

**Untersuchungen zum Wirkmechanismus von 6-Amino-11,12-
dihydro-11-(3',5'-dimethoxy-4'-
hydroxyphenyl)benzo[c]phenanthridiniumchlorid
(BP11)
als potentielles Zytostatikum**

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Stefanie Klose
Kiel 2012

Referent: Prof. Dr. Bernd Clement

Koreferent: Prof. Dr. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung: 18.7.2012

Zum Druck genehmigt am 18.7.2012

Prof Dr. Wolfgang Duschl
(Dekan)

Kurzfassung in Deutsch:

Pankreaskarzinom ist einer der aggressivsten Tumore überhaupt.

Die durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate von Pankreaskarzinompatienten beträgt weniger als 5%. Durch die stagnierende Entwicklung neuer Medikamente, die eine palliative Therapie des Pankreaskarzinoms ermöglicht, ist es von besonderem Interesse und Wichtigkeit neue innovative potentielle Zytostatika zu entwickeln. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Wirkmechanismus eines Benzo[c]phenanthridinium-Derivat (BP11) an Pankreaskarzinomzellen getestet. Die Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit BP11 führte zu einer starken Inhibition des Wachstums. Des Weiteren führte die BP11 Behandlung von Panc89 Zellen und Colo357 Zellen zu Veränderungen im Zellzyklus. Während Panc89 Zellen und Colo357 Zellen nach BP11 Behandlung einen irreversiblen Schaden in der G1-Phase erfahren und sterben, zeigten Colo357 Zellen, die durch stabile Transfektion Bcl-x_L überexprimieren, einen G2-Arrest. Zusätzlich führte die BP11 Behandlung von Panc89 Zellen durch Aktivierung der Cdc2 zu einem verfrühten Eintritt in die Mitose. Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass BP11 Behandlung von Panc89 Zellen zu mitotischen Abnormalitäten führte. In der Literatur wurden diese mitotischen Abnormalitäten auch in Zellen gefunden, bei denen ein funktionelles Ausschalten von Survivin induziert wurde. Survivin spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation der Mitoseprogression in malignen Geweben. Eine Inhibition von Survivin kann u.a. eine Mitotische Katastrophe auslösen. Unsere Daten schlagen vor, dass die Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit BP11 im Zelltod durch Mitotische Katastrophe endet.

Kurzfassung in Englisch:

Pancreatic cancer is one of the most aggressive tumors. The average 5-year survival rate of Pancreatic cancer patients is less than 5 %. Due to the stagnating development of new medicine, which allows a palliative care of Patients with Pancreatic cancer, it is of particular interest and importance to develop new innovative, potential Chemotherapeutika. As part of this PhD thesis, the molecular mechanism of a Benzo[c]phenanthridinium-Derivat (BP11) was tested on Pancreatic cancer cells. The treatment of Pancreatic cancer cells with BP11 caused a strong inhibition of their growth. Further, the BP11 treatment of Panc89 and Colo357 cells lead to alteration in the cell cycle. While Panc89 and Colo357 cells are irreversibly damaged and subsequently die in the G1 phase as a cause of the BP11 treatment, Colo357 cells, which overexpress by a stable transfection Bcl-x_L, showed a G2 arrest. Additionally, the BP11 treatment of Panc89 cells caused an early occurrence of mitosis, due to the activation of Cdc2. Another important outcome of this research is the finding that BP11 treatment of Panc89 cells results in mitotic abnormalities. In literature, these mitotic abnormalities were also found in cells, which induce a functional turn off of Survivin. Survivin plays a decisive part in the regulation of the mitosis progression in malignant tissue. An inhibition of Survivin can trigger among other things a mitotic catastrophe. Our findings propose that the treatment of Pancreatic cancer cells with BP11 terminates in cell death by mitotic catastrophe.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 5 |
| 1 EINLEITUNG | 8 |
| 1.1 Der Zellzyklus | 8 |
| 1.1.1 <i>Die Regulation des Zellzyklus</i> | 9 |
| 1.1.2 <i>Die Regulation der G1-Phase</i> | 11 |
| 1.1.3 <i>Die Regulation der G2/M-Phase</i> | 12 |
| 1.2 Apoptose- Der programmierte Zelltod | 14 |
| 1.2.1 <i>Regulation der Apoptose- Bedeutung der IAPs</i> | 15 |
| 1.2.2 <i>Survivin- Ein Bindeglied zwischen Apoptose und Zellzyklus</i> -- | 18 |
| 1.3 Das Pankreaskarzinom | 20 |
| 1.3.1 <i>Epidemiologie</i> | 20 |
| 1.3.2 <i>Histologie und Pathophysiologie</i> | 20 |
| 1.3.3 <i>Risikofaktoren</i> | 22 |
| 1.3.4 <i>Prognose</i> | 22 |
| 1.4 6-Amino-11,12-dihydro-11-(3',5'-dimethoxy-4'-hydroxyphenyl) benzo [c] phenanthridiniumchlorid (BP11) | 22 |
| 1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit | 25 |
| | |
| 2 MATERIAL | 27 |
| 2.1 Geräte und Materialien | 27 |
| 2.2 Chemikalien und Reagenzien | 28 |
| 2.3 Antikörper und rekombinante Proteine | 30 |
| 2.3.1 <i>Primäre Antikörper</i> | 30 |
| 2.3.2 <i>Sekundäre Antikörper</i> | 31 |
| 2.4 Oligonukleotide - Survivin spez. Primer für die R. T.- PCR | 31 |
| 2.5 Zelllinien | 31 |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------|-----------|
| 3 | METHODEN | 32 |
| 3.1 | Zellkultur | 32 |
| 3.2 | Molekularbiologische Methoden | 32 |
| 3.2.1 | <i>Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen</i> | 32 |
| 3.2.2 | <i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i> | 33 |
| 3.2.3 | <i>Polyacrylamid - Gelelektrophorese</i> | 34 |
| 3.2.4 | <i>Western – Blot – Methode</i> | 35 |
| 3.2.5 | <i>Durchflusszytometrie</i> | 36 |
| 3.2.5.1 | <i>Zellzyklusmessung</i> | 36 |
| 3.2.5.2 | <i>Annexin V - Propidiumiodid Doppelfärbung</i> | 39 |
| 3.2.6 | <i>JAM-Assay</i> | 39 |
| 3.2.7 | <i>Proliferationsassays</i> | 40 |
| 3.2.7.1 | <i>³H-Thymidin-Wachstumsassay</i> | 40 |
| 3.2.7.2 | <i>Zellzählung</i> | 41 |
| 3.2.8 | <i>Zytotoxizitätsassays</i> | 41 |
| 3.2.8.1 | <i>Kristallviolettassay</i> | 41 |
| 3.2.8.2 | <i>LDH Cytotoxicity Detection Kit</i> | 42 |
| 3.2.9 | <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> | 43 |
| 3.2.10 | <i>Polymerasekettenreaktion</i> | 45 |
| 3.2.10.1 | <i>RNA Extraktion</i> | 45 |
| 3.2.10.2 | <i>Reverse Transkriptase</i> | 46 |
| 3.2.10.3 | <i>Schmelzkurvenanalyse</i> | 47 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4 | ERGEBNISSE | 48 |
| 4.1 | Einfluss von BP11 auf Pankreaskazinomzellen | 48 |
| 4.2 | Auswirkung von BP11 auf die Proliferation | 49 |
| 4.2.1 | <i>Proliferationsverhalten der Zellen nach BP11 Behandlung</i> | 49 |
| 4.3 | Zellzyklusmessungen | 52 |
| 4.4 | BP11 induziert apoptotischen und nicht-apoptotischen Zelltod | 55 |
| 4.4.1 | <i>Behandlung mit BP11 führt zum Zelltod von Pankreaskarzinomzelllinien</i> | 55 |
| 4.4.2 | <i>BP11 induziert apoptotischen Zelltod</i> | 56 |
| 4.4.3 | <i>BP11 induziert PARP-Spaltung</i> | 59 |
| 4.4.4 | <i>DNA-Fragmentation nach BP11 Behandlung</i> | 61 |
| 4.4.5 | <i>Quantitative Bestimmung der apoptotischen und nekrotischen Zellen mit Hilfe der AnnexinV/Propidiumiodid Doppelfärbung</i> | 62 |
| 4.5 | Charakterisierung der induzierten intrazellulären Signal- transduktionswege nach BP11 Behandlung | 69 |
| 4.5.1 | <i>Einfluss von BP11 auf die Expression Zellzyklusregulierender Proteine</i> | 70 |
| 4.5.2 | <i>BP11 führt zu morphologischen, subzellulären Veränderungen bei Pankreaskarzinomzelllinien</i> | 72 |
| 4.6 | Untersuchung der Aktivierung von AP1 und NFκB nach BP11 Behandlung | 74 |
| 4.6.1 | <i>Posttranskriptionelle Aktivierung von AP1 nach BP11 Behandlung</i> | 74 |
| 4.6.2 | <i>Untersuchung der potentiellen NFκB - Bindungsstellen nach BP11 Behandlung</i> | 74 |
| 4.7 | Untersuchung der Survivin - Expression nach BP11 - Behandlung | 77 |
| 4.7.1 | <i>Zeitkinetik der Survivin - Expression in BP11 behandelten Panc89 Zellen</i> | 77 |

| | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.8 | Multidrug - Resistenz nach BP11 Behandlung----- | 80 |
| 4.9 | Einfluss von BP11 auf humane diploide Fibroblasten----- | 82 |
| 5 | DISKUSSION----- | 83 |
| 5.1 | BP11 inhibiert das Wachstum von Pankreaskarzinomen und führt zu Veränderungen im Zellzyklus----- | 84 |
| 5.2 | BP11 induziert teilweise apoptotischen Zelltod----- | 85 |
| 5.3 | BP11 - Behandlung führt zur Zentrosomenamplifikation und multipolaren Mitosespindeln----- | 87 |
| 5.4 | BP11 induzierter Zelltod durch Mitotische Katastrophe----- | 89 |
| 6 | SCHLUSSFOLGERUNG----- | 92 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS----- | 93 |
| 8 | DANKSAGUNG----- | 109 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|
| AP-1 | Aktivator-Protein 1 |
| Apaf | Apoptotic peptidase activating factor 1 |
| ATM | Ataxia-telangiectasia mutated |
| ATR | Ataxia-telangiectasia and Rad 3 related |
| Bad | Bcl-2-Antagonist of Cell Death |
| Bak | Bcl-2-Antagonist/killer 1 |
| Bax | Bcl-2-associated X protein |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| Bcl _{xL} | B-cell lymphoma xL |
| BID | BH 3 interacting domain death agonist |
| Bim | Bcl-2 interagierendes Protein; Antagonist; proapoptotisches Protein |
| BIR | Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat |
| CARD | Caspase activation and recruitment domain |
| CDK | Cyclin-abhängige Kinase |
| CDKI | Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| C _T | Cycle threshold |
| DIABLO | Direct IAP binding Protein with low pI |
| DISC | Death Inducing Signalling Complex |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Electrochemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assay |
| Ez4U | Easy for you |
| EPR | Effector cell protease receptor |
| FADD | FAS - associated protein with death domain |
| FAS | F7 - associated surface |

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------|
| FCS | fötales Kälberserum |
| FSC | Forward scatter ; Vorwärtslichtstreuung |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| HBXIP | Hepatitis B virus x protein - interacting protein |
| HRP | Horse – redish Peroxidase |
| IAP | Inhibitor of apoptosis protein |
| IgG | Immunglobulin G |
| INCENP | Inner – centromer – binding - protein |
| INK 4 | Inhibitors of CDK 4 |
| JAM | Just another method |
| JNK | c-Jun N-terminal kinases |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KH ₂ HPO ₄ | Kaliumdihydrogenphosphat |
| KIP | Kinase - inhibitory proteins |
| LDH | Lactasedehydrogenase |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinases |
| MPF | Mitosis-promoting factor |
| mRNA | Messenger RNA |
| Myt | Myelin transcription factor |
| µM | Mikromolar |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD ⁺ | Nicotinamidadenindinukleotid |
| Na ₂ HPO ₄ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| nM | Nanomolar |
| NF-κB | nuclear factor kappa B |
| PanIN | Pancreatic Intraepithelial Neoplasias |
| PARP | Poly [ADP-ribose] polymerase |
| PBGD | Porphobilinogen deaminase |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PLK | Polo like kinase |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |

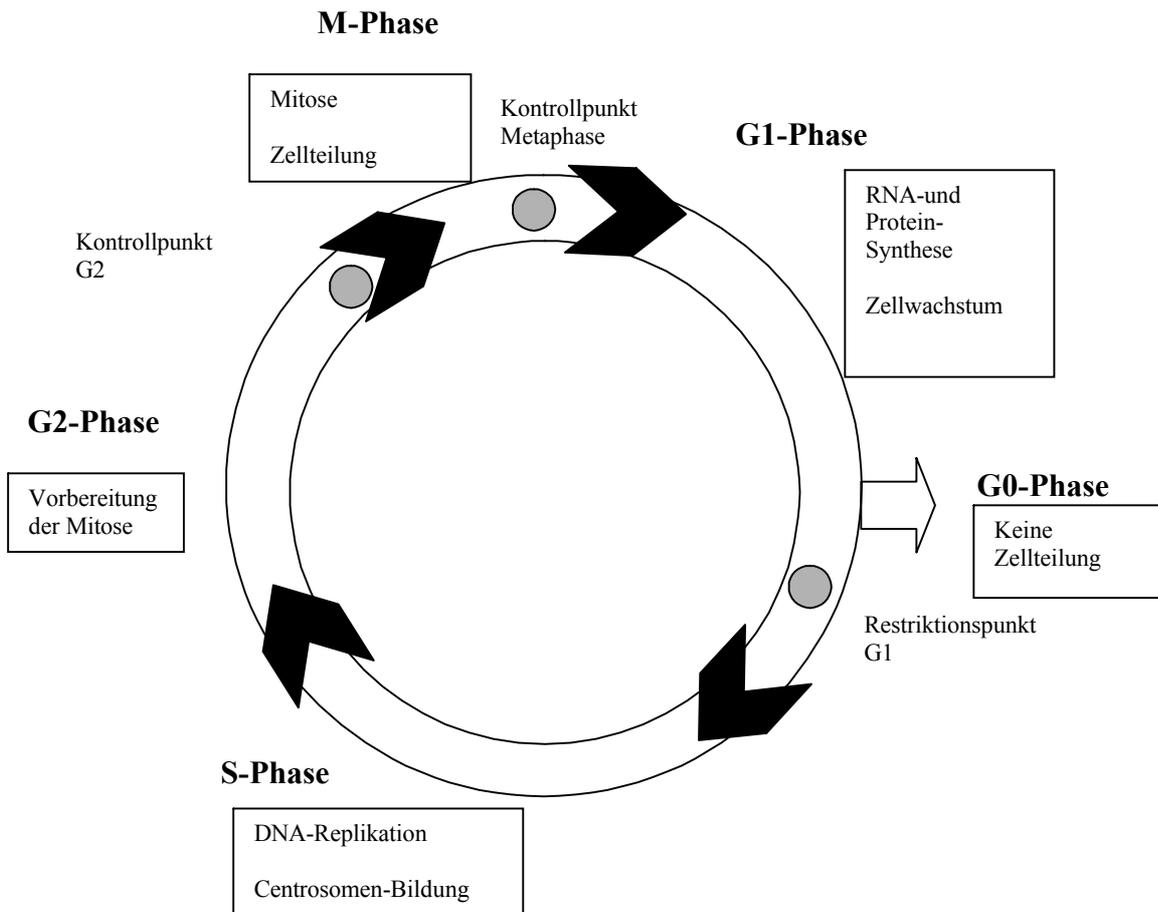
| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rad | Ras-related Protein; Ras = Rat sarcoma |
| Rb | Retinoblastomprotein |
| RING | Really interesting new gene |
| RT | Reverse Transkriptase |
| SMAC | Second mitochondrial derived activator of caspases |
| SMAD | Kombination vom Drosophila Protein MAD (mothers against decapentaplegic) und vom Caenorhabditis elegans Protein SMA (small body size) |
| SSC | Side scatter; Seitwärtslichtstreuung |
| tBid | Trunktiertes Bid |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TRAIL | TNF - related apoptosis-inducing ligand |
| Thr | Threonin |
| Tyr | Tyrosin |
| U.a. | Unter anderem |
| UBC | Ubiquitinligase-Domäne, Ubiquitin-conjugating enzym |
| WAF | Wild-type p53-activated fragment |
| wt | Wild -Typ |
| xIAP | X-linked IAP |
| zVAD- <i>fmk</i> | Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon |

1. EINLEITUNG

Der Zellzyklus

1.1 Der Ablauf des Zellzyklus

Die Vermehrung der Zellen durch Zellteilung, in denen die Zelle verschiedene Phasen durchläuft und in zwei identische Tochterzellen aufgeteilt wird, wird als Zellzyklus bezeichnet. Der Zellzyklus wird in Mitose, G1, S - und G2 - Phasen eingeteilt. Die G1, S und G2 - Phasen (g = für Englisch gap - Lücke) werden zusammen üblicherweise als Interphase bezeichnet. In der G1 - Phase verdoppelt die Zelle ihr Volumen und bereitet sich auf die Zellteilung vor. Dabei findet eine Steigerung der Proteinbiosynthese statt. In dieser Phase haben die Zellen die Möglichkeit in die Ruhephase G0 überzugehen, wenn ihnen z.B. mitogene Reize wie Wachstumsfaktoren fehlen. Nach der G1 - Phase folgt die Synthese-Phase, in der die DNA-Replikation stattfindet. Es wird eine komplette Kopie der DNA erstellt. Wie alle Phasen des Zellzyklus ist die DNA - Replikation ständigen Kontrollmechanismen unterworfen. An die S - Phase schließt sich die G2 - Phase an. Die G2 - Phase dient als Sicherungsphase, in der die vollständige Replikation überprüft wird. Anschließend folgt die Mitose-Phase an deren Ende zwei identische Tochterzellen vorliegen. Schema 1.1 zeigt den vereinfachten Verlauf des Zellzyklus.



Schema 1.1: Vereinfachte Darstellung des Zellzyklus und seine Kontrollpunkte

1.1.1 Die Regulation des Zellzyklus

In die Koordination der Prozesse in den einzelnen Zellzyklusphasen sind eine Menge verschiedener regulatorischer Faktoren involviert. Ein kompliziertes Kontrollsystem sorgt für kontrolliertes Zellwachstum, sowie für die genomische Stabilität. Das Kontrollsystem manifestiert sich in sogenannten Kontrollpunkten, an denen der Verlauf des Zellzyklus, infolge von genotoxischen Stress oder ein nicht ordnungsgemäßer Ablauf der einzelnen Phasen gestoppt werden kann (Hartwelt und Weinert; 1989). Wenn in einem bestimmten Zeitraum der Schaden nicht behoben werden kann, werden Signalwege aktiviert, die zu Zellzyklusarrest oder Apoptose führen (King, K. L. und Cidlowski, J. A., 1998; Guo, M. und Hay, B. A., 1999). Für die genaue Regulation des Zellzyklus sind vor allem zwei Protein - Familien

verantwortlich. Zum einen sind das die Cyclin - abhängigen-Kinasen (CdK; *Cyclin dependent kinase*), die zur Familie der Serin - Threonin - Kinasen gehören, zum anderen die Cycline, die mit den CdKs ein heterodimeres Holoenzym bilden, wobei die CdKs die katalytische Untereinheit und die Cycline die regulatorische Untereinheit darstellen (Sherr, 1996) Die Cycline sind zyklusphasenspezifisch nur kurzzeitig aktiv und werden im Zytoplasma Ubiquitin-abhängig proteolytisch abgebaut. Cycline sind nur während bestimmter Perioden des Zellzyklus transient im Nukleus der Zelle vorhanden, was sie zu geeigneten zeitlichen Markern der Zellzyklusprogression macht (Johnson und Walker, 1999). Die Aktivierung der CdKs erfolgt über die Bindung des entsprechenden Cyclins. Die Cycline werden nach der Stufe des Zellzyklus in vier Klassen unterteilt.

1. **G1/S - Cycline:** sie legen die Zelle auf die DNA - Replikation fest und binden Cdks am Ende der G1 - Phase
2. **S - Cycline:** sie werden für den Beginn der DNA - Replikation gebraucht und binden Cdks während der S - Phase
3. **M - Cycline:** sie treiben die Ereignisse der Mitose voran.
4. **G1 - Cycline:** sie helfen beim Durchlaufen des Restriktionspunktes am Ende der G1 - Phase.

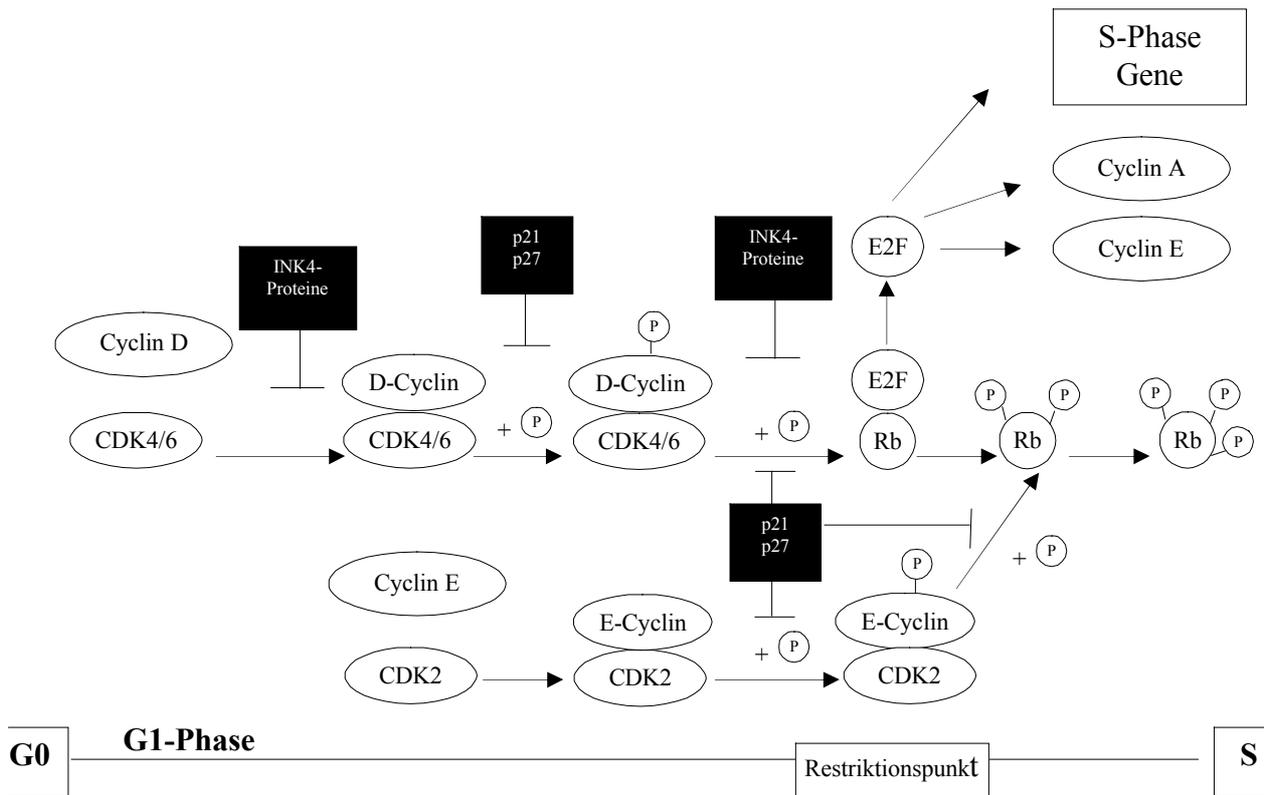
Abb.1.1 Unterteilng der Cycline (Alberts *et al.*, 2004).

Zur Zeit werden in der Literatur 9 CdKs beschrieben (Gray *et al.*, 1999). Die CdKs stehen neben der positiven Kontrolle durch Cyclin - Bindung und Phosphorylierung auch unter negativer Kontrolle durch u.a. CdK - Inhibitoren (CKI). Bis jetzt konnten in Säugetieren sieben verschiedene CKIs identifiziert werden (Harper und Adams, 2001; Sherr und Roberts, 1999). Die CKIs werden auf Grund ihrer Substratspezifität und Struktur in zwei Gruppen unterteilt. Die INK4-Familie (*Inhibitor of CDK4*) besteht aus p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D} und verhindert die Progression aus der G1-Phase in die S - Phase des Zellzyklus. Die Mitglieder der INK4-Familie verhindern die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Ewen, 1995), indem sie die Cyclin D abhängigen CdK4 und CdK6 hemmen (Sherr und Roberts, 1995). Die daraus resultierende Hypophosphorylierung von Rb hat zur Folge, dass E2F aus dem Komplex Rb/E2F nicht aktiviert werden kann und somit die Expression weiterer

Zellzyklus relevanter Faktoren (z.B. Cyclin E) gehemmt wird. Die CIP/KIP - Familie besteht aus p21/WAF1, p27/Kip1 und p57/Kip2. Diese sind in der Lage alle CdKs zu hemmen (Sherr und Roberts, 1995). Im Gegensatz zu den Cyclinen werden die CDks nahezu im Überschuss synthetisiert.

1.1.2 Regulation der G1 - Phase

Das Fortschreiten der Zelle aus der G0 - Phase in die G1 - Phase, sowie der Übergang von der G1 - Phase zur S-Phase wird am sogenannten Restriktionspunkt entschieden (Donjerkovic und Scott, 2000; Sherr, 1999). In der frühen G1 - Phase werden die sogenannten D - Cycline synthetisiert, die wiederum die CDK4 - und CDK6 - Kinasen aktivieren (G1 - CdK - Komplex). Cyclin D/CdK4 (CdK6) - Komplexe phosphorylieren das Retinoblastomprotein (Rb), dieses wird inaktiviert und tritt aus seinem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor E2F aus, welcher wiederum aktiv wird. E2F kann so zahlreiche essentielle Gene für die Weiterführung des Zellzyklus aktivieren. (Sherr und Roberts, 1999; Sherr, 1995). Diese codieren für Proteine, die für den Eintritt in die S-Phase nötig sind, so auch für Cyclin E (G1/S - Cycline) und Cyclin A (S - Cycline) in der späten G1-Phase (Sherr und Roberts, 1999). Neu gebildete CyclinE - CdK2 - Komplexe kontrollieren den Übergang von der G1 - Phase in die S - Phase. Zusätzlich führt der CyclinE/CdK2 - Komplex zu einer weiteren Phosphorylierung von Rb und bewirkt damit, dass es völlig ausgeschaltet bleibt (Vidal *et al.*, 2000). Diese Hyperphosphorylierung von Rb kann als positiver Mechanismus des Teilungsprozesses angesehen werden und bleibt bis zum Ende der G2 - Phase bestehen (Tamrakar *et al.*, 2000; Metheny *et al.*, 1995). Nach der Inaktivierung des Retinoblastomproteins phosphoryliert der Komplex das p27/Kip1 Protein und fördert die Degradation des Proteins. Weiterhin initiiert der CyclinE/CdK2 - Komplex in der frühen S-Phase die Duplikation des Zentrosomens und die DNA - Replikation. Eine vereinfachte Darstellung der regulatorischen Vorgänge der G1 - Phase findet sich in Schema 1.2.



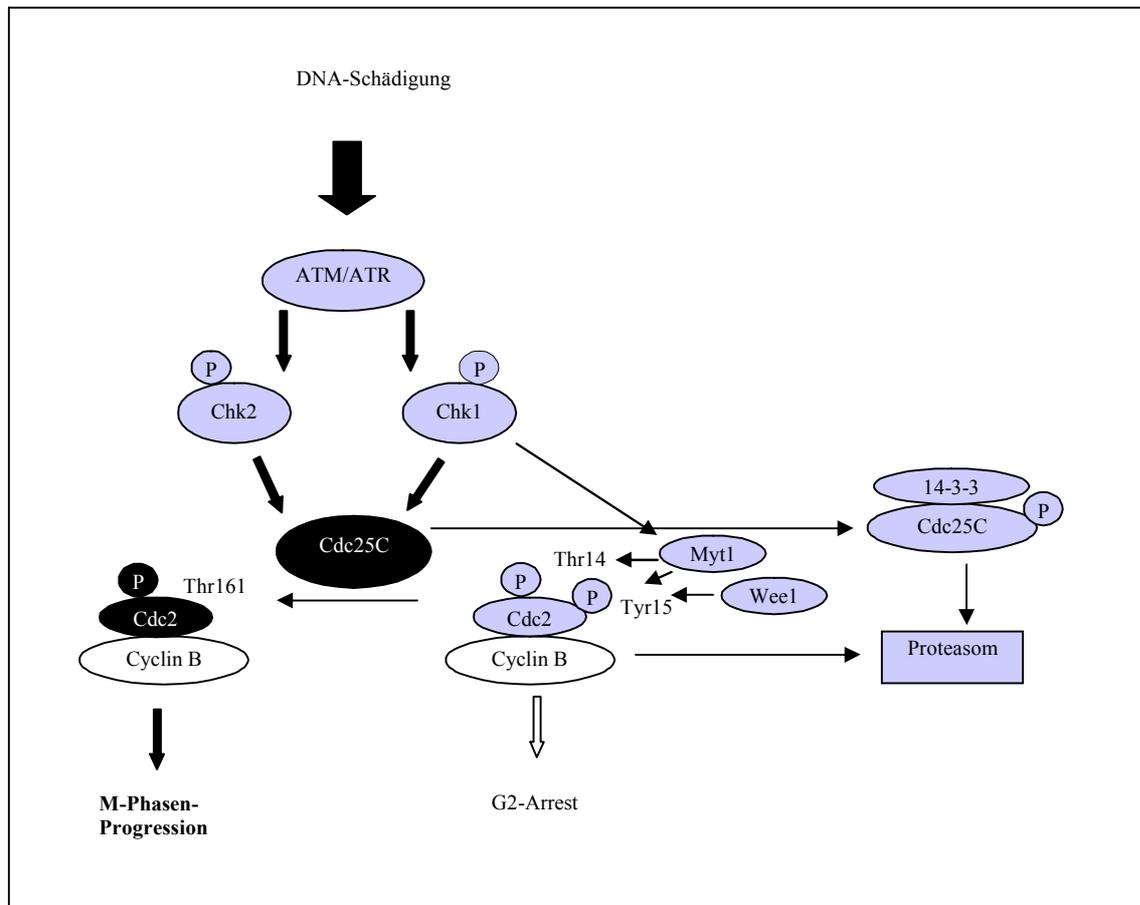
Schema 1.2 : Vereinfachte Darstellung der positiven und negativen regulatorischen Vorgänge der G1-Phase (modifiziert nach Sherr und Roberts, 1995)

In der frühen G1-Phase stimulieren Mitogene die Bildung von Cyclin D. Cyclin D aktiviert Cdk4/6 durch Bildung eines aktiven Holoenzym (D - Cyclin/Cdk4/6-Komplex). Im Laufe der G1 - Phase wird nach Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb) der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und kann für Proteine codieren, die für die Progression in die S - Phase essentiell sind. Unter anderem für Cyclin E, welches wiederum CDK2 durch Bildung eines E-Cyclin/Cdk2 - Komplex aktiviert. Dieser ist essentiell für die Hyperphosphorylierung des Rb - Proteins und damit für den Verlauf einzelner Phasen des Zellzyklus.

1.1.3 Regulation der G2/M - Phase

Der Verlauf der S-Phase, sowie der korrekte Verlauf der G2 - Phase wird durch den Cyclin A/Cdk2 - Komplex gesteuert. Während der S-Phase wirkt der Cyclin A/Cdk2 - Komplex positiv auf die DNA-Replikation. Nachdem die DNA-Replikation vollständig ist, steigt der Proteingehalt an Cyclin B. Cyclin B bildet einen Komplex mit Cdk1 (*cyclin-dependent kinase*) um den MPF (*mitosis-promoting factor*) zu bilden. CDK1 wurde früher auch als Cdc2 (*cell division cycle 2*) Kinase bezeichnet. Zur Aktivierung des MPF ist die Dephosphorylierung des Threonins 14 (Thr14), sowie die Dephosphorylierung des Thyrosins 15 (Tyr15) und die Phosphorylierung des

Threonins 161 (Thr161) durch die Cdc2 Phosphatase essentiell (Atherton-Fessler *et al*, 1994; King *et al*, 1994). Der aktive MPF initiiert die Prophase, gleichzeitig induziert der MPF die Zerstörung des Cyclins B und damit den Beginn der Anaphase. Die Beendigung des Zellzyklus erfolgt im Anschluss durch Dephosphorylierung von Thr 161 und damit der Inaktivierung der Cdc2.

