

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
Sektion Molekulare Onkologie
Im Krebszentrum Nord-CCC
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel – Haus 18
Arnold-Heller-Straße 3
24105 Kiel

(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)

**Antiapoptotische und wachstumsstimulierende Funktionen
der Casein-Kinase 1-delta in Zellen des duktales
Pankreas-Adenokarzinoms**

Inauguraldissertation
Zur
Erlangung der Doktorwürde
Der Medizinischen Fakultät
Der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Benjamin Bohm
aus Bremen
Kiel, 2012

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Anna Trauzold

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Mentlein

Tag der mündlichen Prüfung: 9. September 2013

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
1. Abkürzungsverzeichnis	3
2. Einleitung	5
2.1. Das Pankreaskarzinom	5
2.2. Der programmierte Zelltod (Apoptose)	6
2.3. Apoptoseresistenz	8
2.4. Die Casein-Kinase-1 δ	9
2.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit	10
3. Material und Methoden	11
3.1. Chemikalien und deren Bezugsquellen, Kits	11
3.2. Zellkulturmedien, Zusätze, Inhibitoren.....	11
3.3. Antikörper und rekombinante Proteine	12
3.3.1. Primäre Antikörper	12
3.3.2. Sekundäre Antikörper.....	12
3.3.3. Rekombinante Proteine.....	13
3.3.4. Labormaterialien und Geräte.....	13
3.3.5. Übersicht Zelllinien	13
3.4. Zellkultur	14
3.4.1. Langzeitlagerung der Zellen	14
3.4.2. Auftauen, Kultivieren und Passagieren von Zellen.....	14
3.4.3. Zählen der Zellen	15
3.4.4. Einfrieren von Zellen	15
3.5. Molekularbiologische Routinemethoden.....	15
3.5.1. Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen – RIPA-Lysate	15
3.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	16
3.5.3. Protein-Gelelektrophorese Denaturierende diskontinuierliche Protein- Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)	16
3.6. Western Blot und Immundetektion	17
3.6.1. Western Blot.....	17
3.6.2. Immundetektion.....	17
3.7. Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS-Analyse).....	18
3.7.1. Apoptosemessung und Zellzyklus-Analyse.....	18
4. Ergebnisse	20
4.1. Die Caseinkinasen 1 δ und ϵ werden von den Pankreasadenokarzinom-zelllinien stark exprimiert.....	20
4.2. CK1 δ/ϵ -spezifischer Inhibitor IC261 unterdrückt das Wachstum humaner Pankreas- Tumorzelllinien	21
4.3. Behandlung mit CK1-7 und IC261 vermindert die Resistenz der Pankreastumorzellen gegen die CD95-vermittelte Apoptose	22
4.4. IC261-Behandlung bewirkt eine verminderte Bildung antiapoptotischer Proteine ..	27
4.5. Die Wirkung von Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-FU auf resistente Tumorzellen nach IC261-Vorbehandlung.....	28
5. Diskussion	31
5.1. Rolle der Casein-Kinase 1 δ/ϵ bei Apoptoseresistenzmechanismen in Pankreaskarzinomzellen.....	31
5.2. Die Casein-Kinasen 1 δ und ϵ werden in Pankreaskarzinom-Zelllinien verstärkt exprimiert.....	32

5.3.	Die Behandlung mit IC261 hemmt das Wachstum von Pankreaskarzinom-Zellen.	32
5.4.	Behandlung mit IC261 und CK1-7 sensitiviert Pankreaskarzinom-Zellen für den CD-95-vermittelten Apoptoseweg	33
5.5.	Behandlung mit IC261 und CK1-7 führt zur vermehrten Bid-Spaltung	33
5.6.	Behandlung mit IC261 und CK1-7 führt zur verminderten Bildung antiapoptotischer Proteine	34
5.7.	Behandlung mit IC261 führt nicht zu verbesserter Ansprechbarkeit auf Gemcitabin oder 5FU bei Pankreaskarzinom-Zellen	35
5.8.	Fazit und Ausblick	35
6.	Zusammenfassung	37
7.	Literatur	38

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
APAF1	Apoptotic protease activating factor-1
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma (protein)-2
Bcl-xl	B-cell lymphoma (protein)-xl
Bid	Bcl-2 interacting domain death agonist
CD95L	CD95-Ligand
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis protein
CK	Caseinkinase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DISC	Death inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-associated death domain containing protein
FCS	Fetal calf serum
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
mdm2	Murine double minute oncogene
NF-κB	Nuclear factor kappa B
PBS	Phosphate buffered saline
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PI	Propidiumiodid
PKC	Proteinkinase C

PKD1	Proteinkinase D1
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-duodecylsulfate
siRNA	Short interfering RNA
TNF	Tumor necrosis factor
TNF-R	Tumor necrosis factor receptor
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R	Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand receptor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
zVAD-fmk	Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone

2. EINLEITUNG

2.1. DAS PANKREASKARZINOM

Das Pankreaskarzinom nimmt unter den häufigsten, krebsbedingten Todesursachen der Menschen in Europa und Nordamerika mittlerweile den fünften Platz ein [1]. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Inzidenz dieser Erkrankung, sowohl bei Männern (Platz 10), als auch bei Frauen (Platz 9) hierbei deutlich geringer ist [2]. Die häufigste Ausprägungsform stellt mit über 90% das duktales Adenokarzinom dar [3].

Die hohe Mortalität bei relativ seltener Inzidenz ist bereits ein Indiz für die äußerst schlechte Prognose der Erkrankung, die bei ca. 98% aller Betroffenen unbehandelt zum Tode führt; die mittlere Überlebensdauer liegt lediglich bei knapp 5 Monaten [4]. Hierfür gibt es mehrere Ursachen: zum einen liegt es daran, dass der Tumor lange Zeit symptomlos bleibt und sich erst in sehr fortgeschrittenen Stadien durch recht uncharakteristische Symptome (z.B. abdominale Schmerzen, Appetitlosigkeit, Ikterus) bemerkbar macht. Zum anderen liegt es an der hohen Malignität, bedingt durch schnelle Metastasierung, rasches Wachstum. Eine Früherkennung des Tumorzustands ist mangels wirksamer diagnostischer Möglichkeiten derzeit noch nicht effektiv durchführbar.

Therapieversuche, sowohl mit adjuvanter oder neoadjuvanter Radiotherapie, als auch mit Chemotherapie, brachten in der Vergangenheit nur unbefriedigende Ergebnisse [5];[6]. Zwar zeigten Tumorzellen in neueren Studien eine erhöhte Ansprechbarkeit auf Gemcitabin mit Verbesserung der tumorassoziierten Symptome, jedoch mit nur bescheidener Verbesserung der Überlebensdauer (1-Jahr-Überlebenswahrscheinlichkeit von 18%) [7].

Die einzige Möglichkeit einer kurativen Behandlung besteht derzeit nur in chirurgischen Maßnahmen mit dem Ziel einer R0-Resektion. Hierbei liegt die 5-Jahr-Überlebenswahrscheinlichkeit jedoch ebenfalls lediglich bei 10% [4] und aufgrund der frühzeitigen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung kann nur einem kleinen Teil der betroffenen Patienten bei Diagnosestellung dieser Behandlungsweg empfohlen werden.

Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms werden in der Literatur neben genetischen Faktoren die chronische Pankreatitis, Adipositas und Nikotinabusus genannt [8].

Die ausgeprägte Widerstandsfähigkeit des Tumors gegenüber den bislang erprobten Therapieverfahren mit Radiatio, Chemo- und Immuntherapie deutet darauf hin, dass Pankreaskarzinomzellen über eine hohe Apoptoseresistenz verfügen. Neue Hoffnung wird deshalb in die Erforschung möglicher intrazellulärer molekularer Regulationsmechanismen und Signalwege dieser Apoptoseresistenz und sich daraus ergebenden Therapiealternativen gesetzt. Dieses stellt die Grundlage für die folgende Arbeit dar.

2.2. DER PROGRAMMIERTE ZELLTOD (APOPTOSE)

Apoptose ist eine Art des Zelltodes, die auf streng kontrollierte Weise verläuft. Daher wird es häufig auch „programmierter Zelltod“ genannt. Apoptose ist ein Begriff aus dem Griechischen und wird abgeleitet von *apo* (ab, weg, los) und *ptosis* (Senkung). Apoptotische Zellen sind morphologisch durch eine Zellschrumpfung, sowie Kondensation und Fragmentation des Zellkernes gekennzeichnet. Einzelne Zellbestandteile werden von Vesikeln der Plasmamembran, sog. „apoptotic bodies“ umschlossen. Dieser Vorgang wurde zum ersten Mal von dem australischen Pathologen John F. R. Kerr und seinen schottischen Kollegen Andrew H. Wyllie und Alastair R. Currie in einer 1972 publizierten Arbeit beschrieben, und als Apoptose bezeichnet [9]. In ihren damaligen Versuchsreihen beobachteten sie, dass toxinbehandelte Leberzellen der Morphologie sterbender Embryonalzellen ähnelten.

Die Apoptose liegt als genetisch determiniertes Programm in allen kernhaltigen Zellen vor, und dient sowohl dem Immunsystem, z.B. bei der Eliminierung virusinfizierter Zellen, als auch den Geweben selbst, z.B. Aufrechterhaltung der Zellzahl oder Tötung irreparabel geschädigter Zellen, als wichtiges Instrument zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase. Sie unterliegt hierbei jedoch strengen Kontrollmechanismen, die durch ein komplexe Wechselwirkungen von intrazellulären anti- und proapoptotischen Proteinen gewährleistet werden. Bei Deregulationen dieser Kontrollmechanismen – der sogenannten Apoptosedefizienz - kann es zu ernsthaften pathophysiologischen Veränderungen, bis hin zum malignen Zellwachstum kommen [10].

