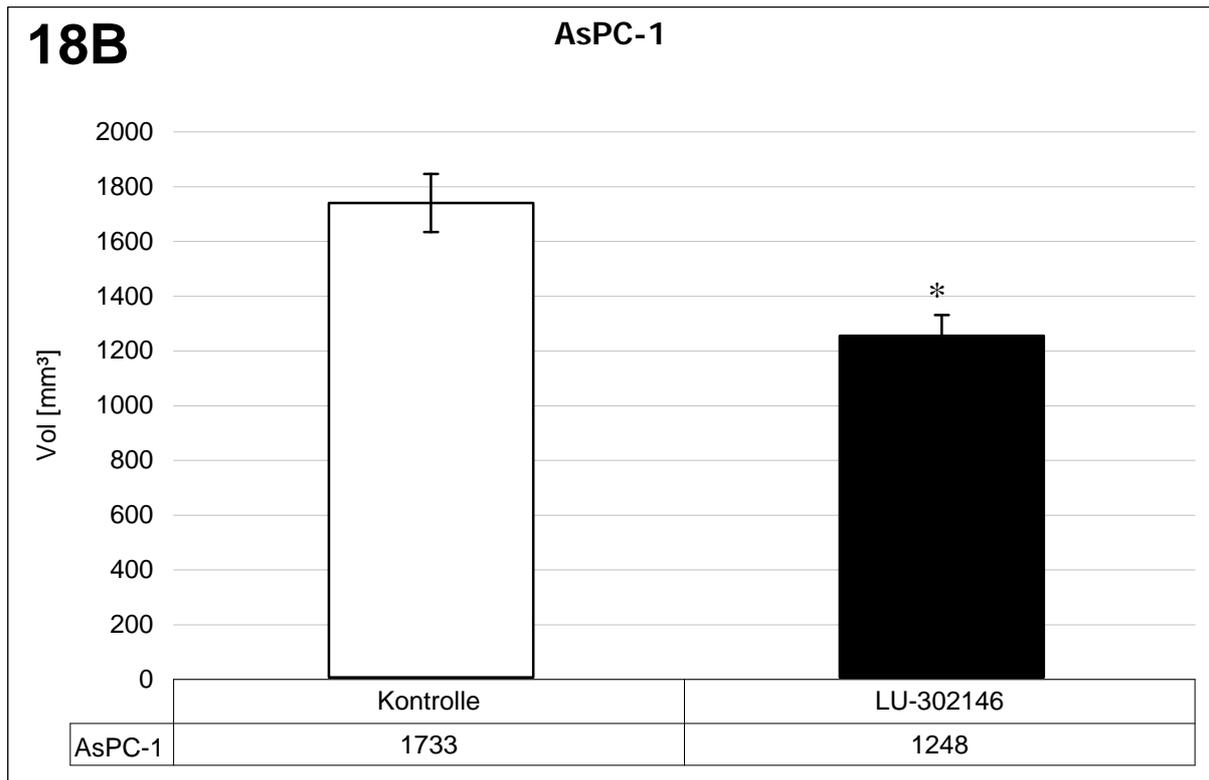
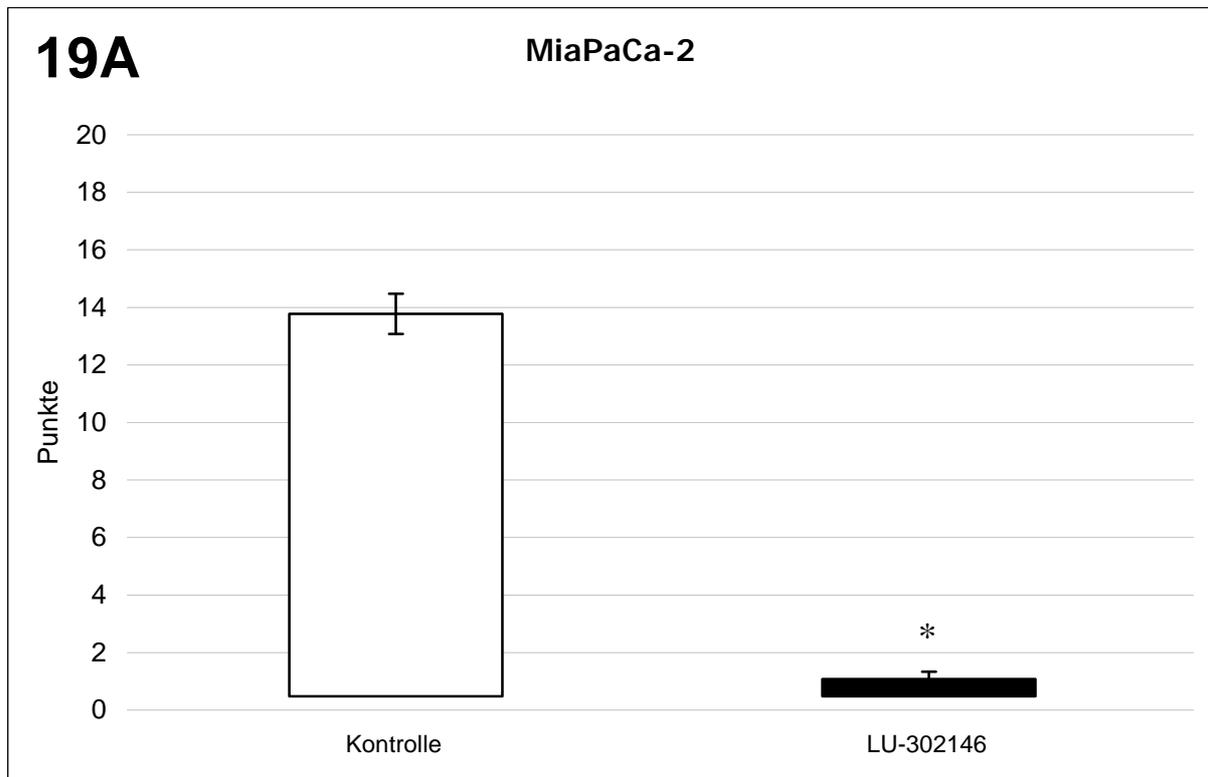


Abbildung 18: Orthotope Pankreaskarzinome wurden in Nacktmäusen aus zwei ET_A-positiven (MiaPaCa-2 und AsPC-1) und einer ET_A-negativen Zelllinie (Panc-1) induziert. Das Volumen des Primärtumors bei den zwei ET_A-positiven Zelllinien wurde durch Applikation des ET_A-Rezeptorantagonisten LU302146 signifikant gesenkt. Bei den ET_A-negativen Panc-1-Tumoren war keine Wirkung zu beobachten. (* = p < 0,05).

5.2.2 Tumordisseminierung unter ET_A-Blockade

Zur Beurteilung der Tumordisseminierung diente der in 4.7.3 beschriebene Disseminierungsscore (angegebene Zahlen entsprechen Punkten). Unter Behandlung mit LU-302146 gelang eine statistisch signifikante Reduktion von lokaler Tumordinfiltration und systemischer Metastasierung der ET_A-positiven Tumore im Nacktmausmodell. In der Kontrollgruppe war die Inzidenz der lokalen Infiltration sowie der Fernmetastasierung signifikant höher als bei MiaPaCa-2 ($13,3 \pm 1,4$ vs. $0,6 \pm 0,5$; $P < 0,05$; Abbildung 19A, Seite 65) und AsPC-1 ($16,9 \pm 1,3$ vs. $12,1 \pm 1,3$; $P < 0,05$; Abbildung 19B, Seite 66). Tumore aus ET_A-negativen Panc-1-Zellen zeigten nach ET_A-Blockade keine Reduktion der lokalen und systemischer Disseminierung ($9,5 \pm 1,7$ vs. $7,5 \pm 1,8$, Abbildung 19C, Seite 66).



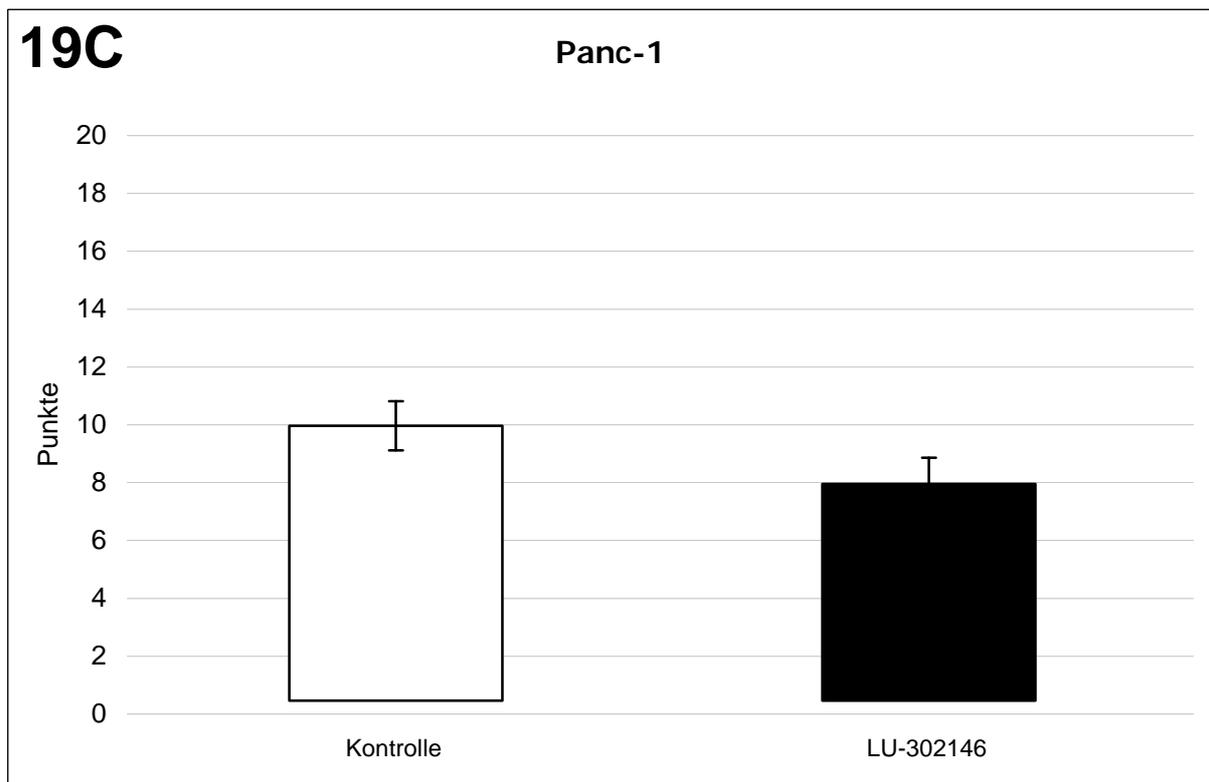
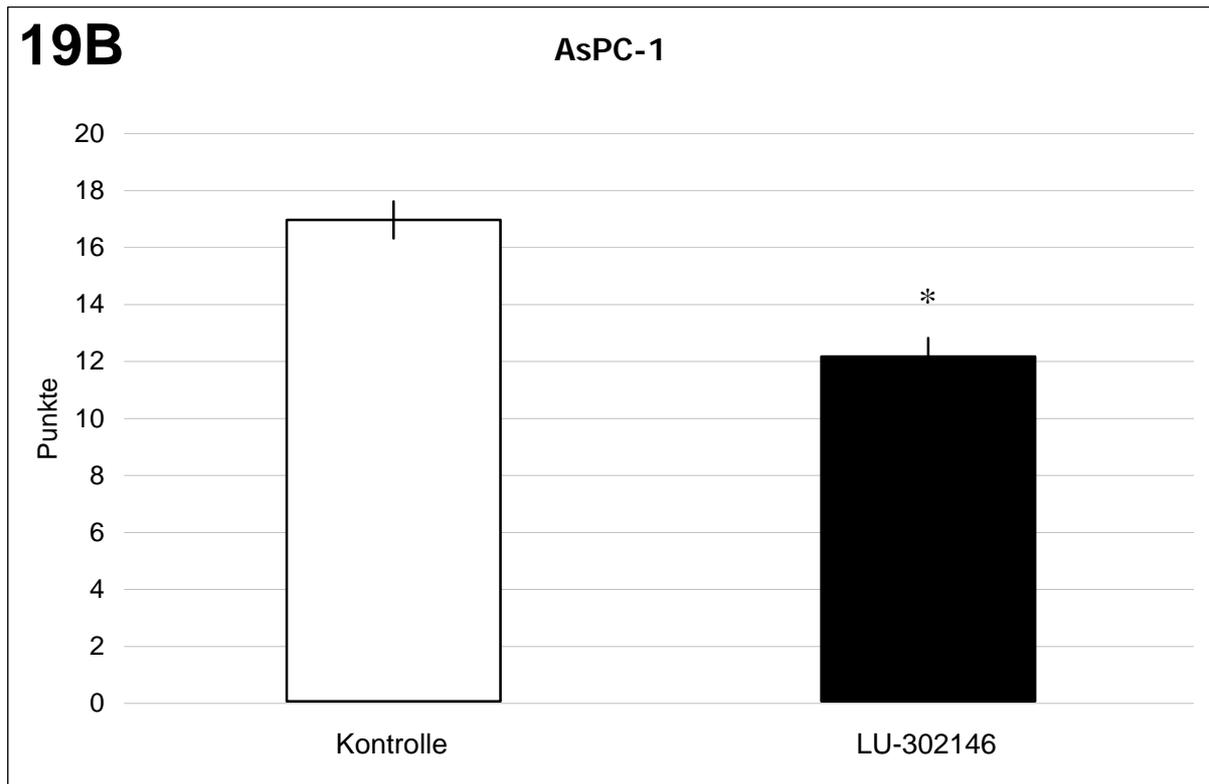
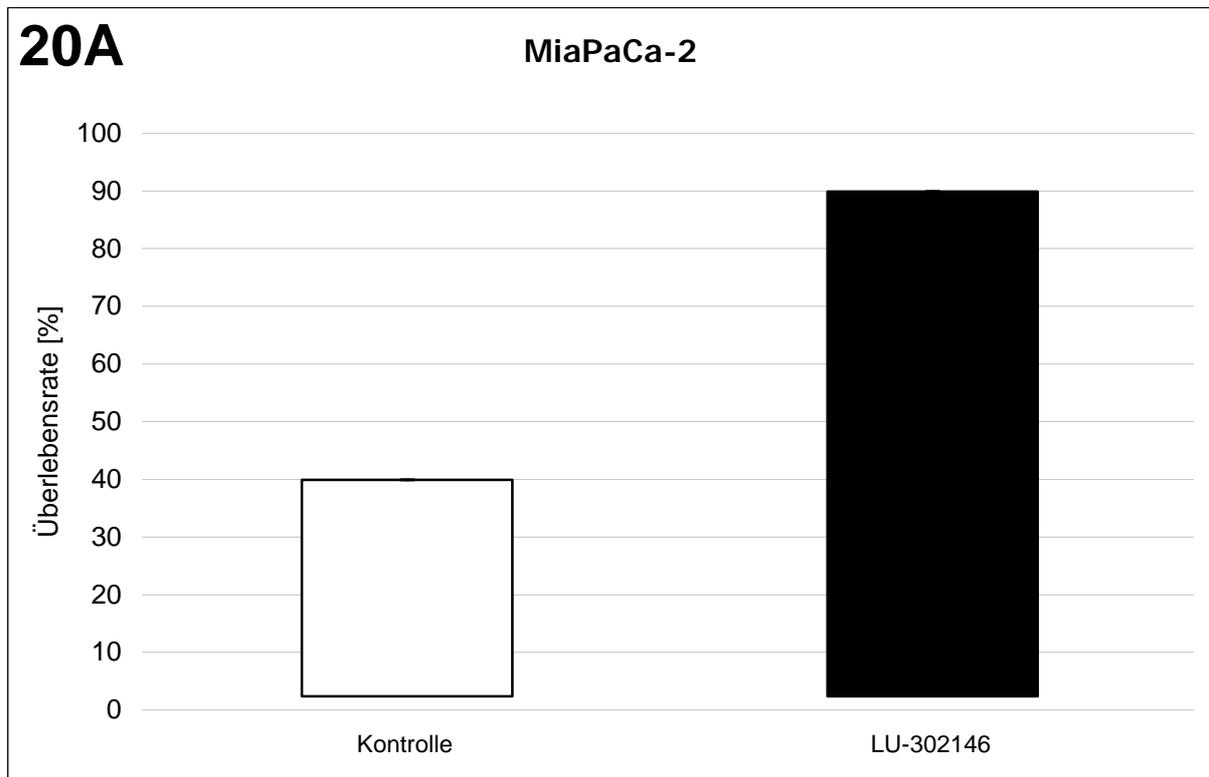