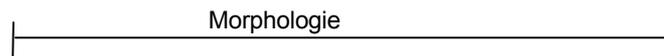


Schema 1.3: Vereinfachte Darstellung der regulatorischen Vorgänge in der G2 - Phase. Der aktive MPF vermittelt den Eintritt in die Mitose-Phase. Um enzymatisch wirksam zu sein, muss Cdc2 am Thr 14 und Tyr 15 dephosphoryliert werden. Ist die Cdc2 an diesen beiden Stellen phosphoryliert, wird der Komplex Cdc2/CyclinB über Proteasomen abgebaut. Die Cdc2 - Phosphatase vermittelt die Dephosphorylierung und die gleichzeitige Phosphorylierung am Thr161. Nach z.B. DNA - Schäden werden die ATM/ATR-Kinasen über u.a. Rad-Proteine (nicht in Abbildung gezeigt) aktiviert. Die ATM/ATR-Kinasen phosphorylieren Chk1 und Chk2 und aktivieren sie damit. Chk1 aktiviert die Wee Kinase, die wiederum für die Phosphorylierung der Cdc2 an Thr 14 und Tyr 15 verantwortlich ist und hemmt hierdurch die Progression der M-Phase. Chk1 und Chk2 phosphorylieren die Cdc25C, die im phosphorylierten Zustand an 14-3-3- Protein bindet und über die Proteasomen abgebaut wird. Damit wird die Dephosphorylierung von Cdc2 gehemmt und G2 - Arrest wird ausgelöst.

1.2 Apoptose – Der programmierte Zelltod

Zellproliferation und Zelltod sind eng miteinander verbundene Vorgänge.

Bereits im 19. Jahrhundert erkannten Forscher, dass der Zelltod physiologisch hervorgerufen werden kann. Lange wurde der Prozess jedoch als nicht relevant beurteilt. Erst im Jahre 1964 wurde der Begriff des programmierten Zelltodes durch Lockshin und Williams (Lockshin und Williams; 1965) verwendet und 1972 durch Kerr, Wyllie und Currie als Apoptose gekennzeichnet (Kerr *et al.*, 1974). Die Apoptose dient der Aufrechterhaltung der normalen Gewebemöostase, durch Eliminierung von krankhaft veränderten, alternden und überflüssigen Zellen (Thompson, 1995; Reed, 1999). Schema 1.4 zeigt eine Übersicht verschiedener Formen des Zelltodes mit deren morphologischen und biochemischen Eigenschaften.



| Formen des Zelltodes | Aussehen des Kerns | Zellmembran | Zytoplasma | Biochemische Eigenschaften |
|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Apoptose | Chromatin-kondensation; DNA-Fragmentation | Vesikelbildung, sog. „membrane blebbing“ | Bildung von „apoptotic bodies“ | Hauptsächlich Caspase - abhängig |
| Nekrose | unregelmäßige Chromatin - kondensation; wahllose Fragmentation der DNA | Anschwellung und Ruptur der Plasmamembran | Volumen-vergrößerung mit Vakuolenbildung; Anschwellung der Organellen | |
| Mitotische Katastrophe | Kernfragmentation; Mikronukleation | | | Initial Caspase-unabhängig; erhöhte CDK1/CyclinB Aktivität |
| Autophagie | Keine Bildung einer „DNA-Leiter“; teilweise Chromatin-kondensation | Vesikelbildung, sog. „membrane blebbing“ | Bildung von Autophagosomen | Caspase-unabhängig; erhöhte lysosomale Aktivität |

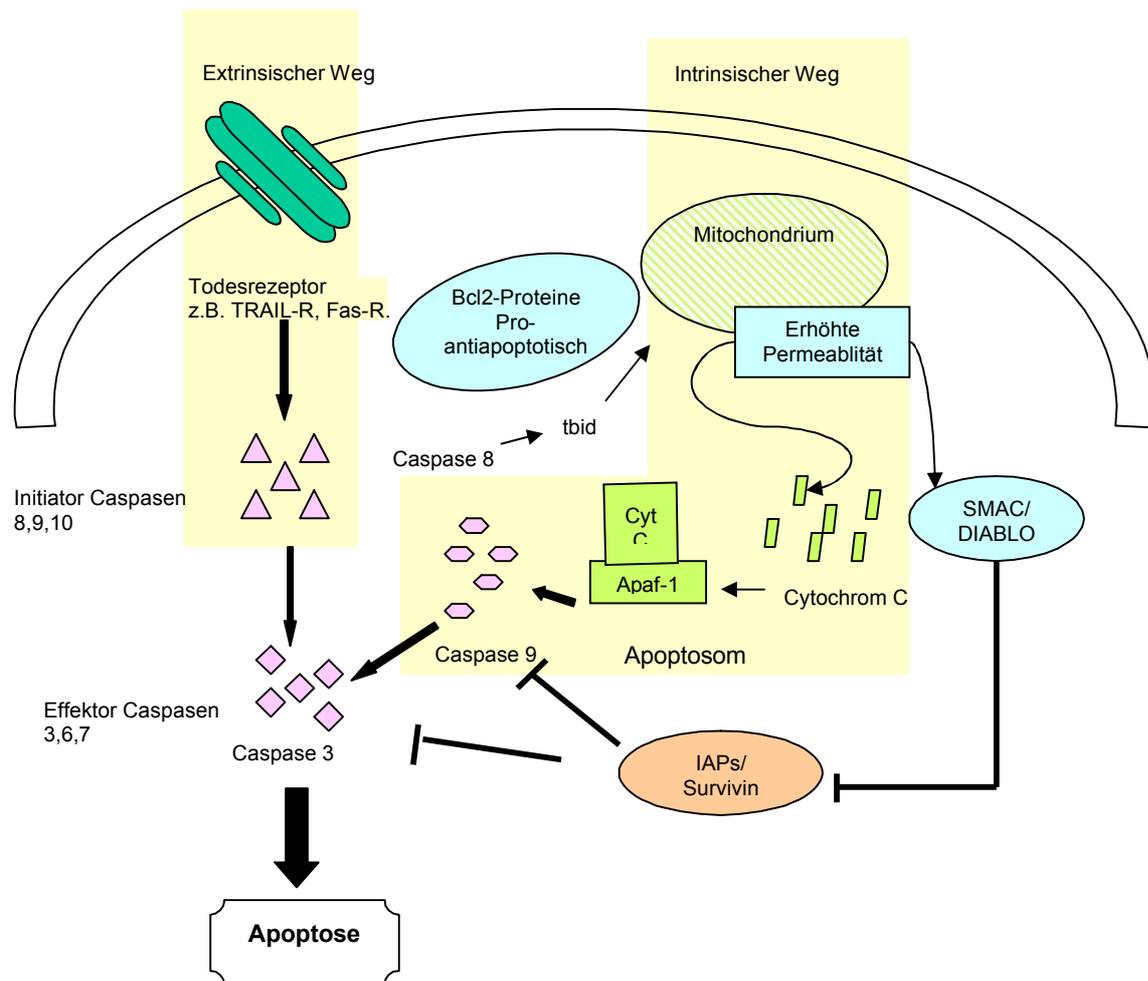
Schema 1.4: Formen des Zelltodes (modifiziert und stark vereinfacht nach Wheatley und McNeish, 2005).

1.2.1 Regulation der Apoptose - Bedeutung der IAPs („Inhibitors of apoptosis“)

Der Prozess der Apoptose ist vielschichtig und erfolgt über eine Reihe von Signalkaskaden, die hauptsächlich mit der Aktivierung von Cystein - Proteasen, den sogenannten Caspasen, den programmierten Zelltod auslösen. In der Zelle liegen die Caspasen als Procaspasen vor und werden erst durch Proteolyse enzymatisch aktiv (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Caspasen werden je nach Aktivierbarkeit und ihrem Substrat in Initiator- sowie Effektor - Caspasen unterteilt (Cohen, 1997). Die Initiator-Caspasen stehen am Anfang der Signalkaskade und können über zwei Wege aktiviert werden. Extrinsisch (*von außen*), über die Aktivierung sogenannter Todesrezeptoren wie CD95 - Rezeptor, TRAIL - R1 und TRAIL - R2, zum anderen über den intrinsischen, mitochondrialen Weg (s. Schema 1.5). Beide Wege der Apoptose - Signalkaskade können unabhängig voneinander funktionieren, sind jedoch auch funktionell miteinander verknüpft. Eine besondere Stellung nimmt Bid, ein Protein der Bcl-2 Familie ein. Bid wird durch einen Caspase 8 abhängigen Weg zu tBid (*trunkiertes Bid*) gespalten. tBid vermittelt nach der Translokation in die Mitochondrienmembran die Freisetzung von Cytochrom C. Cytochrom C bindet in Gegenwart von ATP (*Adenosintriphosphat*) an das Apaptermolekül Apaf (*apoptosis protease - activating - factor - 1*), um das Apoptosom zu formen. Das aktive Apoptosom führt zur Aktivierung der Caspase 9 (Luo *et al.*, 1998).

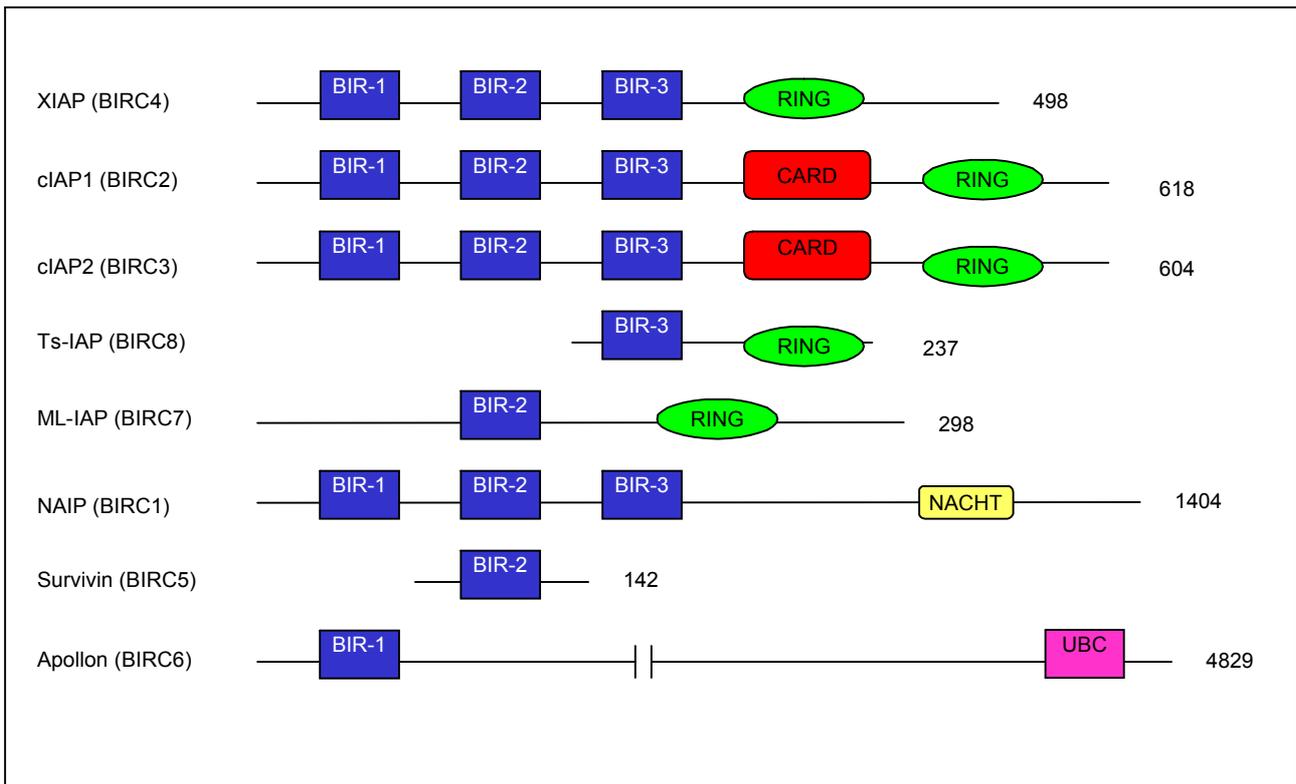
Die Signalkaskade des Apoptoseprozesses unterliegt normalerweise einer strengen Kontrolle. Einer Reihe von Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen, Malignome oder neurodegenerative Veränderungen werden der Fehlregulation der Apoptose zugeschrieben.

Es gibt Schätzungen, dass mehr als die Hälfte aller nicht therapierbaren Krankheiten auf einem Missverhältnis zwischen Proliferation und Apoptose beruhen (Rudin und Thompson, 1997). In der Karzinogenese spielen sowohl Dysregulation im Zellzyklus, sowie Fehlregulation in der Apoptose-Kaskade eine Rolle. Ursächlich beteiligt sind neben den eigentlichen Zellzyklus - und Apoptose-Regulatoren auch Störungen in Signalwegen, die genetische und chromosomale Stabilität kontrollieren (s. auch Kapitel 1.1).



Schema 1.5: Stark vereinfachte Darstellung der Apoptosekaskade (modifiziert nach Debatin und Kramer, 2004; Altieri, 2003b). Die Aktivierung der Apoptosekaskade über den extrinsischen Weg erfolgt über Bildung eines DISC (*death inducing signaling complex*) (nicht in Abbildung dargestellt). Die membranständigen Rezeptoren wie TRAIL - Rezeptor (*TNF - related apoptosis inducing ligand - receptor*) und Fas/CD95-Rezeptor (Sartorius *et al.*, 2001) trimerisieren nach Kontakt mit deren Liganden und bilden einen membrangebundenen Signalkomplex. Dieser Komplex rekrutiert die FADD (*Fas-associated death domain*), welche wiederum Procaspase 8 aus dem Cytosol bindet. Nach Bildung der DISC und der autoproteolytischen Spaltung der Procaspase 8 können die nachgeschalteten Effektor Caspasen proteolytisiert werden und damit die Caspasenkaskade in Gang gebracht werden. Der intrinsische Weg erfolgt über die Bildung eines Apotosoms. Ein Apotosom ist ein heptagonaler Komplex aus Apaf - 1 (*apoptosis protease - activating - factor - 1*) - Molekülen, welches nach Anlagerung von Cytochrom C seine Konformation ändert , was zu einer Oligomersierung führt (Pop *et al.*, 2006; Shi, 2006; Bao und Shi, 2007). Das aktive Apotosom aktiviert die Procaspase 9 zu ihrer Wirkform. Beide Wege münden in der Aktivierung der Effektor-Caspasen. Die aktivierten Effektor-Caspasen, zu diesen zählen vor allem die Caspasen -3, -6 und -7, übernehmen die Ausführung des Todesprogramms, die Degradation hunderter regulatorischer Proteine, sowie die Aktivierung anderer Protease Systeme und Endonukleasen. (Slee *et al.*, 2001; Nicholson *et al.*, 1999; Nunez *et al.*, 1998). Die zentrale Regulationsstelle des intrinsischen Weges sind die Mitochondrien, da sie apoptotische Faktoren, wie Cytochrom C ins Cytosol freisetzen zu vermögen. Die Permeabilität der Mitochondrien wird unter anderem durch UV-Strahlung, Chemotherapeutika, oder auch durch Proteine der Bcl - 2 Familie geregelt. Die Inhibitoren der Apoptose (IAP) wirken durch Hemmung der Caspase 3 und der Caspase 9 antiapoptotisch. Ein aus den Mitochondrien freigesetzter Faktor, Smac/Diablo (*second mitochondrial derived activator of caspases / direct IAP binding protein with low pI*) hemmt die IAP-Funktion und unterstützt die Aktivierung von Caspase - 9.

Eine Menge von Proteinen sind ausschlaggebend für die Apoptoseregulation. Zwei große Genfamilien sind bei Menschen bis jetzt identifiziert worden: Proteine der Bcl - 2 Familie und die IAPs (*Inhibitoren der Apoptose*). 25 Gene der Bcl - 2 Familie sind bis heute bekannt (Gross, 2005). Prinzipiell lassen sich die Mitglieder der Bcl - 2 Familie in zwei Gruppen unterteilen, in pro- und antiapoptotisch wirksame Proteine. Zwei permanent aktive antiapoptotischen Faktoren sind Bcl2 und Bclx_L, welche die Cytochrom C Freisetzung aus den Mitochondrien zu verhindern vermögen (Shimizu *et al.*, 1999). Zu den proapoptischen Mitgliedern zählen Bim, Bad und Bid, welche in der Lage sind Bcl2 zu inhibieren (Luo *et al.*, 1998), Bax und Bak, welche an der Mitochondrienmembran aktiv sind und Cytochrom C und andere Apoptose - fördernde Moleküle freisetzen können (Shimizu *et al.*, 1999). Zur genauen Übersicht siehe auch Cory und Adams, 2002. Die IAPs gehören zu einer heterogenen hochkonservierten Proteinfamilie, deren Hauptmerkmal mindestens eine sogenannte BIR-Domäne (*Baculovirus IAP repeat*) darstellt (Crook *et al.*, 1993) und ein drei Cystein - ein Histidin Zinkbindungsmotiv gemeinsam haben. Vertreter der IAP - Familie hemmen sowohl die extrinsische als auch die intrinsische Apoptosekaskade durch Inhibition bereits aktivierter Caspasen. Die im Carboxy-Terminus lokalisierte RING (*really interesting new gene*) - Domäne ist für die Ubiquitinylierung und anschließender Degradation des Inhibitors und daran gebundenen Caspasen verantwortlich. Bis jetzt sind 8 IAPs bekannt (Deveraux und Reed, 1999). Zur Übersicht siehe Tabelle 2. Besonders zu erwähnen ist, dass Survivin innerhalb der Gruppe der IAPs eine Sonderrolle einnimmt, da es als Apoptose - Inhibitor einerseits und Zellzyklusregulator andererseits eine duale Funktion besitzt (Altieri, 2003a).



Schema 1.6: Domänenstruktur und Länge der IAPs (modifiziert nach Wheatley und McNeish, 2001). IAPs bestehen aus 1 - 3 BIR Domänen. Die Länge der einzelnen IAPs sind in Aminosäuren angegeben. Häufig sind sie Multidomänenproteine, die auch Adaptermoleküle, wie CARD (*Caspase activation and recruitment domain*), die Ubiquitinligase-Domäne UBC, oder die RING Domäne aufweisen. Die NACHT-Domäne stellt eine putitative ATP-Bindungseinheit dar.

1.2.2 Survivin - Ein Bindeglied zwischen Zellzyklus und Apoptose

Survivin wurde 1997 erstmals von Ambrosini mittels Hybridisierungsscreening einer humanen Genbank mit der cDNA des Faktor-Xa-Rezeptors EPR-1 (*effector cell protease receptor-1*) nachgewiesen (Ambrosini *et al.*, 1997).

Das 14,7 kb große Survivin-Gen ist auf dem Chromosom 17q25 lokalisiert (Ambrosini *et al.*; 1998). Survivin besitzt im Unterschied zu den anderen IAP keine Carboxyterminale Ringfinger-Domäne, sondern eine α helikale „coiled-coil-domain“ (Ambrosini *et al.*; 1997), weiterhin besitzt Survivin im Gegensatz zu den anderen IAP nur eine BIR-Domäne. Die α helikale „coiled-coil-domain“ kann mit polymerisierten Mikrotubuli interagieren (Ambrosini *et al.*, 1998; Li und Altieri, 1999). Neben dem Wildtyp Survivin existieren 4 alternative Spleißvarianten. Survivin ist während der fetalen Entwicklung, aber nicht in den meisten adulten Geweben exprimiert, wurde jedoch in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen (Ambrosini *et al.*, 1997). Eine

Überexpression von Survivin wurde z.B. in Tumoren des Pankreas (Sato *et al.*, 2001), des Darms (Sarela *et al.*, 2001; Kawasaki *et al.*, 1998), bei Leukämien (Adida *et al.*, 2000a, Adida *et al.*, 2000b) und Hirntumoren (Chakravarti *et al.*, 2002) beschrieben. Die Survivin Expression wird durch Wildtyp-p53 (Hoffman *et al.*, 2002, Mirza *et al.*, 2002) und dem Retinoblastom-Protein (Jiang *et al.*, 2004) reprimiert und durch den Transkriptionsfaktor E2F1 (Hoffman *et al.*, 2002, Jiang *et al.*, 2004) gefördert. Mutiertes p53 und RB verlieren die Fähigkeit Survivin zu regulieren (Tsuji *et al.*, 2004). Da viele Tumore mutiertes p53 exprimieren (O'Connor *et al.*, 1997), kann die Regulation von Survivin - Expression erheblich gestört sein. Die Funktion von Survivin als „*Inhibitor der Apoptose*“ durch Inhibierung der Caspasen (Tamm *et al.*, 1998; Conway *et al.*, 2002; Marusawa *et al.*, 2003) wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren zeigten eine direkte Interaktion mit Caspasen - 3 und - 7 (Tamm *et al.*, 1998; Conway *et al.*, 2000), die Befunde anderer Autoren sprechen dagegen (Banks *et al.*, 2000; Verdecia *et al.*, 2000, Marusawa *et al.*, 2003). Die Interaktion von Survivin mit der Caspase 9 (s. Schema 1.4) erfolgt über die Phosphorylierung von Survivin durch die Cdk1 am Threonin 34 (Thr34) (O'Connor *et al.*, 2000). Ohne diese Phosphorylierung würde der Survivin – Caspase - 9 - Komplex gespalten und eine Caspase - 9 abhängige Apoptose ausgelöst werden. Dieser Befund wird durch die Hemmung der Apoptose durch den Caspase-Inhibitor zVAD - *fmk* unterstützt. Phosphorylierungsmutanten wirken in Überexpressionsstudien sogar proapoptotisch (O'Connor *et al.*, 2000). Die Hemmung der Caspase - 9 abhängigen Apoptose verläuft über das Protein HBXIP (*hepatitis B virus x protein-interacting protein*) als Cofaktor (Marsawa *et al.*, 2003). Der Komplex Survivin - HBXIP bindet an die Caspase - 9 und inhibiert deren Bindung an Apaf - 1, was zu einer selektiven Blockierung des mitochondrialen Apoptoseweges führt (Marsawa *et al.*, 2003). Hauptsächlich wurde Survivin als zytoplasmatisch lokalisiert beschrieben, konnte aber auch im Nukleus gefunden werden (Fortugno *et al.*, 2002). Dort fungiert es als ein so genanntes *Chromosomal-Passenger-Protein* und hat eine wichtige Funktion während der Zellteilung. Survivin bindet an die Zentromere der Chromosomen in der Prophase/Metaphase und lässt sich an den Mikrotubuli der Teilungsspindel während der Anaphase/Telophase nachweisen (Li *et al.*, 1998; Uren *et al.*, 2000). Dort kolokalisiert Survivin mit anderen *Chromosomal-Passenger-Proteinen*, wie INCENP (*inner-centromer-binding-protein*) und Aurora B (*aurora kinase B*) (Bischoff und

Plowman, 1999; Uren *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde Survivin an den Kinetochoren der Teilungsspindel gefunden (Skoufias *et al.*, 2000). Ein „knock out“ von Survivin verursacht Zellteilungsdefekte, die durch multipolare, mitotische Spindeln und polyploiden Zellen gekennzeichnet sind (Li, *et al.*, 1999).

1.3 Das Pankreaskarzinom

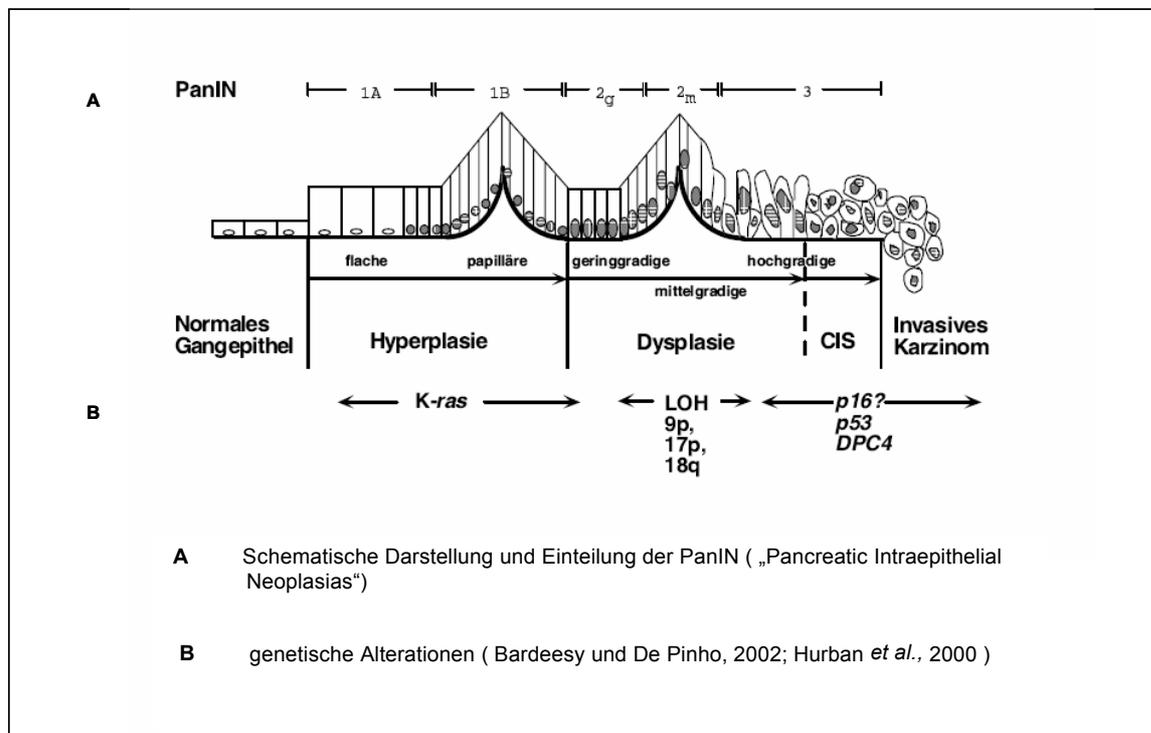
1.3.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom stellt bei Männern laut der amerikanischen Krebsstatistik von 2008 die 10. - häufigste Tumor Neuerkrankung dar. Das Pankreaskarzinom ist ferner die 4. - häufigste Todesursache durch Krebs beider Geschlechter (Jemal, 2008). In Deutschland erkranken laut Robert-Koch-Institut zwischen 11800 und 13500 Menschen jedes Jahr neu an Pankreaskarzinom (Robert Koch - Institut und GEKID 2006). Das Pankreaskarzinom tritt vorwiegend im höheren Alter auf, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen 74 Jahre und bei Männern 67 Jahre beträgt (de Braund., 2004). Seit einigen Jahren erkranken Frauen häufiger als Männer (Robert Koch -Institut und GEKID 2006).

1.3.2 Histologie und Pathophysiologie

Das Pankreas ist eine der wichtigsten Drüsen des Verdauungssystems. Es lässt sich in das exokrine Kompartiment und in das endokrine Kompartiment unterteilen. Der exokrine Teil des Pankreas besteht hauptsächlich aus Azinar- und Duktzellen, die Verdauungsenzyme produzieren. Der endokrine Teil synthetisiert Hormone zur Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels (Bardeesy und DePhino., 2002). Den größten Anteil der Pankreaskarzinome von 90% bilden Adenokarzinome der exokrinen Zellen vom duktalem Phänotyp (Murr, 1994). In der Entwicklung des epithelialen Tumors treten in der Regel beim Pankreaskarzinom, wie auch anderen humanen Neoplasien, mehrere Vorstufen auf. Jede dieser Vorstufen ist mit charakteristischen morphologischen und molekularen Veränderungen verbunden.

Die maligne Transformation, die als *Pancreatic Intraepithelial Neoplasias* (PanIN) klassifiziert wird, wird in drei Stadien unterteilt (Hruban *et al.*, 2000). (Abb 1.2)



Wie in Abb.1.2 dargestellt, korrelieren die morphologischen Veränderungen der dukталen Zellen in den verschiedenen Stufen der PanIN mit einer steigenden Anzahl genetischer Veränderungen.

In 90% der Adenokarzinome liegt eine mutationsbedingte Aktivierung des Kirsten-*ras* (K - *ras*) Onkogenes vor, weiter weisen ca. 90% aller Pankreaskarzinome eine Veränderung des Tumorsupressorproteins p53 in seiner Expression bzw. Funktion auf. Die Inaktivierung der Tumorsupressorgene p16 und SMAD 4 spielen zusätzlich eine wichtige Rolle in der Tumorgenese (Hruban *et al.*, 2000; Ghaneh *et al.*, 2002, Schneider und Schmid, 2003).

Die mutationsbedingten Veränderungen in diesen Genen sind die vier häufigsten Alterationen im Pankreasadenokarzinom. Im Einzelnen führen die Alterationen zu Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod und zur Deregulation des Zellzyklus (Bardeesy und DePhino, 2002; Schneider und Schmid, 2003).

1.3.3 Risikofaktoren

Die genaue Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist unbekannt. Nikotin gilt als einer der sichersten Faktoren, die ein erhöhtes Risiko für die Entstehung des Pankreaskarzinoms darstellt (Falk, 1988; Villeneuve *et al.* 2000). Als weiterhin gesicherte disponierende Faktoren gelten chronische Pankreatitis, Diabetes mellitus, sowie fettreiche Ernährung und daraus resultierendes Übergewicht. (Michand de Gonzalez, 2001) Die direkte Beziehung für Alkohol an der Entstehung des Pankreaskarzinoms (Ghardirian *et al.*, 1991) konnte in neueren Studien nicht bestätigt werden, jedoch spielt der Zusammenhang zwischen Alkohol und chronischer Pankreatitis eine wichtige Rolle in der Entstehung (Whitcomb und Pogue-Geile, 2002).

1.3.4 Prognose

Zum Zeitpunkt der Diagnose ist oft nur noch eine palliative Therapie möglich, da häufig bereits ein fortgeschrittener Tumorstatus erreicht ist. Bei bis zu 50% der Patienten bei Diagnosestellung sind bereits Lymphknoten und periphere Nerven vom Tumor befallen (Takahashi, 1997). Die 5 - Jahres Überlebensrate liegt bei inoperablen Patienten unverändert bei 1 - 2%.

1.4 **6-Amino-11, 12-dihydro-11- (3', 5'-dimethoxy-4'-hydroxyphenyl) benzo [c] phenanthridiniumchlorid (BP11)**

Zur Vereinfachung wird im Folgenden die Abkürzung BP11 statt 6 -Amino -11, 12-dihydro-11- (3', 5'-dimethoxy-4' -hydroxyphenyl) benzo [c] phenanthridiniumchlorid benutzt. BP11 gehört zur Substanzklasse der Benzo [c] phenanthridine und wurde im Rahmen der Promotion von Ilka Kock (Kock, 2003) synthetisiert. Eine größere Anzahl von natürlich vorkommenden Alkaloiden weist ein Benzo[c]phenanthridin-Grundgerüst auf, deren Wirkungsspektrum bekannt ist (Simeon *et al.*, 1989). Der wichtigste Vertreter diese Gruppe ist das Fagaronin (Abb.1.3), welches erstmals

1972 aus der Wurzel von *Fagara zanthoxyloides* isoliert wurde (Messmer *et al.*, 1972).

Abb.1.3:

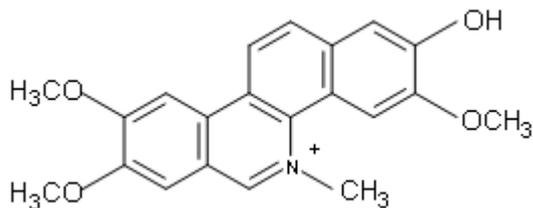


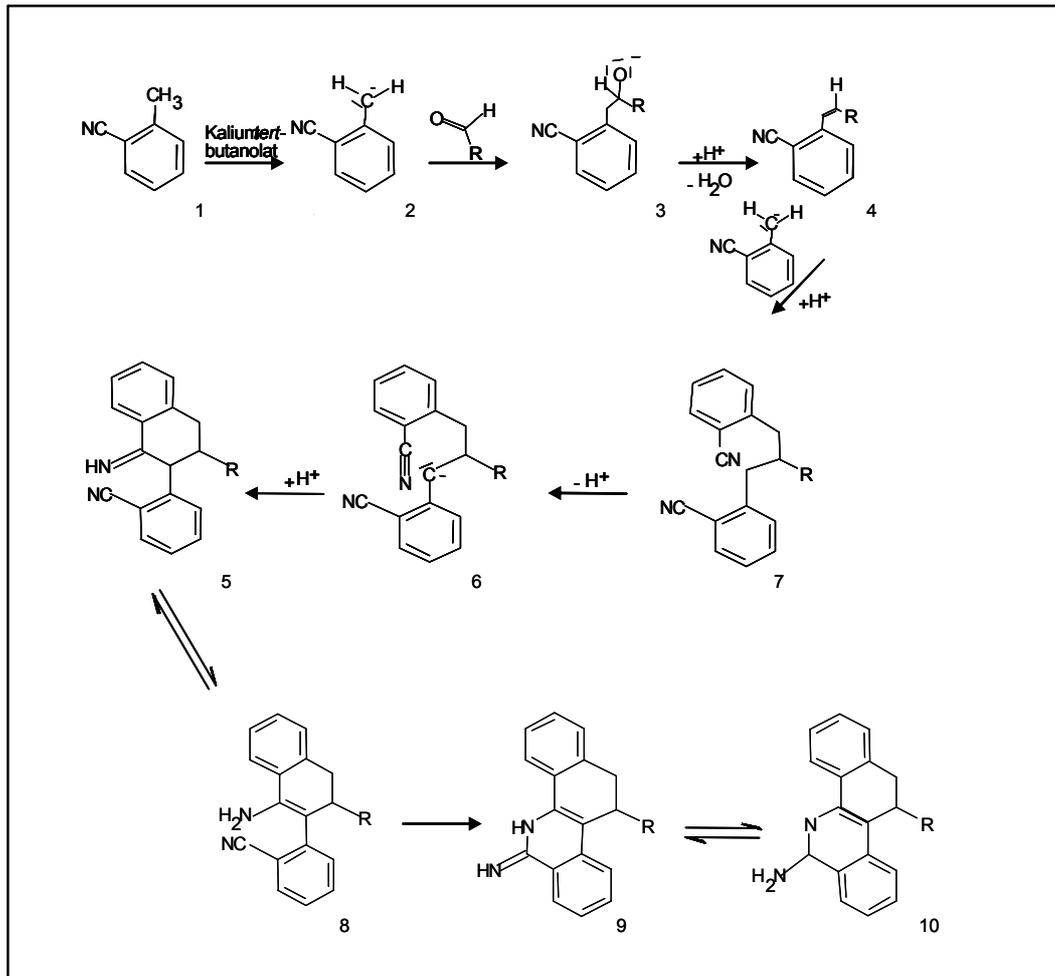
Abb. 1.3: Das natürlich vorkommende Alkaloid Fagaronin mit einem Benzo[c]phenanthridin-Grundgerüst.