Die onkologische Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen induziert bei der Durchführung einer Chemotherapie oder Radiatio häufig gezielt diesen Apoptosemechanismus. Durch maligne Transformation auf subzellulärer Ebene ge-

lingt es einigen Tumoren jedoch, sich diesem Wirkmechanismus durch Resistenzbildung zu entziehen [11].

Grundsätzlich kann Apoptose in Zellen auf zwei Wegen eingeleitet werden: auf dem intrinsischen, stressinduziertem Weg (beispielsweise durch Chemotherapie oder Radiatio) der mitochondrial amplifiziert wird, oder dem extrinsischem Weg, dem eine Aktivierung sogenannter „Todesrezeptoren“ auf der Zelloberfläche durch spezifische Liganden zugrunde liegt. Diese beide Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke mit Aktivierung verschiedener Caspasen (Cystein aspartyl-spezifische Proteasen), welche letztendlich die Eliminierung des Zellorganismus mit der oben beschriebenen, für die Apoptose charakteristischen Morphologie zur Folge hat [11].

Der zur Apoptose führende Signalweg durch die Todesrezeptoren lässt sich vereinfacht wie folgt beschreiben: Die zur TNF(tumor necrosis factor)-Superfamilie gehörenden Oberflächenrezeptoren CD95, TRAIL-R1, TRAIL-R2 oder TNF-R1 bilden nach Bindung eines Liganden an die Rezeptordomäne intrazellulär mit dem Protein FADD (Fas-associated death domain containing protein), und vornehmlich der Caspase-8 den sogenannten DISC (death-inducing-signalling-complex) [12]. Durch die Aktivierung von Caspase-8 durch Autoproteolyse, kommt es schließlich zur Induktion der Apoptose-Kaskade. Ab diesem Punkt lassen sich in Abhängigkeit von der Menge aktivierter Caspase 8 bei der CD95-vermittelten Apoptose zwei Zelltypen – Typ I und II – unterscheiden. Bei den sogenannten Typ-I-Zellen liegen hohe Konzentrationen aktivierter Caspase 8 vor, so dass eine direkte proteolytische Aktivierung der Effektor-Caspase 3 erfolgen kann. Sie sind somit unabhängig von der mitochondrialen Verstärkerschleife, über die in den Typ-II-Zellen die Apoptose mangels ausreichend hoher Caspase 8-Konzentrationen ausgelöst wird [44]. Bei dieser Verstärkerschleife wird durch Bid – einem proapoptotischem Protein aus der Bcl-2-Superfamilie, welches über Spaltung durch Caspase 8 aktiviert wird – Cytochrom-C aus dem Zwischenmembranraum der Mitochondrien freigesetzt, und bildet konsekutiv im Zytosol durch Bindung an APAF1 (apoptotic protease activating factor-1), ATP und Caspase 9 das Apoptosom [13]. Hierdurch kommt es in der Folge wiederum zur Spaltung und Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, welche über DNA-Fragmentierung und Spaltung von Zytoskelettproteinen den Zelltod herbeiführen [14].

Es konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten Pankreas-Tumorzellen in Bezug auf die Induktion der Apoptose zu den Typ-II-Zellen zählen [43].

2.3. APOPTOSERESISTENZ

Im Verlauf maligner Transformation kommt es in Pankreas-Tumorzellen zur Entwicklung verschiedener Resistenzmechanismen, mit denen die Krebszellen durch Apoptosedefizienz der körpereigenen Immunabwehr und exogenen Therapieverfahren, wie beispielsweise Radiatio oder Chemotherapie, entgehen können.

Auf Rezeptorebene bewirkt beispielsweise eine Modulation der CD95-Rezeptordichte oder -funktion, ein vermindertes Ansprechen auf die Signalinduktion, oder gar vermehrte Zellproliferation und Invasivität [15][16][45].

Im weiteren Verlauf der Signalkaskade können durch Veränderungen in Konzentration und Funktion von Regulatorproteinen der Bcl-2-Familie, welche sowohl pro-, als auch antiapoptotische Funktionen übernehmen, ebenfalls antiapoptotische Phänotypen entstehen [11]. So hemmt die Überexpression von Bcl-xL (B-cell lymphoma (protein)-xL) [43] die Aktivierung von Caspase 9 und 3, indem die Freisetzung proapoptotischer, mitochondrialer Proteine blockiert wird.

Außerdem kann über die Induktion von PKC (Proteinkinase C) der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert werden [33]. Diese Aktivierung führt auf verschiedenen Wegen zu einer gesteigerten Apoptoseresistenz.

Des Weiteren können Caspasen direkt durch Interaktion mit sogenannten IAPs (inhibitor of apoptosis protein) in ihrer Funktion reguliert werden [34]. Durch eine Überexpression von c-IAP-1 und -2, sowie XIAP kommt es zu einem schlechteren Ansprechen auf CD95-vermittelte Apoptose und Chemotherapie [35].

Analog hierzu zeigt die Herunterregulation proapoptotischer Proteine wie FADD oder Bid die gleichen Effekte [36].

Als weiteres Beispiel zeigt das proapoptotische Bid-Protein, je nach Grad der Phosphorylierung an seiner Spaltstelle, welche im Wesentlichen durch Casein-Kinasen erfolgt, ein mehr oder weniger ausgeprägtes Ansprechen auf die Spaltung, und somit Aktivierung durch Caspase 8 [26].

2.4. DIE CASEIN-KINASE-1 δ

In den letzten Jahren gewannen nach und nach Protein-Kinasen und Phosphatasen als Zielstrukturen an Bedeutung, wenn es um die Entwicklung neuer Krebsmedikamente ging. Besonders die Casein-Kinase-1-Familie steht hierbei immer mehr im Fokus des Interesses.

CK1 bildet eine Untergruppe in der Superfamilie der serin-/threoninspezifischen Protein-Kinasen, welche ubiquitär in Zellen von Eukaryonten exprimiert werden [17]; [18][20][21]. Die CK1-Phosphorylierung verschiedener Substrate stellt eine Schlüsselfunktion in vielen physiologischen Zellprozessen, wie z.B. DNA-Reparatur, Steuerung des Zellzyklus, Zytokinese, Differenzierung und Apoptose dar [21][23]. Ihre bedeutende Funktion in vielen Signalwegen wird durch wissenschaftliche Veröffentlichungen untermauert, in denen CK1, im Speziellen die Isoformen CK1 α , δ und ϵ , mit Schlüssel-Regulator-Proteinen, unter ihnen p53, mdm2 und β -Catenin, welche als Signal-Integrationsmoleküle in Stresssituationen agieren, in Verbindung gebracht wird [21][24]. Durch Alterationen des Phosphorylierungsstatus von Schlüsselproteinen kann es in der Folge zu Funktionsveränderungen kommen, die – besonders beim Tumorsuppressorprotein p53 und Onkogen mdm2 – zu unkontrolliertem Zellwachstum führen können [22]. Die Wichtigkeit der von CK1 δ/ϵ -vermittelten Signalwege für die Genomstabilität, lässt sich durch die Erkenntnis besser einstufen, dass Mutationen und/oder Aktivitätsveränderungen dieser Kinasen oder ihrer Strukturen, die Entwicklung eines Tumors begünstigen können [21][25]. Derzeit tendiert die Datenlage dahin, dass CK1 antiapoptotisch wirken kann [21].

Resistente Tumorzellen konnten bereits für die CD95-vermittelte Apoptose sensitiviert werden: Durch siRNA-vermittelten „Knock-down“ von CK1 α oder durch die Hemmung von CK1 durch den Molekül-Inhibitor N-(2-Aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulphonamide-dihydrochloride (CK1-7) [26][27].

Neben CK1-7 wurden bereits weitere CK1-spezifische Klein-Molekül-Inhibitoren entwickelt [21][28], darunter auch IC261 [29], welcher eine hohe Selektivität gegenüber CK1 δ/ϵ aufweist. Je nach zellulärem Hintergrund, verursacht die Behandlung mit IC261 vornehmlich einen Zellzyklusarrest oder Apoptose [30]. Da man um die veränderte Aktivität und/oder Expression der verschiedenen CK1-Isoformen in Tumorzellen weiß [21], stellt sich die medikamentöse Therapie resistenter Pankreas-Tumorzellen mit IC261 als vielversprechende Option dar.

2.5. FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Die Pankreas-Adenokarzinomzellen weisen üblicherweise eine Resistenz gegenüber der CD95-vermittelten Apoptose [35] auf. Die Gründe dafür liegen unter anderem in der Überexpression von antiapoptotischen Proteinen wie FAP-1, Bcl-xL, XIAP, cIAP1, cIAP2 und TRAF2 [35][43][45][50].

Darüber hinaus wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Knippschild (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universität Ulm) festgestellt, dass diese Zellen auch eine Überexpression von CK1 δ zeigen [21].

Folgende Fragen sollen im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden:

Ist CK1 δ an der Resistenz gegenüber der CD95-vermittelten und chemotherapeutischen Apoptose beteiligt? Und wenn ja: Über welche Mechanismen geschieht dies?