Abbildung 19: c Die lokale und systemische Tumorstreueung wurde nach einem Disseminierungsscore ermittelt und ist in Punkten angegeben. Bei den ET_A-positiven Tumoren MiaPaCa-2 (A) und AsPC-1 (B) zeigten sich signifikante Unterschiede zur Kontrolle nach Rezeptorblockade mit LU-302146 (* = $p < 0,05$). Keine signifikanten Unterschiede fanden sich bei ET_A-negativen Panc-1 (C).

5.2.3 Veränderung der Überlebensrate durch ET_A-Blockade

Die Aggressivität der MiaPaCa-2- und AsPC-1-Tumore bedingte eine schlechte Überlebensrate der Kontrollgruppen nach 14 Wochen (37,5% bzw. 12,5%). Diese Raten konnten unter LU-302146-Therapie auf 87,5% bzw. 62,5% gesteigert werden. Wegen zu geringer Zahl der Versuchstiere (n = 8 pro Gruppe) sind diese Ergebnisse jedoch nicht signifikant. Bei Panc-1 war die Überlebensrate von 37,5% nicht signifikant verändert gegenüber der Kontrollgruppe (50%). Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 (Seite 67-68) dargestellt.



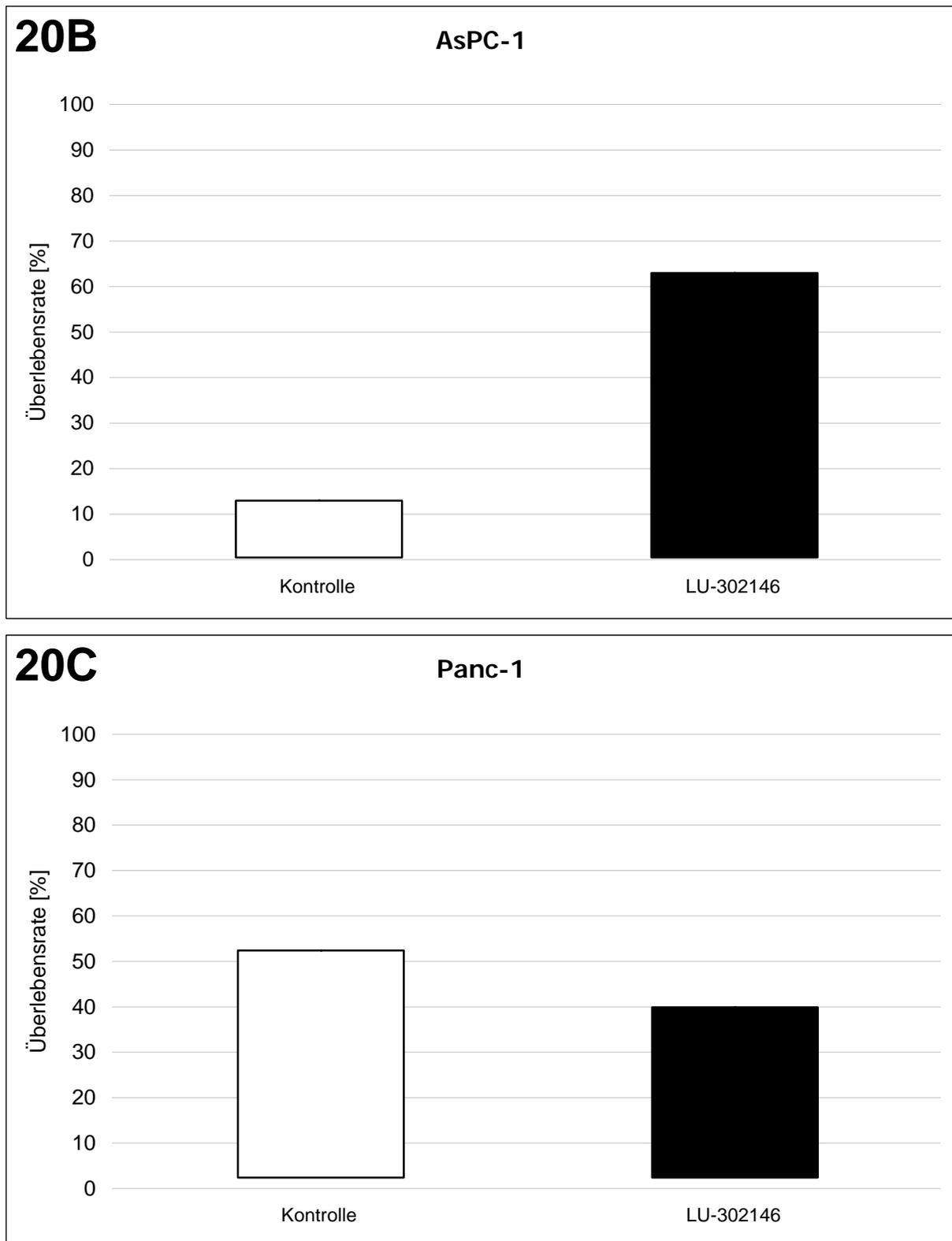
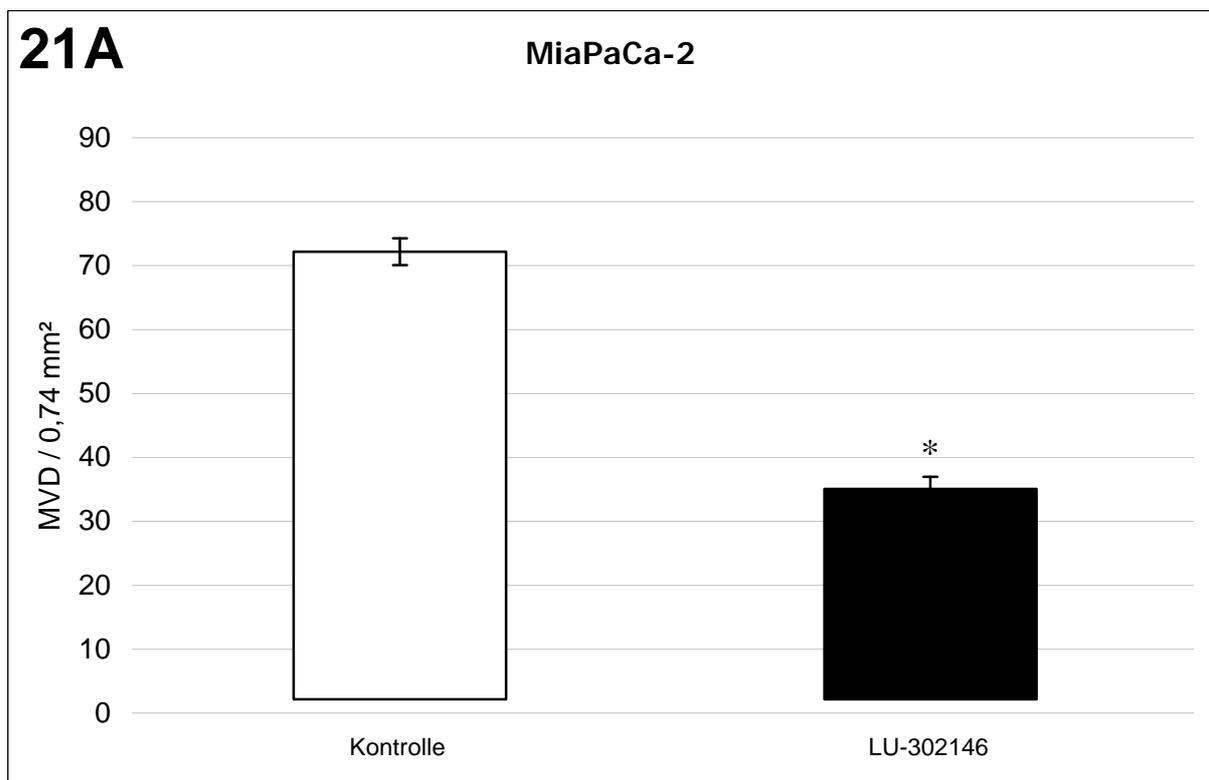


Abbildung 20: Orthotope Pankreaskarzinome wurden in Nacktmäusen aus zwei ET_A -positiven (MiaPaCa-2 und AsPC-1) und einer ET_A -negativen Zelllinie (Panc-1) induziert. Bei den ET_A -positiven Tumoren (A und B) wird durch Applikation von LU-302146 tendenziell eine Verbesserung der Überlebensrate erreicht. Die Resultate sind wegen zu geringer Fallzahl nicht signifikant.

5.2.4 Wirkung der ET_A-Rezeptorblockade auf die Mikrovasculäre Gefäßdichte

Die Mikrovasculäre Gefäßdichte (MVD) wurde als Indikator der angiogenen Aktivität nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-CD31-Antikörpern in Primärtumorgewebe bestimmt, das aus asservierten Proben der oben beschriebenen Experimente gewonnen wurde.

Abbildung 21 (Seite 69-70) zeigt die Verminderung der Gefäßdichte bei Behandlung von ET_A-positiven Tumoren mit dem ET_A-Rezeptorantagonisten LU-302146 im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die MVD bei Tumoren ET_A-negativer Panc-1-Zellen wurde durch Applikation von LU-302146 nicht signifikant verändert.