Im Laufe der Zeit wurde das Wirkspektrum des Fagaronins weiter untersucht, auch Wirkmechanismen anderer Alkaloide mit einem Benzo[c]phenanthridin-Grundgerüst wurden analysiert (Sethi, 1979, Pezzuto *et al.*, 1983; Kakiuchi *et al.*, 1987; Larsen *et al.*, 1993). So konnte gezeigt werden, dass das Fagaronin anti - leukämische Fähigkeiten, sowie DNA-Polymerase-inhibierende Eigenschaften zeigt. Zusätzlich fungiert Fagaronin als Inhibitor der Topoisomerase-I und II (Messmer *et al.*, 1972; Sethi, 1976; Larsen *et al.*, 1993). Da einige der natürlich vorkommenden Alkaloide jedoch eine hohe Toxizität aufweisen, wurden Synthesewege für neue, weniger toxische Benzo[c]phenanthridin - Derivate entwickelt (Mackay *et al.*, 1997). Die Synthesewege erwiesen sich als lang und aufwendig. Aufgrund der vielversprechenden Aktivität der Benzo[c]phenanthridin-Derivate entwickelten Clement und Weide einen neuen sehr kurzen und effizienten Syntheseweg (Clement und Weide, 1995).

Schema 1.7



Schema 1.7 : Synthese der Benzo[c]phenanthridin-Derivate nach Clement und Weide, 1995.



Schema 1.8: Reaktionsmechanismus nach Wolschendorf für die 6-Amino-dihydrobenzo[c]phenanthridine - Synthese (Wolschendorf, 2000).

1. Deprotonierung des o-Tolunitrils durch Kalium-tert-butanolat. 2. und 3. Addition entsprechend einer Knoevenagel-Kondensation des Carbanions (2) an die Carbonylgruppe der Aldehydkomponente (3.). 4. Bildung eines Stilben-Derivates. 5. Addition eines weiteren Carbanions des o-Tolunitrils an das Stilben-Derivat. 6., 7. und 8. Bildung eines Iminonitrils (7.) durch Reaktion des Carbanions (6.) mit der Nitrilgruppe. Tautomerie-Gleichgewicht des Iminonitrils (7.) mit Enaminnitril (8.). 9. Addition der Amino-Gruppe an die Nitrilfunktion. 10. Bildung des 6-Amino-11,12-dihydro-benzo[c]phenanthridins.

Einige der von Weide, (1995); Wolschendorf, (2000) und Kock, (2003) beschriebenen Verbindungen wurden bereits auf ihre zytotoxischen Wirkungen getestet und lieferten vielversprechende Ergebnisse. Zur Untersuchung des Wirkmechanismus, so wie für einen eventuell therapeutischen Nutzen ist eine ausreichende Löslichkeit unumgänglich. Im Rahmen der Dissertation von Ilka Kock, 2003 wurde unter anderem die Wasserlöslichkeit der nur mäßig löslichen Benzo[c]phenanthridine erhöht. Die Erhöhung der Löslichkeit wurde durch

Einführung von Hydroxy-Gruppen in Position 11 des Ringgerüsts gewährleistet (Abb. 1.7) (Kock, 2003). Das daraus synthetisierte 6 - Amino -11,12-dihydro -11-(3',5'-dimethoxy-4'-hydroxyphenyl)benzo[c]phenanthridiniumchlorid entspricht dem BP11 und ergab in den Tests des NCI („National Cancer Institute“, Maryland, USA) und der Firma Baxter (Frankfurt) das Phenanthridin mit der größten Antitumor-Aktivität aller Verbindungen (Kock, 2003).

6-Amino-11-(3',5'-dimethoxy-4'-hydroxyphenyl)-11,12-dihydrobenzo[c]phenanthridiniumchlorid

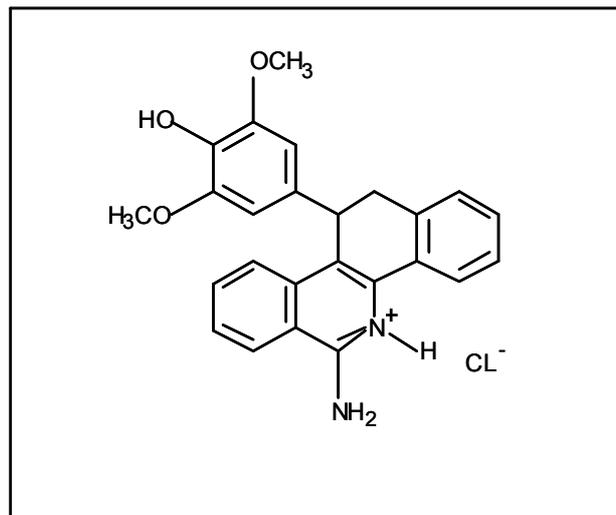


Abb. 1.4 Formel von BP11

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Aufgrund der schlechten Prognose und der seit Jahren stagnierenden Entwicklung neuer Medikamenten und Therapien, die eine palliative Therapie des Pankreaskarzinoms ermöglichen, ist es von besonderer Interesse und Wichtigkeit neue innovative potentielle Zytostatika zu entwickeln. Einige von Kock, 2003 synthetisierte Benzo[c]phenanthridin-Derivate wurden bereits in in-vitro Testsysteme des NCI („National Cancer Institute“), der Firma Baxter (ehemals ASTA Medica) und in Kaiserslautern auf ihr zytotoxisches Potential untersucht. So zeigten einige der ausgesuchten Benzo[c]phenanthridin-Derivate Selektivität gegenüber den Krebsarten Leukämie, Melanom und Mammakarzinom (Kock, 2003). Obwohl das Pankreaskarzinom eines der aggressivsten Tumore darstellt und die 5-Jahresüberlebensrate nach wie vor bei unter 5% liegt, wurden die von Kock ausgesuchten Verbindungen nicht im „In Vitro Cell Line Screening“ auf Ihre Aktivität

gegenüber Pankreaskarzinomzelllinien getestet. 6 – Amino - 11 - (3' 5' - dimethoxy - 4' - hydroxyphenyl) - 11, 12 - dihydrobenzo[c]phenanthridiniumchlorid zeigte die größte Antitumor-Aktivität von allen ausgesuchten Verbindungen und wurde aus diesem Grund für die Pankreaskarzinom - Forschung ausgewählt. Die Fragestellung dieser Arbeit basiert auf den ersten Ergebnissen des „In Vitro Cell Line Screenings“, wobei im Rahmen dieser Dissertation der Wirkmechanismus von BP11 zu klären war.

2 MATERIAL

2.1 Geräte und Materialien

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Casy®Model TT Cell Counter | Innovatis AG, Reutlingen |
| Curix 60 Entwickler | Agfa, Dübendorf |
| Elektrophorese-Kammer | Invitrogen, Karlsruhe |
| Elisa- Reader | Anthos, Salzburg, Österreich |
| FACS Calibur Analyser | BD Biosciences, Heidelberg |
| Falcon | BioRad, München |
| Hyperfilm-ECL | Amersham, Braunschweig |
| iCycler TM - Real - time PCR | BioRad, München |
| Immobilon - P | Millipore, Eschborn |
| Kamera; Canon E 450 | Axioscop 2, Zeiss; Kamera Winder; Göttingen; |
| Kühlzentrifuge (5415R) | Eppendorf, Hamburg |
| Liquid Szintilations Counter | Wallace Oy, Turku, Finnland |
| Minifuge T | Invitrogen, Karlsruhe |
| Mikroskop | Olympus CK2 - TR, Olympus Optical CO LTD, Japan |
| Mikrotiterplatter mit sechs, zwölf und Sechsendneunzig Kavitäten | Sarstedt, Nümbrecht |
| Polyvinylidene - Diflourid (PVDF) | Millipore, Eschborn |
| Standard Power Pack P25 | Biometra, Göttingen |
| Sicherheitswerkbank | Nuaire, Plymouth, USA |
| Whatmann 3MM Filterpapier | Walter, Kiel |
| Zellharvester | Skatron, Lier, Norwegen |
| Zellkulturbrutschrank | Thermo Bioscience, Dreieich |
| Zellkulturflaschen | BioRad, München |

2.2 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Accutase | PAA, Colbe |
| Annexin V | Bioscience, Heidelberg |
| Apoptose-Detection Kit | Clontech, Frankreich |
| BCA Proteinbestimmungs-Reagenz | Pierce Biotechnology, München |
| Blue Juice Gel Loading Buffer (10x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Serva Electrophoresis |
| BP11 | Pharmazeutisches Institut, Kiel |
| Bromphenolblau | LKB Bromma, Schweden |
| Casy ®ton | Schärfe System, Reutlingen |
| Complete Tabletten | Roche, Mannheim |
| dCTP | Amersham, Braunschweig |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, München |
| DTT (Dithiothreitol) | Roth, Karlsruhe |
| ECL™ / ECL™ plus | Biosciences, Buckinghamshire, UK Chemiluminescence |
| EDTA (Ethyldiamintetraacetat) | Sigma-Aldrich, München |
| EMSA - Bindungspuffer | Stratagene, Leek, Niederlande |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| Ez4U | Biomedica, Österreich |
| FCS | Gibco BRL, Eggenstein |
| Gelshift™ Kit | Active Motife, USA |
| Glutamin | Gibco BRL, Eggenstein |
| Glycerin | Sigma-Aldrich, München |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| Hepes | Sigma-Aldrich, München |
| Hoechst Nr.33258 | Sigma-Aldrich, München |
| KCl (Kalium Chlorid) | Roth, Karlsruhe |
| Kristallviolett | Roth, Karlsruhe |
| LDH Zytotoxizitätsassay | Clontech, Frankreich |
| Magermilchpulver | Roth, Karlsruhe |
| β - Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt |

| | |
|----------------------------------------------|--------------------------------------|
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Methyl - H ³ - Thymidin | Ge Healthcare, München |
| Natriumazid (NaN ₃) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth, Karlsruhe |
| [α ³² P] | Amersham, Braunschweig |
| (PBS) 1640 - Zellkultur - Buffered Saline | Gibco BRL, Eggenstein |
| Phosphate Budded Saline (PBS) | Invitrogen, Karlsruhe |
| Phospho - stop Tabletten | Roche, Mannheim |
| Pipetten | Sarstedt, Nürnberg |
| Porphobilinogen deaminase (PBGD) | Eurofins MWG Operon, Ebersberg |
| Propidium Iodid | Sigma - Aldrich, München |
| Pyruvat | Gibco BRL, Eggenstein |
| Rainbowmarker | Ge Healthcare, München |
| Reverse Transkriptase | Invitrogen, Karlsruhe |
| RNAse A | Boehringer, Mannheim |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| RPMI 1640 Medium | Gibco BRL, Eggenstein |
| SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) | AppliChem, Darmstadt |
| Sucrose | Roth, Karlsruhe |
| Supershift first strand cDNA Synthese Kit | Invitrogen, Karlsruhe |
| TRAIL | R&D Systems, Wiesbaden |
| Tris - Base | Merck, Darmstadt |
| Triton | Sigma-Aldrich, München |
| Tween 20 | Merck, Darmstadt |
| Verapamil | Monika Olenska, Mol. Onkologie, Kiel |
| ZVAD-fmk | Bachem, Heidelberg |

2.3 Antikörper und rekombinante Proteine

2.3.1 Primäre Antikörper

| Antikörper | Wirt | Bezugsquellen | Eingesetzte Verdünnung |
|-----------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------|------------------------|
| anti - β - Aktin | Maus | Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA | 1 : 10.000 |
| anti - phosphor p42/p44 | Maus | Cell Signaling, Frankfurt | 1 : 1000 |
| anti - Phosphor chk 2 (Thr 68) | Kaninchen | Cell Signaling, Frankfurt | 1 : 1000 |
| anti chk2 | Kaninchen | Cell Signaling, Frankfurt | 1 : 1000 |
| anti - p27 Kip1 | Kaninchen | Cell Signaling, Frankfurt | 1 : 1000 |
| anti - p21 WAF1/Cip1 | Maus | Cell Signaling, Frankfurt | 1 : 1000 |
| anti - PARP | Kaninchen | Cell Signaling, Frankfurt | 1 : 1000 |
| anti - α Tubulin | Maus | Cell Signaling, Frankfurt; Uwe Knippschild, Ulm | 1 : 10000 |
| anti - β Tubulin | Maus | Uwe Knippschild, Ulm | 1 : 10000 |
| anti - γ Tubulin | Maus | Uwe Knippschild, Ulm | 1 : 10000 |
| anti - Survivin | Kaninchen | Cell Signaling, Frankfurt | 1 : 1000 |

2.3.2 Sekundäre Antikörper

| | | | |
|-------------------------------------------|-------|----------------|----------|
| anti - Kaninchen IgG (HRP - gekoppelt) | Ziege | Cell Signaling | 1 : 3000 |
| anti - Maus IgG (HRP - gekoppelt) | Ziege | Cell Signaling | 1 : 2000 |

2.4 Oligonukleotide - Survivin-spezifische Primer für die RT - PCR

forward Primer 5`-GGACCACCGCATCTCTACAT-3` (Pos. 2855 - 2874)

reverse Primer 5`-GCACTTTCTTCGCAGTTTCC-3` (Pos. 11990 - 12009)

2.5 Zelllinien

| |
|------------------------------------------------------------------|
| Pankreaskarzinomzelllinien |
| Panc89 Colo357/ wt Colo357/ Bcl _x L PancTu-1 |
| Humane Fibroblastenzelllinie |
| KIF5 |

3 METHODEN

3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in Einfriermedium bestehend aus FCS und 10% DMSO in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Nach dem Auftauen der Zellen bei 37°C wurden sie mit Kulturmedium RPMI 1640 versetzt. Die Kultivierung erfolgte in einer mit Wasserdampf gesättigter und 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre bei 37°C in einem Heraeus Brutschrank. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit Trypsin abgelöst und passagiert. Die Zellen wuchsen adhärent und einschichtig.

Kulturmedium

| | |
|------------------------------|-----------------------------------------------------|
| RPMI 1640 Medium mit (1x) | FCS (10%), Glutamin (2 mM) und Pyruvat (2 mM) |
|------------------------------|-----------------------------------------------------|

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen mit einer Dichte von $2,8 \times 10^5$ Zellen/well in 6 - well Platten ausgesät.

Nach 24 Stunden, bei einer Konfluenz von ca. 70% wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von BP11 behandelt. Die Kontrollzellen wurden mit Medium weiter kultiviert. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO. Die Zellen wurden für die jeweilige Versuchsdauer bei 37°C inkubiert.

Zur Extraktion der Proteine wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je nach Konfluenz mit unterschiedlichen Mengen RIPA - Puffer lysiert, 10 min. auf Eis inkubiert und für 20 min. bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurden

die Zellen mit Zellschabern von den Wells abgekratzt, um anschließend die genomische DNA im Lysat durch mehrfache Passagen durch eine 20 Gauge Kanüle zu fragmentieren. Danach wurde das Lysat für 20 min bei 140000 rpm und 4°C in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überführt.

RIPA - Puffer

| | |
|---------------------------------------------------------|--------|
| Tris-Base (pH 7,4) | 50mM |
| NaCl | 150 mM |
| NP-40 | 1% |
| Na-Desoxycholat | 1% |
| SDS | 0,1% |
| 1x Complete Protease-Inhibitor-Tablette / 50ml Puffer | |
| 1x PhosSTOP Phosphatase Inhibitor-Tablette/ 10ml Puffer | |

3.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA Protein Assay Reagent nach Vorschrift des Herstellers (Pierce, Rockford; USA). Die Proben wurden 1:10 mit dem Lysis-Puffer (RIPA + Complete) verdünnt (5µl Lysat und 45µl Lysispuffer). Davon wurde 20µl in das jeweilige Well pipettiert. Im weiteren Schritt wurde zu je 10ml BCA Reagenz A 200µl BCA Reagenz B (1:50) pipettiert. 200µl dieses Gemisches wurden zu den 20µl Probe/Well hinzugegeben und in einer Zweifachbestimmung vermessen. Als Standardreagenz diente Albumin, welches in einem Konzentrationsbereich von 1 - 0,0156 mg/ml eingesetzt wurde. Mit Hilfe eines Elisa - Readers konnte die Adsorption bei 562nm gemessen werden.

3.2.3 Polyacrylamid - Gelelektrophorese

25µg Gesamtprotein pro Probe wurden mit RIPA-Puffer, Complete auf ein identisches Volumen eingestellt und mit 4 x Laemmli-Puffer versetzt. Danach wurden die Proben für 5 min bei 96°C denaturiert. Die Proben und ein Marker wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen. Als Größenmarker diente der Rainbowmarker.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels Gelelektrophorese bei 125 V für 2h.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Western-Elektrophorese - Laufpuffer :
(10x)

| | |
|--------|--------|
| Tris | 25 mM |
| Glycin | 192 mM |
| SDS | 0,1% |

Laemmli - Puffer (pH 6,8):
(4x)

| | |
|----------------|----------|
| Tris-HCl 2M | 1,25 ml |
| SDS 10% | 8 ml |
| DTT | 308,5 mg |
| Glycerin | 2,02 ml |
| Bromphenolblau | 2 mg |

TBS - T (pH 6,8) :
(10x)

| | |
|-----------|---------|
| Tris-Base | 242 g |
| NaCl | 800 g |
| Aquadest | ad 10 l |
| Tween 20 | 1% |

3.2.4. Western Blot - Analyse

Die Proteine wurden aus den Gelen mittels einer Wet - Blot - Methode bei 400mA für 90 min in gekühltem Blottingpuffer auf eine Polyvinylidene - Difluorid (PVDF) - Membran übertragen. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an den Proteinn auf der Membran zu maskieren, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Milch inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit den in TBS - T gelösten primären Antikörpern über Nacht bei 4°C. Die eingesetzte Konzentration der Antikörper richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Nach dreimaligem Waschen in TBS - T wurden die Membranen mit dem speziesspezifischen peroxidasekonjugierten sekundären Antikörper in TBS - T inkubiert in den Konzentrationen nach Angaben des Herstellers. Nach darauf folgenden Waschschritten in TBS - T erfolgte die Detektion der Membran mit dem ECL Chemiluminiszenz Kit unter Verwendung eines Curix 60 Entwicklers und Biomax MR Röntgenfilmen.

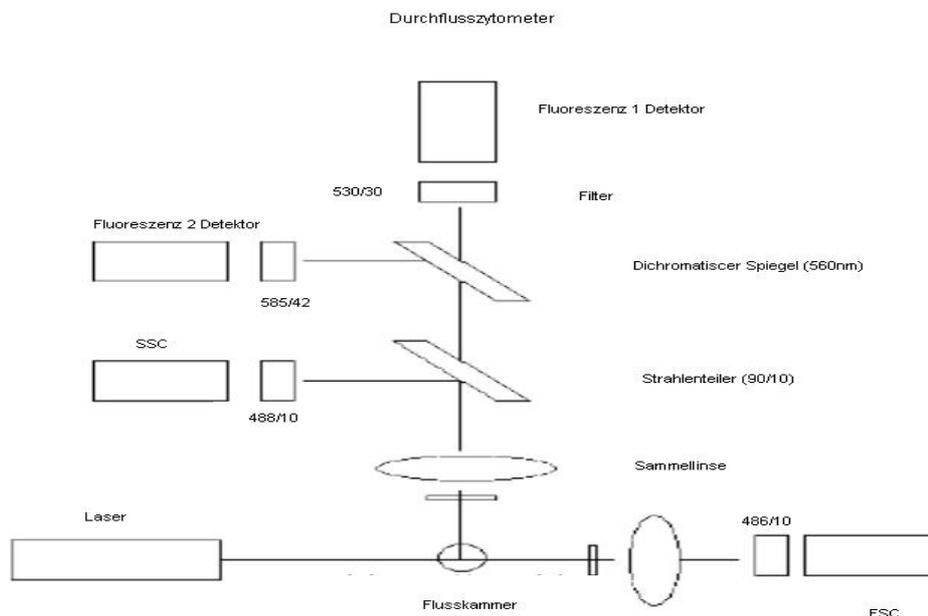
Verwendete Puffer und Lösungen:

| | | |
|--------------------------|------------------|----------|
| Blotting Puffer (10x) | Glycin | 1426 g |
| | Tris-Base | 1211,4 g |
| TBS - T | Tris-Base | 242 g |
| | NaCl | 800 g |
| | Aquadest | ad 10 l |
| | Tween 20 | 1% |
| Blockierungspuffer | TBS-T | 1x |
| | Magermilchpulver | 5% |
| | Tween 20 | 0,1% |

3.2.5 Durchflusszytometrie

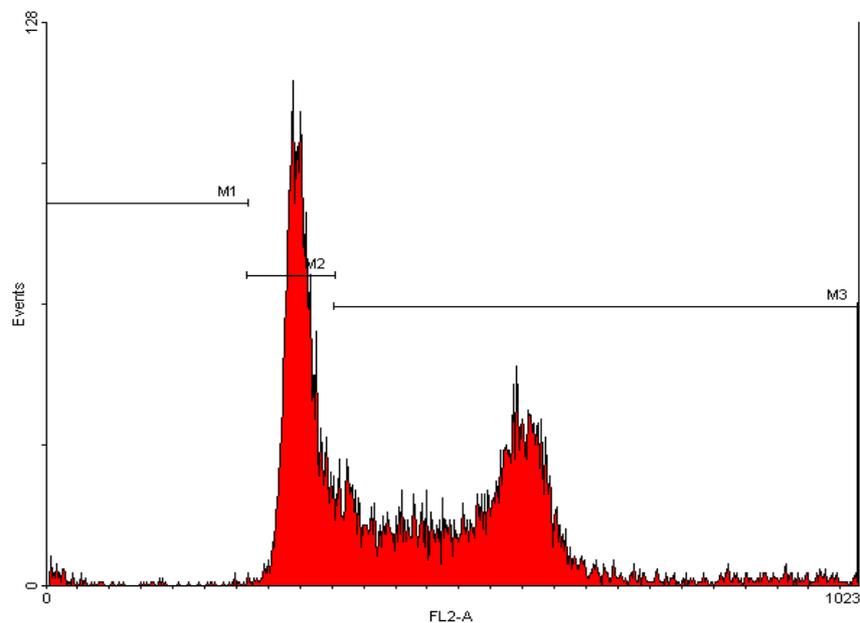
3.2.5.1 Zellzyklusmessung

Die Durchflusszytometrie beruht auf der Analyse von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel. Die Grundvoraussetzung zur Messung mit einem Durchflusszytometer ist das Vorliegen der Probe als Einzelzellsuspension. Die fluoreszenzmarkierte Zelle emittiert optische Signale, wenn einzelne Zellen einen Laserstrahl passieren. Beim Passieren des Laserstrahls streuen die Zellen einen Teil des Lichtes, welches mittels Detektoren, meist Photomultiplier, nachgewiesen wird. Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile sind Zelleigenschaften die die Lichtstreuung beeinflussen. Zusätzlich wird in der Durchflusszytometrie die Fluoreszenz darzustellen, um Subpopulationen, zellulären Strukturen und Funktionen gemessen. Die Auswahl der Fluorochrome ist abhängig von der Anregungsmöglichkeit und der jeweiligen Anwendung. Das Prinzip des FACS ist ausführlich beschrieben worden (Herzenberg et al., 1976). Schema 3.1 zeigt den schematischen Aufbau eines Durchflusszytometers.



(deutsche Darstellung des Bildes von der Homepage FACS Facility, DKF Universität Bern, www.cx.unibe.ch/dkf7/)

Die Untersuchung des Zellzyklus mittels der Durchflusszytometrie beruht auf der Intensität des erhaltenden Fluoreszenzsignals (Herzenberg et al., 1976). Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist abhängig vom DNA-Gehalt der Zelle. In der G1 - Phase (M2) des Zellzyklus besitzt die Zelle einen einfachen DNA - Gehalt, im Verlauf der S - Phase (M3) kommt es auf Grund der Replikation der DNA zu einem Anstieg des DNA - Gehalts, bis am Ende der doppelte Gehalt vorliegt (M3). Apoptotischer Zelltod ist u.a. durch fragmentierte DNA charakterisiert, so dass nach DNA - Färbung von apoptotischen Zellen ein DNA - Gehalt kleiner als der DNA - Gehalt von normalen Zellen in der G1 - Phase vorliegt (M1). (Schema 3.2)



Das Akronym FACS (= fluorescence activated cell sorting) ist eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson, wird aber häufig als Synonym zu Durchflusszytometrie verwendet.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $2,3 \times 10^5$ Zellen/well in 6 - well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von BP11, TRAIL, oder zusätzlich mit dem Caspase-Inhibitor zVAD - *fmk* behandelt. Nach der Inkubation wurde der Überstand in 5ml „Röhrchen“ überführt und die Wells mit 1ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1ml Trypsin abgelöst, vereinzelt und ebenfalls in die Röhrchen überführt. Die Zellsuspension

wurde dann bei 4°C und 1800 rpm für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen mit PBS/ 5 mM EDTA gewaschen. Nach 3 - maligem Wiederholen des Waschschrilles wurden die Zellen in 1ml PBS/5 mM EDTA gelöst. Um die Zellen zu fixieren und die Membran für den Fluoreszenzfarbstoff PI (*Propidiumiodid*) permeabel zu machen, wurde 1 ml Ethanol dazu pipettiert. PI interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und hat eine sehr hohe Quantenausbeute. Für eine optimale DNA - Analyse ist es notwendig RNase dazu zugeben, da PI auch an RNA bindet.

Die Zellen wurden für 30 min mit 20 µg RNase A / 500 µl PBS/EDTA inkubiert, danach zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und in 100 µg/ml PI/PBS resuspendiert. Vor dem Messen wurden die Proben für mindestens 30 min bei 4°C gelagert.

Die Messung erfolgte mit einem Durchflusszytometer (BD Bioscience; Heidelberg). Die Auswertung erfolgte mit WinMDI-Software.

Verwendete Puffer und Lösungen:

| | | |
|------------------------------|----------------------------------|-----------|
| PBS (1x) pH 7,4 | NaCl | 8,0 g |
| | KCl | 0,2 g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 1,44 g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,24 g |
| | dest. H ₂ O ad | 1 Liter |
| PBS/EDTA 5 mM | PBS | 1x |
| | EDTA | 1% |
| Propidiumiodidlösung (PI) | PBS | 1x |
| | EDTA | 1% |
| | PI | 100 µg/ml |

3.2.5.2 Annexin V - Propidiumiodid Doppelfärbung

Hierfür wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro well in 6 - well Platten ausgesät und bei 70% Konfluenz mit dem Caspase-Inhibitor zVAD - *fmk*, mit BP11, und BP11 mit zVAD - *fmk* für den jeweiligen Versuchszeitraum inkubiert. Die Behandlung mit zVAD - *fmk* erfolgte 1 h vor der Zugabe von BP11. Danach wurde der Überstand in FACS - Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Nach dem Zentrifugieren und Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS resuspendiert. Das Pellet der gewaschenen Zellen wurde in 200 μ l einer Lösung aus je 5 μ l Annexin - V bzw. PI eines Apoptose-Detektions Kits von Clontech sowie je 195 μ l Annexin - V - Bindepuffer aufgenommen und anschließend für 20 min lichtgeschützt bei RT inkubiert.

Die Messung erfolgte mit einem Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm WinMDi.

3.2.6 JAM - Assay

Der JAM - Assay wurde 1991 von Polly Matzinger entwickelt und beruht auf dem Prinzip, dass die beim apoptotischen Zelltod entstandene fragmentierte und vorher mit ^3H - Thymidin behandelte DNA unter Verwendung von Vakuum aus den Filtermatten gewaschen werden und zur Erfassung der Apoptoserate dienen kann (P.Matzinger, 1991). ^3H - Thymidin inkorporiert nur in die DNA proliferierender Zellen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro well in 96 - well Platten ausgesät.

Am nächsten Tag wurden die Zellen für 4 Stunden mit ^3H -Thymidin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Medium mit BP11 weiter inkubiert. Nach der erwünschten Behandlungsdauer wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 1 h bei 37°C mit 0,05% SDS in PBS - Lösung lysiert. Die 96 - well Platten wurden durch Glasfaserfilter mit einem Harvester abgesaugt und so die Zellen geerntet. Nach dem Trocknen der Filtermatten wurden diese mit Szintillationsflüssigkeit benetzt und in einem Szintillationsmessgerät gemessen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle und wurden als Zellen mit 100% intakter

DNA angenommen. Das Prozentuale Maß der Apoptose errechnete sich mit folgender Formel: % apoptotische Zellen = (behandelte Zellen/ Kontrolle) x 100

Die Messung erfolgte in 8 - facher Bestimmung.

3.2.7 Proliferationsassays

Zur Quantifizierung der Wachstumsinhibition von BP11 auf Pankreasadenokarzinom-Zellen standen vier Testsysteme zur Verfügung. Zum Einem wurde der Einbau radioaktiv markiertem ^3H - Thymidin gemessen (3.2.7.1), zum Anderen wurde die Zellzahl durch Zellzählung bestimmt (3.2.7.2). Mit Ez4U und Kristallviolett (s. 3.6) standen zwei weitere Systeme zur Verfügung, die nachfolgend ausführlich beschrieben werden.

3.2.7.1 ^3H -Thymidin-Wachstumsassay

Das Prinzip der Proliferationsbestimmung mittels Einbau von radioaktiv markiertem ^3H - Thymidin beruht auf der Inkorporation ^3H - Thymidins in die DNA proliferierender Zellen (Coward *et al.*, 1998).

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Well in 96 - well Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 in einem Brutschrank inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in einer 8 - fach Bestimmung mit BP11, als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (1:1000), oder mit frischem RPMI Medium (Invitrogen, Karlsruhe) behandelt. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen für vier Stunden mit ^3H - Thymidin inkubiert und danach für 1 Stunde mit 0,05% SDS in PBS - Lösung lysiert. Die Zelllysate aus den 96 - well Platten wurden durch Glasfaserfilter mit einem Harvester abgesaugt und so die DNA geerntet und mehrfach mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der Filtermatten wurden diese mit Szintillationsflüssigkeit benetzt und in einem Szintillationsmessgerät gemessen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle und wurden als Zellen mit 100% intakter DNA angenommen.

Das Prozentuale Maß der DNA - Neusynthese errechnete sich mit folgender Formel:
% DNA - Neusynthese = (behandelte Zellen/ Kontrolle) x 100 (vgl. 3.2.6).

3.2.7.2 Zellzählung

Das Proliferationsverhalten wurde mittels Dichtebestimmung semiautomatisch mit dem Casy® Model TT Cell counter bestimmt. Dafür wurden die adhären wachsenden Zellen mit Accutase von dem Boden der Zellkulturplatten abgelöst, vereinzelt und in Casyton gemessen.

3.2.8 Zytotoxizitätsassays

Zur Quantifizierung des BP11 induzierten Zelluntergangs standen mit dem Kristallviolett-Assay (3.6.1), dem LDH Cytotoxicity Detection Kit (Clontech-Takara Bio Europe; Frankreich) (3.6.2) und dem Ez4U-Assay (Biomedica; Österreich) (3.6.3) drei verschiedene Zytotoxizitätsassays zur Auswahl.

3.2.8.1 Kristallviolett-Assay

Die Durchführung des Kristallviolett-assays wurde ausführlich beschrieben (Siegmond *et al.*, 2005).

Dieser Assay ist nur bei adhären wachsenden Zellen durchführbar, da der monochrome Farbstoff Kristallviolett lebende, sowie tote Zellen färbt, jedoch aus den toten Zellen wieder herauswaschbar ist. Damit ist die Anzahl der lebenden Zellen nach Behandlung mit BP11 im Verhältnis zu den Kontrollzellen zu bestimmen.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro Well in 96 - well Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit BP11 behandelt, sowie unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet. Die Zellen wurden für die gewünschte Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und 50 µl einer 0,5% - igen Kristallviolett-Lösung in 20% Methanol / Wasser in jedes Well pipettiert. Nach 20 min wurden die Wells mit Aqua dest. einige Mal gewaschen. Nachdem alle Wells Luft

getrocknet waren, wurde das Kristallviolett in Methanol gelöst und bei 593 nm photometrisch vermessen.