Ziel der Arbeit ist es, durch die Beantwortung dieser Fragen neue potentielle Ansätze für die Behandlung des Pankreas-Adenokarzinoms zu identifizieren.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. CHEMIKALIEN UND DEREN BEZUGSQUELLEN, KITS

BSA	Biochrom KG, Berlin
DMSO	Merck, Darmstadt
ECL™/ECL™plus	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien
Ethanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Mycoplasma Test Kit	Boehringer, Ingelheim
PBS	Life Technologies
Rainbow Marker, RPN 756	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Life Technologies, Eggenstein
Trypsin 0,05%-EDTA 0,02%	Life Technologies, Eggenstein
Tween	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

3.2. ZELLKULTURMEDIEN, ZUSÄTZE, INHIBITOREN

Fötale Kälberserum (FCS)	Hyclone, Logan, UT, USA
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Life Technologies, Eggenstein
Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Life Technologies, Eggenstein
CK1-7	Merck, Calbiochem, Germany
IC261	ICOS Corporation, Washington, USA
ZVAD-fmk	Promega Corporation, Madison, USA

3.3. ANTIKÖRPER UND REKOMBINATE PROTEINE

3.3.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Einsatz	Hersteller
Anti-β-Aktin	Maus (monoklonal)	Western Blot	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Anti-Bid (C-20)	Ziege (polyklonal)	Western Blot	R&D Systems, Germany
Anti-CK1ε	Maus (monoklonal)	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-CK1δ	Maus (monoklonal)	Western Blot	ICOS Corporation, Washington, USA
Anti-PARP	Hase (polyklonal)	Western Blot	Merck, Calbiochem, Germany
Anti-c-IAP1	Hase (polyklonal)	Western Blot	R&D Systems, Germany
Anti-c-IAP2	Ziege (polyklonal)	Western Blot	R&D Systems, Germany
Anti-XIAP	Ziege (polyklonal)	Western Blot	R&D Systems, Germany
Anti-Bcl-xL	Maus (monoklonal)	Western Blot	BD Biosciences Pharmingen, USA
Anti-Caspase 8	Maus (monoklonal)	Western Blot	StressGen Biotechnology, USA
Anti-CD95/CH11	Maus (monoklonal)	Zell-Stimulation	Coulter Immunotech, Germany

3.3.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Einsatz	Hersteller
Anti-Kaninchen-HRP-gekoppelt	Esel (polyklonal)	Western Blot	Amersham Life Science, Braunschweig
Anti-Maus-HRP-gekoppelt	Schaf (polyklonal)	Western Blot	Amersham Life Science, Braunschweig

3.3.3. Rekombinante Proteine

CD95L	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Harald Wajant, Universität Würzburg
-------	----------------------------------------------------------------------------------------

3.3.4. Labormaterialien und Geräte

4-20% Tris-Glycine SDS Gel	Life Technologies, Eggenstein
Biomax MR Röntgenfilm	Kodak Eastman, New York, USA
Casy-Zählautomat	Schärfe System, Reutlingen
Curix 60 Entwickler	Agfa, Dübendorf
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader	Anthos, Salzburg, Österreich
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Liquid Szintillations Counter	Wallace Oy, Turku, Finnland
PVDF Membran, Immobilon-P	Milipore, Eschborn
Schüttler "Certomat U"	Sartorius AG, Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Wet Blot Kammer, Mini Trans Blot Cell	Bio Rad Laboratories, München
Zellharvester	Skatron, Lier, Norwegen
Zellkulturzentrifuge Rotino 48 R	Hettich, Tutlingen

3.3.5. Übersicht Zelllinien

Alle untersuchten Zelllinien sind menschlichen Ursprungs. Die Spalte „Referenz“ gibt die Erstveröffentlichungen an. Die angegebene Charakterisierung ist einer vergleichenden Veröffentlichung von Sipos B. *et al.*, 2003 [48] entnommen.

Zelllinie	Ursprung	Malignität und Differenzierung	Herkunft
Capan1	PDAC/ Lebermetastase	Gut differenziert Grad I	J. Fogh, New York, USA 1977
Colo357	PDAC/ Lymphknotenmetastase	Gut differenziert Grad II bis III	R. Morgan, USA 1980

Panc89	PDAC/ Lymphknoten- metastase	Mäßig differenziert Grad II	T. Okabe, Japan 1983
PancTuI	PDAC/ Primärtumor	Schlecht differenziert, Grad II bis III	M. v. Bülow, Deutsch- land 1980
BxPC3	PDAC/ Primärtumor	Mäßig differenziert Grad II	M.H. Tan, USA 1986
MiaPa Ca-2	PDAC/ Primärtumor	Schlecht differenziert, Grad III	A. Yunis, USA 1977
ASPC-1	PDAC/ Aszites	Mäßig differenziert Grad II/	W.H. Chen, USA 1982
Panc1	PDAC/ Primärtumor	Schlecht differenziert, Grad III	M. Lieber, USA 1975

3.4. ZELLKULTUR

3.4.1. Langzeitlagerung der Zellen

Die Zellen wurden in FCS mit 10% DMSO in flüssigen Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

3.4.2. Auftauen, Kultivieren und Passagieren von Zellen

Von den zu kultivierenden Zellen wurde jeweils ein Aliquot aus dem flüssigen Stickstoff bei 37 °C aufgetaut und mit Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden drei Minuten bei 1400 rpm abzentrifugiert (Rotina 48 R), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 15 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden nun erneut abzentrifugiert, in 5 ml Medium resuspendiert und auf eine T25 Zellkulturflasche ausgesät. Das für die Zellkultur verwandte Medium besteht aus RPMI 1640 Medium versetzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat.

Zum Kultivieren wurden die Zellen in einem Begasungs-Brutschrank in 5,0% CO_2 -haltiger Luft und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37 °C gelagert. Alle für die Experimente verwandten Zellen wuchsen adhärent und einschichtig in T25, T75 oder T175 Zellkulturflaschen.

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen mikroskopisch auf Kontaminationen und zur Beurteilung der Konfluenz begutachtet. Ab einer Zelldichte von 70-90% wurden die Kulturen passagiert. Dazu wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-Lösung je nach Ablöseverhalten der Zelllinien für 5 bis 15 min im Brutschrank inkubiert. Die nun abgelösten Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins mit Medium versehen und drei Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert (Rotina 48 R). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellen im Verhältnis 1:5 neu ausgesät oder bei Bedarf zu diesem Zeitpunkt für eine gezielte Aussaat gezählt.

3.4.3. Zählen der Zellen

Ein Teil der von der Kulturflasche abgelösten und in Suspension befindlichen Zellen wurde im Verhältnis 1:10 sorgfältig mit Trypanblau gemischt und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen mit mehrfacher Wiederholung in einem Volumen von 0,1 µl gezählt, gemittelt, mit 10 multipliziert (Verdünnungsfaktor) und die Zellzahl pro ml ausgerechnet.

3.4.4. Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden jeweils 1×10^6 Zellen in sterile 1,8 ml Nunc Röhrchen mit je 1,5 ml Volumen FCS mit 10% DMSO verteilt. Vor dem Einfrieren wurden die Nunc Röhrchen in einem auf 4 °C vorgekühlten Nalgene Einfrierbehälter äquilibriert und hierin in einem –80 °C Gefrierschrank eingefroren. Innerhalb der folgenden Woche wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

3.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE ROUTINEMETHODEN

3.5.1. Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen – RIPA-Lysate

Um Gesamtprotein aus Zelllysaten zu gewinnen, wurden nur Zellen verwendet, die bereits mindestens eine Woche in Kultur waren, deren Medium am Vortag gewechselt wurde und deren Konfluenz 70-80% betrug. Zunächst wurde das Medium der zu lysierenden Zellen abgesaugt und die adhärennten Zellen wurden mit einmalig mit PBS gewaschen, um bereits abgelöste und apoptotisch aufgetrente Zellteile zu entfernen. Zur eigentlichen Lyse wurden die Zellen mit eiskaltem RIPA-Puffer (100 µl/6well; 1 ml/T75) für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Verbesserung der Lysis-Effizienz wurden die Lysate nun für mindestens eine Stunde bei –20 °C eingefroren, auf Eis

wieder aufgetaut, in Eppendorf Röhrchen überführt und zur Homogenisierung durch eine 26 Gauge Nadel zehn mal aspiriert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation 14000 rpm und 4 °C (Kühlzentrifuge 5415 R) wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei – 20 °C.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris-Cl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% Na-Desoxycholat, 0,1% SDS, eine Complete Tablette (Proteinaseinhibitor-Cocktail, Boehringer) pro 50 ml Puffer.

3.5.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung eines kommerziellen Proteinassays der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers .

3.5.3. Protein-Gelelektrophorese

Denaturierende diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)

Mittels Western-Blot-Analyse ist es möglich, Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und so Zellextrakte qualitativ und semiquantitativ zu überprüfen. Dies erfolgte mittels kommerzieller Gradientengele der Firma Invitrogen. Die zuvor aus RIPA-Lysaten gewonnenen Proben wurden 4x mit Lämmli-Puffer versetzt und dann mit RIPA-Puffer plus Complete auf das gleiche Volumen bei gleicher Gesamtproteinmenge gebracht. Dann wurden die Proben bei 95° C auf dem Schüttler denaturiert, kurz abzentrifugiert und auf das Gel übertragen. Eine Tasche des verwendeten Gels wurde mit maximal 30 µl Gesamtmenge der Probe befüllt. Anschließend wurden die Proben bei einer Spannung von 120V elektrophoretisch aufgetrennt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

Lämmli-Puffer (4x, pH 6,8): 1,25 ml Tris/HCl (2 M), 8 ml SDS (10%), 308,5 mg Dithiotreitol (DTT), 2,02 ml Glycerin, 2 mg Bromphenolblau

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,3): 25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

3.6. WESTERN BLOT UND IMMUNDETEKTION

Die Kombination dieser Methoden wurde benutzt um die elektrophoretisch aufgetrennten zellulären Proteine qualitativ und semiquantitativ indirekt darzustellen.