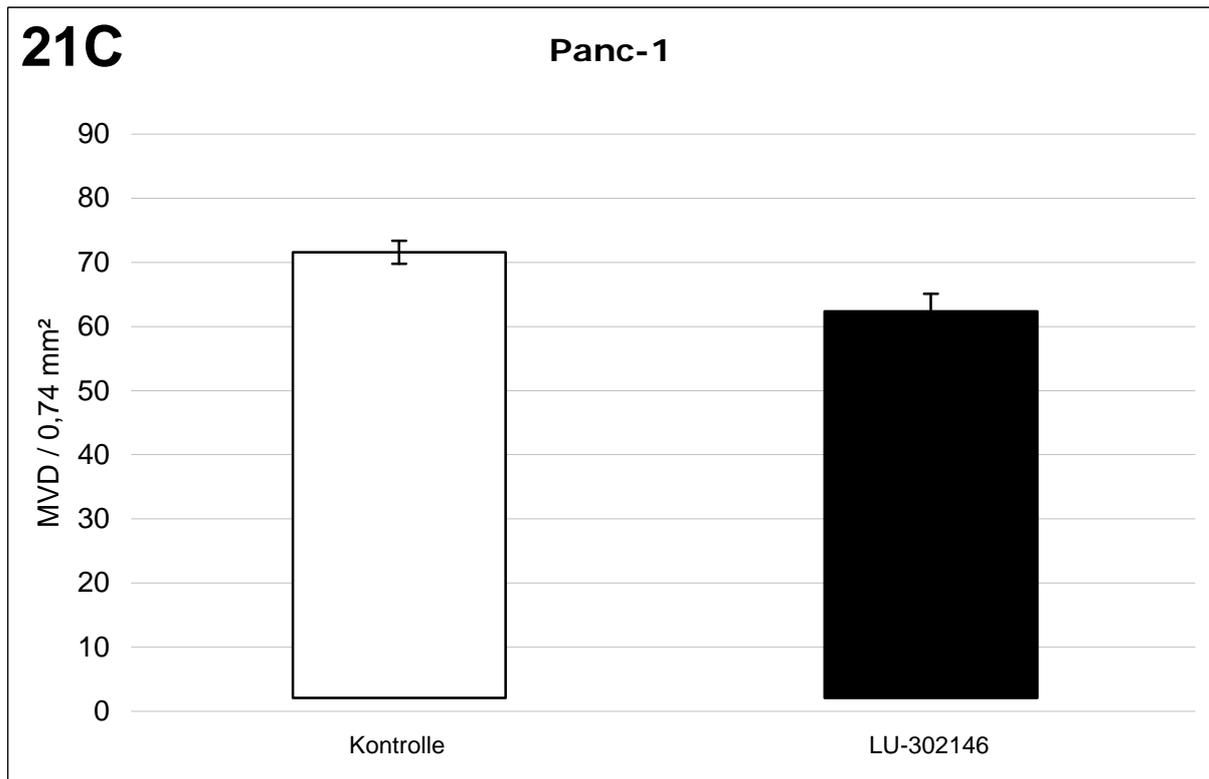
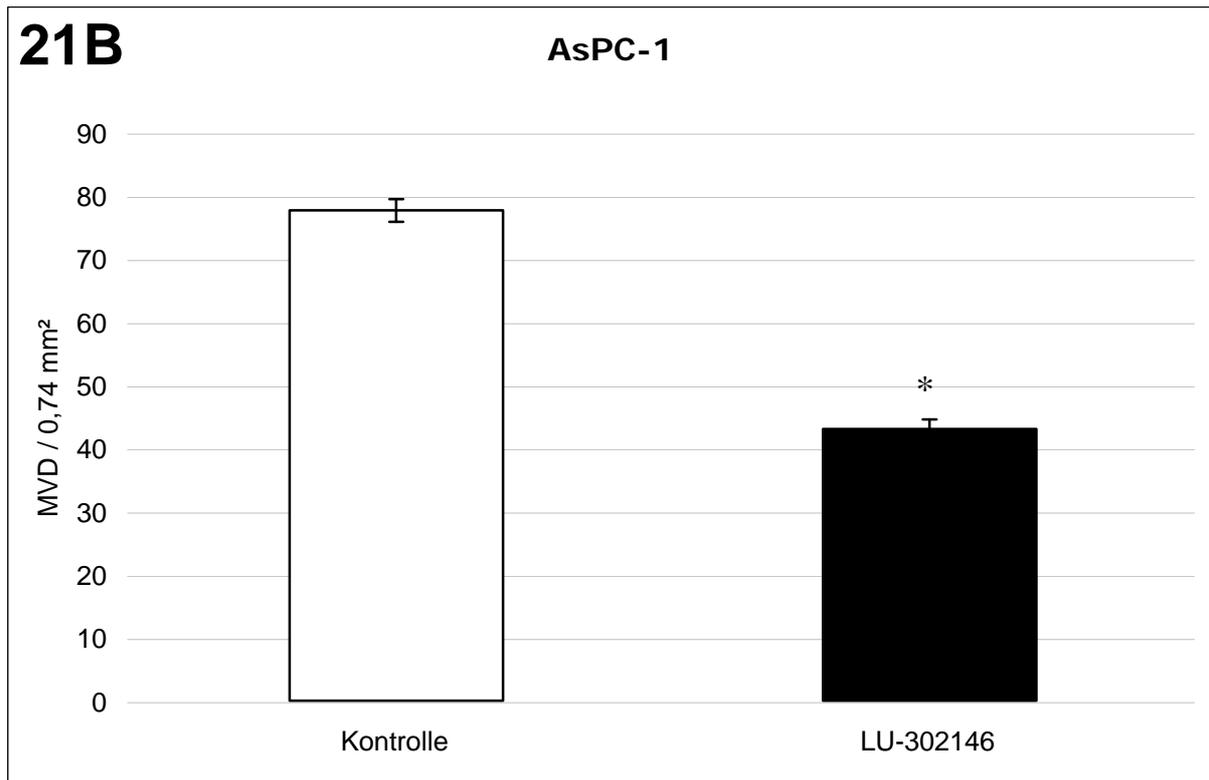


Abbildung 21: Orthotope Pankreaskarzinome wurden in Nacktmäusen aus zwei ET_A-positiven (MiaPaCa-2 und AsPC-1) und einer ET_A-negativen Zelllinie (Panc-1) induziert. Die Mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD) wurde mittels CD31-Immunfärbung quantifiziert. Die Angiogenese war bei MiaPaCa-2 (A) und AsPC-1 (B) unter Therapie mit LU-302146 signifikant supprimiert im Vergleich zu unbehandelten Tumoren. (* = $p < 0,05$)

6 Diskussion

Für das polyfunktionelle Zytokin Endothelin-1 (*ET-1*) wurden seit der Erstbeschreibung 1988 durch YANAGISAWA et al.^[86] außer einer extremen vasokonstriktorisches Wirkung zahlreiche weitere physiologische und pathophysiologische Funktionen beschrieben oder zumindest postuliert. Insbesondere proliferative und zytoprotektive Effekte sind in der Literatur dargestellt, weiterhin auch eine angiogene Komponente via VEGF-Stimulation. Endothelin entfaltet seine Wirkung über die Endothelin-Rezeptoren A (*ET_A*) und B (*ET_B*)^[95], wobei *ET_A* bei Zellproliferation, Apoptosehemmung und Angiogenese diverser Tumorentitäten als essentieller Rezeptor beschrieben wird^[122]. *ET-1* ist ein überwiegend parakrin wirkendes Hormon und kann seine Produktion über einen autokrinen Loop selbst anregen^[123]. Die Mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD) ist im Pankreastumorgewebe höher als in gesundem Pankreasgewebe. Die Expression des angiogenen Schlüsselfaktors VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) korreliert mit der MVD und der Prognose beim Pankreaskarzinom^[33]. Eine Interaktion von *ET-1* mit VEGF ist beschrieben^[124].

Nach der Erkenntnis, daß auch Pankreaskarzinomzellen *ET-1* produzieren^[41], kann eine Involvierung des *ET*-Systems beim Pankreaskarzinom postuliert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des *ET*-Systems beim exokrinen Pankreaskarzinom *in vitro* und *in vivo* unter Berücksichtigung sowohl der Tumorproliferation als auch der Angiogenese charakterisiert werden. Nach Untersuchung des Rezeptorstatus von unterschiedlich differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinien für *ET_A* und *ET_B* wurden *in vitro* Zellkulturen mit selektiven *ET_A*-Antagonisten behandelt und der Effekt auf Proliferation und Angiogenese unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen mit unbehandelten Zellen verglichen. Die gleichen Zelllinien humaner Pankreaskarzinomzellen wurden unter identischen Bedingungen mit exogen appliziertem *ET-1* behandelt. Zur Untersuchung wurden Methoden der Zellbiologie, der Molekularbiologie und der Proteinbiochemie eingesetzt. *In vivo* wurden Nacktmäusen humane Pankreastumore orthotop implantiert. Die Versuchstiere wurden dann mit selektiven *ET_A*-Antagonisten behandelt.

6.1 Effekte des ET-Systems bei Neoplasien

In der Literatur werden zahlreiche Wirkungen der ET-Achse für diverse Tumorentitäten beschrieben. Um die im Ergebnisteil gezeigten Resultate kritisch diskutieren zu können, sollen die aktuellen Erkenntnisse aus der Literatur zunächst systematisch dargestellt werden. In Tabelle 11 (Seite 74) sind die Wirkungen über die beiden Rezeptoren ET_A und ET_B für eine Reihe von Tumorarten aufgelistet. Während physiologisch ET_B überwiegt und bei der Proliferation von Endothelzellen eine wesentliche Rolle zu spielen scheint, ist nach bisherigen Erkenntnissen ET_A der bei Krebserkrankungen dominierende Rezeptor, der, von malignen Zellen exprimiert, eine Reihe von ET-1-Effekten vermittelt. Folgende Ausführungen beziehen sich auf die ET-1–ET_A-Achse.

Proliferation

ET-1 aktiviert verschiedene Kinasen und Liganden, die bei der Zellproliferation involviert sind. Dazu gehört die Protein-Kinase-C, MAPK (mitogen-activated protein kinase), der Epidermal Growth Factor (EGF) und der Insulin-like Growth-Factor-1. Es induziert die „early-response-genes“ c-FOS, c-JUN und c-MYC^[95, 131]. Über den ET_A kann die interzelluläre Kommunikation der Gap-junctions durch ET-1 stark beeinträchtigt werden und so die Wachstumskontrolle überwunden werden^[132].

ET-1 hat somit eine mitogene Wirkung und ist an der Regulierung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung beteiligt. Eine Blockade der ET-Achse in Knockout-Experimenten führte zu schweren Mißbildungen^[133]. ET-1 ist ein *Wachstumsfaktor*.

Anti-Apoptose

ET-1 supprimiert ET_A-vermittelt die Apoptose von Tumorzellen^[131]. Diese Wirkung wurde bisher beim Kolon-Karzinom^[134] und beim Ovarialkarzinom beschrieben^[135]. ET-1 ist damit ein *Survival Factor*.

Angiogenese

VEGF steigert die Expression von Präpro-ET-1-mRNA und die Sekretion von ET-1 in Endothelzellen der Rinderaorta; ET-1 stimuliert die Expression von VEGF-mRNA und Sekretion von VEGF in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte, und zwar direkt und indirekt über ET_A^[124]. Der Effekt ist zeit- und dosisabhängig und wird über HIF-1 α vermittelt^[136]. In humanen Endothelzellen (HUVEC) stimuliert ET-1 seine eigene Synthese über einen autokrinen Loop^[123].

ET-1 wirkt dosisabhängig via ET_B in allen Stadien der Angiogenese ähnlich wie VEGF, und mit diesem auch additiv aber unabhängig: Die Migration, Proliferation und Morphogenese von Endothelzellen wird gefördert, die endotheliale Wundheilung damit beschleunigt^[137]. MMP-2 wird durch ET-1 aktiviert^[5]. ET-1 ist somit auch ein *Angiogenesefaktor*.

Die Beeinflussung der Angiogenese durch ET-1 wurde bisher für Prostata-, Colon und Ovarialkarzinom, für Knochenmetastasen, Astrocytom, Kaposi-Sarkom und für Neubildungen der Lunge sowie bei Mammakarzinom beschrieben^[2, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 126, 138, 139].

Tumorwachstum und Metastasierung

Die Zellmigration und Invasion wird über verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMP) durch ET-1 konzentrationsabhängig gefördert. Eine Aktivierung der MMPs konnte beim Kaposi-Sarkom gezeigt werden. Im Tierexperiment wurde hier mit ET-Antagonisten eine Blockierung des Tumorwachstums erreicht^[103]. ET-1 ist also ein *Metastasierungsfaktor*.

ET-1 verändert die Balance zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zu Gunsten der Knochenbildung^[5].