Die Auswertung erfolgte als „Prozent der Kontrolle“, wobei die unbehandelten Zellen als 100% vital angenommen wurden. Die Überlebensrate errechnet sich somit aus der durchschnittlichen Absorption der behandelten Zellgruppe im Verhältnis zu der durchschnittlichen Absorption einer identischen, aber unbehandelten Kontrollgruppe.

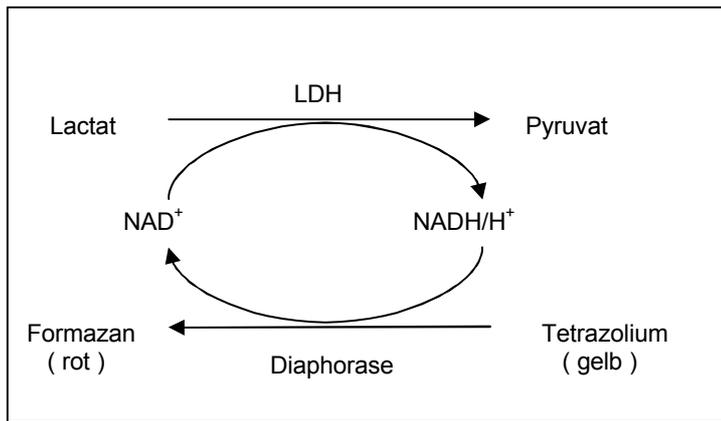
Verwendete Lösungen:

| | | |
|-----------------------|-----------------|------------|
| Kristallviolettlösung | Kristallviolett | 0,5% |
| | Methanol | 20% |
| | Aqua dest. | ad 100,0 g |

3.2.8.2 LDH Cytotoxicity Detection Kit

Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt (Clontech-Takara Bio Europe; Frankreich). Kommt es zum Zelltod wird die LDH sehr schnell freigesetzt und kann im Überstand nachgewiesen werden. Diese Methode basiert auf zwei Redoxgleichungen. Im ersten Schritt katalysiert die LDH die Oxidation von Lactat zu Pyruvat und die gleichzeitige Reduktion des Coenzym NAD^+ zu NADH/H^+ (Decker und Lohmann-Matthes, 1988).

Im zweiten Schritt wird der Wasserstoff vom entstandenen NADH/H^+ durch den im Testreagenz enthaltenen Katalysator Diaphorese auf das gelbfarbene Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) übertragen. INT wird dadurch zu dem rot gefärbten Formazan- Salz reduziert.



Schema 3.3 enzymatische Reaktion des LDH Cytotoxicity Detection Kit (deutsche Darstellung der Abbildung von der Homepage Clontech Laboratories, http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=163571&tabno=3)

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro well in 96 - well Platten ausgesät. Nach Angaben des Herstellers mit nur 1% FCS in RPMI Medium. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit BP11 behandelt. Als Referenz dienten Kontrollansätze, d.h. als Positivkontrolle (maximale, 100% Substratumsetzung) das Detergenz Triton-x-100 (2% in Zellkulturmedium), als Negativkontrolle (minimale, 0% Substratumsetzung) nur mit Medium behandelte Zellen. Als Hintergrundkontrolle diente reines Medium. Die Zellen wurden nach der gewünschten Inkubationszeit für 10 min bei 250 x g in der jeweiligen 96-well Platte zentrifugiert und anschließend der Überstand in eine neue 96-well Platte überführt. Danach wurden 100 µl des frisch angesetzten Reaktionsgemisches (Katalysator Diaphorase + Tetrazoliumsalz INT) zu dem Überstand pipettiert. Nach 30 min Inkubationszeit im Dunkeln bei RT wurde die Absorption unter zu Hilfenahme des Photometers vermessen.

Das Formazan-Salz kann bei einer Messwellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm photometrisch vermessen werden. Die Anzahl der geschädigten Zellen ist direkt proportional zu dem gebildeten Formazan - Salz.

3.2.9 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Diese Methode basiert auf der Messung der Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren an DNA-Konsensussequenzen innerhalb der Promotorregion. Radioaktiv-markierte, 20-22 bp lange Konsensus-Oligonukleotide werden mit

Kernproteinextrakten inkubiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und der Autoradiographie unterzogen. Da ungebundene DNA während der Elektrophorese schneller als Protein - DNA-Komplexe wandert, zeigen sich die Komplexe nach der Autoradiographie als Banden oberhalb der ungebundenen Oligonukleotide (Shift) (Garner und Revzin, 1981). Der sogenannte „*Supershift*“ entsteht, wenn nach Zugabe spezifischer Antikörper gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor ein ternärer Komplex entsteht, welcher eine noch geringere Mobilität aufweist. Transkriptionsfaktoren befinden sich im Zellkern, so dass zu Beginn des Assays die Isolierung der Kern-Proteine erfolgte. Hierfür wurden für 24 h $2,5 \times 10^5$ Zellen pro 6 - well kultiviert und danach für die gewünschte Inkubationszeit mit BP11 behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS wurden die Zellen in 400 μ l Puffer A aufgenommen und 5 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellett wurde dann in 45 μ l Puffer B aufgenommen, 20 min auf Eis geschüttelt und 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der die Kernproteine enthaltende Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers BioRad , Proteinassay, München.

Verwendete Puffer:

| | | |
|----------|---------------|---------------|
| Puffer A | HEPES (pH7,9) | 10 mM |
| | KCl | 10 mM |
| | EDTA | 0,2 mM |
| | DTT | 1 mM |
| | PMSF | 0,5 mM |
| | Aprotinin | 10 μ g/ml |
| Puffer B | HEPES (pH7,9) | 20 mM |
| | NaCl | 0,4 M |
| | EDTA | 0,2 mM |
| | DTT | 1 mM |
| | PMSF | 0,5 mM |
| | Aprotinin | 10 μ g/ml |

Der Nachweis der NF κ B-Aktivierung erfolgte mit dem Gelshift™ (Carcinoma) Kit nach Angaben des Herstellers (Active Motif, USA). Hierfür wurden die Kernextrakte mit einem ^{32}P - markierten Oligonukleotid mit einer NF κ B - Bindungsstelle für 30 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch in einem nativen 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gele wurden Vakuumgetrocknet und auf ein ECL - Chemilumineszenz-Hyperfilm (GE Healthcare, München) gelegt. Die Exposition erfolgte über Nacht, dann wurden die Filme mittels Curix 60-Filmentwickler (AGFA, Gera) entwickelt.

3.2.10 Polymerasekettenreaktion

3.2.10.1 RNA - Extraktion

Für den Nachweis der Survivin - Expression mittels RT - PCR musste zunächst die RNA aus den Zellen isoliert werden. Hierfür wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden für die vorhergesehenen Zeitpunkte mit unterschiedlichen Konzentrationen von BP11 behandelt und anschließend mit dem Lysepuffer (Qiagen, Hilden) und β - Mercaptoethanol lysiert. Die freigesetzte RNA wurde mit 70% Ethanol präzipitiert und durch anschließende Zentrifugation reversibel an die Silikatmembran gebunden. Zuletzt wurde die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert. Die RNA - Lösung wurde bei -80°C eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit Hilfe des Photometers. Durch eine spektralphotometrische Messung der optischen Dichte lässt sich sowohl die Menge als auch die Reinheit von RNA - Lösungen quantifizieren. Dafür wurde die RNA 1:80 mit Aqua ad injectabilia verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Der Nullabgleich erfolgte mit Aqua ad injectabilia. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, während das Maximum der Lichtabsorption von Proteinen bei 280 nm liegt. Die Reinheit der RNA-Lösung lässt sich durch Bestimmung des Extinktionsquotienten 260 nm/280 nm abschätzen. Als Faustregel gilt: Reine RNA hat einen Quotienten von ca. 2, liegt der Quotient unterhalb 1,8 befinden sich zu viele Proteine in der Lösung. Nach Berechnung der Konzentration wurde 2 μg RNA in 10 μl Lösung aliquotiert.

3.2.10.2 Reverse Transkriptase

Bei der RT – PCR - Methode wird zunächst die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase und dNTPs in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das „Superscript first strand cDNA Synthesis Kit “ von Invitrogen verwendet. 2 µg RNA in 10 µl H₂O wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 min. bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt. Die restlichen Reagenzien wurden wie folgt hinzu gegeben:

4 µl 5x RT Buffer
1 µl „random“ hexamer primer
1 µl RNase – Inhibitor
1 µl dNTPs
1 µl Reverse Transkriptase
0,4 µl DTT
1,6 µl H₂O

Der Ansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert, anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Im Anschluß wurde der Ansatz für 5 min. auf Eis gestellt und die cDNA bei -20° C eingefroren. Während bei der klassischen PCR cDNA qualitativ nachgewiesen wird, erfolgt bei der Real Time - PCR eine Quantifizierung der umgeschriebenen mRNA. Dieses erfolgt durch Detektion und Quantifizierung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green), dessen Signal direkt proportional zur Menge des zunehmenden PCR - Produktes ansteigt.

Hierfür wurden 2 µl cDNA, 12,5 µl Syber Green PCR Master Mix (Invitrogen, Karlsruhe) und 0,5 µl des Primers pipettiert und aufgefüllt mit H₂O auf ein Endvolumen von 25 µl. Das Reaktionsgemisch wurde in PCR – Reaktionsgefäße pipettiert und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die PCR gestartet. Initial wurde für 10 min auf 95°C erhitzt, danach folgten 45 Zyklen, wobei jeder Zyklus 15 sek. 95°C, 1 min. 60°C und 45 sek. 72°C beinhaltete. Die Auswertung erfolgte nach der komparativen C_T- Methode, wobei der C_T - Wert des zu untersuchenden Gens auf den C_T - Wert des Housekeeping - Gens PBGD normalisiert wurde. Einen Überblick über die verwendeten Primer gibt Material und Methoden 2.4.

3.2.10.3. Schmelzkurvenanalyse

Zur Charakterisierung entstandener PCR - Produkte wurden mit Sybr - Green Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Dafür wird direkt im Anschluss an eine RT - PCR die Temperatur um jeweils 1°C bis auf 95°C erhöht und dabei die Fluoreszenz gemessen. Bei einer für das Produkt spezifischen Schmelztemperatur trennen sich die DNA - Doppelstränge und verlieren den Farbstoff Sybr - Green, wodurch die Fluoreszenzaktivität abnimmt. Je nach Länge des Produktes entsteht ein spezifischer Schmelzkurvenverlauf, der eine Unterscheidung zwischen PCR - Produkten oder der Bildung von Primerdimeren zulässt, da unspezifische Primerdimere einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen als spezifische doppelsträngige PCR - Produkte.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von BP11 auf Pankreaskarzinomzellen

Um den Einfluss von BP11 auf Pankreaskarzinomzellen analysieren zu können, wurden Panc89, Colo357 und PancTu-I Zellen mit BP11 für 24h behandelt und zunächst mikroskopisch untersucht. In allen drei Zelllinien kann eine morphologische Veränderung unter dem Einfluss von BP11 erkannt werden. Exemplarisch ist dieses für Panc89 in Abb. 4.1 dargestellt. Bei allen Zelllinien kommt es zu einer Abrundung der Zellen. Es fällt auf, dass nach BP11 - Behandlung die Anzahl der Zellen vermindert zu sein scheint. Zur Klärung dieses Effektes wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

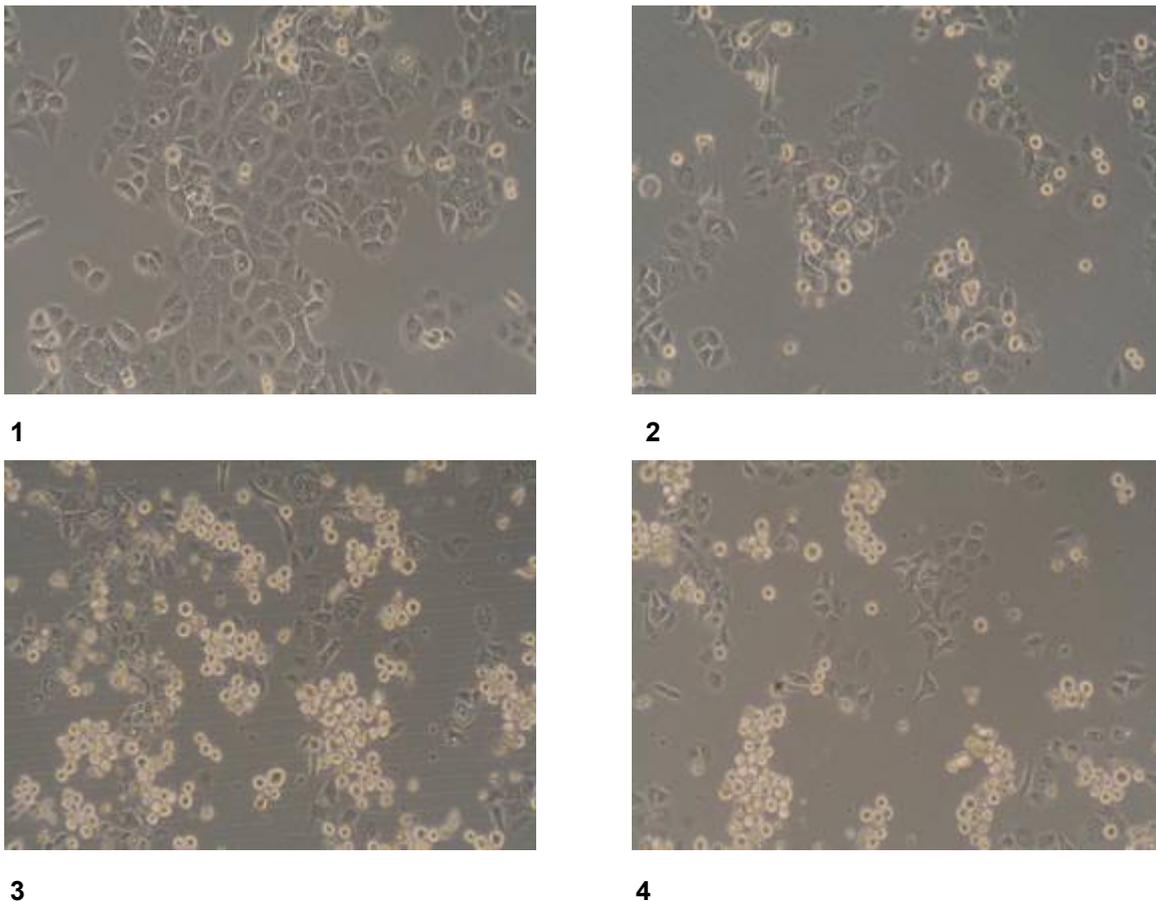


Abb. 4.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Panc 89 Zellen nach BP11 Behandlung

Dargestellt sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen mit einer Canon EOS 350 D Digital Kamera von Panc 89 Zellen mit und ohne Behandlung von BP11. BP11 wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen (Bild 2: 1 μ M; Bild 3: 5 μ M; Bild 4: 10 μ M) eingesetzt und die Zellen nach 24 h untersucht. Diese behandelten Zellen wurden mit unbehandelten Zellen (Bild 1) verglichen.

4.2 Auswirkung von BP11 auf die Proliferation

4.2.1 Proliferationsverhalten der Zellen nach BP11 Behandlung

Anhand der morphologischen Untersuchungen ließen sich keine exakten Aussagen über die Wirkung von BP11 auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen feststellen. Daher wurde mit Hilfe eines halbautomatischen Zellzählers die Zellzahl zu definierten Zeitpunkten bestimmt. Abb.4.2 zeigt, dass die Inkubation mit BP11 bei Colo357 und Panc89 zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Proliferationshemmung führt. Nach dem Ausäen lag die Zahl von Colo357 bei $1,02 \times 10^5$ Zellen/ml und von Panc89 bei $2,18 \times 10^5$ Zellen/ml (Zeitpunkt 0 h). Vor allem nach Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ BP11 war nach 72 h bei beiden Zelllinien keine Zunahme der Zellzahl mehr feststellbar. Die Zellzahl von Colo357 lag nach 72 h bei $1,34 \times 10^5$ Zellen/ml, im Verhältnis dazu die unbehandelten Kontrollzellen bei $7,5 \times 10^5$ Zellen/ml. Die Panc 89 Zellen zeigten ähnliches Verhalten, nach 72 h betrug die Zellzahl $2,04 \times 10^5$ Zellen/ml. Im Vergleich dazu lag die Zellzahl der unbehandelten Kontrollzellen bei $15,4 \times 10^5$ Zellen/ml. Obwohl nach 24 h und 32 h bei beiden Zelllinien noch minimale Zellzahlzunahme nachgewiesen werden konnte, nach 32 h bei Colo357 $2,4 \times 10^5$ Zellen/ml und bei Panc89 $2,86 \times 10^5$ Zellen/ml, verminderte sich die Zellzahl nach 48 h Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ BP11 erheblich (Colo357 $1,6 \times 10^5$ Zellen/ml; Panc89 $2,0 \times 10^5$ Zellen/ml). Analoges Verhalten zeigten beide Zelllinien nach $10 \mu\text{M}$ BP11 Behandlung. Nach $1 \mu\text{M}$ BP11 Behandlung zeigten sich keine Veränderungen im Proliferationsverhalten der Zelllinien. Nach 72 h lässt sich eine Zellzahl von $6,8 \times 10^5$ Zellen/ml von Colo357 und $14,9 \times 10^5$ Zellen/ml bei Panc89 Zellen erfassen.

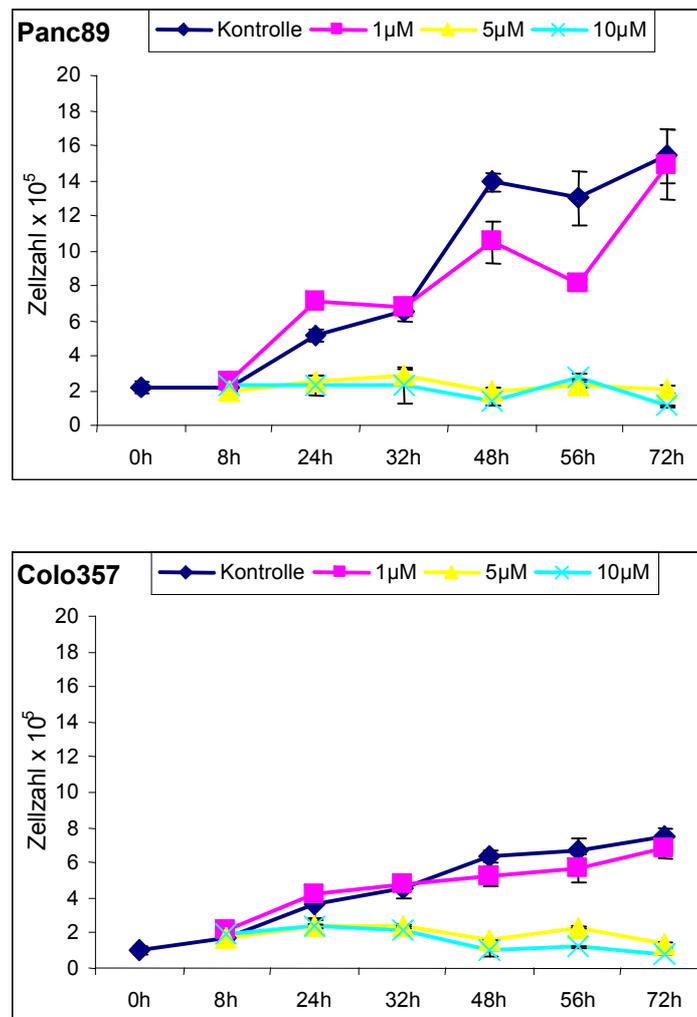


Abb 4.2: Zellzahlbestimmung nach BP11 Behandlung von Panc89 (A) und Colo357 (B) Zellen.

Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien nach BP11 Behandlung. Die Ergebnisse zeigen drei unabhängige Versuche \pm sd. BP11 wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen (1 μ M (Viereck), 5 μ M (Dreieck) und 10 μ M (Kreuz)) eingesetzt. Zur Kontrolle wurde auch das Proliferationsverhalten von unbehandelten Zellen (Raute) untersucht. Die Zellen wurden jeweils nach 8 h, 24 h, 32 h, 48 h, 56 h und 7 h gezählt. Als Ausgangszellzahl galt die ausgesäte Zellzahlmenge.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde die DNA - Neusynthese mit Hilfe der Menge des ^3H - Thymidin-Einbaus nach BP11-Behandlung bestimmt. Das Prinzip der Proliferationsbestimmung mittels Einbau von radioaktiv markiertem ^3H - Thymidin beruht auf der Inkorporation ^3H - Thymidins in die DNA proliferierender Zellen.

Hierfür wurden die Zellen für 24 h Behandlungszeitraum mit BP11 behandelt und anschließend für weitere 4 h mit ^3H -Thymidin inkubiert („gelabelt“). Zusätzlich musste ausgeschlossen werden, dass die Untersuchungsergebnisse durch das für BP11 verwendete Lösungsmittel DMSO beeinträchtigt werden, da eine zelltoxische Wirkung durch DMSO bekannt ist. Aus diesem Grund wurden die Zellen zusätzlich mit DMSO in der höchsten eingesetzten Konzentrationen (0,1%) behandelt. Abb 4.2.1 A zeigt, dass DMSO, in der verwendeten Konzentration im Vergleich zu den

unbehandelten Kontrollen, keinen nachweisbaren Effekt auf die Panc89 Zellen und einen minimalen Effekt (15%) auf die Colo357 Zellen hat. Abb 4.2.1 A zeigt weiterhin, dass die gewählten Konzentrationen von 5 μM und 10 μM BP11 zu einer erheblichen Minderung der DNA-Neusynthese führt. Die DNA-Neusynthese liegt bei der eingesetzten Konzentration von 10 μM BP11 bei beiden Zelllinien unter 10%. Die Behandlung mit 1 μM BP11 führt bei Colo357 Zellen zu einer 50% - igen Hemmung und bei Panc89 nur zu einer 15% - igen Hemmung der DNA - Neusynthese.

In einer weiteren Analyse wurde die Neusynthese der DNA in Panc89 Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika, wie Paclitaxel, Gemcitabin und 5 - Fluoruracil alleine und in Kombination mit BP11 gemessen (Abb 4.2.1 B). BP11 wurde nur in den oben genannten stark inhibitorisch wirksamen Konzentrationen von 5 μM und 10 μM eingesetzt.

Der ^3H - Thymidin Einbau konnte am Stärksten durch die Zugabe von BP11 gemindert werden.

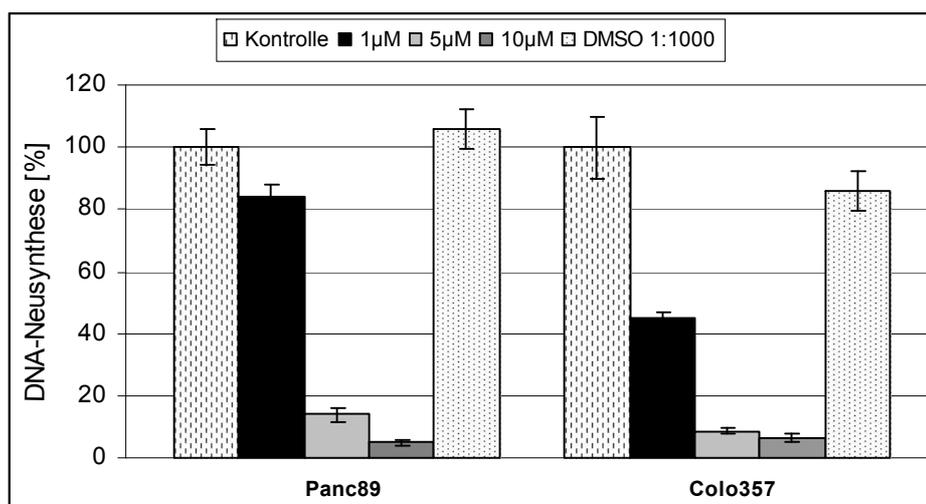


Abb 4.2.1 A: DNA - Neusynthese mit Pankreaskarzinomzelllinien nach 24 h Behandlung mit BP11.

Die Ergebnisse zeigen drei unabhängige Versuche \pm sd. Der ^3H - Thymidin-Assay zeigt die erhöhte Wachstumsinhibition nach BP11 Behandlung. Dargestellt ist die DNA - Neusynthese in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, die als 100% angenommen wurde. Hierfür wurden die am Vortag ausgesäten Zellen für 24 h mit 3 verschiedenen Konzentrationen von BP11 behandelt (1 μM ; 5 μM ; 10 μM) und für 4 h mit ^3H - Thymidin inkubiert.

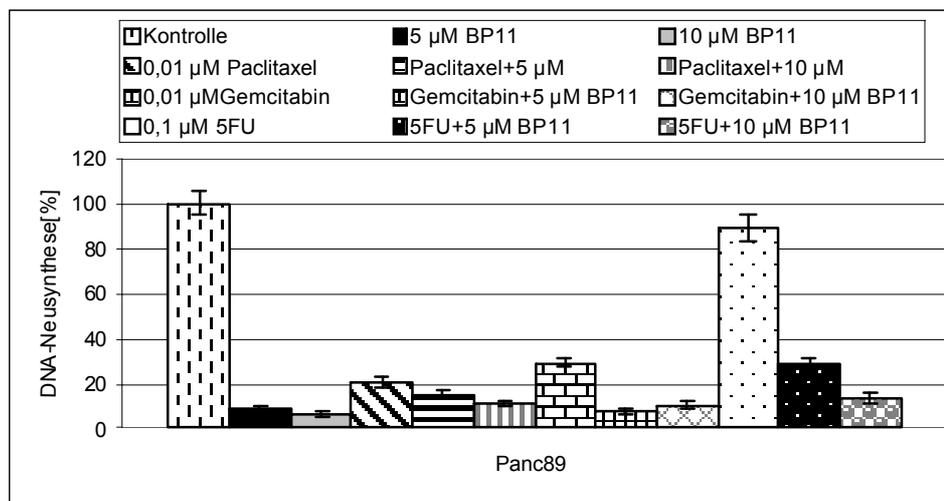


Abb 4.2.1 B: DNA-Neusynthese mit der Pankreaskarzinomzelllinie Panc89 nach 24 h Behandlung mit BP11 und weiteren gängigen Zytostatika alleine, sowie in Kombination

Die Ergebnisse des ^3H -Thymidin-Assay zeigen die Wachstumsinhibition nach BP11, Paclitaxel, Gemcitabin und 5-Fluoruracil Behandlung. Dargestellt ist die DNA-Neusynthese in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, die als 100% angenommen wurde. Hierfür wurden die am Vortag ausgesäten Zellen für 24 h mit 2 verschiedenen Konzentrationen BP11 (5 μM ; 10 μM), sowie mit Paclitaxel (0,01 μM), Gemcitabin (0,01 μM) und 5-Fluoruracil (0,1 μM) behandelt. Zusätzlich wurden die Paclitaxel, Gemcitabin und 5-FU behandelten Zellen in Kombination mit BP11 getestet. Danach erfolgte die Inkubation für 4 h mit ^3H -Thymidin.

4.3 Zellzyklusmessung nach Behandlung mit BP11

Um zu klären, ob die durch BP11 induzierte Hemmung der Proliferation durch gesteigerten Zelltod und/oder Zellzyklusarrest hervorgerufen wurde, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Mit Hilfe des Durchflusszytometers können die einzelnen Phasen des Zyklus dargestellt werden. Die Untersuchung des Zellzyklus mittels der Durchflusszytometrie beruht auf der Intensität des erhaltenden Fluoreszenzsignals. Zur Messung des Zellzyklus ist es notwendig einen Fluoreszenzfarbstoff zu verwenden, welcher mit der DNA interagiert. Aus diesem Grund wird der DNA-interkalierende Farbstoff Propidiumiodid verwendet (Crissman und Steinkamp, 1973).

Ziel dieses Versuchs war es, die vorher bei den Proliferationsanalysen nachgewiesene Wachstumsinhibition der BP11 behandelten Zellen nun auch anhand des Zellzyklus nachzuweisen. Hierfür wurden die Zelllinien Panc89 und Colo357 für

24 h und 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von BP11 behandelt. Als Kontrolle dienten zum einen nur mit Medium zum anderen als Lösungsmittelkontrolle nur mit DMSO (0,1%) behandelte Zellen. Abb 4.3 zeigt die unterschiedlichen Zellzyklusphasen der oben genannten Zelllinien. Dabei ist festzustellen, dass es grundsätzlich in beiden BP11 behandelten Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Anhäufung von Zellen in der sub - G1 - Fraktion kam. Nach 24 h und einer Konzentration von 5 μM BP11 ließen sich Zelllinien-spezifische Unterschiede nachweisen. Waren fast 50% der Panc89 Zellen in der sub - G1 - Fraktion, so lag der Anteil bei Colo357 Zellen bei 20%. Des Weiteren befanden sich nur noch 8% der Panc89 Zellen mit einem DNA - Gehalt von 2N in der G1 - Phase, während der Anteil der Colo357 Zellen bei 20% lag. Nach 48h zeigten beide Zelllinien einen Anteil von 50 - 55% in der sub - G1 - Population (*Anzahl der toten Zellen*). Auch die Anzahl der Zellen in der G1 - Phase relativierte sich, so waren jeweils weniger als 10% der Zellen in der G1 - Phase. Nach der Behandlung mit 10 μM BP11 zeigten beide Zelllinien deutlich geringere Zelllinien-spezifische Unterschiede. Nach 24 h lag die Anzahl der Zellen in der sub - G1 - Population bei Panc89 bei 40%, bei Colo357 bei 47%. Weiterhin konnte die erhebliche Abnahme der Zellen in der G1 - Phase (<10%) bei beiden Zelllinien nach 24 h und 48 h beobachtet werden. Nach 48 h stieg die Anzahl der toten Zellen auf über 55%. Bei den mit 1 μM BP11 behandelten Zellen stieg die Anzahl der toten Zellen in Bezug auf die Kontrolle um 10%.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Behandlung der Pankreastumorzellen mit BP11 zu Veränderungen in dem Zellzyklus (*weniger Zellen in der G - Phase*), sowie zum Zelltod (*Zunahme der sub - G1 - Population*) führte.

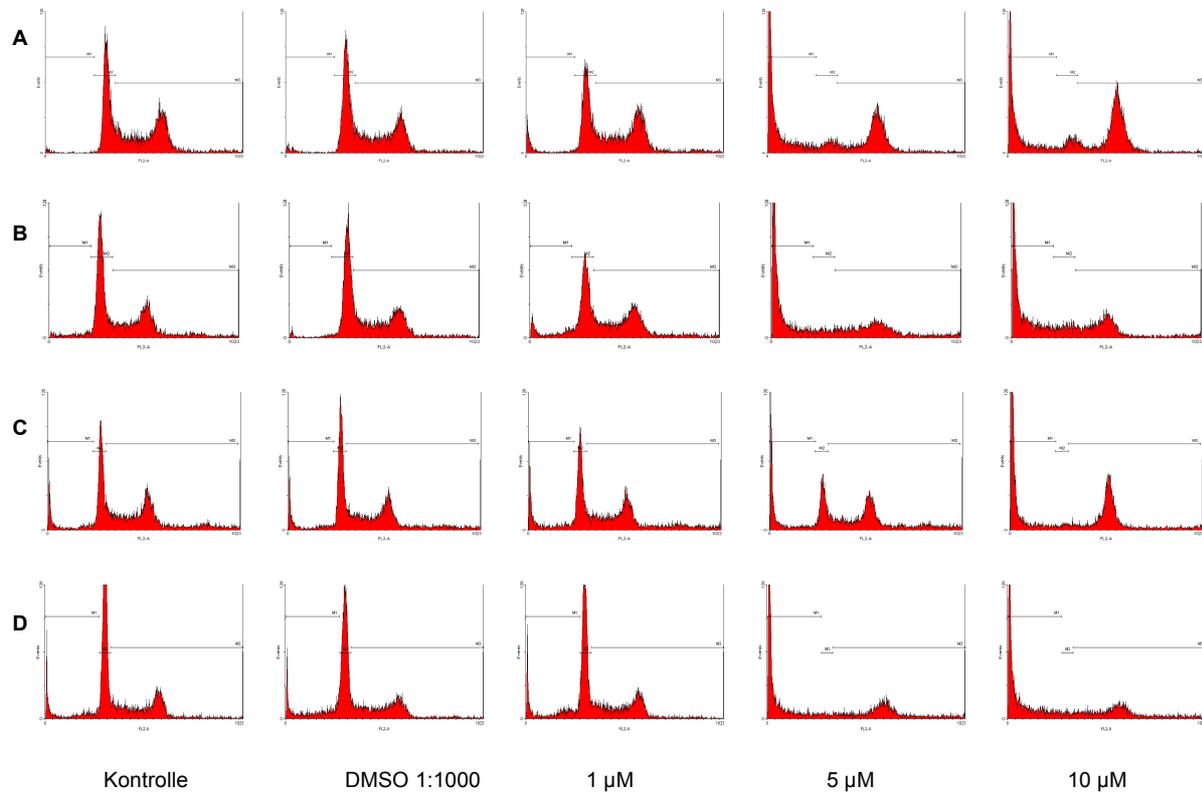


Abb 4.3: Veränderung des DNA-Profiles nach Behandlung mit BP11

Die Zellen wurden jeweils nach Inkubation mit BP11 mit Ethanol fixiert, mit 200 µg/ml. Propidiumiodid angefärbt und sowie durchflusszytometrisch vermessen. Panc89 Zellen (Abb A: 24 h; B: 48 h) und Colo357 Zellen (Abb C: 24 h; D: 48 h). Die y - Achse spiegelt die Anzahl der Zellen wieder, die x - Achse zeigt den Fluoreszenzdetektor (FLA). Die einzelnen Phasen des Zellzyklus wurden mit Markern unterteilt. Marker 1: sub - G1 - Population, Marker 2: G1 - Population, Marker 3: G2 - und M - Population (s. Material und Methoden 3.2.5.1).