3.6.1. Western Blot

Für den Transfer der Proteine wurde das Wet-Verfahren unter Benutzung einer Blotting Kammer (Bio Rad) angewendet. Nach Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde zunächst eine PVDF-Membran durch jeweils fünfminütige Inkubation in Methanol, Aqua dest und Blotting Puffer vorbereitet. Die Schichtung des Blots begann mit der anodenwärts gerichteten Seite eines aufklappbaren Blotting Kammer Einsatzes. Ihr folgten zwei Lagen eines auf Gelmaße zugeschnittenen und mit Blotting-Puffer durchtränkten Whatmann 3MM-Papieres. Weiterhin folgten die PVDF-Membran, das Gel und schließlich zwei weitere Lagen des Whatmann Papieres. Anschließend wurde der Einsatz mit der kathodenwärts gerichteten Seite zugeklappt und in richtiger Orientierung in eine mit Blotting-Puffer gefüllte Blotting Kammer (Mini Trans Blot Cell, Bio Rad) gesetzt, so dass der Einsatz vollständig mit Puffer bedeckt war. Der Transfer erfolgte über eine Stunde bei 400 mA.

Ein Liter Blotting-Puffer auf Wasserbasis enthält 12,11 g Tris Base, 14,26 g Glycin und 200 ml Methanol.

3.6.2. Immundetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsmöglichkeiten für Antikörper abzusättigen. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Antikörperpuffer inkubiert. Dieser Puffer enthielt den jeweiligen primären Antikörper in einer den Angaben des Herstellers folgenden Verdünnung. Danach wurde die Membran 5 min, 15 min und 30 min mit PBST auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit dem in Antikörperpuffer gelösten sekundären Konjugat-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Wiederholung des beschriebenen Waschvorganges wurde die Membran für 5 min mit einem Chemilumineszenz Substrat (ECL™ bzw. ECLplus™) inkubiert. Die Membran wurde schließlich mit Klarsichtfolie luftblasenfrei ummantelt und in einer Dunkelkammer einem Röntgenfilm exponiert und dieser entwickelt.

- Ein Liter PBS-Lösung (10x) enthält 80 g NaCl, 14,5 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ und 2 g KCl .
- PBST (1x) enthält PBS (1x) und 0,1% Tween20.
- Der Blockierungspuffer enthält PBST (1x) und 5% Magermilchpulver.
- Antikörperpuffer enthält PBST (1x) und 0,5% Magermilchpulver.

3.7. FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS-ANALYSE)

Bei den Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Analysen handelt es sich um eine Form der Durchflußzytometrie, bei der vorbehandelte Proben (Zellen) mit einer Fluoreszenz „beladen“ wurden und diese Proben anschließend als einzelne Partikel (Counts) hinsichtlich ihrer absorptiven (photometrischen) und fluoreszierenden Eigenschaft (Qualität) und Stärke (Quantität) untersucht wurden. Die fluoreszenzzytometrischen Messungen erfolgten am „FACScan“ der Firma Becton Dickinson. Die Auswertung erfolgte am angeschlossenen PowerPC mit der „CellQuest“-Software (Becton Dickinson).

3.7.1. Apoptosemessung und Zellzyklus-Analyse

Um auch tote, nicht mehr adhärente Zellen zu analysieren, wurde der Überstand abgenommen und in 15 ml-Röhrchen übergeben. Die adhärennten Zellen wurden mit PBS/5mM-EDTA gewaschen und anschließend für ca. 5 min. (bis unter dem Mikroskop zu erkennen war, dass die Zellen abgelöst waren) bei 37 °C mit 1ml Trypsin inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit ihren zugehörigen Überständen in 15ml-Röhrchen vereinigt und abzentrifugiert (450 x g, 4 °C, 8 min.). Der Überstand wurde anschließend verworfen. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS 5 mM EDTA gewaschen, bei 450 x g zentrifugiert und die Pellets in jeweils 1 ml PBS 5 mM EDTA gelöst. Darauf wurde jeweils 1ml ETOH (99,9 %) hinzugegeben und die Zellen bei RT für 30 min. inkubiert. Anschließend wurden die Überstände entfernt und die Zellpellets mit jeweils 500 µl PBS 5 mM EDTA 0,1 M RNase A (Qiagen) bei RT inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit 500 µl PBS 5 mM EDTA Propidiumiodid (200 µg/ml) für 30 min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und der DNA-Gehalt wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Aufgrund des folgenden Prinzips ist anschließend eine qualitative und quantitative Analyse der gemessenen Zellen möglich: Der fluoreszierende Farbstoff Propidium Iodid bindet an die DNA der Zellen. Da sich in proliferierenden Zellen der DNA-Gehalt der Zellen während der S-Phase zur G2-Phase hin verdoppelt und die Fluoreszenz einer Zelle somit proportional zu ihrem DNA-Gehalt ist, lässt sich diese Färbung ausnutzen, um den Zyklusstatus einer einzelnen Zelle zu bestimmen.

Eines der typischen Merkmale der Apoptose ist die Fragmentierung von chromosomaler DNA in Bruchstücke von 180 Basenpaaren oder ein Vielfaches davon. Diese Fragmente werden von der Zelle freigesetzt, so dass bei einer DNA-Färbung von apoptotischen Zellen ein DNA-Gehalt beobachtet wird, der kleiner ist als bei einer normalen Zelle in der G1-Phase. Man spricht von sub-G1-Zellen. Die DNA-Färbung kann somit auch gebraucht werden, um Apoptose in einer Zellpopulation zu quantifizieren.

4. ERGEBNISSE

4.1. DIE CASEINKINASEN 1 δ UND 1 ϵ WERDEN VON DEN PANKREASADENOKARZINOM-ZELLINIEN STARK EXPRIMIERT

Die von Mitgliedern der CK1-Superfamilie bewirkten Signaleigenschaften stellen möglicherweise vielversprechende Ansatzmöglichkeiten für die medikamentöse Tumortherapie dar. Aus diesem Grund wurden zunächst in 8 verschiedenen Pankreas-Tumorzelllinien die Expression von CK1 δ und CK1 ϵ bestimmt. Die einzelnen Zelllinien weisen Unterschiede im Differenzierungsgrad, Wachstumsverhalten und Resistenzprägung gegen Apoptose auf [48]. Wie Abbildung 1 zeigt, kann in den Zelllinien ASPC-1 und BxPC3 für CK1 δ , sowie allein für die CK1 ϵ in Capan-1-Zellen, ein niedrigerer Expressionsgrad gemessen werden, verglichen mit den schlechter differenzierteren Zelllinien MiaPaCa-2, Panc1, Panc89 und PancTuI (Abb. 1). Obwohl keine gravierenden Unterschiede in der nachgewiesenen Menge der CK1 δ/ϵ -Proteine festgestellt werden konnten, wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Knippschild kürzlich nachgewiesen, dass sich die CK1 δ/ϵ -spezifische Kinaseaktivität in den verschiedenen Zelllinien zum Teil um bis das 6-fache voneinander unterscheidet [49].

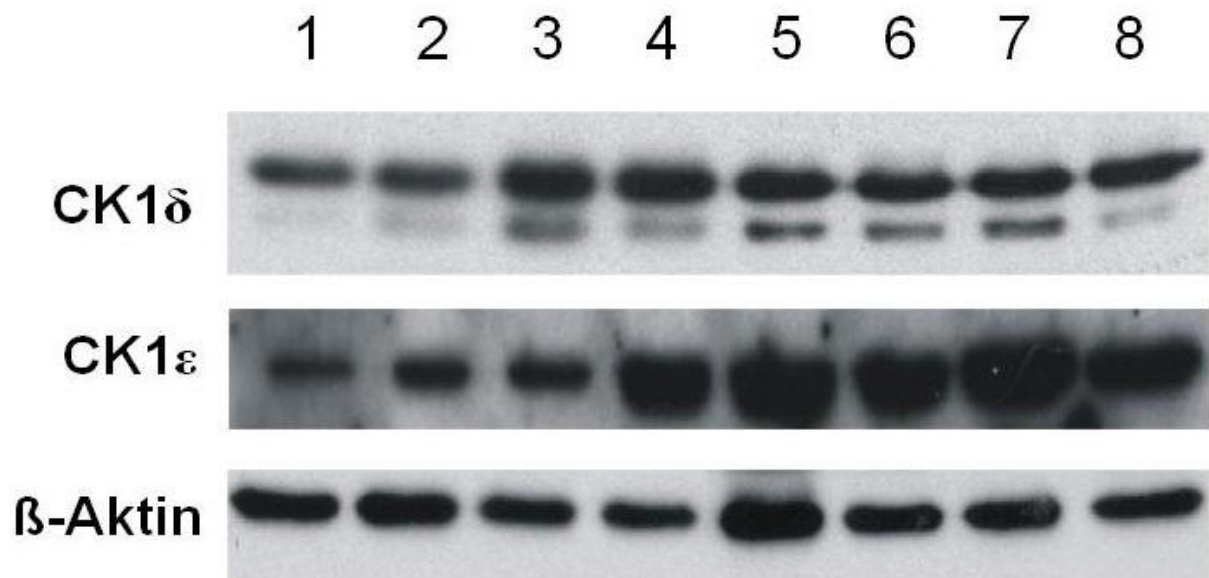
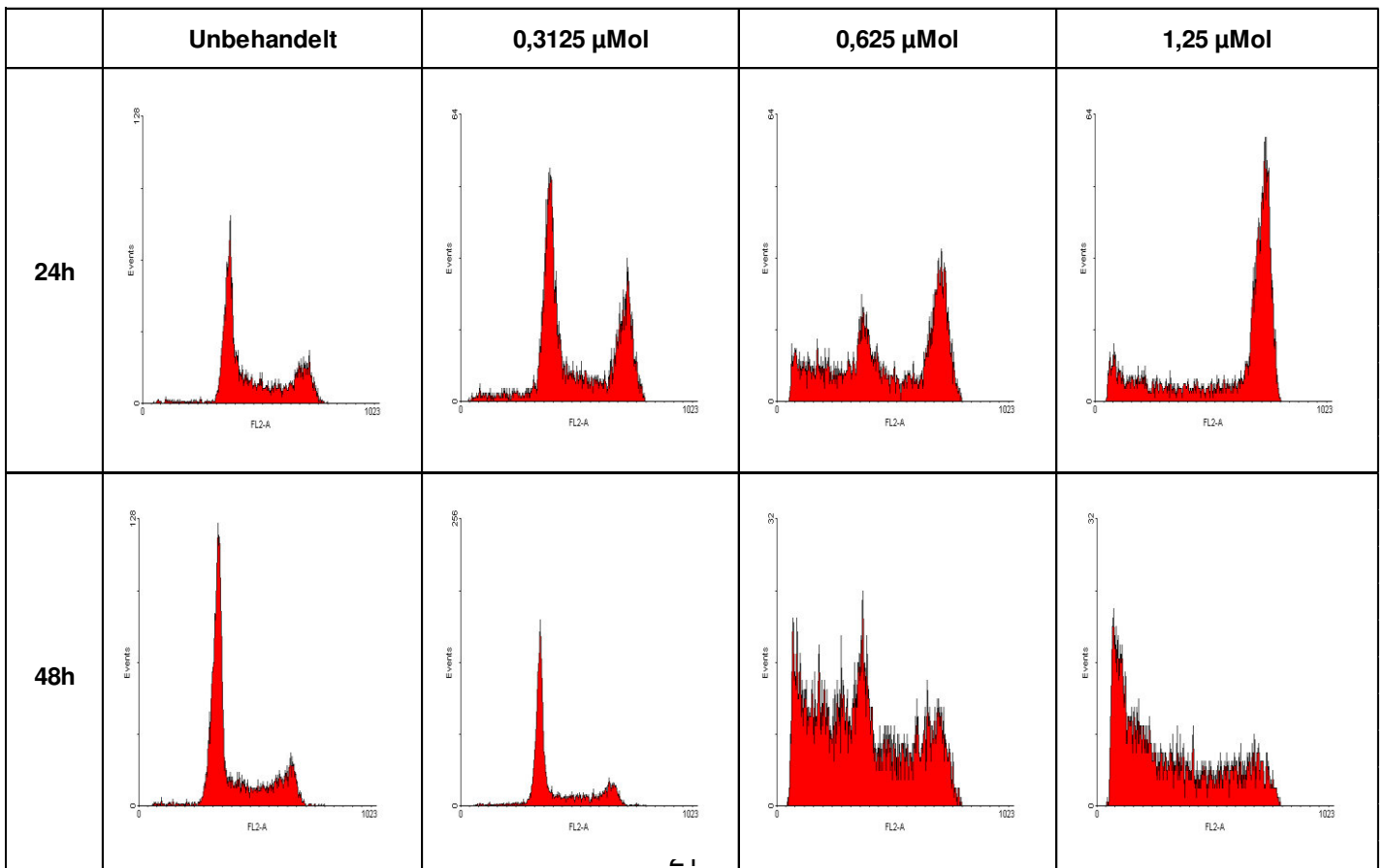