ET-Antagonismus als Therapiestrategie

Beim Ovarialkarzinom konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, daß durch eine selektive Inhibition von ET_A das Tumorwachstum signifikant gesenkt werden kann. Die VEGF-Sekretion war supprimiert und die Mikrogefäßdichte reduziert, gleichzeitig waren die Zellen für die durch Paclitaxel induzierte Apoptose sensitiver^[98, 136]. Auch beim Prostatakarzinom werden neue Therapieansätze mit selektiven ET_A-Antagonisten wie Atrasentan gesehen^[2].

Eine anti-ET-Therapie könnte demnach eine Doppelstrategie verfolgen: die Tumorprogression kann direkt supprimiert werden; gleichzeitig reduziert die antiangiogene Komponente das Tumorwachstum und die Metastasierung indirekt.

Tabelle 11 (Seite 74): Übersicht der Funktion von Endothelin-1 und seinen Rezeptoren bei verschiedenen Tumorerkrankungen (modifiziert nach BAGNATO und NATALI^[122]). + höhere; – niedrigere Expression der Rezeptoren im Vergleich zum gesunden Normalgewebe; ° = unklar/ keine Daten. In vielen Fällen korreliert die ET-1-Konzentration mit dem Tumorstadium und der Vaskularisierung. Die Angaben zur Wirkung der Rezeptorantagonisten beziehen sich auf experimentelle Ergebnisse, klinische Erkenntnisse sind kursiv dargestellt. Die beschriebenen rezeptorvermittelten Wirkungen sind exemplarisch und können je nach histologischem Subtyp variieren.

6. Diskussion

Tumorentität	ET-1	ET-Rezeptoren	A	B	Wirkung von Rezeptorantagonisten
Prostatakarzinom [2, 5, 102, 125]	stimuliert Wachstum von Prostatakarzinom- zellen, hemmt Apop-tose via ET _A , stimuliert Nozizeptoren, stimuliert Osteoblasten	Hohe Expression von ET _A , verminderte oder fehlende ET _B -Expression, ET _B -Gen oft methyliert.	+	-	<i>Atrasentan lindert Schmerzen und verzögert die Tumorprogression.</i> Supprimiert osteoblastische Knochenmetastasierung
Ovarialkarzinom [5]	Autokriner Wachstumsfaktor, fördert Zellproliferation, -überleben und invasion. Stimulation der VEGF-abhängigen Angiogenese via ET _A .	Erhöhte Expression von ET _A .	+		Atrasentan vermindert die Tumorzellproliferation und das Wachstum von Xenograft. Additive Effekte mit Taxanen.
Melanom	fördert Proliferation und Invasion von Melanomzellen	Downregulation von ET _A ; ET _B ist stärker exprimiert als in benignen Nävi.	+	+	ET _B -Antagonisten vermindern Wachstum von Melanomzellen und reduzieren Wachstum humaner Melanomzellen in Nacktmäusen.
Knochentumore	stimuliert Osteokalzinexpression, Alkalische Phosphatase und Knochenneubildung.	Expression von ET _A und ET _B .	+	+	ET _A -Antagonisten inhibieren die ET-induzierten Effekte.
Mammakarzinom [126, 127, 128]	<i>ET-1-Expression verhält sich reziprok zum Grad der Tumorzelldifferenzierung.</i>	<i>Höhere ET_B-Expression als in normalem Gewebe.</i>	+	+	Apoptoseinduktion und reduziertes Tumorwachstum mit BQ788 und BQ123
Nierenzellkarzinom	Antagonismus zur Paclitaxel-induzierten Apoptose.	Alle Zelllinien exprimieren ET _A .	+	°	(keine Daten)
Bronchialkarzinom	ET-1 wird von den meisten Adenokarzinomen produziert.	Expression von ET _A und ET _B . ET _A ist relativ weniger exprimiert im Vergleich zu normalem Gewebe.	-	+	(keine Daten)
Kolonkarzinom [129, 130]	Protektion von Karzinomzellen vor FasL-induzierter Apoptose. Stimuliert Proliferation von Tumorzellen.	Expression von ET _A und ET _B	+	+/-	Reduktion der Zellproliferation mit ET _{A+B} -Antagonisten. Potenzierung der FasL-vermittelten Apoptose.
Zervixkarzinom	fördert Proliferation von HPV-pos. Zervixkarzinomzell-Linien	Expression von ET _A und ET _B . Bei HPV-pos. Zellen vermehrte ET _A -Expression.	+		Proliferations- und Wachstumsinhibierung mit Atrasentan bei Xenograft. Additive Effekte mit Taxan.
Kaposi Sarkom [103]	fördert Zellproliferation, -migration und -invasion durch MMP über auto-krine Mechanismen.	Expression von ET _A und ET _B	+	+	ET _{A+B} -Antagonisten reduzieren die ET-1-induzierte Zellproliferation und -invasion. Inhibierung des Tumorwachstums in Nacktmäusen.
ZNS-Tumore	fördert die Proliferation von Meningeomzellen	Expression von ET _A und ET _B	+	+	Antagonisierung von ET-1-induzierten Effekten mit BQ123

6.2 Eigene Ergebnisse

OIKAWA et al. beschrieben 1994 erstmals die Produktion von ET-1 bei humanen Pankreaskarzinomzellen^[41]. In der internationalen Literatur gibt es bislang aber keine evidenten Daten über die Bedeutung der ET-Achse beim Pankreaskarzinom.

Zur Exploration einer potentiellen Rolle von ET-1 analog den in der Literatur beschriebenen Effekten bei anderen Tumorentitäten wurden in einem ersten Schritt das Expressionsverhalten von ET-1 sowie den ET-Rezeptoren ET_A und ET_B für mehrere Zelllinien humaner Pankreaskarzinomzellen untersucht. Mittels RT-PCR konnte nachgewiesen werden, daß die Zelllinien Mia-PaCa-2 und AsPC-1 positiv für ET_A sind, während Panc-1 kein ET_A exprimieren. ET_B wird von keiner der untersuchten Zelllinien exprimiert (Abb. 6, Seite 39).

Wir postulierten, daß beim Pankreaskarzinom ET_A der für die Signaltransduktion entscheidende Rezeptor ist, falls das ET-System bei diesem Tumor eine Rolle spielt. Dieses Ergebnis ist kongruent zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zu verschiedenen Neoplasien. Die folgenden Studien konzentrierten sich daher auf die ET-1–ET_A-Achse.

Da die Zellen sowohl die Substanz ET-1 als auch einen Rezeptor dafür exprimieren, ist vorstellbar, daß die Tumorzellproliferation von einem autokrinen Loop profitiert. Dieser könnte durch ET_A-selektive Antagonisten unterbrochen werden. Da allerdings auch die ET_{A+B}-negativen Panc-1 ET-1 sezernieren, kann davon ausgegangen werden, daß die Karzinomzellen nicht die primären Effektorzellen sind. Ziel war, den ET_A-moderierten Effekt von ET-1 *in vitro* auf die Zellproliferation und *in vivo* auf das Tumorwachstum sowie auf die Tumorangiogenese des Pankreaskarzinoms zu untersuchen; und zwar dosis- und konzentrationsabhängig.

6.2.1 Effekt der ET-1-ET_A-Achse auf das Proliferationsverhalten *in vitro*

Wirkung ET_A-selektiver Antagonisten *in vitro* auf die Tumorproliferation

In der ersten Untersuchungsreihe konnte gezeigt werden, daß die Proliferationsrate bei ET_A-positiven Zelllinien humaner Pankreaskarzinome durch Applikation von selektiven ET_A-Antagonisten signifikant supprimiert werden kann (Abbildung 7, Seite 41-42). Die beobachteten Effekte waren dosisabhängig und unter hypoxischen Bedingungen deutlich stärker als bei Normoxie ausgeprägt. Bei den ET_A-negativen Zellen Panc-1 wurde kein Effekt gesehen. Diese Ergebnisse zeigen den ET_A-vermittelten Effekt von ET-1 auf die Tumorzellproliferation beim Pankreaskarzinom und stehen in Einklang mit vielen publizierten Studiendaten anderer Tumorentitäten. Zweitens wird ein therapeutisches Potential deutlich, das eine ET-antagonistische Strategie für die Krebsbehandlung bieten könnte.

Ist die Proliferation ET_A -abhängig zu supprimieren, müßte sie durch ET_A -Agonismus bei exogener Applikation von ET-1 stimuliert werden können. Vorausgesetzt, Hypoxie ist ein Stimulus für ET-1 wie in der Literatur beschrieben ^[140], dann wäre die ET-Achse unter Normoxie möglicherweise nur submaximal involviert und ließe sich hier weiter stimulieren. Zur Untersuchung dieser These erfolgten Versuche mit exogen appliziertem ET-1 unter normoxischen Bedingungen.

Keine gesteigerte Tumorzellproliferation nach exogener ET-1-Applikation

In einer ersten Untersuchung der Proliferationsstimulation nach ET-Applikation in verschiedenen Konzentrationen konnte dieses Postulat nicht bestätigt werden. Nach einem Beobachtungsintervall von 72 Stunden wurde in der Zellzählung eine relativ starke Streuung ohne interpretierbare Tendenz gesehen. Eine signifikante Stimulierung durch ET-1 ließ sich nicht erkennen (Abbildung 8, Seite 43-44). Möglicherweise hatten sich die Zahlen von nativen vs. behandelten Zellen allerdings nach dem relativ langen Zeitintervall von 72 Stunden nach initialen Differenzen im Verlauf angeglichen.

Keine zeitabhängigen Unterschiede bei ET-1-Agonismus.

Um den Faktor Zeit bei der Stimulierung mit ET-1 besser beurteilen zu können, erfolgte in anschließenden Untersuchungen im MTT-Assay die Messung der Zellviabilität in variablen Zeitintervallen von 3 bis 72 Stunden. Betrachtet man die Ergebnisse aller drei untersuchten Zelllinien (Abbildung 9, Seite 45-46), sind aber auch hier keine zeitliche Veränderung zu registrieren und auch kein Unterschied zu nativen Zellkulturen.

Keine Stimulation durch ET-1, aber partielle Proliferationssuppression unter ET_A -Antagonisten

Als nächster Schritt erfolgt der BrdU-Assay zur Quantifizierung der Zellproliferation auf Ebene der DNA-Replikation. Die Zellen wurden entweder mit ET-1 oder mit den selektiven ET_A -Antagonisten LU-302146 und BQ485 behandelt. Die Ergebnisse bestätigten die vorausgegangenen Untersuchungen (Abbildung 10, Seite 47-48): die ET-1-Applikation zeigte bei keiner Zelllinie einen signifikanten Effekt; gleichzeitig gelang mit den ET_A -Antagonisten bei 2 von 3 Zelllinien eine signifikante Suppression, die für LU-302146 stärker ausgeprägt war als für BQ485. Bei den MiaPaCa-2-Zellen (undifferenziert) wurde die DNA-Replikation unter LU302146 um fast 40%, bei HPAF-2-Zellen (mittelgradig differenziert) sogar um über 60% gegenüber den Nativzellen reduziert. Für BQ485 wurden bei den beiden Zelllinien Rückgänge von 20% resp. 30%

beobachtet. Möglicherweise ist LU-302146 diesen Ergebnissen zufolge potenter, wobei in der Literatur keine vergleichenden pharmakokinetischen Daten zu LU302146 und BQ-485 vorliegen.

Bei der dritten Zelllinie, AsPC-1 (schlecht differenziert), wurde nur eine tendenzielle Suppression gesehen, die weder für LU-302146 noch für BQ485 signifikant war. Ein aggressiveres Wachstumsverhalten dieser Zelllinie wurde auch in den Tierexperimenten gesehen, auch hier fiel eine Suppression durch ET_A-Blockade tendenziell schwächer aus als bei MiaPaCa-2-Zellen.

Ergebnisse anderer Studien zur Proliferationsstimulation durch ET-1 *in vitro*

ROSANÒ et al. ^[98] konnten beim Ovarialkarzinom zeigen, daß sich die Zellproliferation durch selektive ET_A-Blockade mit Atrasentan (ABT-627) zeit- und dosisabhängig signifikant reduzieren läßt und die Apoptoserate in den Zellen zunimmt. Unter vergleichbaren Bedingungen wie in dieser Arbeit wurden analoge Ergebnisse erzielt. Nach 72 Stunden entsprach die Wachstumsrate unter ABT-627 ca. 25% der nativen Rate. Unter 1 µM ABT-627 stagnierte das Zellwachstum während einer Versuchsphase von 5 Tagen. Ein Stimulationsversuch erfolgte in der Studie nicht. Unter selektiver ET_B-Blockade war die Proliferationsrate gegenüber Kontrollkulturen unverändert, so daß die Vermittlung über ET_A als erwiesen gelten kann.

PFAB et al. haben beim Morris-Hepatom (an Ratten chemisch induzierter Tumor) eine dosisabhängige Wachstumsstimulierung durch exogene ET-1-Applikation *in vitro* zeigen können. Der maximale Effekt wurde bei einer Konzentration von 1 µmol/l registriert, das entspricht den Bedingungen in dieser Arbeit. Durch ET_A-Blockade mit LU135252 gelang eine signifikante konzentrationsabhängige Proliferationsinhibierung um 50% ^[141].