4.4 BP11 induziert apoptotischen und nicht-apoptotischen Zelltod.

4.4.1 Behandlung mit BP11 führt zum Zelltod von Pankreaskarzinomzelllinien

Um den Anteil der toten Zellen weiter zu charakterisieren, wurde die Lactatdehydrogenase (LDH) im Mediumüberstand der BP11 behandelten Zellen gemessen. Ist die LDH vermehrt im Mediumüberstand nachzuweisen, deutet dies auf eine erhöhte Zellyse hin und kann als Marker für den Zelltod erfasst werden. Die Lactatdehydrogenase ist ein zytoplasmatisches Enzym welches konstitutiv in allen Zellen vorhanden ist. Kommt es zum Zelltod wird die LDH sehr schnell freigesetzt und kann im Überstand nachgewiesen werden (Korzeniewski und Callewaert, 1983; Decker und Lohmann-Matthes, 1988).

Hierfür wurden die Zellen für 24 h (Abb. 4.4.1) mit 1 μM , 5 μM und 10 μM BP11 behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO (0,1%). Als Negativkontrolle dienten nur mit Medium behandelte Zellen mit 1% FCS. Als Positivkontrolle dienten mit Triton X (2%) behandelte Zellen. Triton X ist ein nichtionisches Tensid, welches unweigerlich zur Zellyse führt und somit als Positivkontrolle dienen kann. Nach 1 μM BP11 Behandlung war bei Colo357 Zellen schon eine deutliche LDH - Freisetzung zu erkennen (40%), bei Panc89 Zellen nur eine LDH - Freisetzung von 15%. Nach einer Behandlung von 5 μM und 10 μM BP11 zeigten sich keine Unterschiede bei Panc89 und Colo357 Zellen. Nach 5 μM BP11 Behandlung starben 50% der Zellen, nach 10 μM BP11 Behandlung stieg der Anteil der toten Zellen auf 55%.

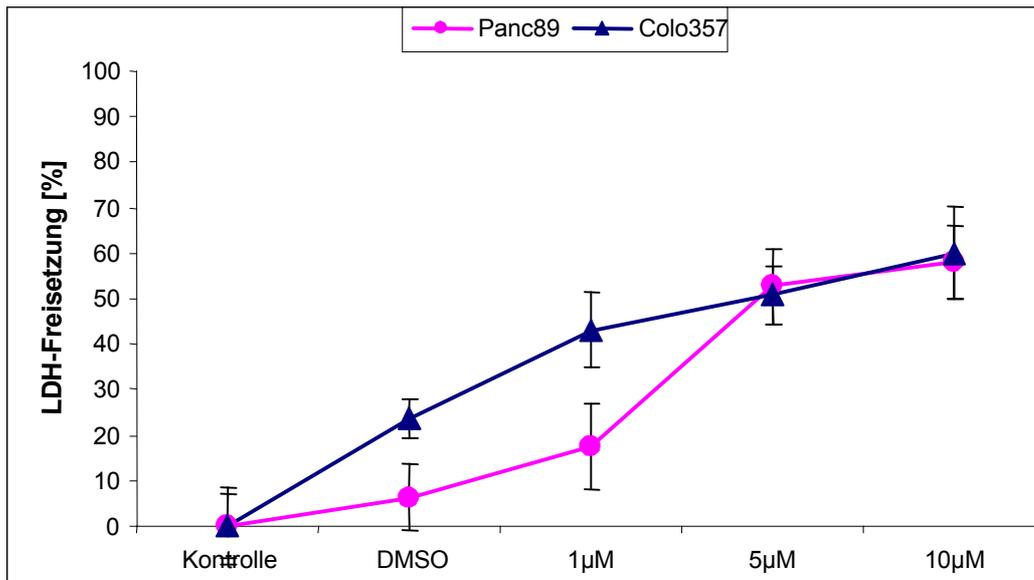


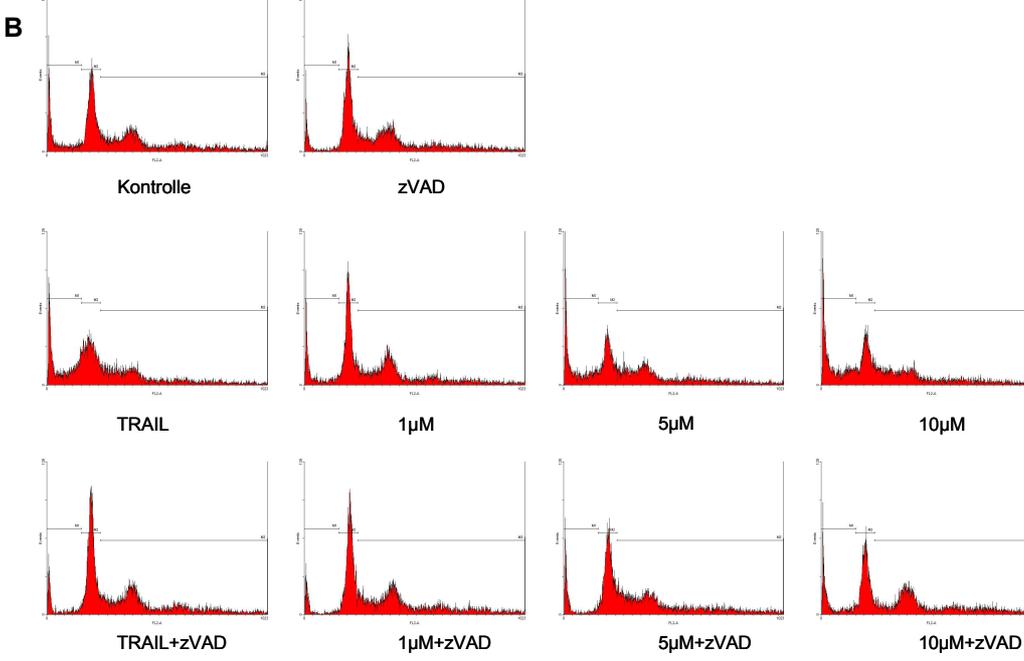
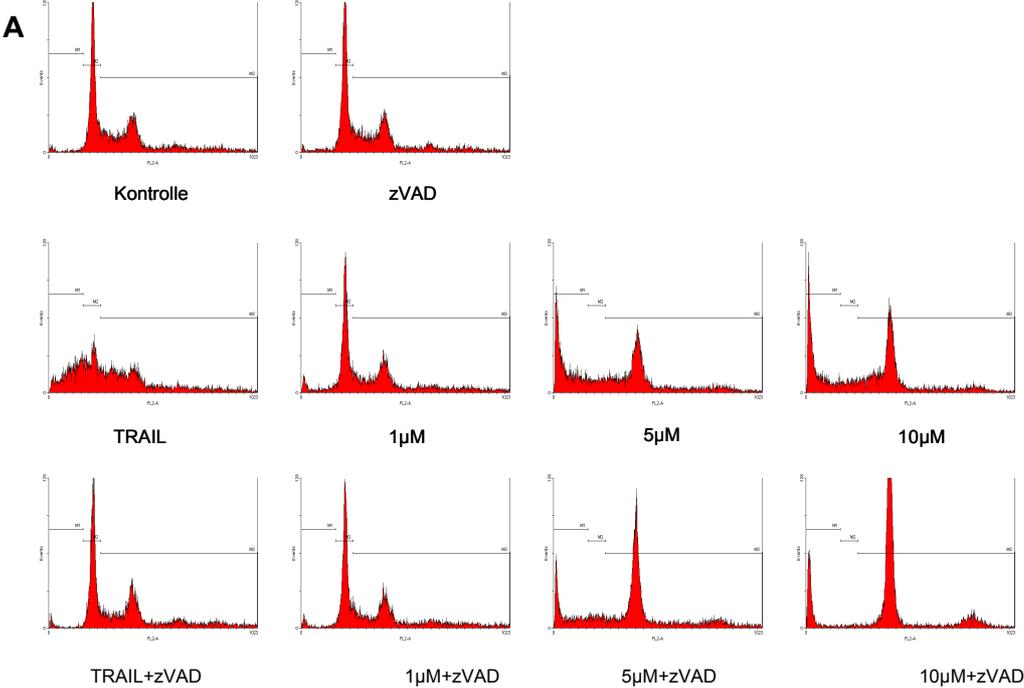
Abb 4.4.1 zeigt die Lactasedehydrogenase- Freisetzung von Panc89 Zellen (Dreiecke) und Colo357 Zellen (Kreise) nach BP11 Behandlung über einen Zeitraum von 24 h. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen \pm SD. Die Zellen wurden mit BP11, Triton X (2%), DMSO behandelt. Die Auswertung und Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Clontech; Saint-Germain-en-Laye; Frankreich).

4.4.2 BP11 induziert apoptotischen Zelltod

Da ab einer Konzentration von 5 μ M BP11 vermehrt Zellen in der sub-G1-Population auftraten, wurde im nächsten Schritt die Wirkung von BP11 in Kombination mit dem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor zVAD - *fmk* (20 μ M) untersucht. Durch Zugabe von zVAD - *fmk* kann sowohl Zelltod, als auch DNA-Fragmentation gehemmt werden (Morita-Fujimura *et al.*, 1999). Der sub - G1 - Peak spiegelt apoptotische Zellen wieder. Apoptose ist durch Kondensation des Chromatins, Fragmentierung der DNA, sowie der Kerne charakterisiert (s.Kapitel 1.2). Per Definition wird Apoptose als Caspase - abhängiger Zelltod beschrieben. Ziel dieses Versuches war zu untersuchen, ob BP11 induzierter Zelltod abhängig von Caspasen, also apoptotisch verläuft. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Mitochondrien an dem BP11 - induzierten Zelltod beteiligt sind. Hierzu wurde eine im Labor etablierte Colo357/Bclx_L Zelllinie, die eine Überexpression von Mitochondrien-schützenden Protein Bclx_L aufweist, verwendet. Panc89 Zellen, Colo 357/ wt und Colo357/ Bclx_L Zellen wurden ausgesät und für 24 h und 48 h mit BP11, TRAIL und zVAD - *fmk* behandelt. In vorangegangenen Versuchen konnte unter anderem gezeigt werden, dass mit Bclx_L

transfizierte Zellen, Zelltod durch das Apoptose auslösende Agens TRAIL vollständig verhindern können (Hinz, *et al.*, 2000). Als Kontrolle dienten nur mit Medium, oder zVAD - *fmk* alleine behandelte Zellen. TRAIL gehört zur Familie der Todesliganden und seine Wirkung auf Pankreaskarzinomzellen ist ausführlich untersucht worden (Siegmond, *et al.*, 2004; Hinz, *et al.*, 2000; Trauzold, *et al.*, 2001; Trauzold, *et al.*, 2003).

Somit dienten die mit TRAIL behandelten Zellen als Kontrolle für das System. Der ab einer Konzentration von 5 μM BP11 und TRAIL induzierte Zelltod bei Panc89 Zellen und Colo357/wt konnte teilweise nach Präinkubation mit zVAD - *fmk* inhibiert werden (Abb. 4.4.2 A & B). Nach 24 h und 48 h starben zwischen 10% und 20% weniger Zellen, als die nur mit BP11 behandelten Zellen. Die konzentrationsabhängige Abnahme der Panc89 Zellen in der G1 - Phase konnte nicht durch Präinkubation mit zVAD - *fmk* inhibiert werden. Die Anzahl der Panc89 Zellen in der G1 - Phase lag nach 24 h und 48 h Behandlung mit 5 μM und 10 μM BP11 unter 10%. Interessanterweise stieg die Anzahl der Zellen in der G2 - Phase. Dieser nach der Präinkubation resultierende G2 - Arrest konnte sowohl mit Panc89 Zellen, als auch mit Colo357/wt und Colo 357/Bclx_L Zellen gezeigt werden (Abb 4.4.2 C) Zelllinien-spezifische Unterschiede traten bei den Zellen in der sub - G1 - Population auf. Während bei den Panc89 schon im vorherigen Versuch gezeigt werden konnte, dass diese Zelllinie ab 5 μM BP11 sensitiv gegenüber BP11 ist, trat bei den Colo357/Bclx_L Zellen nur geringer Zelltod auf (10% - 20%). Dieser jedoch ließ sich auch teilweise durch zVAD - *fmk* inhibieren. Bei den Apoptose - resistenten Colo357/Bclx_L Zellen trat der G2 - Arrest auch ohne zVAD - *fmk* Behandlung auf. Nach 24 h und einer Konzentration von 10 μM BP11 waren 20% mehr Zellen in der G2 - Phase, als im Vergleich die unbehandelten und die TRAIL behandelten Zellen. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass der BP11 - induzierte Zelltod zum Teil abhängig von den Caspasen und zum Teil über die Beteiligung der Mitochondrien verläuft.



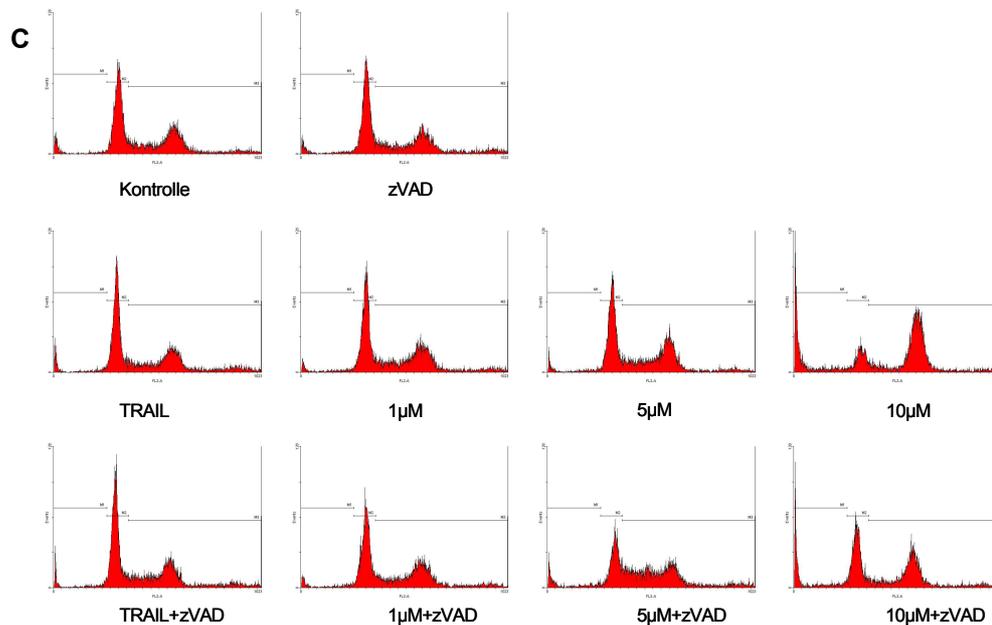


Abb 4.4.2: Einfluss von zVAD - *fmk* und $Bclx_L$ - Überexpression auf BP11 - induzierte Zellzyklusveränderungen in Pankreastumorzellen. Die Zellen (A) Panc89, (B) Colo357/wt und (C) Colo357/ $Bclx_L$ wurden entweder für 1 h mit zVAD - *fmk* (20 µM) präinkubiert und darauf mit 3 verschiedenen Konzentrationen (1 µM, 5 µM und 10 µM) BP11 für 24 h behandelt, oder nur für 24 h mit BP11 inkubiert. Als Kontrolle dienten nur mit Medium, oder nur mit zVAD - *fmk* behandelte Zellen. Zusätzlich wurde TRAIL (*TNF - related apoptosis inducing ligand*) (100 nM) analysiert. Die Zellen wurden mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch vermessen. Jede Messung erfolgte dreifach.

4.4.3 BP11 induziert PARP - Spaltung

Die teilweise erzielte Inhibition des Zelltodes durch zVAD - *fmk* gilt als starker Hinweis, dass Caspasen an dem Zelltod beteiligt sind. Als ein anerkannter Nachweis von Caspase 3-Aktivierung (*Exekutive Caspase*) dient der Nachweis von PARP - Spaltung (Sato und Lindahl, 1992; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998). Die PARP gilt als ein wichtiges DNA - Reparaturenzym in Zellen. Nach Aktivierung der Apoptosekaskade wird das ca. 116 kDa große Protein PARP durch Caspasen in zwei kleinere Proteine (89 kDa und 24 kDa) geschnitten. Ziel des Versuchs war die Verifizierung der oben gezeigten Daten und damit der Nachweis der PARP - Spaltung. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von BP11 für 24 h behandelt und die Spaltung von PARP mittels Western Blot untersucht (s.

Material und Methoden). Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass Behandlung von Panc89 mit BP11, ab einer Konzentration von 5 μM zu einem erheblichen Zelltod (50%) führte (Abb. 4.4.2). Auch auf Proteinebene zeigt sich, dass BP11 konzentrationsabhängig Panc89 Zellen in den apoptotischen Zelltod führt (Abb. 4.6.3). In der niedrigen Konzentration von 1 μM BP11 ist keine Aktivierung der Caspase 3 zu erkennen. Die Behandlung mit 10 μM BP11 ergibt bei der Untersuchung der PARP - Spaltung keine Unterschiede im Vergleich mit der Behandlung von 5 μM BP11 (Abb. 4.6.3). Ab einer Konzentration von 5 μM BP11 lässt sich eine deutliche Spaltung der PARP und damit eine Aktivierung der Caspase 3 erkennen.

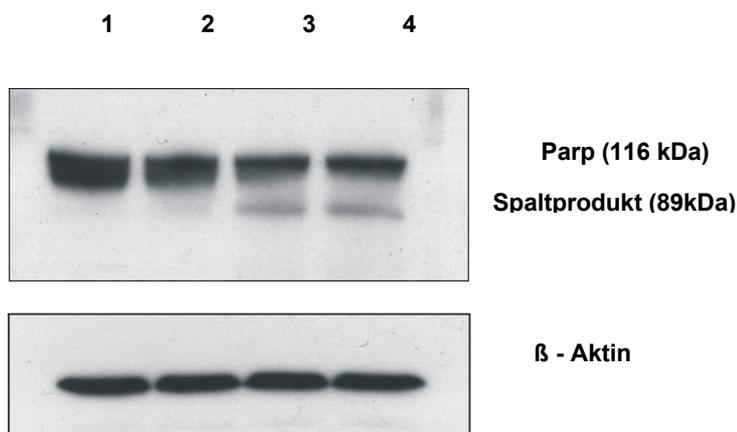


Abb 4.4.3: Analyse der PARP - Spaltung von Panc89

Der indirekte Nachweis des apoptotischen Zelltodes nach BP11 - Behandlung durch PARP - Spaltung. BP11 wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (1. Kontrolle, 2. 1 μM BP11, 3. 5 μM BP11 und 4. 10 μM BP11).

Die Lysate der Zellen wurden in der SDS - Page aufgetrennt und auf die PVDF - Membran transferiert. Der Nachweis von PARP erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper der Firma Cell Signaling und einem sekundären anti - Kaninchen HRP - gekoppelten Antikörper. Zum Nachweis der gleichen Ladungsmenge wurde zusätzlich β - Aktin detektiert.

4.4.4 DNA-Fragmentation nach BP11 Behandlung

Eine weitere spezifische Untersuchung für den Beweis, dass BP11 Pankreaskarzinomzellen in den apoptotischen Zelltod führen kann, ist der JAM - Assay (*Just another method*). Der JAM - Assay dient zur Quantifizierung der Apoptose Rate und basiert auf dem Prinzip, dass apoptotisch sterbende Zellen ihre DNA in Fragmente zerlegen.

Hierfür wurden Panc89 und Colo357 Zellen für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von BP11, TRAIL (100 ng/ml), zVAD - *fmk* (20 µM) und als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (0,1%) behandelt. Die Durchführung des JAM - Assays erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben. Die Ergebnisse des JAM - Assays (Abb. 4.4.4) zeigen jedoch nur geringe DNA - Fragmentierung nach BP11 Behandlung. Im Vergleich zeigen die im Experiment mitgeführten TRAIL behandelten Zellen eine erwartete hohe DNA - Fragmentierung. Bei beiden Zelllinien liegt die Apoptose-Rate der TRAIL behandelten Zellen zwischen 75% und 65%. Zudem zeigen die mit zVAD - *fmk* präinkubierten Zellen nach TRAIL Behandlung eine fast vollständige Abnahme der Apoptosefähigkeit.

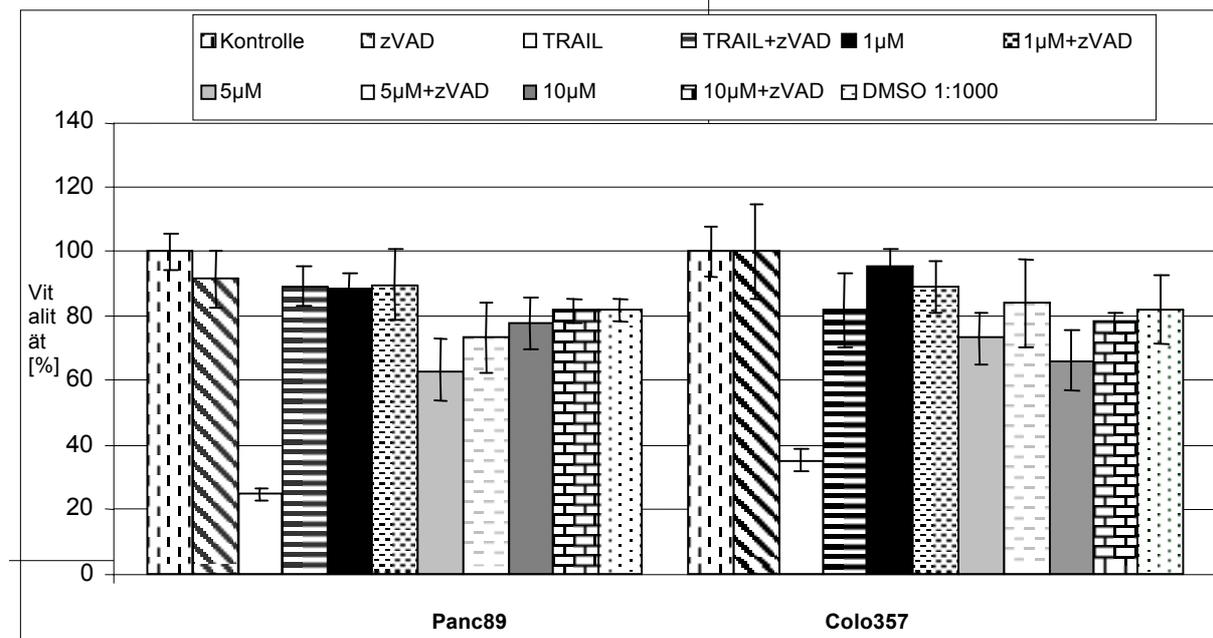


Abb 4.4.4: DNA - Fragmentationsassay von Panc89 und Colo357

Dargestellt sind die Ergebnisse des DNA - Fragmentationsassays, in Prozent der Kontrolle. Hierfür wurden die am Vortag ausgesäten Zellen für 4 h mit ^3H - Thymidin inkubiert, anschließend 3x mit PBS gewaschen und jeweils mit BP11 in 3 verschiedenen Konzentrationen (1 μM , 5 μM und 10 μM) zusammen mit 20 μM zVAD - *fmk* sowie alleine behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die als 100% vital angesehen werden. Zusätzlich wurde TRAIL in der Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD einer 8 - fach Bestimmung.

4.4.5 Quantitative Bestimmung der apoptotischen und nekrotischen Zellen mit Hilfe der Annexin V/Propidiumiodid Doppelfärbung

Um einen weiteren unabhängigen Versuch zur Quantifizierung der toten Zellen nach BP11 Behandlung durchzuführen, wurden Colo357 und Panc89 Zellen der Annexin/Propidiumiodid (PI) Doppelfärbung unterzogen und durchflusszytometrisch vermessen. Annexin erkennt frühapoptotische Zellen und dient in der Doppelfärbung mit PI zur Unterscheidung apoptotischer (Annexin positive, Propidiumiodid negative) und nekrotischer (Annexin positive, Propidiumiodid positive) Zellen (Vermees *et al.*, 1995). Annexin V (VAC alpha) ist ein Ca^{2+} - abhängiges Membranlipid, welches eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin besitzt (Andree *et al.*, 1990). Phosphatidylserin befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran. Während frühen Apoptosestadien wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert

(Fadok *et al.*, 1992; Koopman *et al.*, 1994). Durch Markierung der Zellen mit FITC - Annexin V kann man frühapoptotische Zellen durchflusszytomertisch nachweisen.

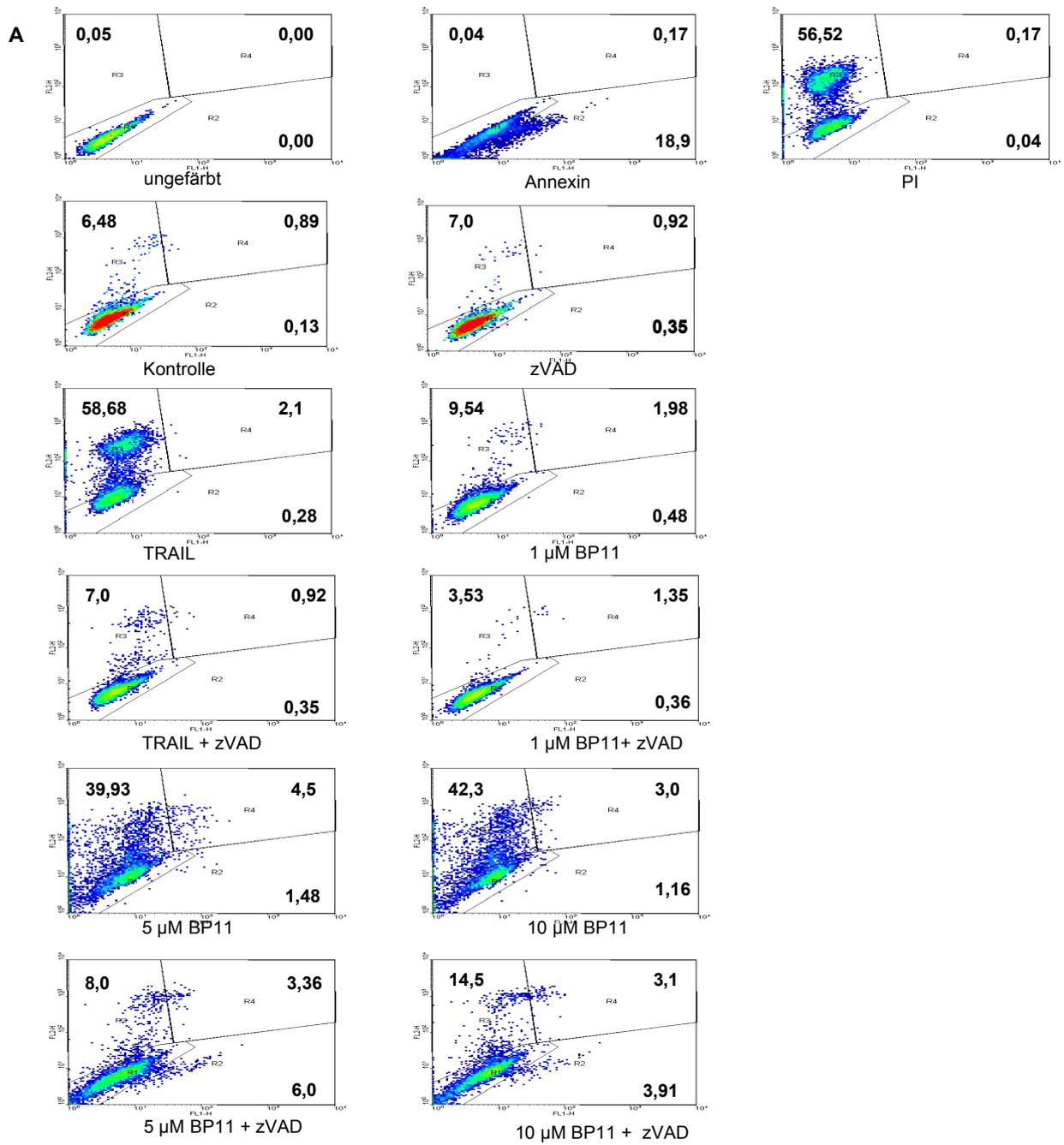
Um eine Diskriminierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu erreichen, ist es notwendig ein DNA - Farbstoff, wie Propidiumiodid zusätzlich zu verwenden, der nur permeabilisierte Membranen passieren kann.

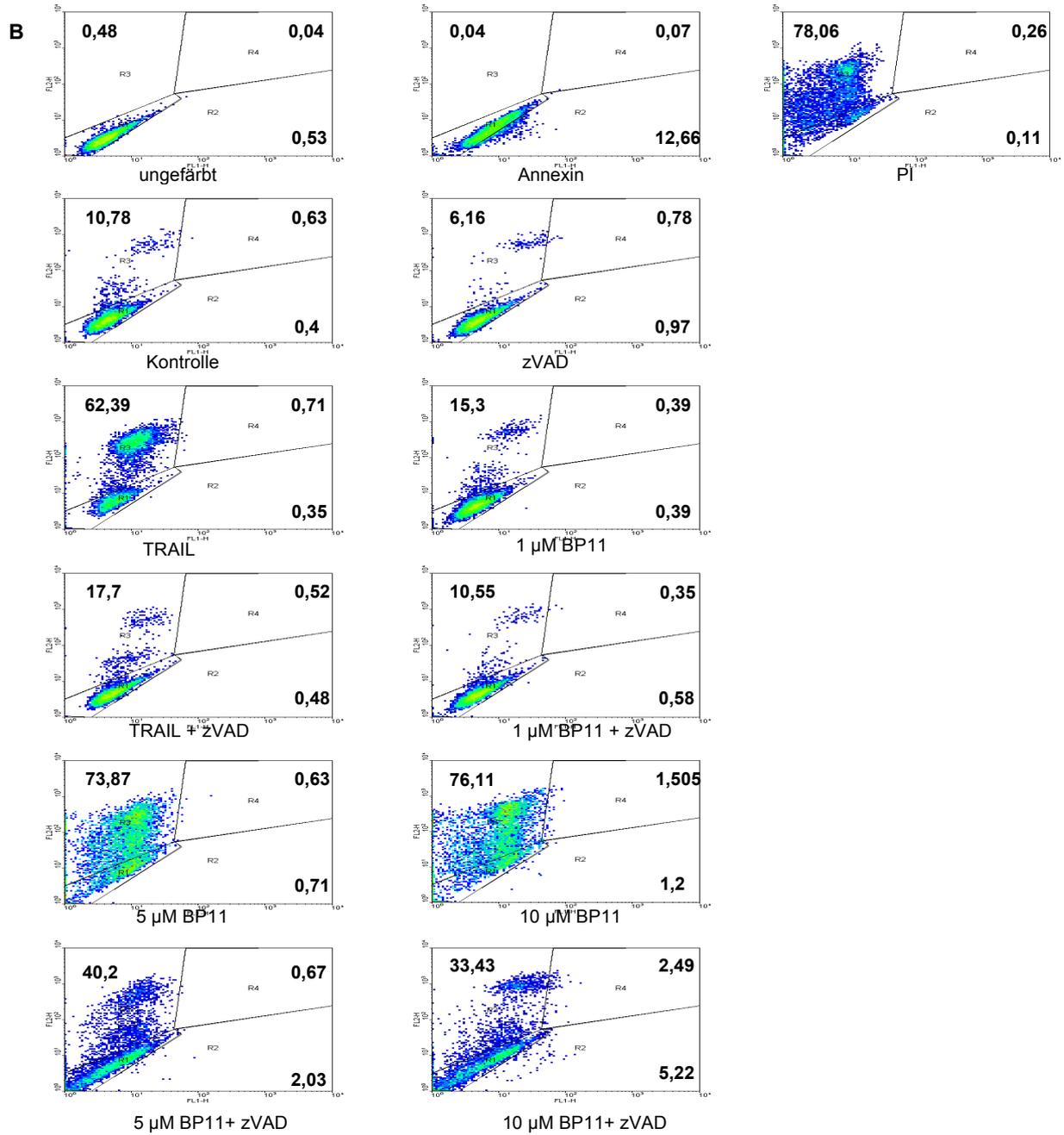
Durch die Doppelfärbung der Zellen mit Annexin und Propidiumiodid (PI) kann zwischen vitalen (Annexin V - negativ; PI - negativ; R1), frühapoptotischen Zellen (Annexin V - positiv; PI - negativ, R2) und nekrotischen bzw. spätapoptotischen Zellen (Annexin V - und PI - positiv, R3 und R4) unterschieden werden.