Abb. 1: CK1 δ/ϵ -Expression in gängigen Pankreastumor-Zelllinien. Gleiche Mengen von Zellextrakten (75 μ g) von ASPC-1 (1), BxPC3 (2), Capan-1 (3), Colo 357 (4), MiaPaCa-2 (5), Panc1 (6), Panc89 (7) und PancTu I (8) wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression beider CK1-Isoformen wurde im Western-Blot unter Verwendung von isoformspezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Gelbeladungskontrolle diente der Nachweis der Menge von β -Aktin.

4.2. CK1 δ/ϵ -SPEZIFISCHER INHIBITOR IC261 UNTERDRÜCKT DAS WACHSTUM HUMANER PANKREAS-TUMORZELLINIEN

Der CK1 δ/ϵ -spezifischer Inhibitor IC261 ist klassifiziert als ein Klasse-1-Inhibitor, welcher eine hohe Spezifität für die CK1 δ/ϵ auf molekularer Ebene besitzt. Als nicht-geladenes Molekül vermag es bei physiologischem pH-Wert durch Membranen zu diffundieren. IC261 ist im Inneren der Zellen hoch aktiv und es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass eine Behandlung mit IC261, abhängig von der jeweiligen Zelllinie, hauptsächlich einen Zellzyklusarrest oder Apoptose verursacht [30][42]. Vor diesem Hintergrund wurden die Auswirkungen von IC261 auf das Zellwachstum von Pankreas-Tumorzelllinien untersucht (Abbildung 2a). Die Ergebnisse zeigen, dass IC261 (1,25 μ M) das Wachstum von Pankreas-Tumorzellen hemmt. Die FACS-Analyse von PI-markierten Pankreas-Tumorzellen zeigt, dass Unterschiede in der Wirkung von IC261, sowohl zeit-, als auch dosisabhängig sind. Wie die Abbildungen 2 und 3 zeigen, führt IC261-Behandlung schon innerhalb der ersten 24h zu einem starken Anstieg von Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Nach weiteren 24h konnte die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrest und eine starke Zunahme von Zelltod (sub-G1-Fraktion) festgestellt werden.

2.)



3.)

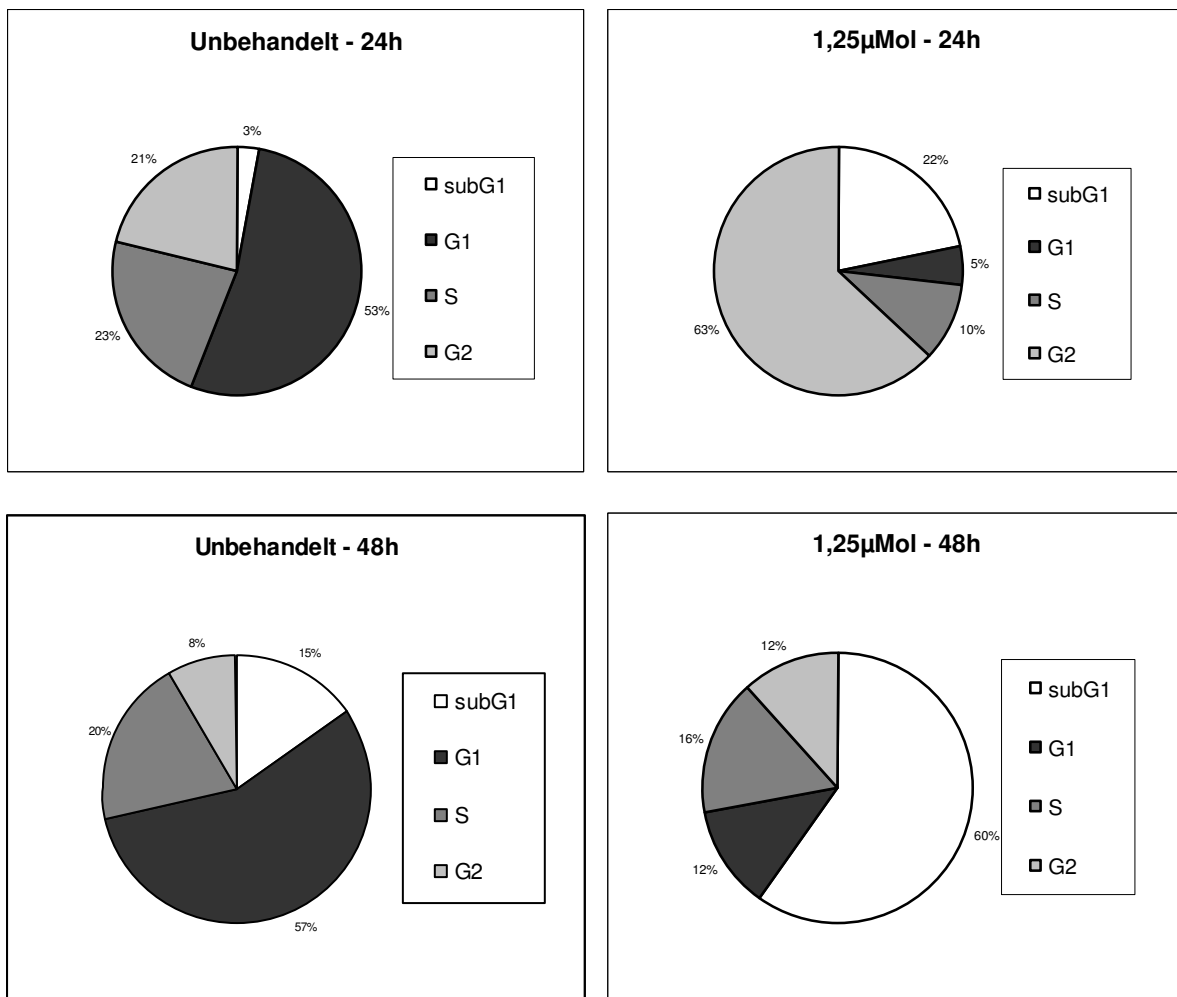


Abb. 2: Zellzyklusanalyse von unbehandelten und mit IC261-behandelten Panc89-Zellen. Nach Vorbehandlung mit IC261 in vier unterschiedlichen Konzentrationen wurden nach jeweils 24 und 48 Stunden mittels FACS-Analyse der DNA-Gehalt der Zellen und damit der Zellzyklus und Apoptoseverhalten der Tumorzellen analysiert.

Abb 3: Graphische Darstellung der mittels FACS-Analysen erhobenen Daten. Exemplarisch werden nur die Ergebnisse für mit 1,25µMol-Konzentration von IC261-behandelten Panc89-Zellen präsentiert.

4.3. BEHANDLUNG MIT CK1-7 UND IC261 VERMINDERT DIE RESISTENZ DER PANKREASTUMORZELLEN GEGEN DIE CD95-VERMITTELTE APOPTOSE

Wie eingangs bereits beschrieben wurde, sind Pankreastumorzellen häufig resistent gegen CD95-vermittelte Apoptose.