Eine andere Untersuchung von ALI et al. ^[142] zeigte eine signifikante Zunahme der Proliferationsrate nach exogener ET-1-Applikation bei humanen Kolonkarzinomzellen. Unter Gabe von ET-1 in Konzentrationen zwischen 1 bis 10 nmol/l wurde das Zellwachstum um Werte von 13 bis 33% in Intervallen von 24-72 Stunden gesteigert. Dieser Effekt war durch selektive ET_A-Blockade (BQ 123, BQ610), nicht aber durch ET_B-Blockade (BQ788) inhibierbar. Die Ergebnisse zeigen aber interessanterweise keine Proliferationssuppression unter alleiniger Gabe von BQ123 oder BQ610, also ohne zusätzliche ET-1-Gabe. Offenbar läßt sich hier eine nativ inaktive ET-Achse erst nach exogener Stimulation mit den Antagonisten inhibieren.

Die tumorsuppressive Wirkung einer ET_A-antagonistischen Behandlung wie sie in dieser Arbeit *in vitro* untersucht wurde, stimmt mit publizierten Daten anderer Tumorstudien gut überein. Der Vergleich der Ergebnisse spricht dafür, daß die ET-Achse in vielen Tumoren aktiv ist, sich dann auch antagonisieren läßt und sich wegen bereits maximaler intrinsischer Stimulation aber nicht

mehr weiter steigern läßt; dies scheint in den untersuchten rezeptorpositiven Pankreaskarzinomzellen der Fall zu sein. In manchen Tumoren scheint die ET-Achse genuin nicht aktiv zu sein, so daß ein inhibitorischer Effekt durch Rezeptorantagonisten erst nach exogener Stimulierung auftritt.

In Tumoren mit aktiver ET-Achse stellt die anti-ET-Therapie damit eine mögliche Option als Komponente einer Tumorbehandlung dar.

6.2.2 Untersuchung des Einflusses der ET-1-ET_A-Achse auf die VEGF-Expression *in vitro*

mRNA-Ebene

In der Real-time PCR wurde die für den vaskulären Schlüsselfaktor VEGF codierende mRNA aus den Pankreaskarzinomzellen MiaPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 unter Stimulation mit ET-1, sowie unter ET_A-selektiver Antagonisierung mit LU302146 und BQ-485 quantifiziert. Die Ergebnisse sind insgesamt uneinheitlich (Abbildung 13, Seite 55-56).

Unter ET-1-Applikation wurde bei einer schlecht differenzierten Zelllinie (AsPC-1) die erwartete Stimulation beobachtet: die gemessene VEGF-mRNA-Menge war doppelt so groß wie bei den nativen Zellen. Dieser Effekt wurde allerdings durch die Antagonisten nicht supprimiert.

Bei MiaPaCa-2-Zellen wurde nach ET-1-Applikation signifikant weniger VEGF-mRNA nachgewiesen, unter Antagonisierung dagegen signifikant mehr als in nativen Zellen. Bei mittelgradig differenzierten HPAF-2-Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen, weder unter Applikation von ET-1, noch unter LU-302146 oder BQ-485.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse muß postuliert werden, daß die Stimulierung der Angiogenese durch ET-1, wie es *in vivo* beobachtet und in vielen Studien untersucht wurde, bei den untersuchten Pankreaskarzinomzellen entweder nicht oder nur partiell VEGF-vermittelt ist. Möglich ist allerdings auch, daß sich bei den untersuchten Zellen *in vitro* bereits ein Kompensationsmechanismus etabliert hat. Analoge Beobachtungen mit scheinbar paradoxem Effekt wurden beispielsweise bei Hypertensions-Studien gemacht. Trotz permanenter ET-Stimulation in transgenen Tieren blieb eine hypertensive Wirkung wie nach *i.v.*-Injektion aus. Umgekehrt litten heterozygote knock-out Versuchstiere unter Hypertension^[97].

Protein-Ebene

Im Western-Blot konnte nachgewiesen werden, daß alle untersuchten Pankreaskarzinomzellen VEGF sezernieren, und dies sowohl unter Einfluß von exogen appliziertem ET-1, als auch von ET_A-Antagonisten (Abbildung 15, Seite 58). Eine quantitative Aussage zum Vergleich der Pro-

ben ist allerdings nicht möglich; hierzu dienten weitere ELISA-Analysen: Die VEGF-Konzentration im Zellkulturmedium nahm entsprechend einer kontinuierlichen Sekretion bei allen untersuchten Zelllinien stetig zu (Abbildung 16, Seite 59-60). Die nativen Zellen zeigten allerdings keinen Unterschied im Vergleich zu den mit ET-1 behandelten Zellen. Eine Stimulierung der VEGF-Produktion konnte wie auch bei den Resultaten der Real-time PCR nicht beobachtet werden.

Ergebnisse anderer Studien zum Einfluß der ET-1–ET_A-Achse auf VEGF

SPINELLA et al. gelang es beim Ovarialkarzinom durch exogene Applikation von ET-1 die Expression von VEGF-mRNA zu stimulieren. Dieser Effekt war zeit- und konzentrationsabhängig und konnte mit dem selektiven ET_A-Antagonisten BQ-123 inhibiert werden^[136]. Die Versuchsbedingungen waren ähnlich wie in dieser Arbeit.

Durch selektive ET_A-Blockade mit ABT-627 in Zellkulturen humaner Ovarialkarzinome (PMOV1 und POMV2) konnte die VEGF-Sekretion nach 24 Stunden um ca. 45% supprimiert werden, in Kombination mit Paclitaxel um ca. 60%^[98]. Diese Ergebnisse, konnten wir für das Pankreaskarzinom in dieser Form nicht bestätigen.

Die verschiedenen Ergebnisse bei der Untersuchung der Angiogenesestimulierung durch ET-1 weist auf die Komplexität in der Regulation der Angiogenese hin. Ein genereller Effekt auf die Tumorangio-genese mit konsekutiv reduzierter VEGF-Sekretion durch Inhibierung der ET-Achse erscheint damit beim Pankreaskarzinom fraglich.

6.2.3 Untersuchung eines autokrinen Endothelin-Loops

Für humane Endothelzellen (HUVEC) ist ein autokriner Loop für ET-1 beschrieben, der hier wahrscheinlich über ET_B vermittelt wird^[123]. BAGNATO et al. zeigten mittels RT-PCR beim Ovarialkarzinom, daß alle Zelllinien, die ET-1 produzierten, ebenfalls ET_A-mRNA exprimierten; die Expression von ET_B-mRNA war in malignem Gewebe reduziert. Immunhistochemische Untersuchungen bestätigten die Koexpression in vivo. Daraus wurde ein autokriner Loop von ET-1 über den ET_A abgeleitet und konnte in Studien belegt werden^[143].

Bei den ET_A-positiven (und ET_B-negativen) Pankreaskarzinomzellen MiaPaCa-2, AsPC-1 und HPAF-2 konnte eine Suppression der ET-1-Sekretion im ET-1-ELISA nach ET_A-Blockade gezeigt werden (Abbildung 17, Seite 61-62). Dies deutet auf eine Stimulation im Sinne eines autokrinen Loops über ET_A und damit auf eine Aktivität der ET-1–ET_A-Achse bei diesen Tumorzellen hin. Die Halbwertszeit für ET-1 beträgt 4-7 min^[95], dementsprechend ist keine stetige Konzentrationszunahme über die Zeit zu sehen, wie dies bei einer Akkumulation unter kontinuierli-

cher Sekretion und längerer Halbwertszeit der Fall wäre. Die Meßwerte zeigen als „Momentaufnahmen“ wie unterschiedlich aktiv das ET-System zu verschiedenen Zeiten ist.

6.2.4 Die Rolle der ET-1-ET_A-Achse auf Tumorwachstum und Tumorangiogenese *in vivo*

Die Implantation der Pankreastumore in die Versuchstiere erfolgte nach der Methode von HOTZ et al. ^[119] in orthotoper Technik bei Nacktmäusen. Die Entzündung sowie die desmoplastische Reaktion entsprechen denen der menschlichen Erkrankung. Die orthotope Implantation ist besser geeignet, die klinische Tumorerkrankung zu imitieren. Der natürliche Weg von Tumorwachstum, Infiltration und Fernmetastasierung wird in diesem Tiermodell realistisch nachvollzogen. Das Primärtumorvolumen ist nach vergleichbarer Zeit größer und die Infiltration sowie Metastasierung sind weiter fortgeschritten als bei ektoper Tumorinduktion.

Nach subkutaner Injektion von humanen Tumorzellen in immundefiziente Versuchstiere kommt es dagegen seltener zur Metastasierung in parenchymatöse Organe, die klinischen Zeichen der Tumorkrankheit wie Ascites sind deutlich weniger ausgeprägt, so daß diese Modelle die reale Situation wesentlich schlechter repräsentieren also die orthotope Implantation ^[144]. Die unkontrollierte Aussaat injizierter Tumorzellen führt zudem zu einer unrealistischen initialen Pseudometastasierung, welche die Ergebnisse dann verfälscht.

Für die orthotope Technik sind mehrere Alternativen bekannt. Die direkte Injektion kann allerdings zur Stichkanalmetastasierung und peritonealen Disseminierung führen. Eine Fixierung größerer Tumorfragmente im Pankreas der Versuchstiere mittels Naht kann zu reaktiven Entzündungen führe. Daher wurde das von Hotz et al. etablierte Modell verwendet, in dem zwei 1 mm³ große Tumorfragmente in Parenchymtaschen minimal-traumatisch implantiert werden. Die Tumorangehrate beträgt nahezu 100%, es kommt zu keiner artifiziellen Metastasierung. Dennoch handelt es sich bei der hier verwendeten Methode immer noch um ein Xenotransplantat in immundefizienten Nacktmäusen, das auch bei guter Annäherung an die klinische Realität mit der de-novo-Genese des Pankreaskarzinom beim Patienten nicht gleichgesetzt werden kann.

Primärtumorvolumen

Bei den ET_A-positiven Zelllinien (MiaPaCa-2 und AsPC-1) wurde unter ET_A-Blockade mit LU302146 eine signifikante Reduktion des Primärtumorwachstums gesehen. Diese Suppression war bei den undifferenzierten MiaPaCa-2-Zellen ausgeprägter als bei den schlecht differenzierten AsPC-1-Zellen mit vergleichsweise kleinerem Primärtumorvolumen. Die Tumorgröße der ET_A-negativen Panc-1-Zellen war unter ET_A-Inhibierung im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verändert.

Die Ergebnisse zeigen das Suppressionspotential einer ET_A-Blockade bei ET_A-positiven Pankreaskarzinomen. Die fehlenden Differenzen zwischen Kontrolle und Probe ET_A-negativer Panc-1-Zellen belegen zudem die Bedeutung des ET_A.

ROSANÒ et al. erzielten *in vivo* mit ET_A-exprimierenden humanen Ovarialkarzinomzellen (HEY human ovarian carcinoma xenografts) vergleichbare Ergebnisse: Nach subkutaner Tumorinduktion wurden die Tiere für 21 Tage mit dem selektiven ET_A-Antagonisten ABT-627 behandelt. Darunter kam es zu einer signifikanten Reduktion der Primärtumorgröße, die vergleichbar war mit einer Paclitaxel-Behandlung und in Kombination mit dieser additive Effekt zeigte^[98].

BANERJEE et al. haben die ET_A-Blockade für das Prostatakarzinom im Tiermodell für Knochenmetastasierung untersucht (männliche homozygote CB-17 SCID/SCID-Mäuse, humane Prostatakarzinomzellen C4-2b); ihnen gelang unter Applikation des ET_A-Antagonisten ABT-627 über 35 Tage eine tendenzielle, und unter Kombinationstherapie mit Docetaxel eine signifikante Reduktion des Tumorumfanges um bis zu 90%^[145].

Beim Morris-Hepatom (an Ratten chemisch induzierter Tumor) konnte PFAB et al. eine signifikante Tumorwachstumsreduktion unter kombinierter ET_{A+B}-Blockade mit LU302872 erreichen^[141].

Disseminierungs-Score

Mit Hilfe eines Disseminierungsscores wurde sowohl die Lokalinfiltration als auch die Fernmetastasierung registriert, außerdem wurden klinische Parameter (Ascites, Ikterus, Ileus, Kachexie) berücksichtigt. Sinn des Disseminierungsscores war die standardisierte Erfassung und Quantifizierung relevanter Unterschiede der Tumoraussaat in den Tierstudien. Das verwendete Scoring-System wurde bereits zur Beurteilung verschiedener Tiermodelle etabliert und hatte sich hier bewährt. In Tierstudien erzielten schlecht differenzierte AsPC-1-Karzinome signifikant höhere Punktzahlen als die moderat differenzierten HPAF-2-Tumore. Der Disseminierungsscore kann somit die Effektivität einer Therapie gut beschreiben.