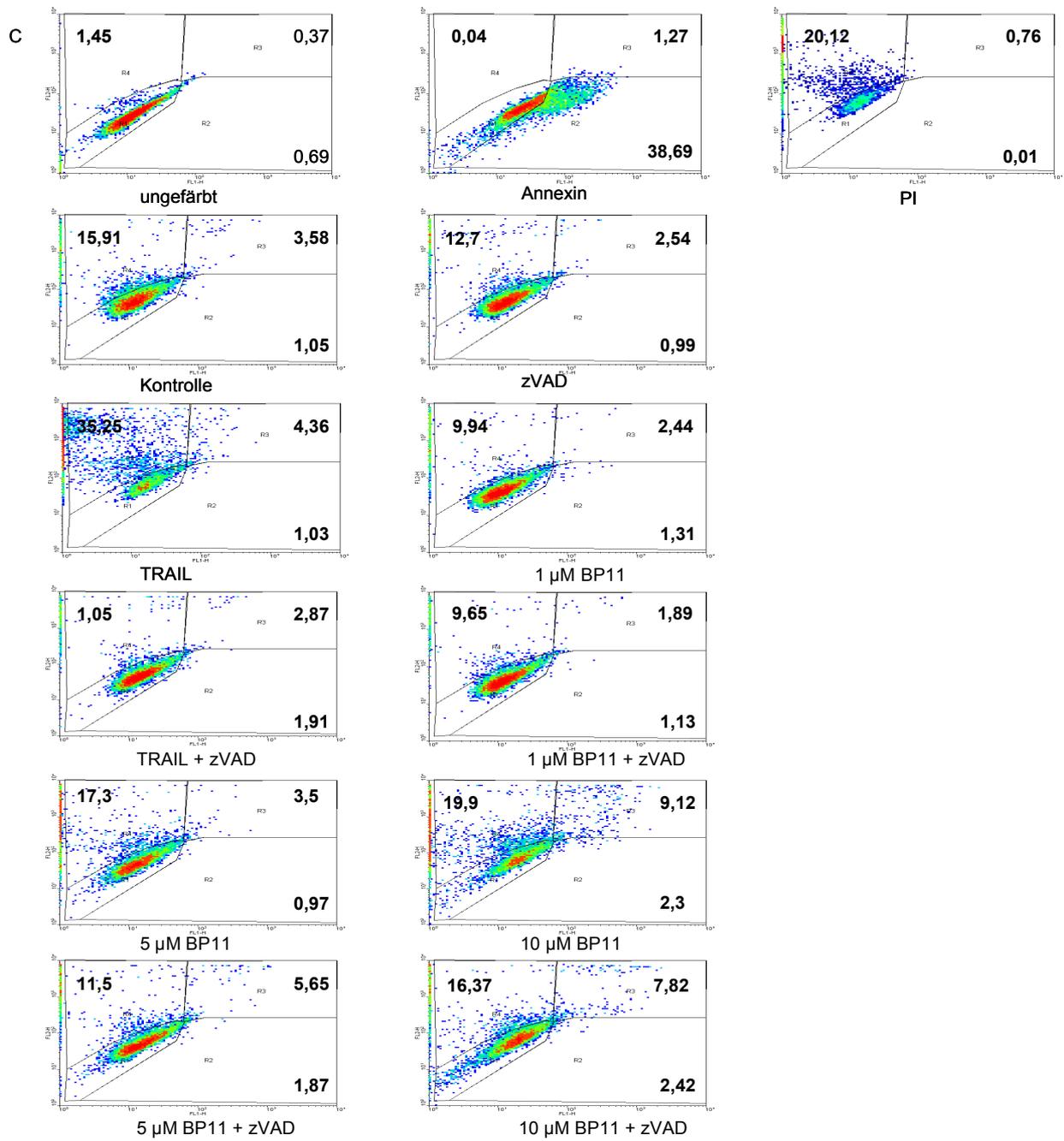
Hierfür wurden beide Zelllinien für 24 h und 48 h Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von BP11 behandelt und mit Annexin V/Propidiumiodid angefärbt. Zur Einstellung des Gerätes wurden zusätzlich ungefärbte, nur mit Annexin V und nur mit PI gefärbte Zellen vermessen. Die Ergebnisse der Annexin V/Propidiumiodid Doppelfärbung sind in Abb. 4.4.5 dargestellt. Interessanterweise zeigten beide Zelllinien nach 24 h und 48 h nur geringe Annexin V (positive) und PI (negative) Färbung. So zeigten die Panc89 Zellen (Abb. 4.4.5 A und B) nach 24 h und 48 h Behandlung mit 5 μ M und 10 μ M BP11 nur um die 1% Annexin positive und damit frühapoptotische Zellen. Der Anteil der PI-positiven Zellen lag bei ca. 40%. Im Vergleich zeigten jedoch auch die TRAIL behandelten Zellen ähnliche Ergebnisse, was darauf schließen lässt, dass es sich um apoptotische Zellen in späteren Stadien handelte. Diese Schlussfolgerung wurde durch die zusätzliche Präinkubation mit dem Caspase-Inhibitor zVAD - *fmk* bestärkt. Die Differenz zwischen den PI positiven Zellen ohne zVAD - *fmk* Vorbehandlung und den PI positiven Zellen mit zVAD - *fmk* Vorbehandlung ergibt die Anzahl der spätapoptotischen Zellen. Durch die Inhibition der Caspasen konnte auch bei den Panc89 Zellen nach 24 h und 5 μ M BP11 Behandlung, sowie nach 10 μ M BP11 Behandlung 30% weniger PI positive Zellen detektiert werden (Abb. 4.4.5 A). Die Anzahl der PI positiven Zellen lag nach 24 h bei den beiden oben genannten Konzentrationen bei ca. 40% nach zVAD - *fmk* Präinkubation nur noch bei ca. 10% (Abb. 4.4.5 A). Nach 48 h und 5 μ M und 10 μ M BP11 Behandlung wurden im Durchschnitt 35% spätapoptotische Zellen detektiert. Der Anteil der PI positiven Zellen, die nicht mit zVAD - *fmk* präinkubiert wurden, betrug bei beiden BP11 Konzentrationen ca. 75%. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass ein Teil der Zellen nach längerer Behandlung (48 h) mit 5 μ M und 10 μ M BP11 nekrotisch sterben (Abb. 4.4.5 B). Die Colo357 Zellen zeigten nach 24 h

und 48 h TRAIL und BP11 Behandlung deutlich weniger detektierbare PI positive Zellen als die Panc89 Zellen (Abb. 4.4.5 C und D). Interessanterweise zeigten die Colo357 Zellen nach 48 h TRAIL, 5 μ M und 10 μ M BP11 Behandlung Annexin V und PI positive Zellen. Durch die Präinkubation mit zVAD - *fmk* konnten die TRAIL behandelten Annexin V/PI pos. Zellen um 33% gemindert werden. Bei den mit zVAD - *fmk* präinkubierten und 10 μ M BP11 behandelten Zellen lag der Anteil nur bei 4% (Abb. 4.4.5 D). Auch dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass ein Teil der Colo357 Zellen nach 48 h BP11 Behandlung in den Konzentrationen von 5 μ M und 10 μ M nekrotisch sterben (Abb. 4.4.5 D).

Abb. 4.4.5:







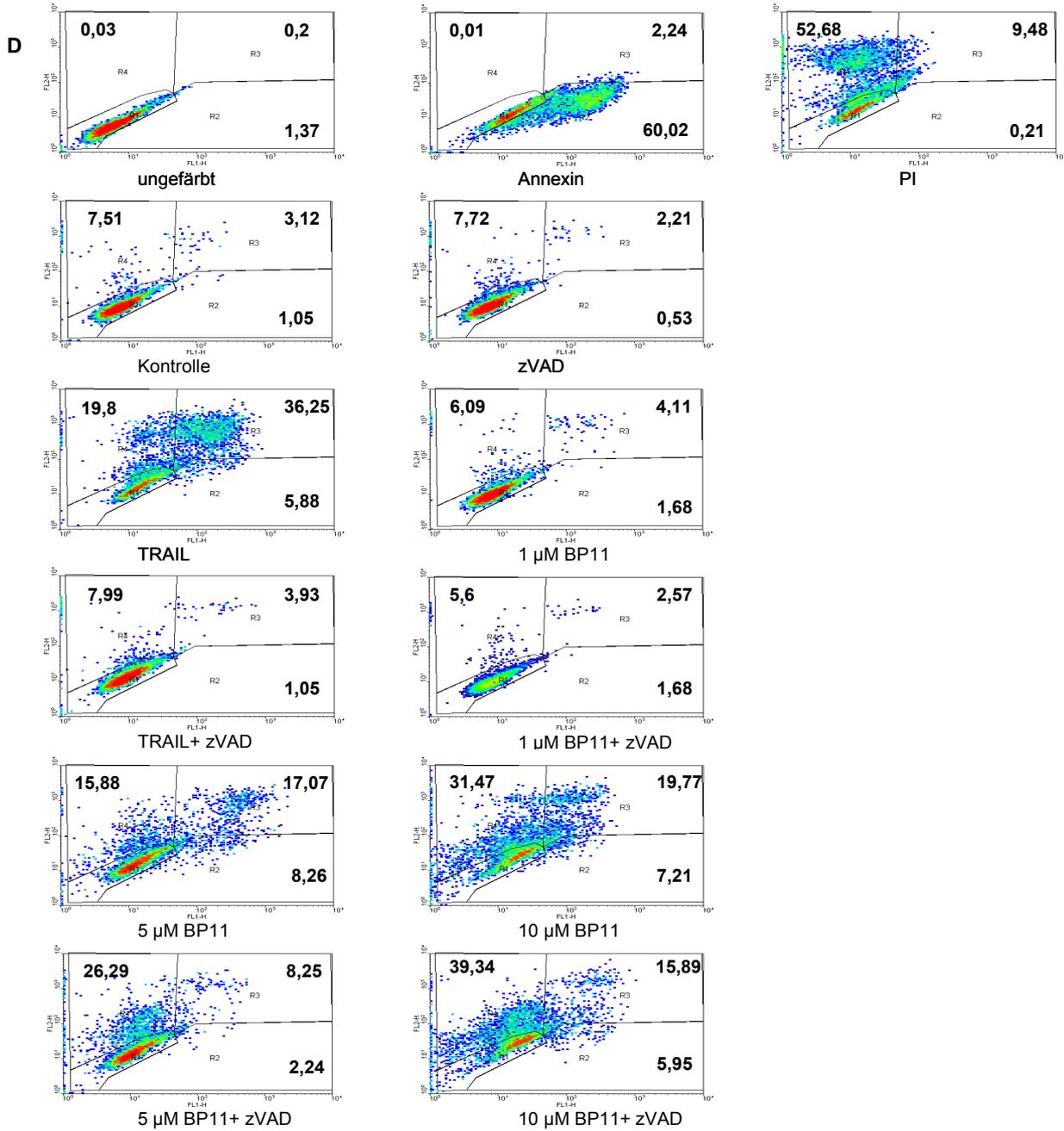


Abb 4.4.5: Nekrotischer und Apoptotischer Zelltod durch BP11.

Panc89 Zellen (A,B) und Colo357 Zellen (C,D) wurden für 24 h (A,C) und 48 h (B,D) mit BP11, sowie teilweise mit zVAD - *fmk* (20µM) behandelt. Einfacherhalber wurde als Beschriftung zVAD und nicht zVAD - *fmk* verwendet. Die Einstellung erfolgte mit ungefärbten Zellen, nur mit Annexin V und nur mit PI gefärbten Zellen. Die Auswertung erfolgte mit dem Setzen sogenannter Gates. Gate R1 zeigt vitale Zellen, Gate R2: Annexin V positive, Gate R3: Annexin V/ PI positive und Gate R4: PI positive Zellen.

4.5 Charakterisierung der induzierten intrazellulären Signaltransduktionswege nach BP11 Behandlung

Unter den intrazellulären Signaltransduktionskaskaden nehmen die Kinasen der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAP - Kinasen) eine zentrale Rolle ein. Der MAP-Kinaseweg ist eine Signalkaskade in einem hierarchisch aufgebauten Signalnetzwerk. Die MAP - Kinasen sind Hauptbestandteile von zellulären Reaktionsmechanismen, die für die Kontrolle der Embryogenese, Proliferation, Apoptose und Differenzierung von Zellen wichtig sind. Die als erstes charakterisierten MAP - Kinasen waren die ERK1/2. Sie werden durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli und Onkogenen aktiviert, die eine Proliferation oder erhöhte Zelldifferenzierung bewirken (Cobb & Goldsmith, 1995). Die c - Jun - NH₂ - terminale Kinase JNK, sowie p38 können durch eine Vielzahl an Stimuli, wie Entzündungsmediatoren und Stress aktiviert werden. Die Intrazelluläre MAP - Kinase - Aktivierungskaskade wird durch eine Phosphorylierungskaskade reguliert. Um die intrazellulären Antworten der Zelle auf BP11 zu analysieren, wurde die Expression und damit der Phosphorylierungsstatus einzelner MAP - Kinasen auf Proteinebene mit Hilfe des Western Blots untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit BP11 behandelt, Lysate hergestellt, mit Hilfe der Elektrophoresetechnik aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. Abb. 4.5.1 A zeigt den Aktivierungsstatus an Hand der phosphorylierten Form der JNK/SAPK bei Panc89 Zellen. Ab einer Konzentration von 5 µM BP11 wird die JNK/SAP - Kinase phosphoryliert und somit aktiviert. Abb. 4.5.1 B zeigt den Aktivierungsstatus an Hand der phosphorylierten Form von ERK1/2 (p42/p44) bei Colo357 Zellen. Ab einer Konzentration von 5 µM BP11 wird ERK1/2 phosphoryliert und damit aktiviert. In Panc89 Zellen (Abb. nicht gezeigt) hatten nach BP11 Behandlung keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der ERK1/2. Die wichtigsten Substrate der ERKs sind Transkriptionsfaktoren, die sie nach der Translokation in den Kern durch Phosphorylierung aktivieren können.

Abb 4.5.1:

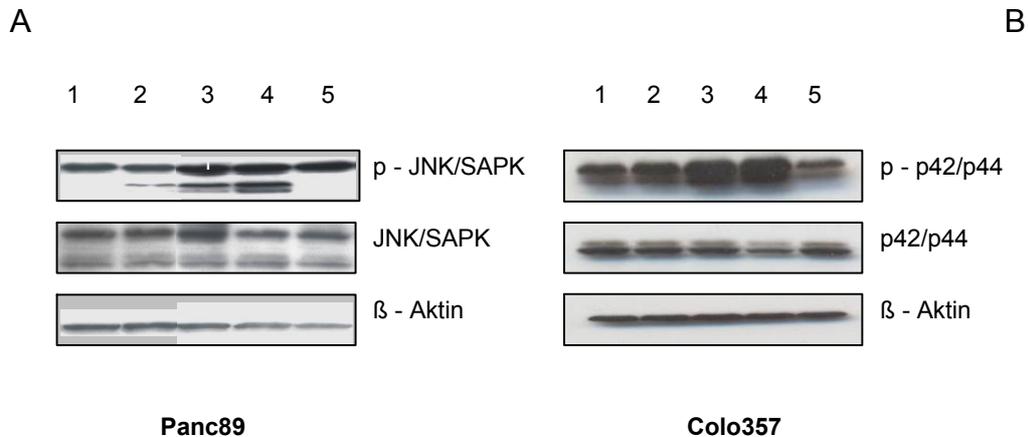


Abb 4.5.1: Charakterisierung intrazellulärer Signaltransduktionswege von Panc89 Zellen (A) und Colo357 Zellen (B). BP11 wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (1. Kontrolle, 2. 1 μM BP11, 3. 5 μM BP11, 4. 10 μM BP11 und 5. DMSO (0,1%)). Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen (1.) und mit DMSO behandelte Zellen (5.). 25 μg Protein wurde als Lysat in der SDS - Page aufgetrennt und auf PVDF - Membranen transferiert. Der Nachweis von p - JNK/SAPK, p42/p44 und der nicht-phosphorylierten Form JNK/SAPK erfolgte mit den polyklonalen Antikörpern der Firma Cell Signaling und einem sekundären anti-Kaninchen HRP-gekoppelten Antikörper. Der Nachweis von p - p42/p44 erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper der Firma Cell Signaling und einem sekundären anti - Maus HRP - gekoppelten Antikörper.

4.5.1 Einfluss von BP11 auf die Expression zellzyklusregulierender Proteine

Den sequentiellen Ablauf des Zellzyklus steuern bestimmte Proteine. Zu den wichtigsten gehören die Zykline und die zyklinabhängigen Kinasen (CDK). Die Kontrolle der Zellzyklusübergänge erfolgt über die CDKs. Antagonisten der CDK sind die zyklinabhängigen Kinase - Inhibitoren (CDKI), welche aus zwei Unterheiten, die INK4-Familie und die CIP/KIP (*CDK - inhibitory proteins/kinase - inhibitory proteins*) bestehen. Die Expression wichtiger zellzyklusregulierender Proteine in BP11 - behandelten Zellen wurde mit Hilfe des Western Blots geklärt. Dafür wurden die Zellen für 24 h mit BP11 behandelt, Lysate erstellt und die Expression der Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Abb. 4.5.2 A zeigt die Expression von p21, einem CDKI aus der Familie der CIP/KIP - Proteine. Nach 5 μM und 10 μM BP11 Behandlung erfolgte eine deutliche Heraufregulation von p21, was auf einen daraus resultierenden Zellzyklusarrest schließen lässt (Ogryzko, *et al.*, 1997; Niculesu, *et al.*, 1998; Radhakrishnan *et al.*, 2004). Abb. 4.5.2 B zeigt die Expression von p27,

ebenfalls einem CDKI aus der Familie der CIP/KIP-Proteine. Die Heraufregulation von p27 nach 5 μM und 10 μM BP11 lässt auch hier auf einen G1 - Arrest schließen (Reynisdottir *et al.*, 1995). Zusätzlich kontrolliert p27 durch Inhibition des Cyclin E/CDK2 - Komplexes den Übergang in die S-Phase am Restriktionspunkt (Steege und Abrams, 1997).

Abb 4.5.2 C zeigt den Phosphorylierungsstatus von Cdk1. Cdk1, auch Cdc2 genannt, vermittelt die Initiierung der Mitose (s. 1.2.2). Aktivierung der Cdk1 setzt eine Dephosphorylierung am Thr14 und Tyr15 voraus. Interessanterweise zeigt Abb 4.5.2 C nach Behandlung mit BP11 in den Konzentrationen von 5 μM und 10 μM eine Abnahme der Phosphorylierung Cdc2 bei gleichbleibender Menge von Cdc2. Dies deutet auf eine Aktivierung von Cdc2 durch BP11.

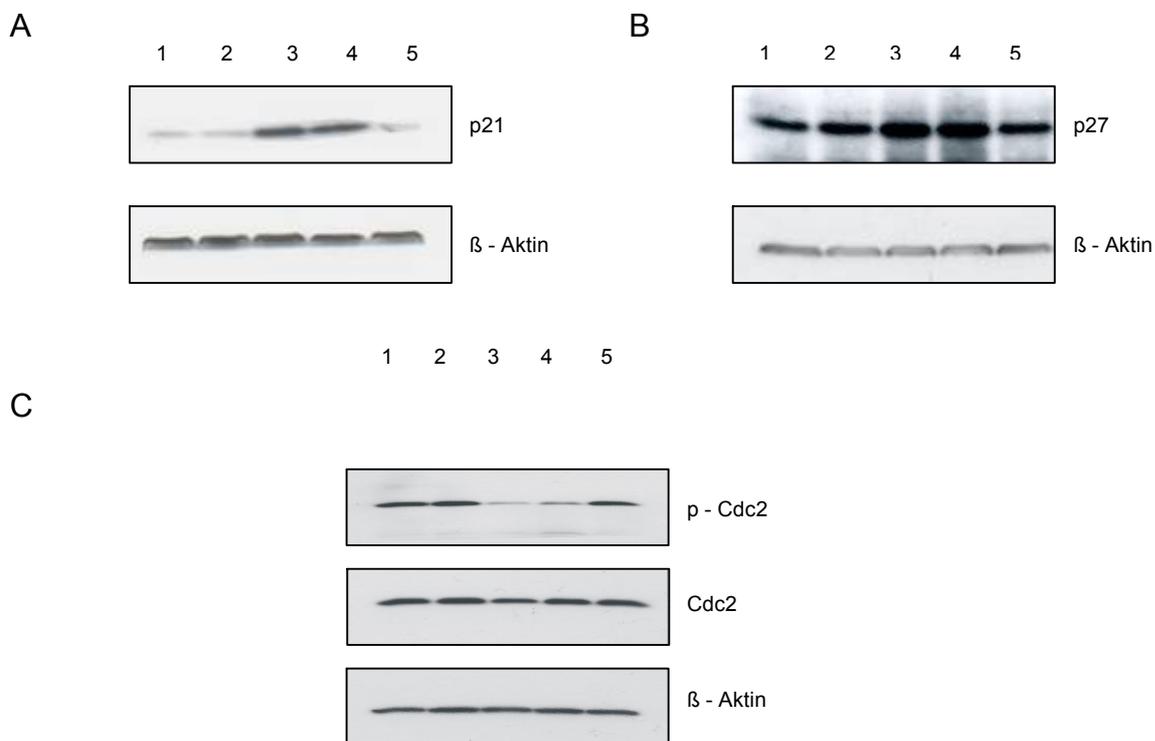


Abb. 4.5.2: Expression zellzyklusregulierender Proteine bei Panc89 Zellen

Die Zellen wurden mit drei unterschiedlichen Konzentrationen von BP11 für 24 h behandelt (2. 1 μM , 3. 5 μM , 4. 10 μM) Zusätzlich dienten unbehandelte (1.) und nur mit DMSO 0,1 % (5.) behandelte Zellen als Kontrolle. Das Behandlungsschema war bei A, B und C identisch. Die Lysate wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte bei A, B und C mit einem polyklonalen Antikörper der Firma Cell Signaling. Die eingesetzten Konzentrationen wurden den Angaben des Herstellers entnommen. Der Nachweis erfolgte bei A, B und C mit einem sekundären anti - Kaninchen HRP-gekoppelten Antikörper der Firma Cell Signaling. β - Aktin diente zum Nachweis der gleichen Ladungsmenge.

4.5.2 BP11 - Behandlung führt zu morphologischen, subzellulären Veränderungen bei Pankreaskarzinomzellen

Nachdem bei Testungen verschiedener Phenanthridiniumderivaten der Einfluss von BP11 auf die Polymerisation von Tubulin gezeigt werden konnte (Marko, 2003), wurde untersucht ob BP11 die Veränderungen des Tubulinnetzwerkes verursacht. Hierzu wurden Panc89 und Colo357 Zellen mittels Immunofluoreszenz untersucht, mit BP11 behandelt und die intrazelluläre Verteilung von α , β , γ Tubulin mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Zusätzlich wurde die zelluläre DNA mit Hoechst 33258 (Sigma - Aldrich, München) angefärbt. Hoechst 33258 gehört zu den Bisbenzimid - Farbstoffen. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in der A - T - Region der DNA (Weisblum und Haennsler, 1974). Die Zellen wurden 1 h, 8 h, 24 h und 48 h nach BP11 Behandlung mikroskopisch analysiert. Exemplarisch zeigt Abb. 4.5.3 die Auswertungen nach 24 h Behandlung mit BP11 und Anfärbung von α , β Tubulin. Wie in vorausgegangenen Untersuchungen zeigt BP11 ab einer Konzentration von 5 μM einen Einfluss auf den Spindelapparat. Während bei den unbehandelten Kontrollzellen und den mit 1 μM BP11 behandelten Zellen einzelne mitotische Zellen mit einem korrekt ausgebildeten Spindelapparat zu erkennen sind, führt die Behandlung mit 5 μM BP11 zur Ausbildung von multipolaren Mitosespindeln. Schon nach 1 h führt die Konzentration von 5 μM zu erheblichen Störung im Aufbau des Spindelapparates. Abb 4.5.4 zeigt eindrucksvoll die diffuse Verteilung der Zentrosomen in der Zelle. Die Zellen wurden fixiert und zusätzlich mit γ -Tubulin angefärbt. Durch die DNA - Färbung waren in den 5 μM und 10 μM BP11 behandelten Zellen veränderte Kernformen und kondensiertes Chromatin (*apoptotic bodies*) im Vergleich zu den Kontrollzellen und mit 1 μM BP11 behandelten Zellen zu beobachten (Abb 4.5.3: Bild 2, 4, 6 und 8).

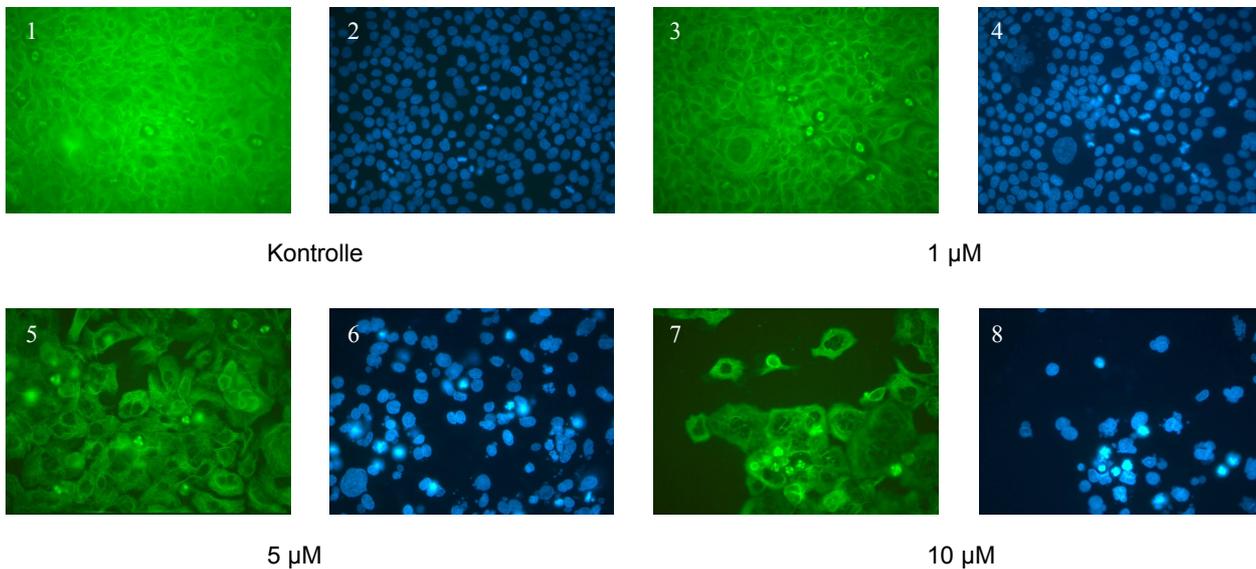


Abb. 4.5.3: Einfluß von BP11 auf das Tubulinnetzwerk in Panc89 Zellen. Zellen wurden zur Detektion von α, β Tubulin mit dem monoklonalen Mausantikörper Tubulin markiert. Zur Detektion der DNA wurde der Hoechst Farbstoff (Nr. 33258, Sigma) eingesetzt. Die Zellen wurden entweder nicht (Abb. 1 und 2), mit 1 µM BP11 (Abb. 3 und 4), mit 5 µM BP11 (Abb. 5 und 6) oder mit 10 µM BP11 (Abb. 7 und 8) behandelt.

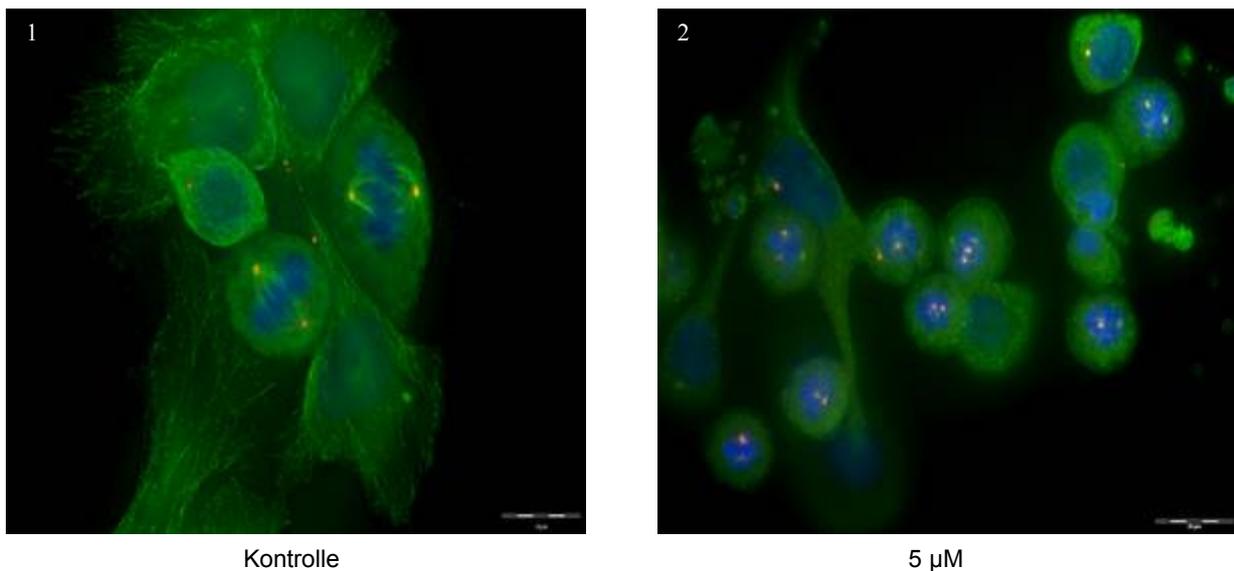


Abb. 4.5.4: Einfluß von BP11 auf das Tubulinnetzwerk von mitotischen Panc89 Zellen. Zellen wurden für 24 h mit 5 µM BP11 behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Panc89 Zellen. Der Maßstab bei den Panc89 Kontrollzellen liegt bei 32 µm, bei den 5 µM behandelten Zellen bei 20 µm. Die Zellen wurden mit dem monoklonalem Mausantikörper α, β, γ Tubulin markiert. Zur Detektion der DNA wurde der Hoechst Farbstoff (Nr. 33258, Sigma) eingesetzt.

4.6 Untersuchung der Aktivierung von AP1 und NFκB nach BP11 Behandlung

4.6.1 Posttranskriptionelle Aktivierung von AP1 nach BP11 Behandlung

Die AP1 - Aktivierung kann auf posttranskriptioneller Ebene, sowie transkriptioneller Ebene erfolgen. Um der Frage nachzugehen, ob der Phosphorylierung der JNK/SAP - Kinasen, sowie der ERKs eine posttranskriptionellen Aktivierung durch Phosphorylierung von c - JUN folgt, wurde die AP1 DNA - Bindungsaktivität untersucht. Hierfür wurden Panc89 Zellen für 24 h und 48 h mit 5 µM BP11, sowie als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (0,05%) 1 : 2000 inkubiert. Daraus wurden Kernextrakte isoliert und mit einem kommerziellen [$\gamma^{32}\text{P}$] - markierten AP1 - Konsensus Oligonukleotid inkubiert. Im Anschluss wurde ein Electrophoretic Mobility Shift Assay durchgeführt. Oligonukleotid gebundenes AP1 wurde durch die veränderte Beweglichkeit in der Gelelektrophorese sichtbar. Abb 4.6.1 A zeigt nach 24 h BP11 Behandlung eine starke Erhöhung der AP1 DNA - Bindungsaktivität, welche auch nach 48 h bestehen blieb.

4.6.2 Untersuchung der potentiellen NFκB - Bindungsstellen nach BP11 Behandlung

NFκB spielt eine große Rolle in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie Apoptose, Tumorstadium, Entzündung, sowie Tumorentstehung. Die NFκB DNA-Bindungsaktivität wurde mit isolierten Kernextrakten von Panc89 Zellen und nachfolgenden EMSA („*Electrophoretic Mobility Shift Assay*“) untersucht. Die Aktivierung von NFκB in BP11 behandelten Zellen konnte nach 24 h und 48 h gezeigt werden (Abb. 4.6.2 B). Hierzu wurden Panc89 Zellen für 24 h und 48 h mit 5 µM BP11 und DMSO (1 : 2000) behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Um die Zusammensetzung der identifizierten NFκB - Banden zu untersuchen, wurden sogenannte Supershift – Experimente durchgeführt. Bei dieser Methode können mit Hilfe von Antikörpern die einzelnen Heterodimere von NFκB nachgewiesen werden. NFκB besteht aus Heterodimeren verschiedener Unterheiten.

Hierzu wurden zusätzlich zu den radioaktiv markierten Oligonukleotiden Panc89 Zellen mit spez. Antikörpern gegen p50 und p65 inkubiert. Binden die Antikörper an den Komplex zwischen radiomarkierten Oligonukleotiden und Transkriptionsfaktor verschiebt sich die Beweglichkeit der markierten Oligonukleotide. Die Bande „shiftet“ nach oben. Bei Zugabe der Antikörper gegen NF κ B p50 und NF κ B p65 konnte ein Supershift detektiert werden (Abb. 4.6.3 C).