Um die möglichen Auswirkungen der CK1 δ/ϵ -Hemmung auf die CD95-vermittelte Apoptose zu untersuchen, wurden Panc89-, BxPC3-Zellen und MiaPaCa-2 mit

agonistischem anti-CD95-Antikörper CH11 behandelt, mit oder ohne Vorbehandlung mit IC261 (Panc89, BxPC3, MiaPaCa-2), bzw. CK1-7 (Panc89). Als Apoptose-Nachweis wurden FACS-Analysen mit PI-gefärbten Zellen durchgeführt. Zur Feststellung, ob es sich bei eventuellem Zellsterben um Apoptose handelt, wurde ein Caspasen-Inhibitor zVAD-fmk verwendet. Die Ergebnisse in Abbildung 4 belegen den bisherigen Kenntnisstand: Panc89-Zellen sind nahezu vollständig resistent gegen CD95-vermittelte Apoptose. Die Vorbehandlung mit IC261 zeigt jedoch, dass die Zellen für den Apoptoseweg sensitiviert werden, und es in mehr als 50% zum Zelltod durch die gleichzeitige Behandlung mit IC261 und CH11 kommt. Der gleiche Effekt lässt sich durch einen analogen Behandlungsversuch mit dem Casein-Kinase-Inhibitor CK1-7 erreichen (Abb. 5), hier ist die beschriebene Wirkung sogar noch etwas ausgeprägter (43,3% im Vergleich zur Kontrolle).

Der hier beobachtete Zelltod wird als apoptotisch eingestuft, da er sich durch die zusätzliche Gabe des Caspasen-Inhibitors zVAD-fmk fast komplett aufheben lässt (Abb. 4 und 5).

Es fällt zudem auf, dass die alleinige Behandlung mit IC261 (Abb. 4) oder CK1-7 (Abb. 5) bereits einen vermehrten Zelltod zur Folge hat, was im Einklang mit den schon in den Abbildungen 2 und 3 gezeigten Ergebnissen steht.

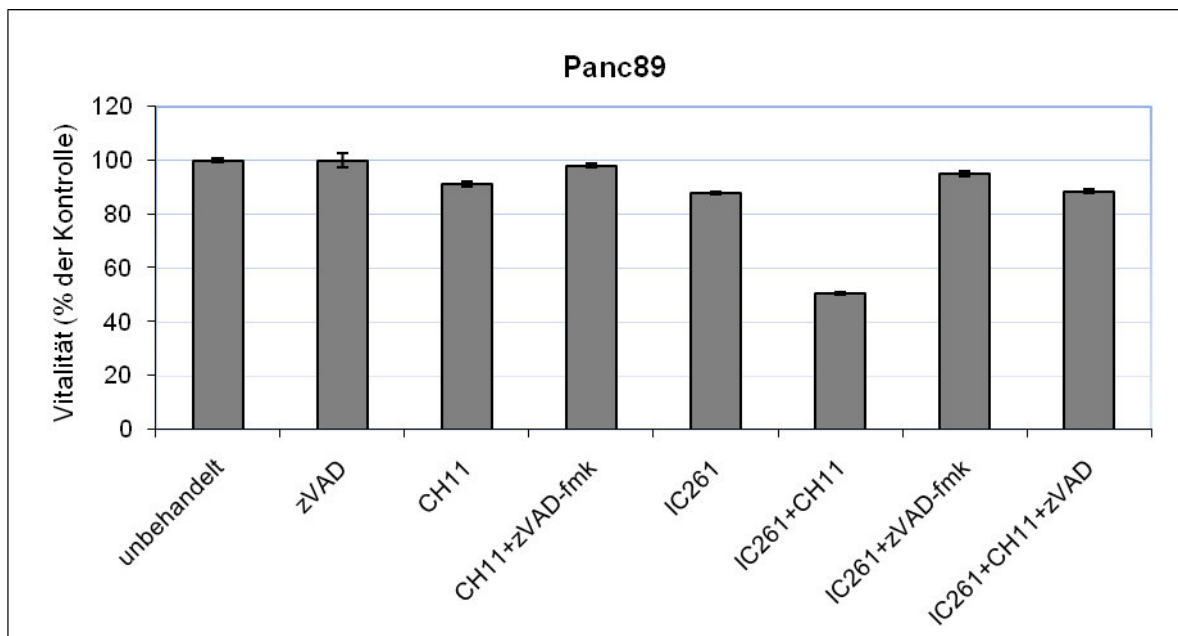


Abb. 4: Panc89-Zellen wurden mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11 (100ng/ml) über 16 Stunden behandelt; sowohl mit, als auch ohne Vorbehandlung mit IC261 (1.25 μ M, 6h). Der Caspaseninhibitor zVAD-fmk wurde in den entsprechenden Ansätzen 1h vor CH11 hinzugegeben. Alle Ansätze wurden parallel mittel FACS analysiert (siehe Material und Methoden). Dargestellt wurden die Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen mit den Standardabweichungen.

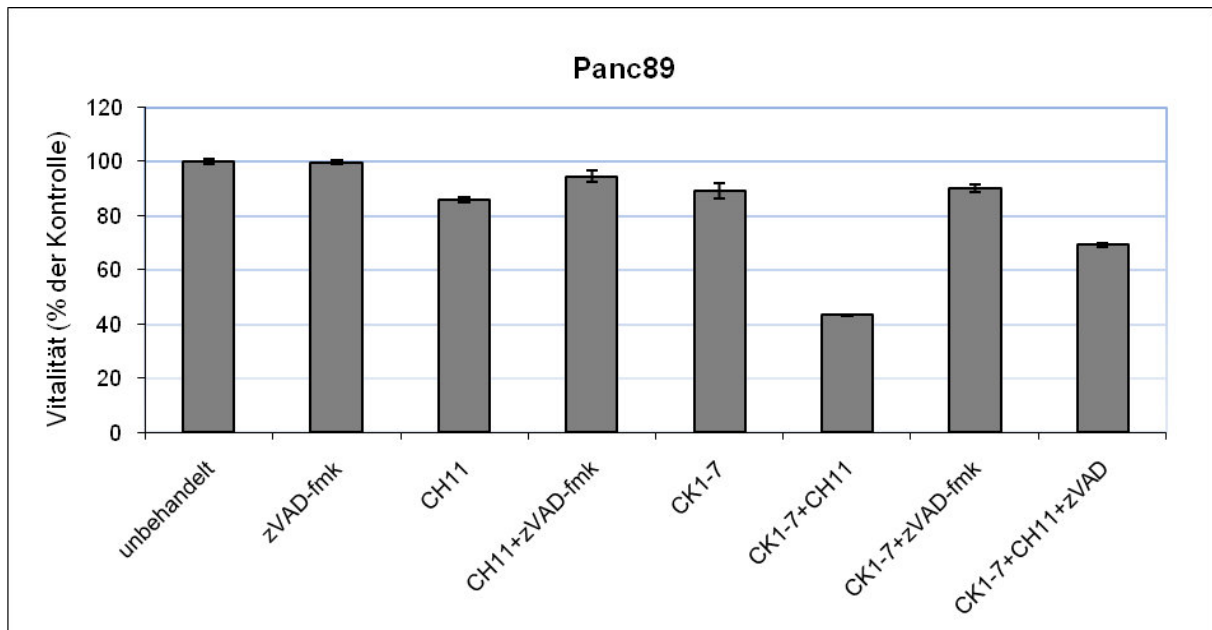


Abb. 5: Panc89-Zellen wurden mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11 (100ng/ml) über 16 Stunden behandelt; sowohl mit, als auch ohne Vorbehandlung mit CK1-7 (200 μ M, 6h). Der Caspaseninhibitor zVAD-fmk wurde in den entsprechenden Ansätzen 1h vor CH11 hinzugegeben. Alle Ansätze wurden parallel mittel FACS analysiert (siehe Material und Methoden). Dargestellt wurden die Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen mit den Standardabweichungen.

Ähnlich den Panc89-Zellen erwiesen sich die BxPC3-Zellen (Abb.6) und die MiaPaCa-2-Zellen (Abb. 7) resistent gegen die Behandlung mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11. Auch hier bewirkte die Kombinationstherapie mit dem CK1 δ/ϵ -Inhibitor IC261 eine Sensitivierung für die CD95-vermittelte Apoptose. Auffällig ist, dass dieser Effekt bei den MiaPaCa-2-Zellen, welche durch schlechte Differenzierung, schnelleres Tumorstadium, ausgeprägtere Apoptoseresistenz und somit einen noch maligneren Phänotyp charakterisiert sind, weniger ausgeprägt ist. Der hier beobachtete Zelltod wird hier ebenfalls als apoptotisch eingestuft, da er sich durch die zusätzliche Gabe des Caspasen-Inhibitors zVAD-fmk wieder fast komplett aufheben lässt.