In dieser Arbeit korrelieren die Ergebnisse sehr gut mit denen der Volumenreduktion des Primärtumors *in vivo*: Bei den ET_A-positiven Zelllinien MiaPaCa-2 und AsPC-1 wurde unter LU302146-Applikation eine signifikante Reduktion des Disseminierungsscores registriert (Abbildung 19, Seite 65-66). Bei den MiaPaCa-2-Tumoren wurde ein extensives lokales Wachstum und eine Infiltration der anatomischen Nachbarstrukturen bis in das Retroperitoneum beobachtet. Eine Metastasierung trat hauptsächlich abdominal, aber auch pulmonal und mediastinal auf. Die Tiere entwickelten eine apparente Tumorkrankheit mit Ascites. AsPC-1-Tumore zeigten bei kleinerem Primärtumorvolumen eine aggressivere Tumordisseminierung. Dies kam in den höheren Score-Werten der unbehandelten Kontrollgruppen zum Ausdruck: AsPC-1-Tumore 16,9 Punkte vs. 13,3 Punkte bei MiaPaCa-2-Tumoren. Zudem war die Suppression unter ET_A-Blockade für MiaPaCa-2 auf unter 5% im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ausgeprägt als die Suppression bei AsPC-1, hier sank der Score nach Applikation von LU-302146 auf 70% der Kontrollgruppe. Das Ergebnis korrelieren mit den Resultaten der Tumorzellproliferation *in vitro* im BrdU-Assay: hier gelang bei MiaPaCa-2 eine signifikante Reduktion unter ET_A-Inhibierung (mit LU302146 und BQ-485), bei AsPC-1-Zellen war die Reduktion nur tendenziell sichtbar und nicht signifikant (Abbildung 10, Seite 48).

ET_A-negative Panc-1-Tumore zeigten keine signifikanten Unterschiede.

ROSANÒ et al. beschreiben für das Ovarialkarzinom einen Effekt der ET-1–ET_A-Achse auf die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen sowie auf die Stimulation von Zellmigration und –invasion bei beeinträchtigter interzellulärer Kommunikation. Dadurch soll ET-1 bei humanen Zelllinien (HEY, OVCA) die Transition von epitheliale in mesenchymales Gewebe, einem essentiellen Schritt bei der Tumordisseminierung und Ausprägung eines invasiven Phänotyps, fördern ^[146]. Diese Untersuchungen sind konkludent zu den eigenen Ergebnissen.

Überlebensrate

Die aggressive Tumorbilogie der un- bzw. schlecht-differenzierten humanen Pankreaskarzinomzelllinien MiaPaCa-2 und AsPC-1 zeigte sich auch beim 14-Wochen-Überleben: 37,5% der Nacktmäuse aus der Gruppe der MiaPaCa-2-Zellen überlebten 14 Wochen, bei AsPC-1-Tumoren nur 12,5%. Unter ET_A-Blockade mit LU302146 wurde für beide Zelllinien ein tendenziell längeres Überleben erreicht (87,5% und 62,5%), das aufgrund zu geringer Versuchstierzahlen nicht signifikant war. Bei den ET_A-negativen Panc-1-Tumoren wurden keine deutlichen Unterschiede unter Behandlung mit dem ET_A-Antagonisten gesehen (Abbildung 20, Seite 67-68).

In der Literatur finden sich keine signifikanten Angaben zur Verlängerung des Überlebens unter ET_A-Blockade im Tiermodell.

Mikrovaskuläre Gefäßdichte (MVD)

Unter ET_A-Blockade mit LU302146 war die MVD als Surrogatmarker der Angiogenese im Primärtumorgewebe ET_A-positiver Zelllinien signifikant reduziert. Dies wurde zunächst als Ausdruck der in der Literatur beschriebenen Stimulation der VEGF-Sekretion durch ET-1 verstanden: Durch eine selektive Inhibierung der ET-1–ET_A-Achse wird mit VEGF ein Hauptstimulus eliminiert und die Angiogenese reduziert. Diese These ließ sich aber *in vitro* nicht verifizieren; unter ET-1 konnte hier keine Steigerung der VEGF-Produktion registriert werden und mit ET_A-Antagonisten gelang keine signifikante Suppression.

Allerdings ist bei der *in vivo* erreichten Suppression des Tumorwachstums davon auszugehen, daß das reduzierte Tumorwachstum möglicherweise auch zu einer abgeschwächten Angiogenese führt. Die verminderte Angiogenese im Tierexperiment könnte somit eine indirekte und keine primäre Folge der ET_A-Blockierung sein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß die Hemmung der Angiogenese durch ET_A-Antagonisten nicht über VEGF, sondern andere proangiogene Mediatoren führt.

In Immunhistochemischen Untersuchungen von ROSANÒ et al. beim Ovarialkarzinom wurde unter ET_A-Inhibierung mit ABT-627 eine signifikante Reduktion der VEGF-positiven Zellen um 45% gesehen. Die MVD war darunter ebenfalls signifikant um 45% reduziert. Unter Kombinationstherapie mit ABT-627 und Paclitaxel wurde eine nahezu komplette Inhibierung von VEGF und Tumorangiogenese beschrieben.

AKHAVAN et al. erreichten beim experimentellen Prostatakarzinom (ET_A-positive Wildtyp-Prostatakarzinomzellen PPC-1 in Nacktmäusen) unter Kombinationstherapie von ABT-627 mit Docetaxel zwar eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums, die MVD war jedoch unverändert^[147].

Die verschiedenen Ergebnisse lassen auf eine grundsätzliche Involvierung des Endothelinsystems in die Tumorangiogenese schließen; diese ist aber nicht immer aktiv und wird offenbar nicht ausschließlich durch VEGF moderiert.

In vorläufigen Ergebnissen von klinischen Phase-I- und -II-Studien mit dem selektiven ET_A-Antagonisten ABT-627 beim Prostatakarzinom sowie bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom wurden nach oraler Applikation regelmäßig Serumkonzentrationen im biologisch aktiven Bereich gemessen, ohne daß es zu schwerwiegenden toxischen Wirkungen kam. Eine Progressionsverzögerung wurde insbesondere bei osteoblastischer Knochenmetastasierung berichtet^[2, 104, 138].

7 Zusammenfassung

Das polyfunktionelle Zytokin Endothelin-1 (*ET-1*) hat neben seinen kreislaufwirksamen Effekten auch Wirkungen auf die Proliferation von Zellen und auf die Angiogenese. *In vitro* wurde für mehrere Tumorentitäten gezeigt, daß ET-1 die Proliferation von malignen Zellen stimuliert, sowie als Apoptose-Inhibitor einen Survival-factor darstellt. *In vivo* wurden erhöhte Plasmakonzentrationen von ET-1 bei verschiedenen Tumorerkrankungen gemessen. Auch die Rezeptorpopulation im Tumorgewebe ist verändert, der Endothelin-Rezeptoren A (ET_A) scheint dabei eine besondere Rolle zu spielen. Bei mehreren Neoplasien wird daher in der Inhibierung der sog. ET-1- ET_A -Achse eine potentiell neue Therapiestrategie gesehen. Auch Zellen des humanen Pankreaskarzinoms, welches inzwischen eine der häufigsten Krebstodesursachen darstellt, und das bei unzureichender Wirksamkeit der zytostatischen Chemotherapie nach wie vor nur ungenügend behandelt werden kann, sezernieren ET-1. Ziel dieser Arbeit war, die Rolle des ET-Systems für die Pathogenese bzw. die Therapie des Pankreaskarzinoms zu evaluieren.

Humane Pankreaskarzinomzelllinien unterschiedlicher Differenzierungsgrade wurden entweder mit exogenem ET-1 oder mit selektiven ET_A -Antagonisten (LU-302146, BQ485) *in vitro* behandelt. Bei den rezeptorpositiven Tumorzellen (MiaPaCa-2, AsPC-1, HPAF-2) gelang es, die Tumorzellproliferation *in vitro* durch selektive ET_A -Blockade dosisabhängig zu reduzieren. *In vivo* zeigte sich im orthotopen Nacktmausmodell unter ET_A -Inhibierung dieser Zelllinien ein reduziertes Tumorstadium sowie eine verminderte lokale und systemische Tumordisseminierung; das Überleben war tendenziell verlängert. Bei rezeptornegativen Zellen (Panc-1) wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, daß die ET-1 Wirkung beim humanen Pankreaskarzinom über ET_A vermittelt wird.

Eine postulierte Stimulation der Tumorzellproliferation durch eine exogene Applikation des Agonisten konnte *in vitro* nicht verifiziert werden. Das Endothelin-System der untersuchten Zelllinien war offenbar intrinsisch maximal gesättigt und exogen nicht weiter stimulierbar.

Zur Evaluierung der Angiogenese *in vivo* wurde die Mikrovaskuläre Gefäßdichte mittels anti-CD31-Antikörper bestimmt; diese war unter ET_A -Blockade reduziert. *In vitro* konnte auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene allerdings kein Effekt von ET-1 oder den ET_A -Antagonisten auf die Expression des vaskulären Schlüsselfaktors VEGF gezeigt werden. Eine Hemmung der Tumorangiogenese erfolgt in unserem Pankreaskarzinom-Modell offenbar nicht über VEGF, sondern möglicherweise über andere proangiogene Mediatoren.

Die Ergebnisse zeigen eine Rolle der ET-1–ET_A-Achse beim humanen Pankreaskarzinom. In einem klinisch relevanten Tiermodell wurde durch selektive Blockade des ET_A eine Reduktion von Tumorwachstum und -disseminierung erreicht. ET_A-Antagonisten stellen demzufolge eine potentielle Therapiestrategie für das Pankreaskarzinom dar, die insbesondere in Kombination mit etablierten Behandlungsregimen eine neue Option bieten könnte.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Mathers CD, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJL (2001) Cancer incidence, mortality and survival by site for 14 regions of the world. WHO 2001 Global Program on Evidence for Health Policy Discussion Paper No. 13.
- 2 Nelson JB (2003) Endothelin Inhibition: Novel Therapy For Prostate Cancer. *The Journal of Urology*. 170(6Pt2):65-68.
- 3 Grimshaw MJ (2005) Endothelins in breast tumour cell invasion. *Cancer Letters* 222:129–138.
- 4 Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A (2004) Endothelin-1-induced Prostaglandin E2-EP2, EP4 Signaling Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Production and Ovarian Carcinoma Cell Invasion. *J Biol Chem*. 279(45):46700-46705.
- 5 Bagnato A, Spinella F (2003) Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab*.14(1):44-50.
- 6 RKI, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2008) Krebs in Deutschland 2003 - 2004, Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage, 2008..
- 7 U.S. National Institutes of Health, National Cancer Institute (Hrsg.) (2008) Cancer Statistics, Surveillance Epidemiology and End Results. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>.
- 8 Cancer Research U.K. (2007) UK Pancreatic Cancer incidence statistics. <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/pancreas/incidence/>.
- 9 Künzli BM, Friess H, Kleeff J, et al. (2004) Kurativ-operative Therapie des Pankreaskarzinoms. *Onkologie* 10:1285–1300.
- 10 American Cancer Society (2002) Facts and figures. Atlanta, GA (USA): American Cancer Society.
- 11 Statistisches Bundesamt (Hrsg.) (2007) Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2005. Destatis, Statistisches Bundesamt Wiesbaden..
- 12 RKI, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2004) Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. Robert Koch Institut, AG Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland.
- 13 Mayer RJ (2004) Pancreatic Cancer, in Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, Harrison TR, Resnick WR, Wintrobe MM, Thorn GW, Adams RD, Beeson PB, Bennett IL, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Root R, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Hrsg): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, 16th Edition.
- 14 Boyle P, Maisonneuve P, Bueno de Mesquita B, et al. (1996) Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the search programme of the IARC.. *Int J Cancer*. 67(1):63-71.
- 15 Lowenfels AB, Maisonneuve P (2004) Epidemiology and Prevention of Pancreatic Cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 34(5):238-44.
- 16 Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, et al. (2002) Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer*. 26(4):176-275.
- 17 Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. (2001) Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer.. *JAMA*. 286(8):921-9.
- 18 Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, et al. (2006) The influence of bio-behavioural factor on tumour biology: pathways and mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 6:240-248.
- 19 Rivenson A, Hoffmann D, Prokopczyk B, Amin S, Hecht SS: (1988) Induction of lung and exocrine pancreas tumors in F344 rats by tobacco-specific and Aroclor-derived N-nitrosamines.. *Cancer Res*. 48(23): 6912-7.
- 20 Mirvish SS (1986) Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer.. *Cancer*. 58(8):1842-50.
- 21 Cowgill SM, Muscarella P (2003) The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg* 186:279-286.
- 22 Hruban, RH, Offerhaus, GJA, Kern, SE (2001) Familial pancreatic cancer. Cameron, JL editor, *Pancreatic Cancer*, BC Decker, Inc., Hamilton, London, Ontario, pp 25-36.
- 23 Cavestro GM, Comparato G, Nouvenne A, Sianesi M, Di Mario F (2003) The Race from Chronic Pancreatitis to Pancreatic Cancer. *JOP. J Pancreas*. 4(5):165-68.
- 24 Bastidas JA, Niederhuber JE (1995) Pancreas, in Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS, Niederhuber JE (Hrsg): *Clinical Oncology*. Churchill Livingstone, New York, 1995.
- 25 Pour PM, Pandey KK, Batra SK (2003) What is the origin of pancreatic adenocarcinoma?. *Molecular Cancer*. 2:13.
- 26 Riede UN, Schaefer HE (1999) Allgemeine und spezielle Pathologie. G. Thieme Verlag Stuttgart New York 4. Auflage S. 794-96.