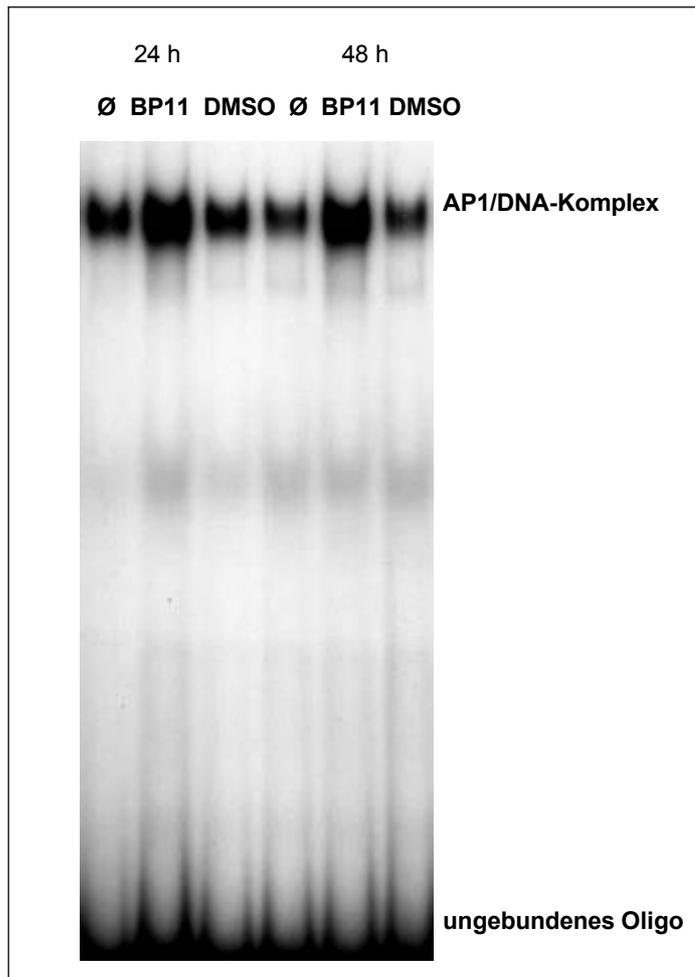
A

Abbildung 4.6.1: Electrophoretic Mobility Shift Assay. A: Ap1 - Induktion nach 24 h und 48 h und 5 μ M BP11 Behandlung von Panc89 Zellen.

Panc89 Zellen wurden entweder unbehandelt (Ø)Negativkontrolle, mit 5 μ M BP11 (BP11), oder als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO behandelt. Anschließend wurde an Hand von Kernproteinextrakten die AP1 Induktion nach 24 h und 48 h mittels EMSA analysiert. Als AP1 - bindende Sequenz wurde ein kommerzielles, radiomarkiertes AP1 - Konsensus - Oligonukleotid verwendet.

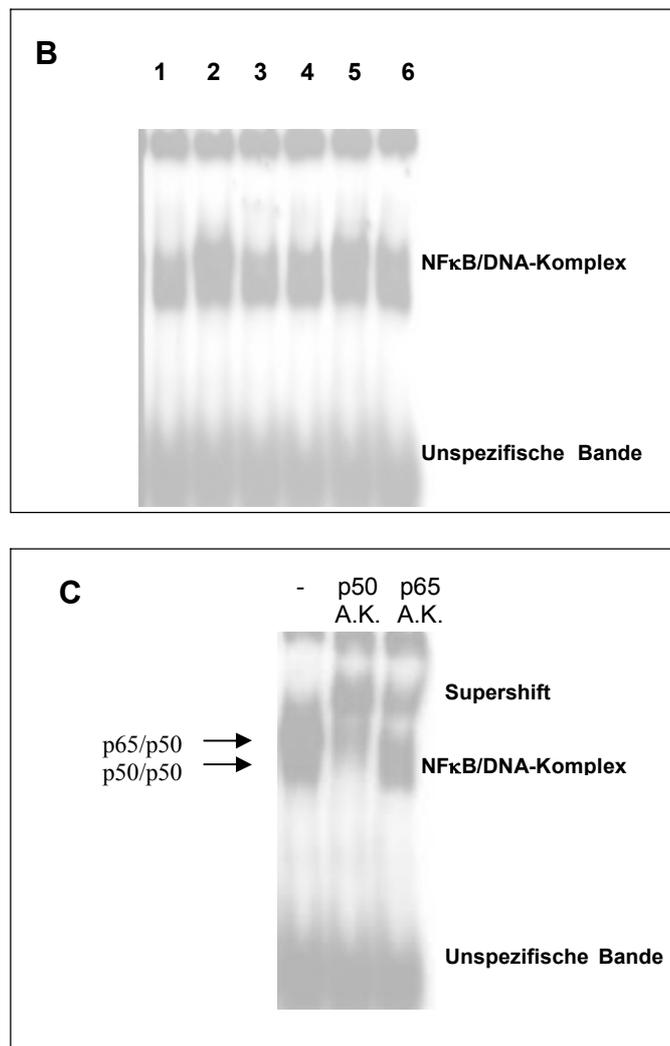


Abb. 4.6.2: Electrophoretic Mobility Shift Assay. B: Untersuchung der NFκB - Induktion nach 24 h und 48 h Stunden nach BP11 Behandlung von Panc89 Zellen.

Panc89 Zellen wurden entweder unbehandelt (1&4)- Negativkontrolle, mit 5 μM BP11 (2&5), oder als Lösungsmittelkontrolle mit DMSO (3&6) behandelt. Anschließend wurde an Hand von Kernproteinextrakten die NFκB - Induktion nach 24 h (1-3) und 48 h (4-6) mittels EMSA analysiert. Als NFκB - bindende Sequenz wurde ein kommerzielles, radiomarkiertes NfκB - Konsensus-Oligonukleotid verwendet.

Abb. 4.6.3: Die Abbildung zeigt eine repräsentative Supershiftanalyse mit Igκ

C: Panc89 Zellen wurden für 24 h Stunden mit 5 μM BP11 behandelt (Bande 1-3). Es wurden nukleäre Extrakte isoliert, diese mit Igκ gelabelt und in einem Gelshiftverfahren aufgetrennt. Unstimulierte Panc89 Zellen dienen als Negativkontrolle (nicht gezeigt). Die mit den polyklonalen Kaninchen Antikörper anti - p50 und anti - p65 versehenen Proben shifteten die entsprechenden Proben nach oben

Die Mechanismen der Apoptosehemmung von NF κ B sind vielfältig. Zielgene von NF κ B sind u.a. Bcl2-Homologe, wie BclxL, sowie Mitglieder der IAP - Familie (v.a. cIAP1 und cIAP2). Andere Gruppen konnten bereits zeigen, dass auch Survivin in der Regulation von NF κ B involviert ist (Chen *et al.*, 2003; Kawakami *et al.*, 2005). Zusätzlich wird die Aktivierung des Survivin – Promoters durch AP – 1 diskutiert (Che *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurde eine Zeitkinetik der Survivinexpression nach BP11 Behandlung untersucht.

4.7 Untersuchung der Survivin-Expression nach BP11-Behandlung

4.7.1 Zeitkinetik der Survivin-Expression in BP11 behandelten Panc89 Zellen

Die nach BP11 Behandlung mittels Immunfluoreszenz nachgewiesenen polyploiden Zellkerne und die multipolare Spindel deuteten zusätzlich auf den Einfluss von BP11 auf die Survivin - Expression hin. Deshalb wurde eine Zeitkinetik der Survivin - Expression auf Protein - und RNA - Ebene untersucht. Abb 4.7.1 zeigt die Survivin - Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Zellen wurden mit 5 μ M und 10 μ M BP11 für den gewünschten Zeitraum behandelt, lysiert und mit Hilfe des Western Blots analysiert. Nach 1h Behandlung mit 5 μ M und auch 10 μ M BP11 (Bande 2 und 6) erfolgte eine starke Repression von Survivin. Nach 8 h Behandlung mit beiden Konzentrationen (Bande 3 und 7) stieg die Survivin-Proteinmenge wieder an und erreichte ein Maximum nach 24h (Bande 4 und 8). Abb. 4.7.2 zeigt die Survivin - Expression auf RNA-Ebene. Analog zum Protein konnte in einer R.T. - PCR eine Repression von Survivin zeitabhängig dargestellt werden. Die Polymerasekettenreaktion (PCR, „*Polymerase chain reaction*“) wurde in den achtziger Jahren entwickelt (Mullis, 1990) und beruht auf der Methode bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren.

Hierfür wurden Panc89 Zellen für 1 h, 8 h, 24 h und 48 h mit 5 μ M BP11 behandelt. Nach RNA - Isolation (s. Material und Methoden 3.2.10.1) wurden 2 μ g RNA/10 μ l in cDNA mittels einer Reversen Transkriptase umgeschrieben (s. Material und Methoden 3.2.10.2) und mit Hilfe einer quantitativen PCR ausgewertet. Nach 1 h

folgte eine maximale Repression von Survivin, nach 8 h stieg der Survivin Level wieder an, erreichte jedoch nicht den maximal Wert der unbehandelten Kontrollzellen. Nach 24 h erfolgte erneut eine Survivin-Repression. Dies widerspricht der Survivin - Regulation auf Protein-Ebene, dort stieg die Survivin - Proteinmenge nach 24 h Behandlung mit 5 μ M BP11 auf ein Maximum an (Abb. 4.7.1).

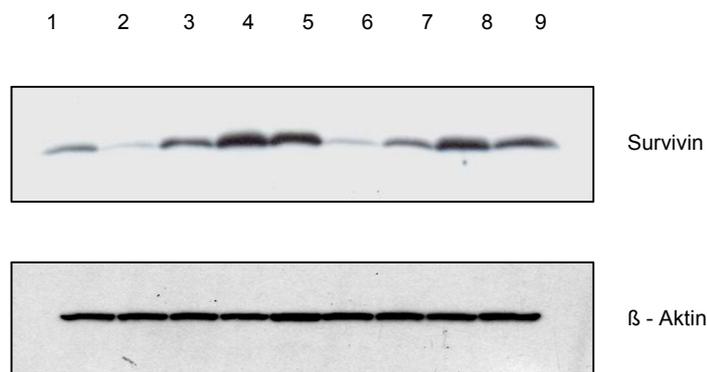
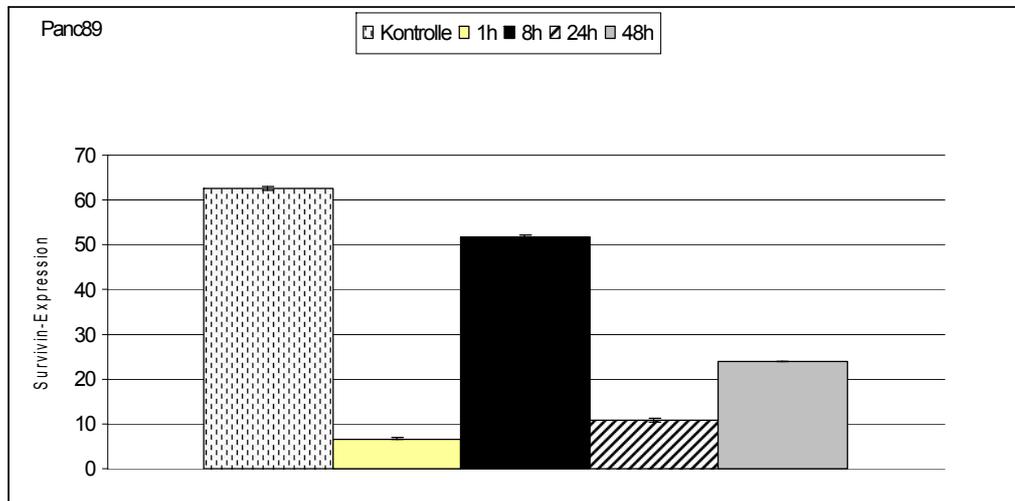


Abb. 4.7.1: Zeitkinetik der Survivin-Expression in Panc89 Zellen nach BP11 Behandlung

Jeweils 25 μ g Zellysat von Panc89 Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Western Blot Analyse wurde mit Hilfe von einem polyklonalen Antikörper gegen Survivin (Cell Signaling, Frankfurt) durchgeführt. Als Ladungskontrolle wurde eine β - Aktin Bestimmung durchgeführt. Bande 1 zeigt unbehandelte Kontrollzellen. Bande 2,3,4,5 zeigt die Survivin-Expression nach 5 μ M BP11 Behandlung nach jeweils Bande 2 1 h, Bande 3 8 h, Bande 4 24 h und Bande 5 48 h. Bande 6, 7, 8 und 9 zeigt die Survivin - Expression nach 10 μ M BP11 Behandlung nach jeweils Bande 6 1 h, Bande 7 8 h, Bande 8 24 h und Bande 9 48 h.

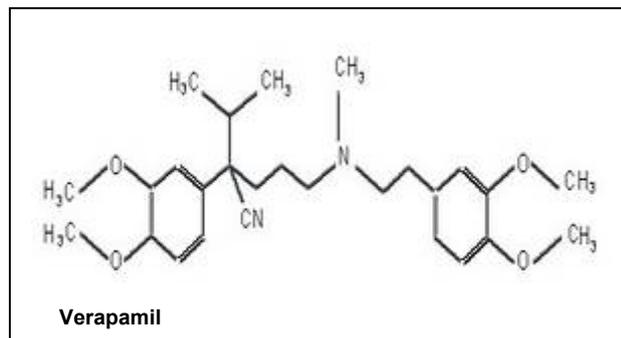
Abb. 4.7.2

**Abb. 4.7.2 Zeitkinetik der Survivin Expression auf RNA-Ebene in Panc89 Zellen**

Jeweils 2 µg Gesamt RNA wurden mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Detektion der PCR Amplifikate erfolgte mit Sybr Green. Um Kontaminationen zu erkennen wurde als Leerwert Aqua ad iniectionem mitgeführt. Bande 1 (gestrichelte Bande) zeigt die Survivin – Expression von unbehandelten Panc89 Zellen. Bande 2 (gelbe Bande) nach 1h , Bande 3 (schwarze Bande) nach 8 h , Bande 4 (gestreifte Bande) nach 24 h und Bande 5 (graue Bande) nach 48 h 5 µM BP11 Behandlung. Die Expression des Survivin-Gens wurde auf das Housekeeping Gen PBGD normiert., da PBGD im Vergleich zu β - Aktin gering exprimiert wird.

4.8 Multidrug- Resistenz nach BP11-Behandlung

Die Multidrug-Resistenz (MDR) gilt als wichtiger Chemoresistenzmechanismus. Ein MDR-Phänotyp der Zellen beruht u.a. auf der Überexpression von Transportproteinen. Das am besten charakterisierte Transportprotein ist das durch das MDR1-Gen kodierte P - Glykoprotein (Pgp) (Mechetner *et al.*, 1998). Verapamil (Schema 4.3), ein Phenylalkylamin besitzt die Fähigkeit die Zytostatika - Resistenz aufzuheben (Zamora *et al.*, 1988). Für beide Enantiomere des Verapamils wurde der Angriff am membranständigen P - Glykoprotein und dessen Blockade nachgewiesen (Toffoli *et al.*, 1995). Neben der Bindung am P - Glykoprotein wurde ein weiterer Mechanismus postuliert: Verapamil verbessert die Membrangängigkeit der eigentlichen Zytostatika (Pajeva *et al.*, 1996; Dey *et al.*, 1997). Um BP11 als potentiell Zytostatikum weiter zu erforschen, wurde die MDR mit Hilfe des Kristallviolettassays (s. Material und Methoden 3.2.8.1) an Panc89 und Colo357 Zellen getestet. Die Zellen wurden mit 10 μM Verapamil für eine Stunde präinkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen von BP11 für 24 h behandelt. Als Kontrolle dienten einmal unbehandelte, zum anderen nur mit Verapamil behandelte Zellen. Abb. 4.8 zeigt exemplarisch die Auswertung des Kristallviolettassays von Panc89 Zellen. Nach Verapamil-Inkubation starben 20% der Zellen in Bezug auf die unbehandelten Kontrollzellen, die in diesem Experiment als 100% gesetzt wurden. Ab einer Konzentration von 5 μM BP11 starben ca. 40% der Zellen, wobei die Erhöhung der Konzentration auf 10 μM BP11 keine Verdopplung der toten Zellen zur Folge hatten. Nach der Behandlung mit 10 μM BP11 über einen Zeitraum von 24 h starben 50% der Panc89 Zellen. Würde eine Multidrug - Resistenz über das membranständige P - Glykoprotein bestehen, würde die Präinkubation mit Verapamil deutlich mehr tote Zellen durch Blockade des Efflux von BP11 zur Folge haben. Abb. 4.8 zeigt jedoch nur max. 5% mehr tote Zellen nach Präinkubation mit Verapamil und anschließender Behandlung mit 5 μM BP11. Die Behandlung mit Verapamil und anschließender Behandlung mit 10 μM BP11 zeigte keine Unterschiede im Vergleich zu den mit BP11 alleine behandelten Zellen. BP11 in einer Konzentrationen von 1 μM hatte wie in den vorherigen Experimenten kaum Einfluss auf die Pankreaskarzinomzelllinien (Colo357 nicht gezeigt).



Schema 4.3 : Verapamil, ein Calcium- Antagonist mit amphiphilen Charakter.

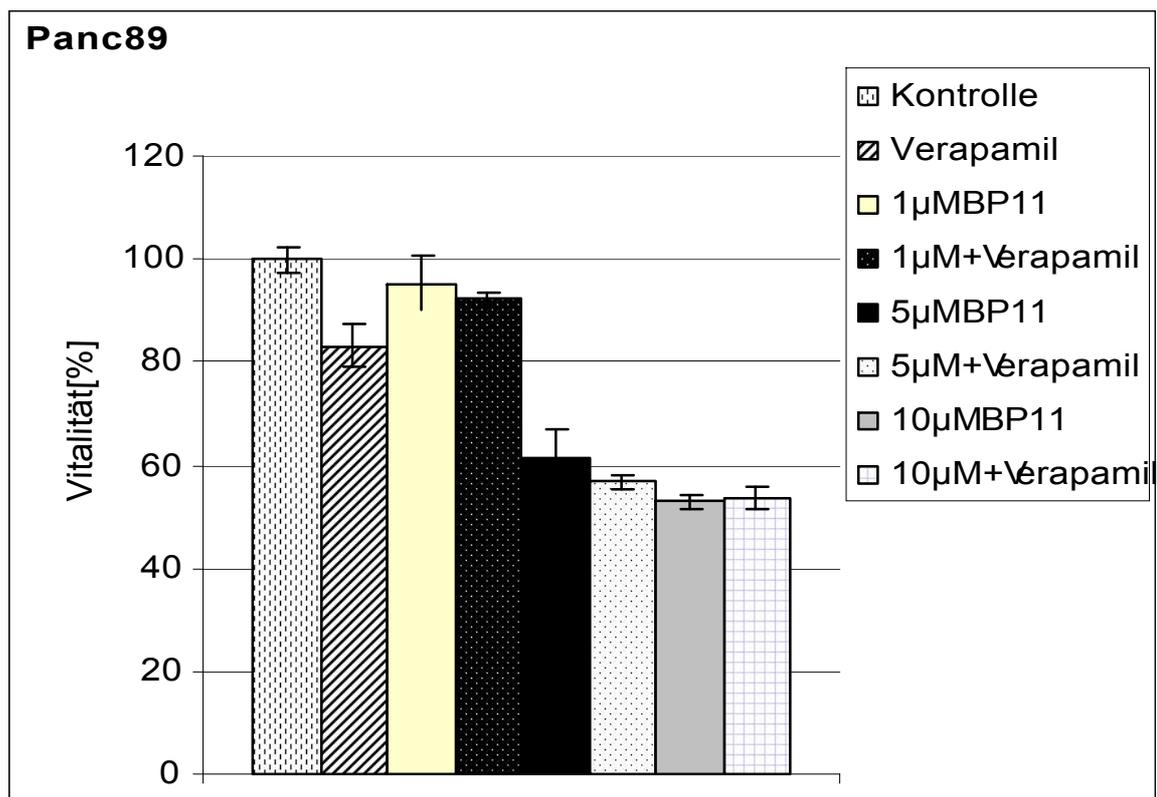


Abb. 4.8: Einfluss von Verapamil auf BP11-induzierten Zelltod

Panc89 Zellen wurden für 1 h mit Verapamil vorbehandelt und anschließend für 24 h mit BP11 in drei verschiedenen Konzentrationen (1 µM, 5 µM und 10 µM) behandelt. Dargestellt ist die Vitalität in Prozent, wobei die Kontrollzellen (unbehandelt) 100% gesetzt wurden. Die Werte sind 8 - fach Bestimmungen, wobei der Mittelwert \pm SD aufgetragen wurde.

4.9 Einfluss von BP11 auf humane diploide Fibroblasten

Um BP11 als potentiell Zytostatikum weiter zu untersuchen, wurde der Einfluss von BP11 auf Fibroblasten getestet. Hierfür wurde einmal der Kristallviolettassay und zum anderen der Ez4U - Assay durchgeführt. Dafür wurden 1×10^4 Zellen in 96 - well Platten ausgesät und am nächsten Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen von BP11 behandelt. Abb. 4.9 A zeigt die graphische Auswertung des Kristallviolettassays, wobei unbehandelte Zellen als Kontrolle dienten und als 100% vital angesehen wurden. Abb. 4.9 B zeigt die graphische Auswertung des Ez4U - Assays, wobei die Auswertung simultan zur Auswertung des Kristallviolettassays durchgeführt wurde.

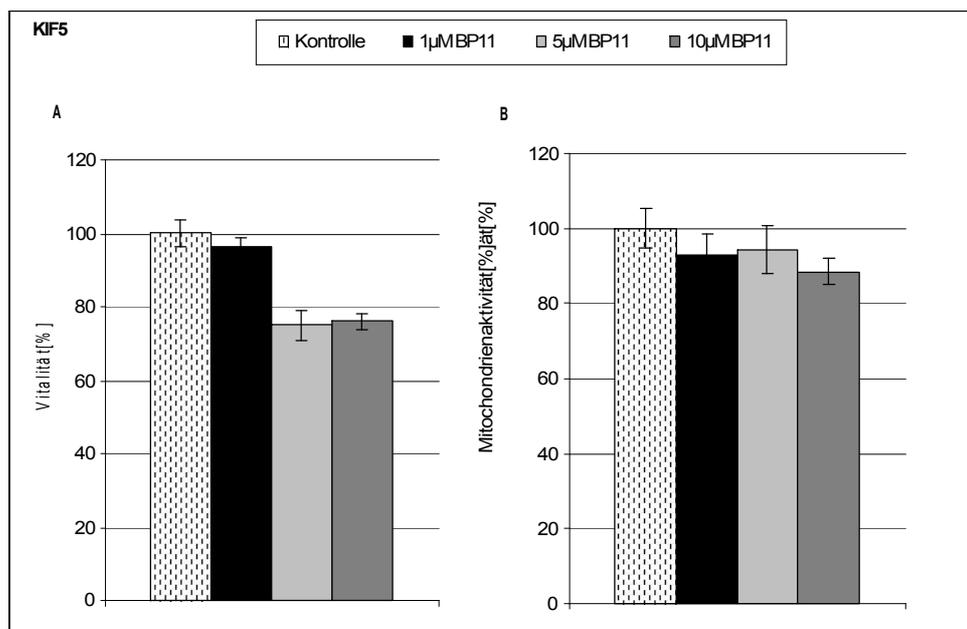


Abb. 4.9: Einfluss von BP11 - Behandlung auf die Vitalität humaner diploider Fibroblasten. Die Fibroblasten (KIF 5) wurden für 24 h mit drei verschiedenen Konzentrationen 1 µM (schwarzer Balken), 5 µM (hell grauer Balken) und 10 µM (dunkel grauer Balken) behandelt. Abb. A zeigt die graphische Darstellung eines Kristallviolettassays. Dargestellt ist die Vitalität in Prozent, bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen (gestrichelter Balken), wobei diese als 100% gesetzt wurden. Die Werte ergeben sich aus einer 8 - fach Bestimmung, der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aufgetragen. Abb. B zeigt die graphische Darstellung eines EZ4U - Assays. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Biomedica, USA). Aufgetragen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen einer 8 - fach Bestimmung.

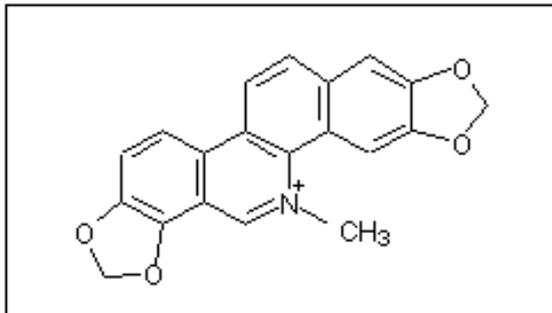
5 DISKUSSION

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist ein hochmaligner, epithelialer Tumor, der nicht auf die gängigen Chemotherapien anspricht. In einer großen Anzahl an Phase - II - Studien konnte kein Chemotherapeutikum etabliert werden, das einen bedeutenden therapeutischen Effekt zeigt. Frühere Veröffentlichungen beschreiben die Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege und Adaptermoleküle an der Apoptoseresistenz, frühzeitigen Metastasierung, sowie weiterer antiapoptischer Mechanismen, wie die Aktivierung von NF κ B und AP1 (Trauzold *et al.*, 2005, Trauzold *et al.*, 2006, Siegmund *et al.*, 2007). Ziel dieser Arbeit war es, das potentielle Zytostatikum, BP11, auf seine molekularen Wirkmechanismen beim Pankreaskarzinom zu testen. Eine Reihe von ausgesuchten Benzo[c]phenanthridin-Derivaten wurde im Rahmen der Dissertation von Ilka Kock (Ilka Kock, 2003 und nachfolgender Arbeiten) bei *in vitro*-Testungen im National Cancer Institute und der Firma Baxter auf ihr zytotoxisches Potential untersucht. Strukturell ähnliche Substanzen, wie Irinotecan und Topotecan werden heute erfolgreich in der Antitumortherapie eingesetzt (Pommier, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Benzo[c]phenanthridin-Derivat BP11 (6-Amino-11,12-dihydro-1-(3'-5'-dimethoxy-4'-hydroxyphenyl)benzo[c]phenanthridiniumchlorid) untersucht, welches von allen getesteten Verbindungen als einzige in der Lage war, das Zellwachstum in einem Konzentrationsbereich unterhalb von 1 μ M zu halbieren (Ilka Kock, 2003). Es sei jedoch anzumerken, dass bei beiden Testsystemen keine Pankreaskarzinomzelllinie ausgewählt wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen ergaben sich aus dem Testsystem der Firma Baxter, die im Rahmen einer bestehenden Kooperation die Benzo[c]phenanthridin-Derivate mit Hilfe des XTT - Zytotoxizitätstests untersucht haben.

5.1 BP11 inhibiert das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen und führt zur Veränderung im Zellzyklus

Die hier präsentierten Versuche wurden mit etablierten Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt (Sipos *et al.*, 2003). Die Phasenkontrastaufnahmen, die Wachstumskurven, der ^3H - Tymidin-Einbau und die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass BP11 zu einer Hemmung der Proliferation und zum Zelltod der Pankreaskarzinomzellen führt. Ähnliche Ergebnisse zeigten Untersuchungen des Sanguinarin (13-methyl benzodioxolo(5, 6-c)-1,3-dioxolo(4,5-i)phenanthridin) (Kim *et al.*, 2008).

Schema 5.1



Schema 5.1:

Sanguinarin, ein natürlich vorkommendes Alkaloid mit Benzophenanthridin-Grundgerüst

Sanguinarin ist ein Benzophenanthridin-Derivat, welches in der Lage ist, das Wachstum zu inhibieren, sowie den apoptotischen Zelltod in verschiedener malignen Zelltypen auszulösen (Adhami *et al.*, 2003; Adhami *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2002). Die Daten unterstützen meine Ergebnisse, die ein Abrunden der als Monolayer wachsenden Zellen und eine deutliche Inhibition des Wachstums zeigten. Eingehende Analysen ergaben einen konzentrationsabhängigen und Zelllinien-spezifischen Effekt von BP11. So wurde bei der Zelllinie Panc89 der Anstieg der Zellen in der sub - G1 - Population (*apoptotischer Zelltod*) nach 24 h Behandlung bei einer Konzentration von 5 μM bei 50% der Zellen beobachtet. Bei der Zelllinie Colo357 war eine höhere Konzentration von BP11 (10 μM) nötig, um nach 24 h einen ähnlichen Effekt zu erzielen. Unterschiede in den Zelllinien ergaben sich auch bei Zellen in der G1 - Phase. Erneut war der Effekt von BP11 in der Konzentration von 5 μM bei Panc89 deutlich ausgeprägter als bei Colo357. Nach 24 h befanden sich nur noch 8% der Panc89 Zellen in der G1 - Phase, während bei Colo357 der Anteil noch

bei 20% der Zellen lag. Bei beiden Zelllinien war kein Unterschied zu den unbehandelten Zellen in der G2 - Phase zu beobachten, was daraus schließen lässt, dass die Zellen aus der G1 - Phase nach BP11 Behandlung einen irreversiblen Schaden erfahren und sterben. Die Hochregulation der Proteine p21 und p27 deuteten auf einen Zellzyklusarrest hin. Das unterschiedliche Zelllinien - spezifische Verhalten könnte auf Grund der verschiedenen genetischen Grundlagen (Sipos *et al.*, 2003) auf Unterschiede in den Signaltransduktionswegen der Zelllinien zurückzuführen sein (Siegmond *et al.*, 2007).

5.2 BP11 induziert teilweise apoptotischen Zelltod

Basierend auf den ersten Daten, wurden zusätzlich Zellen, die durch stabile Transfektion Bclx_L in Colo357 Zellen überexprimieren, verwendet. Zum einen dienten die daraus resultierenden Daten, zur Absicherung erster Ergebnisse, zum anderen um weitere Daten bezüglich des BP11 - induzierten Zelltod zu erhalten. Auch unter diesem Aspekt konnten andere Gruppen zeigen, dass das strukturell verwandte Alkaloid Sanguinarin in der Regulation von pro - apoptotischen und anti - apoptotischen Proteinen der Bcl - 2 Familie zu Gunsten der pro - apoptotischen Proteine Bax, Bid, Bak anti - apoptotische Familienmitglieder, wie z.B. Bcl - 2, oder Bclx_L runterreguliert (Adhami, *et al.*, 2003). Die in unseren Experimenten verwendete Pankreaskarzinomzelllinie Panc89 zeigt eine konstitutive Überexpression von Bclx_L, nach BP11 - Behandlung konnte keine Runterregulation von den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl - 2 - Familie beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), dieses widerspricht den Ergebnissen des Sanguinarin nicht vollständig, deutet bezüglich des BP11 - induzierten Zelltodes jedoch auf andere, oder zusätzliche Mechanismen hin.

Bclx_L ist ein anti-apoptotisches Protein und gehört zur Familie der Bcl - 2 Proteine. Zusätzlich zum Zellüberleben (Zhu *et al.*, 2005) wird Bclx_L mit der Regulation des Zellzyklus (Itoh *et al.*, 2003) und der Zelldifferenzierung (Wakabayashi *et al.*, 2000) in Zusammenhang gebracht.

Nachdem die Apoptoseresistenz vielfach in weiteren Systemen untersucht und bestätigt wurde (Daten nicht dargestellt) wurden zusätzliche Zellzyklusuntersuchungen mit den Colo357/Bclx_L Zellen durchgeführt. Um den

Zelltod weiter verifizieren zu können, wurde der Breitspektrum Caspase - Inhibitor zVAD - *fmk* in Kombination mit BP11 eingesetzt.

zVAD - *fmk* (Benzyloxycarbonyl - Valin - Alanin - Aspartat - *Fluoromethylketon*) gehört zu den synthetischen Peptidinhibitoren und bindet unspezifisch durch seine Benzyloxycarbonyl - Gruppe an alle bekannten Caspasen. Die Fluoromethylgruppe bindet an das aktive Zentrum der Caspasen, was zu einer sofortigen und irreversiblen Hemmung der Caspasen führt (Borner und Monney, 1999; Garcia - Calvo *et al.*, 1998). Nukleäre Kondensation und Fragmentation kann sowohl caspase - abhängig, als auch caspase - unabhängig auftreten (Deschesnes *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde u.a. der „klassischen Weg“ der Apoptose untersucht, dieser geht mit einer Caspasen - Aktivierung einher, womit der Einsatz des Breitspektrum - Caspasen - Inhibitors mit einer Inhibierung des apoptotischen Zelltodes begründet ist.

Zelllinien - spezifische Unterschiede traten sowohl bei Zellen in der G1 - Phase, als auch bei Zellen in der sub - G1 - Phase (*apoptotic bodies*) auf. Während bei den Zelllinien Panc89 und Colo357/wt die BP11 - induzierte Abnahme der Zellen in der G1 - Phase nach Hemmung der Caspasen nicht reversibel war, konnte der Zelltod bei Zellen, die sich in der sub - G1 - Phase befanden teilweise rückgängig gemacht werden. Interessanterweise traten bei den Apoptose-resistenten Colo357/Bcl_{xL} Zellen, als auch bei den mit zVAD - *fmk* vorbehandelten Zellen jeweils ein G2 - Arrest auf. Diese Daten liefern den Beweis, dass zumindest ein Teil der Zellen nach BP11 - Behandlung durch apoptotische Zelltod sterben. Nach Caspase - Inhibition durch zVAD - *fmk* war ein verminderter Zelltod durch BP11 festzustellen. Da dieser jedoch nicht vollständig gehemmt wurde, deuten diese Ergebnisse auf das Vorhandensein weiterer Wege für BP11 induzierten Zelltod. Dabei kommt dem antiapoptotischen, sowie Zellzyklusregulierendem Protein Survivin eine Schlüsselrolle zu.