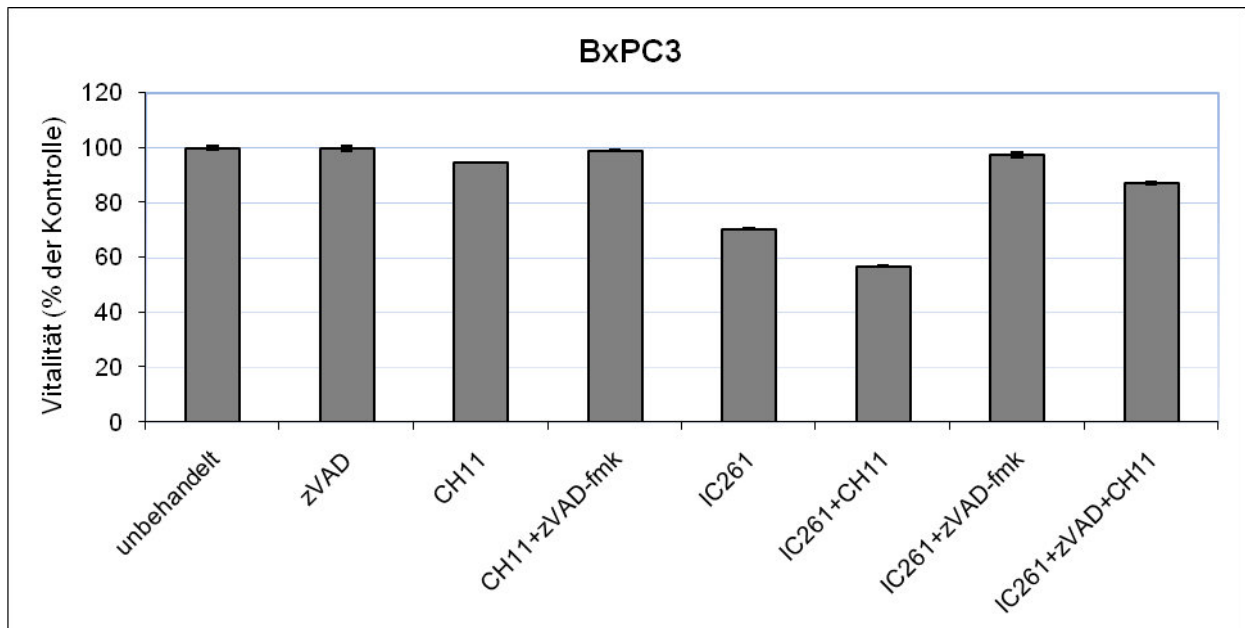


Abb. 6: BxPC3-Zellen wurden mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11(100ng/ml) über 16 Stunden behandelt; sowohl mit, als auch ohne Vorbehandlung mit IC261 (1,25 μ M, 6h). Der Caspaseninhibitor zVAD-fmk wurde in den entsprechenden Ansätzen 1h vor CH11 hinzugegeben. Alle Ansätze wurden parallel mittel FACS analysiert (siehe Material und Methoden). Dargestellt wurden die Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen mit den Standardabweichungen.

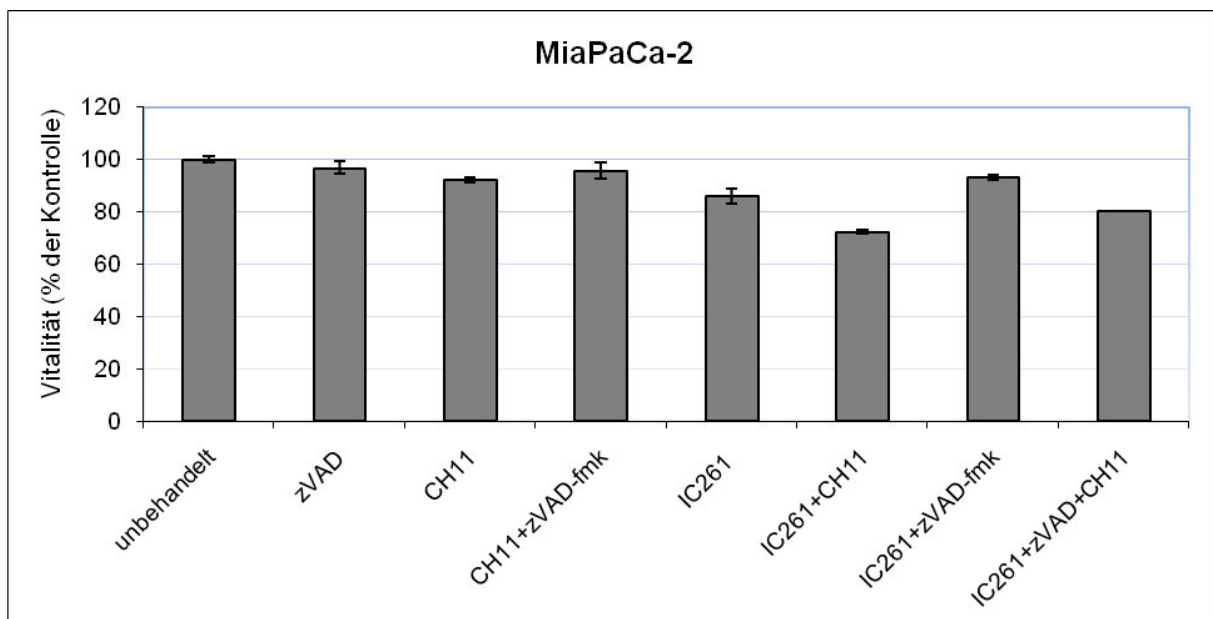


Abb. 7: MiaPaCa-2-Zellen wurden mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11 (100ng/ml) über 16 Stunden behandelt; sowohl mit, als auch ohne IC261-Vorbehandlung (1,25 μ M, 6h). Der Caspaseninhibitor zVAD-fmk wurde in den entsprechenden Ansätzen 1h vor CH11 hinzugegeben. Alle Ansätze wurden parallel mittel FACS analysiert (siehe Material und Methoden). Dargestellt wurden die Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen mit den Standardabweichungen.

Um herauszufinden, welche Ursachen die verbesserte Ansprechbarkeit der Zellen auf CH11 in Gegenwart von CK1 δ/ϵ -Inhibitoren zugrunde liegen könnten, wurde zunächst die Expression und Spaltung von Procaspase 8, Bid und PARP in Panc89-Zellen nach Behandlung mit IC261 und CK1-7 in Kombinationstherapie mit CH11

untersucht, und mit den Konzentrationen bei entsprechender Monotherapie – analog zu den unter 4 und 5 dargestellten Versuchsreihen - verglichen.

Es zeigt sich, dass die Behandlung mit den Casein-Kinase-Inhibitoren CK1-7 und IC261 sowohl einen Anstieg der durch CD95 aktivierten Caspase 8, als auch eine Aktivitätssteigerung der Effektor-Caspase 3, dargestellt durch die vermehrte Spaltung des Caspase-3-Substrats PARP (Abb. 8 und 9), verursacht. Zusätzlich zeigt sich, dass es unter kombinierter Gabe von IC261 und CH11 zur verstärkten Spaltung von Bid kommt, während eine Spaltung dieses proapoptotischen Proteins unter alleiniger Gabe, entweder von IC261 oder CH11, ausbleibt.

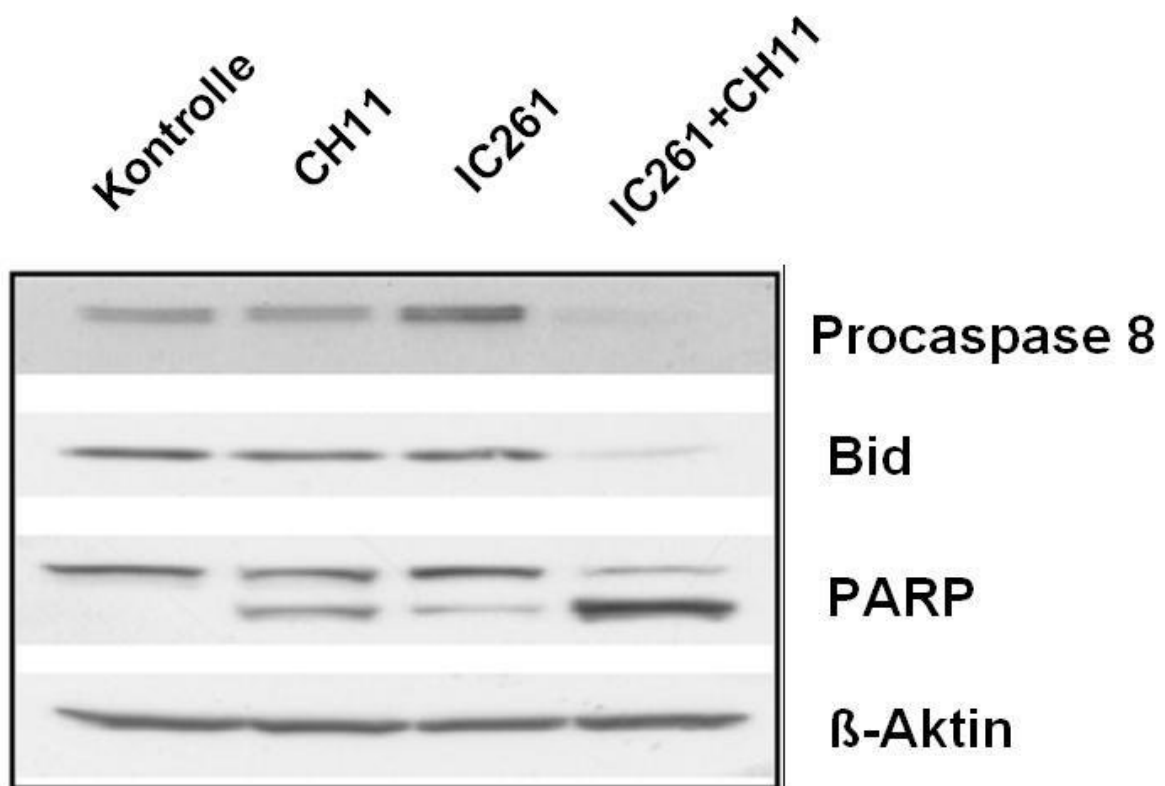


Abb. 8: Western-Blot-Analyse von Panc89-Zellen nach 16-stündiger Behandlung mit dem anti-CD95-Antikörper CH11, sowohl mit, als auch ohne vorherige Inkubation mit dem Casein-Kinase-Inhibitor IC261 (1,25 μ M, 6h). Gleichmäßige Gelbeladung wurde durch die Bestimmung von β -Aktin sichergestellt.