- 27 Schneider G, Schmid RM (2003) Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Molecular Cancer*. 2:15.
- 28 Juhász M, Nitsche B, Malfertheiner P, Ebert MPA (2003) Implications of growth factor alterations in the treatment of pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 2:5.
- 29 Scheider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM (2005) *Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects*. Gastroenterology. 128:1606–1625.
- 30 Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A (2003) Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Molecular Cancer*. 2:7.
- 31 Barton CM, Hall PA, Hughes CM, Gullick WJ, Lemoine NR (1991) Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer.. *Pathol*. 163(2):111-6..
- 32 Hotz HG, Foitzig T, Hotz B, Hines OJ, Reber HA, Buhr HJ (2003) Evaluation of vascular endothelial growth factor blockade and matrix metalloproteinase inhibition as a combination therapy for experimental human pancreatic cancer.. *J Gastrointest Surg*. 7(2):220-7.
- 33 Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y, et al. (2003) Expression of Angiogenic Factors in Pancreatic Ductal Carcinoma: A Correlative Study with Clinicopathologic Parameters and Patient Survival. *Pancreas*. 26(4):344-349.
- 34 Uchima Y, Sawada T, Nishihara T, Maeda K, Ohira M, Hirakawa K (2004) Inhibition and mechanism of Action of a Protease Inhibitor in human pancreatic cancer cells.. *Pancreas*. 29(2):123-31.
- 35 Korc M (2003) Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Mol Cancer*. 7;2:8.
- 36 Itakura J, Ishiwata T, Friess H, et al. (1997) Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression.. *Clin Cancer Res*. 3(8):1309-16..
- 37 Kuehn R, Lelkes PI, Bloechle C, Niendorf A, Izbicki JR. (1999) Angiogenesis, angiogenic growth factors, and cell adhesion molecules are upregulated in chronic pancreatic diseases: angiogenesis in chronic pancreatitis and in pancreatic cancer.. *Pancreas*. 18(1):96-103..
- 38 Ikeda N, Adachi M, Taki T, et al. (1999) Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer.. *Br J Cancer*. 79(9-10):1553-63..
- 39 Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, et al. (1998) Expression of two angiogenic factors, vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor in human pancreatic cancer, and its relationship to angiogenesis.. *Eur J Cancer*. 34(9):1439-47..
- 40 Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, et al. (2003) Regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1a , Vascular Endothelial Growth Factor, and Angiogenesis by an Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Autocrine Loop in Human Pancreatic Cancer. *Am J Pathology*. 163(3):1001-1011.
- 41 Oikawa T, Kushuhara M, Ishikawa S, et al. (1994) Production of endothelin-1 and thrombomodulin by human pancreatic cancer cells.. *Br J Cancer*. 69(6):1059-64.
- 42 Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Negri G, Oohara T, Beger HG (1996) Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res*. 56(12):2703-6..
- 43 Juhász M, Nitsche B, Malfertheiner P, Ebert MPA (2003) Implications of growth factor alterations in the treatment of pancreatic cancer. *Molecular Cancer*. 2:5.
- 44 Wang F, Herrington M, Larsson J, Permert J (2003) The relationship between diabetes and pancreatic cancer. *Molecular Cancer*. 2:4.
- 45 Khorana AA, Fine RL (2004) Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol*. 5: 655–63.
- 46 Carla Boccaccio, Gabriella Sabatino, Enzo Medico, et al. (2005) The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature*. 434(17):396-400.
- 47 Kächele V, Seufferlein T, Adler G, Brambs HJ, Juchems MS, Pauls S (2004) Diagnostik beim Pankreaskarzinom. *Onkologe*. 10:1276–1284.
- 48 Steinberg W (1990) The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol*. 85(4):350-5..
- 49 Forsmark CE, Lambiase L, Vogel SB (1994) Diagnosis of pancreatic cancer and prediction of unresectability using the tumor-associated antigen CA19-9. *Pancreas*. 9(6):731-4..
- 50 Beger HG, Rau B, Gansauge F, Poch B, Link KH (2003) Treatment of Pancreatic Cancer: Challenge of the Facts. *World J Surg*. 27(10):1075-84.
- 51 Büchler MW, Uhl W, Malfertheiner P (2004) Tumore des Pankreas, in: *Pankreaserkrankungen*, 2. Auflage, S. Karger, Basel, S. 125-166..
- 52 Oettle H, Moser L, Hilbig A, Budach V (2004) Multimodale palliative Behandlung des Pankreaskarzinoms. *Onkologe*. 10:1310–1319.
- 53 Westphal S, Kalthoff H (2003) Apoptosis: Targets in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer*. 2:6.
- 54 Lockhart AC, Rothenberg ML, Berlin JD (2005) Treatment for Pancreatic Cancer: Current Therapy

- and Continued Progress. *Gastroenterology*. 128(6):1642–1654.
- 55 Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, et al. (2000) Resected adenocarcinoma of the pancreas—616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg*. 4(6):567-79. .
- 56 Hishinuma S, Ogata Y, Tomikawa M, Ozawa I, Hirabayashi K, Igarashi S (2006) Patterns of Recurrence After Curative Resection of Pancreatic Cancer, Based on Autopsy Findings. *J Gastrointest Surg*. 10(4):511-8. .
- 57 Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386():671-674.
- 58 Zakrzewicz A, Pries AR (2002) Angiogenese und Angioadaptation: Lockende Rufe nach neuen Gefäßen. *Physiologie.Edition_01* 2002.
- 59 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med*. 9:669-76.
- 60 Tonini T, Rossi F, Claudio PP (2003) Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 22(42):6549-6556.
- 61 Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature Med*. 9:653-60.
- 62 Fidler IJ, Ellis LM (1994) The Implications of Angiogenesis for the Biology and Therapy of Cancer Metastasis. *Cell*. 79(2):185-188.
- 63 Fidler IJ, Langley RR, Kerbel RS, Ellis LM (2004) Angiogenesis, in DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Hrsg): *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, 7th Edition, pp 945.
- 64 Fidler IJ, Ellis LM (2004) Neoplastic Angiogenesis — Not All Blood Vessels Are Created Equal. *N Engl J Med*. 351(3):215-216.
- 65 Folkman J (1990) What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent?. *J Natl Cancer Inst*. 82(1):4-6.
- 66 Berger G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenetic switch. *Nature Reviews*. 3:401-10.
- 67 Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, Weinberg RA. (2003) Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis.. *Cancer Cell*. 3(3):219-31..
- 68 Folkman, J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med*. 1(1):27.
- 69 Reinmuth N, Parikh AA, Ahmad SA, et al. (2003) Biology of Angiogenesis in Tumors of the Gastrointestinal Tract. *Microscopy Res Tech*. 60(2):199-207.
- 70 Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.. *N Engl J Med*. 315(26):1650-9.
- 71 Fenton RG, Longo DL (2004) Cancer Cell Biology and Angiogenesis, in Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL, Harrison TR, Resnick WR, Wintrobe MM, Thorn GW, Adams RD, Beeson PB, Bennett IL, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Root R, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Hrsg): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, 16th Edition.
- 72 Fisher B, Gunduz N, Saffer EA (1983) Influence of the Interval between Primary Tumor Removal and Chemotherapy on Kinetics and Growth of Metastases. *Cancer Res*. 43(4):1488-92..
- 73 Fisher WE, Berger DH (2003) Angiogenesis and Antiangiogenetic Strategies in Pancreatic Cancer. *Int J Gastrointest Cancer*. 33(1):79-88.
- 74 Folkman, J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 285(21):1182-6.
- 75 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.. *N Engl J Med*. 350(23):2335-42.
- 76 Marschall Zv, Cramer T, Höcker M, et al. (2000) De Novo Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Pancreatic Cancer: Evidence for an Autocrine Mitogenic Loop. *Gastroenterology*. 119(5):1358-1372.
- 77 Duffy JP, Eibl G, Reber HA, Hines OJ (2003) Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Molecular Cancer*. 2:12.
- 78 Karayiannakisa AJ, Bolanakis H, Syrigosb KN, et al. (2003) Serum vascular endothelial growth factor levels in pancreatic cancer patients correlate with advanced and metastatic disease and poor prognosis. *Cancer Letters* 194:119–124.
- 79 Niedergethmann M, Hildenbrand R, Wostbrock B, et al. (2002) High expression of vascular endothelial growth factor predicts early recurrence and poor prognosis after curative resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pancreas*. 25(2):122-9..
- 80 Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K (2000) High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma.. *Cancer*. 88(10):2239-45..
- 81 Schuch G, Kisker O, Atala A, Soker S (2002) Pancreatic tumor growth is regulated by the balance

- between positive and negative modulators of angiogenesis. *Angiogenesis*. 5(3):181-190.
- 82 Büchler P, Reber HA, Ullrich A, et al. (2003) Pancreatic cancer growth is inhibited by blockade of VEGF-RII. *Surgery*. 134(5):772-782..
- 83 Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.. *Nature*. 263(5579):663-5..
- 84 Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 3 .
- 85 Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF (1985) Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells.. *Am J Physiol*. 248(5 Pt 1):C550-6.
- 86 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.. *Nature*. 332(6163):411-5. .
- 87 Förstermann U (2001) Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: die Blutgefäße, in Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, . Urban & Fischer, München Jena, S. 495.
- 88 Gray GA, Battistini B, Webb DJ (2000) Endothelins are potent vasoconstrictors, and much more besides. *Trends Pharmacol Sci*. 21(2):38-40.
- 89 Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. (1989) The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86(8):2863-7.
- 90 Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, et al. (1988) Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety.. *Biochem Biophys Res Commun*. 156(3):1182-6.
- 91 Randall MD, Douglas SA, Hiley CR. (1989) Vascular activities of endothelin-1 and some alanyl substituted analogues in resistance beds of the rat.. *Br J Pharmacol*. 98(2):685-99.
- 92 Grant K, Loizidou M, Taylor I (2003) Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer*. 88(2):163-6.
- 93 Kedzierski RM, Yanagisawa M (2001) ENDOTHELIN SYSTEM: The Double-Edged Sword in Health and Disease. *Ann Rev Pharmacol. Toxicol*. 41:851–76.
- 94 Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S. (1991) Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells.. *Stroke*. 22(3):378-83.
- 95 Levin ER (1995) Endothelins. *N Engl J Med*. 333(6):356-361.
- 96 Simonson MS, Herman WH (1993) Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem*. 268(13):9347-57.
- 97 Hocher B, Paul M (2000) Transgenic animal models for the analysis of the renal endothelin system.. *Nephrol Dial Transplant*. 15(7):935-7.
- 98 Rosanò L, Spinella F, Salani D, et al. (2003) Therapeutic Targeting of the Endothelin A Receptor in Human Ovarian Carcinoma. *Cancer Research*. 63(10):2447-2453.
- 99 Moraitis S, Miller WR, Smyth JF, Langdon SP (1999) Paracrine Regulation of Ovarian Cancer by Endothelin. *European Journal of Cancer*. 35(9):1381-7.
- 100 Rosano L, Di Castro V, Spinella F, Decandia S, Natali PG, Bagnato A (2006) ZD4054, a Potent Endothelin Receptor A Antagonist, Inhibits Ovarian Carcinoma Cell Proliferation. *Exp Biol Med*. 231:1132–1135..
- 101 Lassiter LK, Carducci MA (2003) Endothelin receptor antagonists in the treatment of prostate cancer. *Semin Oncol*. 30(5):678-88.
- 102 Kopetz ES, Nelson JB, Carducci MA (2002) Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. *Invest New Drugs*. 20(2):173-82.
- 103 Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, Bagnato A, et al. (2003) Endothelin Receptor Blockade Inhibits Molecular Effectors of Kaposi's Sarcoma Cell Invasion and Tumor Growth in Vivo. *Am J Pathology*. 163(2):753-62.
- 104 Carducci MA, Jimeno A (2006) Targeting Bone Metastasis in Prostate Cancer with Endothelin Receptor Antagonists. *Clin Cancer Res*. 12(20): 6296s..
- 105 Cartier F, Delarue C, Remy-Jouet I, Kodjo MK, Fournier A, Vaudry H. (1999) The stimulatory effect of endothelin-1 on frog adrenocortical cells is mediated through both the phospholipase C and the adenylyl cyclase transduction pathways.. *Mol Cell Endocrinol*. 147(1-2):27-36.
- 106 Itoh S, Sasaki T, Ide K, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M (1993) A novel endothelin ETA receptor antagonist, BQ-485, and its preventive effect on experimental cerebral vasospasm in dogs. *Biochem Biophys Res Commun*. 195(2):969-75.
- 107 Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ (1977) Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer*. 19(1):128-35..