Eine wesentliche Rolle des Survivins ist die Regulation der Mitoseprogression in malignen Geweben, deswegen wurde zunächst in Immunfluoreszenzanalysen geklärt, wie weit BP11 Behandlung zu Mitotischen Abnormalitäten in Pankreaskarzinomzellen führt.

5.3 BP11 - Behandlung führt zur Zentrosomenamplifikation und multipolaren Mitosespindeln

In den Immunfluoreszenzanalysen waren bei allen BP11 behandelten Zelllinien Zentrosomenamplifikationen mit bis zu 4 Zentrosomen in einer Zelle zu beobachten. Nach BP11 Behandlung waren diese Zellen nicht mehr in der Lage eine funktionelle Spindel aufzubauen (Abb. 4.5.3 und Abb. 4.5.4). Eine Induktion von multipolaren Spindeln und Zentrosomenamplifikationen nach BP11 - Behandlung wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit beschrieben. Zentrosomen spielen in der Zellzyklusregulation eine zentrale Rolle. Sie sind dynamische Organellen, die während des Zellzyklus eine Reihe von auffälligen strukturellen Veränderungen, wie Duplikation (S - Phase), Elongation (G2 - Phase), Reifung (G2/M - Phase), Separation (G2/M - Phase) und Zentriolendisorientierung (Ende Mitose/G1 - Phase) durchlaufen (Borens und Boudjuo, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999; Urbani und Stearns, 1999). Die korrekte Ausführung ist wichtig für die Ausbildung einer bipolaren mitotischen Spindel. Fehlerhafte Zentrosomenduplikation führt zur Ausbildung von mono - oder multipolarer mitotischer Spindeln. Die nachgewiesenen Spindel - und Zentrosomendefekte in den BP11 behandelten Pankreaskarzinomzelllinien lassen auf einen Einfluss eines oder mehrerer Proteine des mitotischen Zytoskeletts, wie z.B. Tubulin, Mikrotubuli - akzessorischer Proteine oder zentrosomaler Proteine, wie Survivin schließen.

Mitotische Abnormalitäten, wie sie nach Behandlung mit BP11 beobachtet wurden, wurden auch in Zellen gefunden, bei denen ein funktionelles Ausschalten von Survivin induziert wurde.

„*Knocked out*“ von Survivin führte nach wenigen Tagen zum Absterben von Mäuseembryonen. Weiterhin führte der „*knocked out*“ von Survivin zu schweren Störungen der Mitose von humanen Zellen. Die Zellen konnten keine regulären Mitosespindeln ausbilden und wiesen multiple polyploide Zellkerne auf (Uren *et al.*, 2000). Interessanterweise führte ein „*knocked out*“ von INCENP zu gleichen funktionellen Störungen in der Mitose (Uren *et al.*, 2000). INCENP und Survivin werden als Teil eines sogenannten „*chromosomal passenger complex*“ beschrieben (Skoufias *et al.*, 2000; Temme *et al.*, 2003; Uren *et al.*, 2000; Wheatly *et al.*, 2001), beide Proteine nehmen eine essentielle Rolle während der Mitose ein (Wheatly *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass Survivin während der Metaphase an die

Spindelfasern bindet und durch p34^{CDC2} - Cyclin B1 phosphoryliert wird. Durch die Phosphorylierung kann Survivin die Procaspase 9 binden und stabilisieren. Umgekehrt führt Dephosphorylierung zu einem Caspase - 9 - abhängigen apoptotischen Zelltod. Während der Prometa - und Metaphase binden Survivin, die Aurora B - Kinase und INCENP am Kinetochor der Chromosomen und bilden den Kinetochorkomplex (Bolton *et al.*, 2002; Wheatly *et al.*, 2001). Weiterhin organisiert Survivin als Teil des „*chromosomal passenger complex*“ durch seine Interaktion mit Tubulin und einigen Kinasen u.a. die Segregation der Chromosomen (Adams *et al.*, 2001).

Die zeitabhängige Herunterregulation von Survivin führt dazu, dass der mitotische Spindelapparat nicht, oder fehlerhaft ausgebildet wird. Diese Beobachtung konnte auch in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gemacht werden. Die dazu notwendigen Untersuchungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Uwe Knippschild, Universitätsklinikum Ulm durchgeführt. Bereits 15 min nach Behandlung mit 5 µM BP11 ist eine fehlerhafte Ausbildung des Spindelapparates zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch (Video) wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Uwe Knippschild durchgeführt. Die schnelle Inaktivierung von Survivin (Abb. 4.7.1), sowie die fehlerhafte Ausbildung des Spindelapparates führen letztlich sofort zu einem nicht lebensfähigen Zustand bzw. zum programmierten Zelltod der proliferierenden Zellen. Diese Daten konnten einen wichtigen Schritt in der Signaltransduktion aufklären. Die Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit BP11 endet größten Teils im Zelltod durch Mitotische Katastrophe nach zeitabhängiger Herunterregulation von Survivin. Die essentielle Funktion des Survivins bei der Mitose macht es zu einem interessanten Zielprotein für die Entwicklung inhibitorischer Moleküle zur Behandlung von Krebs oder anderen Erkrankungen.

5.4 BP11 induzierter Zelltod durch Mitotische Katastrophe

Pankreaskarzinomzellen besitzen fast ausnahmslos mutiertes p53, was einen tetraploiden Arrest bei einer DNA - Schädigung verhindert und eine verfrühte Initiation der Mitose und mitotischer Katastrophe zur Folge haben kann. Die Induktion und die Erhaltung des tetraploiden G1 - Kontrollpunktes erfordert eine intakte p53 - und pRb - Funktion. Mehreren Berichten zufolge führt das Mikrotubuli-destabilisierende Nocodazol zu einer Zerstörung des Spindelapparates (Minn *et al.*, 1996; Wahl *et al.*, 1996), was bei p53 mut. Zellen zu einer Endoreduplikation und Hyperploidie führt. Western Blot Analysen (CDK1) und Immunfluoreszenz - Aufnahmen zeigten nach BP11 Behandlung ähnliche Ergebnisse. Die Mitotische Katastrophe ist durch das Auftreten von aberranten Mitosen charakterisiert. Sie wird durch verschiedene Stimuli ausgelöst. Zum einen führt die Hemmung unterschiedlicher G2 - Checkpoint Gene, wie ATM, ATR, PLK 1, PLK 2, PLK 3 und 14 - 3 - 3 σ zur Induktion der Mitotischen Katastrophe (Bunz *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Roninson *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003), zum anderen können mikrotubulin-schädigende Agentien, wie Taxane, Vinca-Alkaloide und Cholchicine eine Mitotische Katastrophe induzieren. Diskutiert wird ebenso eine Herunterregulation von Survivin (Magalska *et al.*, 2006). Auch der verfrühte Eintritt der Mitose durch Aktivierung der Cdc2 wird als Initiator der Mitotischen Katastrophe angesehen. Die verfrühte Cdc2 - Aktivierung zeigten die BP11 behandelten Panc89 Zellen (Abb. 4.5.2 C). Ursprünglich beschrieb die Mitotische Katastrophe die Zelltodart, bei der die Zellen durch eine Überproduktion der cyclinabhängigen Kinasen Cdc2 in Hefen zur Mitose gezwungen werden (Russell und Nurse, 1986). Heute gibt es jedoch noch keine klare Definition der mitotischen Katastrophe. Die Ähnlichkeit der mitotischen Katastrophe mit der klassischen Apoptose äußert sich vor allem in der Chromatin-Kondensation (Chakrabarti und Chakrabarti; 1987). Die Zusammenhänge sind jedoch bis heute noch nicht völlig geklärt. Unter der Annahme, dass der programmierte Zelltod nach der Aktivierung der Caspasen - Kaskade ausgelöst wird, scheint die Mitotische Katastrophe unabhängig von der Apoptose abzulaufen. Nabha *et al.*, 2002 konnte zeigen, dass der Caspase - Inhibitor zVAD - fmk den als Mitotische Katastrophe bezeichneten Zelltod nicht verhindern konnte (Nabha, *et al.*, 2002). Zusätzlich führt die Überexpression von antiapoptischen Proteinen, wie z.B. Bcl - 2

zu einer gesteigerten mitotischen Katastrophe (Lock und Stribinskiene, 1996; Ruth und Roninson, 2000). Die überwiegende Meinung ist jedoch, dass die Mitotische Katastrophe von der Apoptose gefolgt wird (Magalska *et al.*, 2006; Wolanin *et al.*, 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Meinung, da die Behandlung der stabil transfizierten Colo357/Bclx_L Zellen mit BP11, sowie die mit zVAD - *fmk* präinkubierten Panc89 und Colo 357/wt Zellen einerseits zur Bildung aberranter Mitosen führt, andererseits typische apoptotische Merkmale, wie die Parp-Spaltung zeigen. Interessanterweise zeigen Immunfluoreszenzaufnahmen von Pankreaskarzinomzellen nach Präinkubation mit zVAD - *fmk* und anschließender Behandlung mit BP11, dass die Zahl der aberranten Mitosen weiter ansteigt (Abb. nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Mitotischen Katastrophe und der Apoptose hin. So zeigten in den Zellzyklusanalysen Pankreaskarzinomzellen 10% weniger Zelltod nach Präinkubation mit zVAD - *fmk*, als die gleichen nur mit BP11 behandelten Zellen. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BP11 in einer noch nicht eindeutig geklärten Art die Polymerisation des Mikrotubulingerüsts stört. Infolgedessen kommt es zur fehlerhaften Ausbildung der Mitosespindel. Anschließend geht die Zelle in die sogenannte Mitotische Katastrophe, gefolgt von, oder parallel der klassischen Apoptose. Die Involvierung des Survivin - Proteins gilt in den oben genannten Signaltransduktionswegen von Pankreaskarzinomzellen nach BP11 Behandlung als wahrscheinlich. Zusätzlich spielen weitere Proteine eine wesentliche Rolle. So werden nach BP11 Behandlung die Proteine p21 und p27 (Abb. 4.5.2 A und 4.5.2 B) hochreguliert, was auf einen Zellzyklusarrest schließen lässt (Ogryzko, *et al.*, 1997; Niculesu, *et al.*, 1998; Radhakrishnan *et al.*, 2004). Durch die gleichzeitige Aktivierung von Cdc2 kommt es zum Einstieg in die Mitose (Abb. 4.5.2 C). Durch die fehlerhafte Ausbildung der Mitosespindel endet die Zelle jedoch mit der Mitotischen Katastrophe.

Abschließend:

Zelluläre Effekte von BP11:

| | Effekt | Evidenz |
|---------------------------|---------------|----------------|
| Proliferation | ↓↓ | +++ |
| Wachstum | ↓ | ++ |
| Zentrosomenamplifikation | ↑ | +/- |
| Multipolare Mitosespindel | ↑↑ | +/- |
| Kondensiertes Chromatin | ↑ | +++ |

Die Involvierung anderer Schlüsselproteine sollten im Rahmen weiterer Arbeiten untersucht werden.

6 SCHLUSSFOLGERUNG

Es erscheint interessant und notwendig diese in vitro gewonnenen Daten im Tiermodell zu überprüfen, um festzustellen, ob die Behandlung mit BP11 ein neues Therapiekonzept für das Pankreaskarzinom darstellen könnte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adams, P.D. & Kaelin, W. G.: Transcriptional control by E2F. *Semin. Cancer Biol.*, **6**: 99–108, 1995.

Adams, R.R., Carmena, M. & Earnshaw, W.C.: Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.*, **11**: 49-54, 2001.

Adhami, V.M., Aziz, M.H., Mukhtar, H. & Ahmad, N.: Activation of prodeath Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCaT keratocytes. *Clin. Cancer Res.*, **9**: 3176–3182, 2003.

Adhami, V.M., Aziz, M.H., Reagan-Shaw, S.R., Nihal, M., Mukhtar, H. & Ahmad, N.: Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. *Mol. Cancer Ther.*, **3**: 933–940, 2004.

Adida, C., Recher, C., Raffoux, E., Daniel, M.T., Taksin, A.L., Rousselot, P., Sigaux, F., Degos, L., Altieri, D.C. & Dombret, H.: Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.*, **111**: 196-203, 2000.

Adida, C., Haioun, C., Gaulard, P., Lepage, E., Morel, P., Briere, J., Dombret, H., Reyes, F., Diebold, J., Gisselbrecht, C., Salles, G., Altieri, D.C. & Molina, T.J.: Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, **96**: 1921-1925, 2000.

Altieri, D. C.: Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, **22**: 8581-8589, 2003a.

Altieri, D.C.: Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat. Rev. Cancer*, **3**: 46-54, 2003b.

Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D.C.: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.*, **3**: 917-921, 1997.

Atherton-Fessler, S., Liu F., Gabrielli, B., Lee, M.S., Peng, C.Y. & Piwnica-Worms, H.: Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. *Mol. Biol. Cell.*, **5**: 989-1001, 1994.

Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T. & Willems, G.M.: Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.*, **265**: 4923-4928, 1990.

Banks, D.P., Plescia, J., Altieri, D.C., Chen, J., Rosenberg, S.H., Zhang, H. & Ng, S.C.: Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood*, **96**: 4002-4003, 2000.

Bao, Q. & Shi, Y.: Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.*, **14**: 56-65, 2007.

Bardeesy, N. & DePhino, R.A.: Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 897-909, 2002.

Bischoff J.R. & Plowman G.D.: The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol.*, **9**: 454 - 459, 1999.

Chakravarti, A., Noll, E., Black, P.M., Finkelstein, D.F., Finkelstein, D.M., Dyson, N.J. & Loeffler, J.S.: Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J. Clin. Oncol.*, **20**: 1063 -1068, 2002.

Che, X.F., Zheng, C.L., Owatari, S., Mutoh, M, Gotanda, T., Jeung, H.C., Furukawa, T., Ikeda, R., Yamamoto, M., Haraguchi, M., Arima, N. & Akiyama, S:
Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. *Blood*, **107**: 4880-4887, 2006.

Chen X., Kandasamy, K. & Srivastava, R.K.: Differential Roles of Rel A (p65) and c-Rel Subunits of Nuclear Factor κ B in Tumor Necrosis Factor – related Apoptosis – inducing Ligand Signaling. *Cancer Research*, **63**: 1059 – 1066, 2003.

Chiba, S., Okuda, M., Mussman, J. G. & Fukasawa, K.: Genomic convergence and suppression of centrosome hyperamplification in primary p53^{-/-} cells in prolonged culture. *Exp. Cell Res.*, **258**: 310-321, 2000.

Cobb, M.H. & Goldsmith, E.J.: How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.*, **270**: 14843-14846, 1995.

Conway, E. M., Pollefeyt, S., Cornelissen, J., DeBaere, I., Steiner-Mosonyi, M., Ong, K., Baens, M., Collen, D. & Schuh, A. C.: Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. *Blood*, **95**: 1435-1442, 2000.

Conway, E. M., Pollefeyt, S., Steiner-Mosonyi, M., Luo, W., DeVriese, A., Lupu, F., Bono, F., Leducq, N., Dol, F., Schaeffer, P., Collen, D. & Herbert, J. M.: Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology*, **123**: 619-631, 2002.

Cory, S. & Adams, J. M.: The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 647-656, 2002.

Coward, P., Wada, H.G., Falk, M.S., Chan, S.D., Meng, F., Akil, H.: Controlling signaling with a specifically designed Gi-coupled receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**: 352-357, 1998.

Crissman, H.A. & Steinkamp J.A.: Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell Biol.*, **59**: 766-771, 1973.

Crook, N.E., Clem, R.J. & Miller, L.K.: An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.*, **67**: 2168-2174, 1993.

Debatin, K.M. & Krammer, P.H.: Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, **23**: 2950-2966, 2004.

De Braud, F., Cascinu, S. & Gatta, G.: Cancer of pancreas. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **50**: 147-155, 2004.

Decker, T. & Lohmann-Matthes M.L.: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods*, **115**: 61–69, 1988.

Deschesnes, R.G., Huot J., Valerie K., & Landry J.: Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation. *Mol. Biol. Cell*, **12**: 1569-1582, 2001.

Deveraux, Q.L. & Reed, J.C.: IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, **13**: 239-52, 1999.

Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. & Ambudkar, S.V.: Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**: 10594-10599, 1997.

Ding, Z., Tang, S.C., Weerasinghe, P., Yang, X., Pater, A. & Liepins, A.: The alkaloid sanguinarine is effective against multidrug resistance in human cervical cells via bimodal cell death. *Biochem. Pharmacol.*, **63**: 1415-1421, 2002.

Donjerkovic, D. & Scott D.W.: Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell. Res.*, **10**: 1-16, 2000.

Ewen, M.E.: The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Rev.*, **13**: 45-66, 1994.

Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. & Henson, P.M: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, **148**: 2207-2216, 1992.

Falk, R.T., Pickle, L.W., Fontham, E.T., Correa, P. & Fraumeni, J.F. Jr.: Life-style risk factors for pancreatic cancer in Louisiana: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.*, **128**: 324, 1988.

Fortugno, P., Wall, N.R., Giodini, A., O'Connor, D.S., Plescia, J., Padgett, K.M., Tognin, S., Marchisio, P.C. & Altieri, D.C.: Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J. Cell Sci.*, **115**: 575-85, 2002.

Fukasawa, K. & Vande Woude, G. F.: Synergy between the Mos/mitogen-activated protein kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 506-518, 1997.

Garner, M.M. & Revzin, A.: A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.*, **9**: 3047-3060, 1981.

Ghadirian, P., Simard, A. & Baillargeon, J.: Tobacco, alcohol, and coffee and cancer of the pancreas. A population-based, case-control study in Quebec, Canada. *Cancer*, **67**: 26, 1991.

Ghaneh, P., Kawesha, A., Evans, J.D. & Neoptolemos, J.P.: Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.*, **9**: 1-11, 2002.

Gross, A.: Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle? *J. Bioenerg. Biomembr.*, **37**: 113-9, 2005.

Guo, M. & Hay, B. A.: Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **6**: 745-52, 1999.

Hanley, A.J. & Mao, Villeneuve, P.J., Johnson, K.CY.: Alcohol, tobacco and coffee Surveillance System case-control project. Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Eur. J. Cancer Prev.*, **9**: 49-55, 2000.

Hartwell, L.H. & Weinert T.A.: Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**: 629-634, 1989.

Herzenberg, L.A., Sweet R.G. & Herzenberg L.A.: Fluorescence-activated cell sorting. *Sci.Am.*, **234**: 108-117, 1976.

Hinchcliffe, E.H., Cassels, G.O., Rieder, C.L. & Sluder, G.: The coordination of centrosome reproduction with nuclear events of the cell cycle in the sea urchin zygote. *J. Cell. Biol.*, **140**: 1417-1426, 1998.

Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H. & Ungefroren, H.: Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, **19**: 5477-5486, 2000.

Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J. & Murphy, M.: Transcriptional repression of the antiapoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.*, **277**: 3247-3257, 2002.

Hruban R.H., Wilentz R.E. & Kern S.E.: Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am. J. Pathol.*, **156**: 1821-1825, 2000.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu,,J., Murray, T. & Thun, M.J.: Cancer statistics. *C.A. Cancer J. Clin.*, **58**: 71-96, 2008.

Jiang, Y., Saavedra, H.I., Holloway, M.P., Leone, G. & Altura, R.A.: Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. *J. Biol. Chem.*, **279**: 40511-40520, 2004.

Johnson, D.G. & Walker, C.L.: Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **9**: 295-312,1999.

Kawakami, H., Tomita, M., Matsuda, T., Ohta, T., Tanaka, Y., Fujii, M., Hatano, M., Tokuhisa, T. & Mori, N.: Transcriptional activation of survivin through the NF-kappaB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int. J. Cancer*, **115**: 967-974, 2005.

Kawasaki, H., Altieri, D.C., Lu, C.D., Toyoda, M., Tenjo, T. & Tanigawa, N.: Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.*, **58**: 5071-5074, 1998.

Kerr, J.F., Winterford, C.M. & Harmon, B.V.: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **73**: 2013-2026, 1994.

Kim, S., Lee, T.J., Leem, J., Choi, K.S., Park, J.W. & Kwon, T.K.: Sanguinarine-induced apoptosis: generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL. *J. Cell Biochem.*, **104**: 895-907, 2008.

King, K.L. & Cidlowski, J.A.: Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.*, **60**: 601-617, 1998.

King, R.W., Jackson, P.K. & Kirschner M.W.: Mitosis in transition. *Cell*, **79**: 563-571, 1994.

Kock, I.: Synthese und Testung von Benzo[c]phenanthridin-Derivaten als potentielle Zytostatika. *Dissertation*, Kiel 2003.

Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T. & van Oers, M.H: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.*, **84**: 1415-1420, 1994.

Korzeniewski, C. & Callewaert, D.M.: An enzym-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods*, **64**: 313-320, 1983.

Krebs in Deutschland, Krebsregister: 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken: *Robert Koch-Institut & GEKID*, 36-38,2006.

Lacey, E.A., Maldonado, J E., Clabaugh, J.P. & Matocq, M.D.: Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Mol. Ecol.*, **8**: 1754-1756, 1999.

Li, F., Ackermann, E.J., Bennett, C.F., Rothermel, A.L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P.C. & Altieri D.C.: Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell. Biol.*, **1**: 461-466, 1999.

Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C. & Altieri, D. C.: Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**: 580-584, 1998.

Li, F. & Altieri D.C.: The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res.*, **59**: 3143-3151, 1999.

Lock R.B. and Stribinskiene L. *Cancer Res.*, **56**: 4006–4012, 1996.

Lockshin, R.A. & Williams, C.M.: Programmed Cell Death-I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. *J. Insect. Physiol.*, **11**: 123-33, 1965.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X.: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **4**: 481-490, 1998.

Magalska, A., Sliwinska, M., Szczepanowska, J., Salvioli, S., Franceschi, C. & Sikora, E.: Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe. *Int. J. Cancer.*, **119**: 1811-1818, 2006.

Marusawa, H., Matsuzawa, S., Welsh, K., Zou, H., Armstrong, R., Tamm, I. & Reed, J. C.: HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J.*, **22**: 2729-2740, 2003.

Mechetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker, R.J. & Fruehauf, J.P.: Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin. Cancer Res.*, **4**: 389-398, 1998.

Messmer, W.M., Tin-Wa, M., Fong, H.H.S., Bevelle, C., Farnsworth, N.R., Abraham, D.J. & Trojanek, J.: Fagaronine, a new tumor inhibitor isolated from fagara zathoxyloides lam (Rutacaceae). *J. Pharm. Sci.*, **61**: 1858-1859, 1972.

Metheny, L.J., Nelson, D.A. & Ludlow, J.W.: Effect of the kinase inhibitor 2-aminopurine on the cell cycle stage-dependent phosphorylation state of the retinoblastoma protein. *Exp. Cell. Res.*, **218**: 151-154, 1995.

Michand de Gonzalez, A., Sweetland, S. & Spencer, E.: A meta-analysis of obesity and risk of pancreatic cancer. *JAMA*, **286**: 921-929, 2001.

Mirza, A., McGuirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., Wen, S. F., Wang, L., Kirschmeier, P., Bishop, W. R., Nielsen, L. L., Pickett, C. B. & Liu, S.: Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*, **21**: 2613-2622, 2002.

Murita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Kawase, M., Murakami, K., Kim, G.W. & Chan, P.H.: Inhibition of interleukin-1beta converting enzyme family proteases (caspases) reduces cold injury-induced brain trauma and DNA fragmentation in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **19**: 634-642, 1999.

Murr, M.M., Sarr, M.G., Oishi, A.J. & van Heerden J.A.: Pancreatic cancer. *CA. Cancer J. Clin.*, **44**: 304-318, 1994.

Mussman, J. G., Horn, H. F., Carroll, P. E., Okuda, M., Tarapore, P., Donehower, L. A. & Fukasawa, K.: Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene*, **19**: 1635-1646, 2000.

Nabha, S.M., Mohammad, R.M., Dandashi, M.H., Coupaye-Gerard, B., Aboukameel, A., Pettit, G.R. & Al-Katib, A.M: Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. *Clin. Cancer Res.*, **8**: 2735–2741, 2002.

Nicholson, D.W.: Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.*, **11**: 1028 - 1042, 1999.

Niculescu AB III, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. Effects of p21 (Cip1/Waf1) at both the G₁/S and the G₂/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol. Cell Biol.*, **18**: 629–643, 1998.

Nunez, G., Benedict, M. A., Hu, Y. & Inohara, N.: Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, **25**: 3237-3245, 1998.

O'Connor, P. M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T. G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D. A., Monks, A., Sausville, E. A., Weinstein, J. N., Friend, S., Fornace, A. J., Jr. & Kohn, K.W.: Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res*, **57**: 4285-4300, 1997.

O'Connor, D.S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S., Marchisio, P.C. & Altieri, D.C.: Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**: 13103-13107, 2000a.

Ogryzko, V.V., Wong, P. & Howard, B.H.: WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.*, **17**: 4877–4882, 1997.

Pajeva, I.K., Wiese, M., Cordes, H.P. & Seydel, J.K.: Membrane interactions of some catamphiphilic drugs and relation to their multidrug -resistance-reversing ability. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **122**: 27-40, 1996.

Pommier, Y.: Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I wieht camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, **4**: 429–434, 2004.

Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S. & Salvesen, G.S.: The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol. Cell.*, **22**: 269-275, 2006.

Radhakrishnan, S.K., Feliciano, C.S., Najmabadi F., Haegebarth A., Kandel E.S., Tyner A.L. & Gartel A.L.: Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene.*, **23**: 4173-4176, 2004.

Reed, J.C.: Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.*, **17**: 2941-2953,, 1999.

Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A. & Massague J.: Kip/cip and Ink4 CDK inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.*, **9**: 1831-1845, 1995.

Rothenberg, M. L., Abbruzzese, J. L., Moore, M., Portenoy, R. K., Robertson, J. M. & Wanebo, H. J.: A rationale for expanding the endpoints for clinical trials in advanced pancreatic carcinoma. *Cancer*, **78**: 627-632, 1996.

Rudin, C.M. & Thompson, C.B.: Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.*, **48**: 267-281, 1997.

Russell, P., Nurse, P.: Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided. *Cell*, **45**: 781-782, 1986.

Ruth A.C. & Roninson I.B.: Effects of the multidrug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. *Cancer Res.*, **60**: 2576–2578, 2000.

Satoh M.S. & Lindahl T.: Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA-Repair. *Nature*, **356**: 356-358, 1992.

Satoh, K., Kaneko, K., Hirota, M., Masamune, A., Satoh, A. & Shimosegawa, T.: Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer*, **92**: 271-278, 2001.

Schneider, G. & Schmid, R.M.: Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol. Cancer*, **2**: 15, 2003.

Sherr, C.J. & Roberts, J.M.: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, **9**: 1149-1163, 1995.

Sherr, C.J.: Cancer cell cycles. *Science*, **274**: 1672-1677, 1996.

Shi, Y.: Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **18**: 677-684, 2006.

Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y.: Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**: 483-487, 1999.

Siegmund, D., Klose, S., Zhou, D., Baumann, B., Röder C., Kalthoff, H., Wajant, H. & Trauzold, A.: Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells. *Cell. Signal.*, **19**: 1172-1184, 2007.

Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal D.S., Lyer S., Boulares A.H. & Smulson M.E.:

Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose)polymerase in the early stages of apoptosis. *J.Biol.Chem.*, **273**: 13703-137012, 1998.

Sipos, B., Möser, S., Kalthoff, H., Török, V., Löhr, M. & Klöppel G.: A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch.*, **442**: 444-452, 2003.

Skoufias, D. A., Mollinari, C., Lacroix, F. B. & Margolis R. L.: Human survivin is a kinetochoreassociated passenger protein. *J. Cell. Biol.*, **151**: 1575-1582, 2000.

Slee, E.A., Adrain, C. & Martin, S.J.: Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **276**: 7320-7326, 2001.

Steeg, P.S. & Abrams, J.S.: Cancer prognostics: past, present and p27. *Nat. Med.*, **3**: 152-154, 1997.

Takahashi, T., Ishikura, H., Motohara, T., Okushiba, S., Dohke, M. & Katoh, H.: Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J. Surg. Oncol.*, **655**: 164-170, 1997.

Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T. & Reed, J. C.: IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.*, **58**: 5315-5320, 1998.

Tamrakar, S., Rubin, E. & Ludlow, J.W.: Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Fron.t Biosci.*, **5**: 121-137, 2000.

Thompson, C. B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**: 1456-1462, 1995.

Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y.: Caspases: enemies within. *Science*, **281**: 1312-1316, 1998.

Toffoli, G., Simone, F., Corona, G., Raschack, M., Cappelletto, B., Gigante, M. & Boiocchi, M.: Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. *Biochem. Pharmacol.*, **50**: 1245-1255, 1995.

Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Röder, C., Kalthoff, H. & Wajant, H.: TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, **25**: 7434-7439, 2006.

Trauzold, A., Röder, C., Sipos, B., Karsten, K., Arlt, A., Jiang, P., Martin-Subero, J.I., Siegmund, D., Muerköster, S., Pagerols-Raluy, L., Siebert, R., Wajant, H. & Kalthoff, H.: CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *FASEB J.*, **19**: 620-622, 2005.

Trauzold, A., Schmiedel, S., Röder, C., Tams, C., Christgen, M., Oestern, S., Arlt, A., Westphal, S., Kapischke, M., Ungefroren, H. & Kalthoff, H.: Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells. *Br. J. Cancer*, **89**: 1714-1721, 2003.

Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schütze, S., Schäfer, H., Oestern, S., Röder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., Walczak, H. & Kalthoff, H.: CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, **20**: 4258-4269, 2001.

Tsuji, N., Furuse, K., Asanuma, K., Furuya, M., Kondoh, K., Kamagata, C., Sasaki, M., Kobayashi, D., Yagihashi, A., Takahashi, H. & Watanabe, N.: Mutations of the p53 gene and loss of heterozygosity at chromosome 17p13.1 are associated with increased survivin expression in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **87**: 23-31, 2004.

Uren, A.G., Wong, L., Pakusch, M., Fowler, K.J., Burrows, F.J., Vaux, D.L. & Choo, K.H.: Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell- cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr. Biol.*, **10**: 1319-1328, 2000.

Verdecia, M.A., Huang, H., Dutil, E., Kaiser, D.A., Hunter, T. & Noel, J. P.: Structure of the human antiapoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat. Struct. Biol.*, **7**: 602-608, 2000.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutlingsberger C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.*, **184**: 39-51, 1995.

Vidal, A. & Koff, A.: Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene.*, **247**: 1-15, 2000.

Weisblum, B. & Haenssler, E.: Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. *Chromosoma*, **46**: 255-260, 1974.

Wheatley, S.P. & McNeish, I.A.: Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **247**: 35-88, 2005.

Whitcomb, D.C. & Pogue-Geile, K.: Pancreatitis as a risk for pancreatic cancer. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, **31**: 663-678, 2002.

Wolanin, K., Magalska, A., Mosieniak, G., Klinger, R., McKenna, S., Vejda, S., Sikora, E. & Piwocka, K.: Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells. *Mol. Cancer Res.*, **4**: 457-469, 2006.

Wolschendorf, U.: Synthese und Testung substituierter 6 - Aminobenzo[c]phenanthridine als potentielle Zytostatika. *Dissertation*, Universität Kiel, 2000.

Zamora, J.M., Pearce, H.L. & Beck, W.T.: Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells. *Mol. Pharmacol.*, **33**: 454-62, 1988.

8 DANKSAGUNGEN

Mein besonderen Dank gilt meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. Bernd Clement**, Inhaber des Lehrstuhls der Pharmazeutischen Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, der durch die Überlassung des Themas, seine stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft das Entstehen dieser Dissertationsarbeit ermöglichte. **Herrn Prof. Dr. Holger Kalthoff**, Leiter der Sektion für molekulare Onkologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein Interesse am Fortgang der Untersuchungen. **Frau PD Dr. Ania Trauzold** danke ich für die Betreuung, ihr Engagement, ihre Diskussionsbereitschaft, ihre Anregungen und ihre Hilfe in all den Jahren.

Weiteren Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Knippschild für die ausserordentlich freundliche Aufnahme, Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente im Universitätsklinikum Ulm.

Mein Dank richtet sich auch an alle Kollegen und Mitarbeiter des Institus für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft. Besonderen Dank bei Bianca und Alexandra für all ihre Hilfe und auch für amüsante Frühstückspausen.

Frau Birgit Fricke danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Electrophoretic Mobility Shift Assays.

Melanie Hartmann danke ich für die Unterstützung bei dem Layout.

Bei Dr. Ole Ammerpohl bedanke ich mich für die praktische Unterstützung, die geduldige Auskunftsbereitschaft und die Hilfe bei allen FACS- Problemen.

Zusätzlich möchte ich mich noch bei Dr. Christian Röder für die Unterstützung bei der elektronischen Datenverarbeitung bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Kolja Bubolz für das Korrekturlesen des Manuskriptes bedanken.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern für Ihre Unterstützung und ihre Motivation.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit -abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer- nach Inhalt und Form meine Arbeit ist.

Weder die gesamte Arbeit noch Teile davon habe ich an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens eingereicht. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden

Kiel

Stefanie Klose