- 108 Fountzilas G, Gratzner H, Lim LO, Yunis AA (1986) Comparative effects of selected drug combinations on the growth of a human pancreatic carcinoma cell line (MIA PaCa-2). *J Natl Cancer Inst.* 76(1):37-43..
- 109 Kim YW, Kern HF, Mullins TD, Koriwchak MJ, Metzgar RS (1989) Characterization of clones of a human pancreatic adenocarcinoma cell line representing different stages of differentiation. *Pancreas.* 4(3):353-62..
- 110 Tan MH, Chu TM (1985) Characterization of the tumorigenic and metastatic properties of a human pancreatic tumor cell line (AsPC-1) implanted orthotopically into nude mice. *Tumour Biol.* 1985;6(1):89-98.
- 111 Chen WH, Horoszewicz JS, Leong SS, et al. (1982) Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites. *In Vitro.* 18(1):24-34. .
- 112 Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G (1975) Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer.* 15(5):741-7..
- 113 Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55-630.
- 114 Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S (1985) Quantification of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response.. *J Immunol Methods.* 82:169-179.
- 115 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732):1350-4.
- 116 Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* 162:156-159.
- 117 Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(9):4350-4.
- 118 Lämmlí (1970) SDS-PAGE. *Nature.* 227:680-685.
- 119 Hotz HG, Reber HA, Hotz B, et al. (2001) An Improved Clinical Model of Orthotopic Pancreatic Cancer in Immunocompetent Lewis Rats. *Pancreas.* 22(2):113-121.
- 120 Weidner N (1998) Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol.* 184(2):119-22.
- 121 Weidner N (1995) Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer.. *Am J Pathol.* 147(1):9-19.
- 122 Bagnato A, Natali PG (2004) Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *Journal of Translational Medicine* 2:16.
- 123 Saijonmaa O, Nyman T, Fyhrquist F (1992) Endothelin-1 stimulates its own synthesis in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 188(1):286-91.
- 124 Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M (1998) Stimulatory Interaction Between Vascular Endothelial Growth Factor and Endothelin-1 on Each Gene Expression. .
- 125 Guise TA, Mohammad KS. (2004) Endothelins in bone cancer metastases.. *Cancer Treat Res.* 2004;118:197-212.
- 126 Wülfing P, Kersting C, Tio J, et al. (2004) Endothelin-1-, Endothelin-A-, and Endothelin-B-Receptor Expression Is Correlated with Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Angiogenesis in Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 10:2393-2400.
- 127 Alanen K, Deng DX, Chakrabarti S (2000) Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathology.* 36(2):161-7.
- 128 Grimshaw MJ, Naylor S, Balkwill FR (2002) Endothelin-2 is a hypoxia-induced autocrine survival factor for breast tumor cells. *Mol Cancer Ther.* 1(14):1273-81.
- 129 Egidy G, Juillerat-Jeanneret L, Jeannin JF, Korth P, Bosman FT, Pinet F (2000) Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am J Pathol.* 157(6):1863-74..
- 130 Ali H, Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I (2000) Stimulation of colorectal cancer cell line growth by antagonists A ET-1 and its inhibition by ET. *Gut.* 47;685-688.
- 131 Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P (2003) The Endothelin Axis: Emerging Role in Cancer. *Nat Rev Cancer.* 3(2):110-6.
- 132 Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A (2003) Endothelin-1 decreases GAP-junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem.* 278(42):41294-301.
- 133 Taniguchia T, Muramatsu I (2003) Pharmacological knockout of endothelin ETA receptors. *Life Sciences.* 74(2003):405-409.
- 134 Eberl LP, Valdenaire O, Saintgiorgio V, Jeannin JF, Juillerat-Jeanneret L (2000) Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. *Int J Cancer.* 86(2):182-

- 7..
- 135 Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, et al. (2002) Endothelin-1 acts as a survival factor in ovarian carcinoma cells. *Clin Sci (Lond)*. 2002 Aug;103 Suppl 48:302S-305S. .
 - 136 Spinalla F, Rosanò L, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A (2002) Endothelin-1 Induces Vascular Endothelial Growth Factor by Increasing Hypoxia-inducible Factor-1a in Ovarian Carcinoma Cells. *J Biol Chem*. 277(31):27850-5.
 - 137 Salani D, Taraboletti G, Rosano L, et al. (2000) Endothelin-1 Induces an Angiogenic Phenotype in Cultured Endothelial Cells and Stimulates Neovascularization In Vivo. *Am J Path*. 157(5):1703-11.
 - 138 Chiappori AA, Haura E, Rodriguez FA, et al. (2008) Phase I/II study of atrasentan, an endothelin A receptor antagonist, in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 14(5):1464-9.
 - 139 Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, et al. (2005) Expression of endothelin-1 is related to poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer*. 41(18):2828-35.
 - 140 Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, et al. (2000) Role of Endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma.. *Am J Pathol*. 157:1537-47..
 - 141 Pfab T, Stoltenburg-Didinger G, Trautner C, Godes M, Bauer C, Hoher B (2004) The endothelin system in Morris hepatoma-7777: an endothelin receptor antagonist inhibits growth in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 141(2):215-22..
 - 142 Ali H,Loizidou M, Dashwood M, Savage F, Sheard C, Taylor I (2000) Stimulation of colorectal cancer cell line growth by antagonists A ET-1 and its inhibition by ET. *Gut*. 47;685-688.
 - 143 Bagnato A, Salani D, Di Castro V, et al. (1999) Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*. 59(3):720-7.
 - 144 Hotz HG, Reber HA, Hotz B, et al. (2003) An orthotopic nude mouse model for evaluating pathophysiology and therapy of pancreatic cancer.. *Pancreas*. 26(4):e89-98.
 - 145 Banerjee S, Hussain M, Wang Z, et al. (2007) In vitro and in vivo molecular evidence for better therapeutic efficacy of ABT-627 and taxotere combination in prostate cancer.. *Cancer Res*. 15;67(8):3818-26.
 - 146 Rosanò L, Spinella F, Di Castro V, et al. (2006) Endothelin-1 is required during epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer progression. *Exp Biol Med*. 231(6):1128-31.
 - 147 Akhavan A, McHugh KH, Guruli G, et al. (2006) Endothelin receptor A blockade enhances taxane effects in prostate cancer. *Neoplasia*. 8(9):725-32.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
5-FU	5-Fluorouracil
AAT	anti-angiogene Therapie
Abb	Abbildung
AFP	α -Fetoprotein
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AsPC	AsPC-1
ATCC	American Type Culture Collection
B2M	β -2-Mikroglobulin
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchonin acid)
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
Bp	Basenpaare
BQ	ET _A -Antagonist BQ-485
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw	Beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Karzinom
cAMP	3',5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CEA	Karziñoembryonales Antigen
COX	Cyclooxygenase
Cp	Crossing point
CT	Computertomografie
C _T	Schwellenwertzyklus (threshold cycle)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Diff	Differenz
DIG	Digoxygenin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTPs	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
ECE	Endothelin converting enzyme
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ERCP	endoskopisch-retrograde Cholangio-Pankreatikografie
ET	Endothelin
ET _A	Endothelin-Rezeptor-A

9. Anhang

ET _B	Endothelin-Rezeptor-B
EtBr	Ethidiumbromid
etc	etcetera
EtOH	Ethanol
EUS	Endosonografie
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G	Guanin
G	Erdbeschleunigung in Gramm
ggf	gegebenenfalls
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPAF	HPAF-II
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothel Cell
i.p.	intraperitoneal
IC50	Inhibitionskonzentration
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Gamma-Immunoglobulin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
KG	Körpergewicht
Konz	Konzentration
LU	ET _A -Antagonist LU302146 (BSF302146)
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
MM	Molekülmasse
MPC	MiaPaCa-2
MRCP	Magnetresonanz-Cholangio-Pankreatikografie
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomografie
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid
N	Normal
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NGF	Nerve Growth Factor
OD	optische Dichte
PaCa	Pankreaskarzinom
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	Phosphate-buffered-saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
resp	respektive
RPM	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Reverse Transkription/ Reverse transcriptase
RTD-PCT	Real-time detection PCR
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S
ssDNA	Einzelstrang-DNA (single stranded DNA)
StAbw	Standardabweichung
t	Zeit

9. Anhang

Tab	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Temp	Temperatur
TGF	Transforming Growth Factor
TNM	Tumorausdehnung – Lymphknotenbefall – Fernmetastasen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	
U	Aktivitätseinheit für Enzyme (unit(s))
u.a.	unter anderem
UICC	Unio Internationalis Contra Cancrum
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl	vergleiche
vs	versus
z.B.	zum Beispiel
γ GT	γ -Glutamyltransferase

Darüber hinaus wurden die international üblichen Abkürzungen für die Einheiten des *Système International d'Unités* (SI-Einheiten) und der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) verwendet.

9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aminosäuresequenz der Endotheline.
Abbildung 2: Biosynthese des ET-1.
Abbildung 3: Molekularstruktur von LU302146.
Abbildung 4: Molekularstruktur von BQ485.
Abbildung 5: Anlagerung der Sonden an die Ziel-DNA.
Abbildung 6: Expression von ET-1 und seinen Rezeptoren.
Abbildung 7: Ergebnisse der Zellzählung bei ET_A-Blockade.
Abbildung 8: Ergebnisse der Zellzählung unter Applikation von ET-1.
Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der Zell-Viabilität (MTT-Assay).
Abbildung 10: Zellproliferation im Stimulations- und Suppressionsversuch.
Abbildung 11: Fotografie einer Gelelektrophorese.
Abbildung 12: Exemplarische RT-PCR-Fluoreszenzkurven.
Abbildung 13: Ergebnisse der Real-time-PCR.
Abbildung 14: Eichkurve zur Proteinkonzentrationsbestimmung.
Abbildung 15: Western Blot.
Abbildung 16: VEGF-ELISA.
Abbildung 17: ET-1-ELISA.
Abbildung 18: Volumen des Primärtumors.
Abbildung 19: Tumorstreuung.
Abbildung 20: Überlebensrate.
Abbildung 21: Mikrogefäßdichte (MVD).

9.3 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren beim Pankreaskarzinom.
Tabelle 2: Antagonisten der ET-Rezeptoren.
Tabelle 3: Sequenzen der Primer für ET-1, ET_A und ET_B, für die Real-time PCR.
Tabelle 4: Pipettierschema für den Mastermix.
Tabelle 5: PCR-Programm.
Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten Primer für VEGF und β_2 -Mikroglobulin (B2M).
Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Sonden für VEGF und β_2 -Mikroglobulin (B2M).
Tabelle 8: Konzentration der isolierten RNA.
Tabelle 9: Quantifizierung der Expression von VEGF-mRNA.
Tabelle 10: Proteingehalt in den Proben nach Inkubation.
Tabelle 11: Rolle von ET-1 und seinen Rezeptoren bei verschiedenen Tumorerkrankungen.

9.4 Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater, Herrn Privatdozenten Dr. med. H. G. Hotz, sehr herzlich für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas und für die Möglichkeit der Durchführung der experimentellen Arbeiten sowie die jahrelange Betreuung danken. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. medic. S. Bhargava für die intensive Betreuung der praktischen Arbeiten und der Projektplanung.

Ohne die engagierte Einarbeitung und die ständige Hilfe im Labor durch Frau B. Hotz und Herrn M. Arndt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die Motivation in den kritischen Situationen aber auch die freundschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe war die Basis dieser Arbeit – vielen Dank!

Im Leben überhaupt soweit gekommen zu sein ist die Leistung meiner Eltern. Mein leider so frühgestorbener Vater hat mich auf den Weg gebracht, den zu gehen meine Mutter mich immer voll und ganz unterstützt hat. Auch Dieter möchte ich an dieser Stelle sehr danken für so Vieles. Ihnen sei diese Arbeit gewidmet.

Nicht zuletzt danke ich meiner geliebten Serap für die tägliche Unterstützung und so viel Geduld.

9.5 Erklärung

Ich, Till Stummeyer, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von Endothelin-1 für die Tumorangiogenese und das Wachstum des Pankreaskarzinoms“ 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.

19. Juni 2008

T. Stummeyer

9.6 Lebenslauf

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

9.7 Publikationen

BHARGAVA S, STUMMEYER T, HOTZ B, HINES OJ, REBER HA, BUHR HJ, HOTZ HG (2004) Selective Inhibition of Endothelin Receptor A as an Anti-angiogenic and Anti-proliferative Strategy for Experimental Human Pancreatic Cancer. *Angiogenesis* Vol 7 Supplement 1:44

BHARGAVA S, HOTZ B, STUMMEYER T, BUHR HJ, HOTZ HG (2004) Endothelin-1: A Role as an Autocrine Growth Factor in Human Pancreatic Cancer Cells? *Langenbecks Arch Surg* 389:418-419

BHARGAVA S, STUMMEYER T, HOTZ B, HINES OJ, REBER HA, BUHR HJ, HOTZ HG (2005) Selective Inhibition of Endothelin Receptor A as an Anti-angiogenic and Anti-proliferative Strategy for Human Pancreatic Cancer. *J Gastrointest Surg* 9:703-709