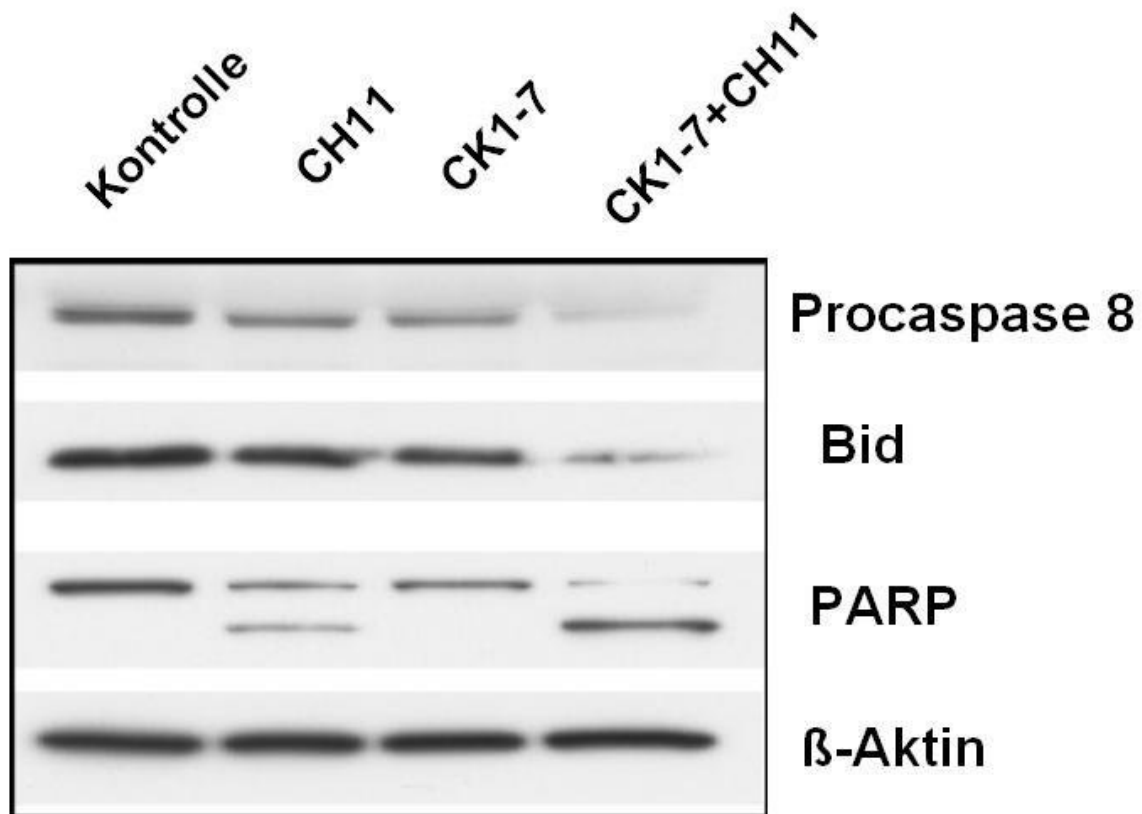


Abb. 9: Western-Blot-Analyse von Panc89-Zellen nach 16 stündiger Behandlung mit dem anti-CD95-Antikörper CH11, sowohl mit, als auch ohne vorherige Inkubation mit dem Casein-Kinase-Inhibitor CK1-7 (200 μ M, 6h). Gleichmäßige Gelbeladung wurde durch die Bestimmung von β -Aktin sichergestellt.

4.4. IC261-BEHANDLUNG BEWIRKT EINE VERMINDETE BILDUNG ANTIAPOPTOTISCHER PROTEINE

Um weitere Effekte auf den CD95-vermittelten Apoptoseweg zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von antiapoptotischen Proteinen in nicht vorbehandelten, und jeweils mit den CK1 δ/ϵ -Inhibitoren IC261 und CK1-7 vorbehandelten Panc89-Zellen bestimmt. Hierbei zeigt sich, dass Bcl-xL, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, das antiapoptotisch wirkt, indem es die Cytochrom-C-Freisetzung aus den Mitochondrien verhindert, und die Mitglieder der IAP-Familie c-IAP, c-IAP2 und XIAP, deren Wirkung hauptsächlich auf der Inhibition von Caspasen beruht, sowohl unter IC261, als auch CK1-7 herunterreguliert werden (Abb. 10).

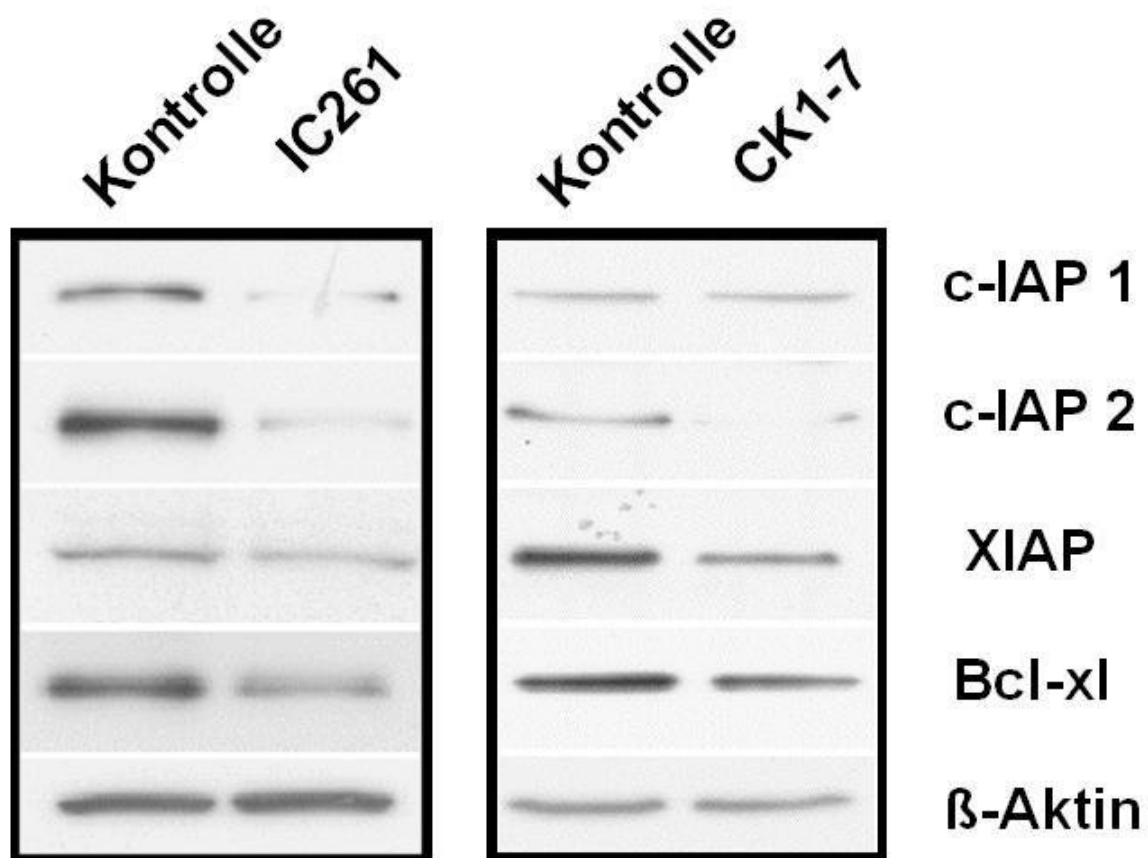


Abb.10: Panc89-Zellen wurden mit oder ohne CK1 δ/ϵ -Inhibitoren IC261 (1,25 μ M) oder CK1-7 (200 μ M) inkubiert. Nach 22h wurden aus den Zellen Gesamtzelllysate gewonnen und anschließend mittels Western-Blot-Analyse die Expression von anti-apoptischen Proteinen untersucht. Gleiche Proteinmengen wurden mittels β -Aktin-Bestimmung kontrolliert.

4.5. DIE WIRKUNG VON CHEMOTHERAPEUTIKA GEMCITABIN UND 5-FU AUF RESISTENTE TUMORZELLEN NACH IC261-VORBEHANDLUNG

Neben einer Resistenz gegen die CD95-Rezeptor-vermittelte Apoptose, zeigen Pankreastumorzellen auch eine Resistenz gegen Chemotherapeutika. Es wurde deshalb mittels FACS-Analyse untersucht, ob eine Behandlung mit dem Casein-Kinase-Inhibitor IC261 mit einer verbesserten Ansprechbarkeit auf die Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-Fluoruracil – beides Medikamente aus der Gruppe der Antimetabolite – einhergeht.

Wie Abbildung 11 zeigt, konnten in den Versuchen an den mäßiggradig differenzierten Panc89-Zellen zwar sowohl ein Effekt durch die Chemotherapie mit Gemcitabin, als auch durch die alleinige Behandlung mit IC261 nachgewiesen werden, in der Kombinationsbehandlung beider Substanzen kam es jedoch nicht zu einem vermehrten Zelltod im Vergleich zur Kontrollgruppe.

In der Versuchsreihe mit den chemoresistenten PancTuI-Zellen sind die Behandlungseffekte weit weniger ausgeprägt, und zeigen hier in der Kombinationstherapie mit IC261 und Gemcitabin keinerlei Erhöhung des Zelltodes (Abb. 12). Auch der Effekt der Monotherapie mit IC261 auf die Zellvitalität ist äußerst gering.

Ähnlich wie im Falle von Gemcitabin war auch die Wirkung von 5-FU nicht durch die Hemmung von CK1 δ/ϵ mit IC261 bei Panc89 und PancTuI-Zellen gestiegen (Abb. 13 und 14).

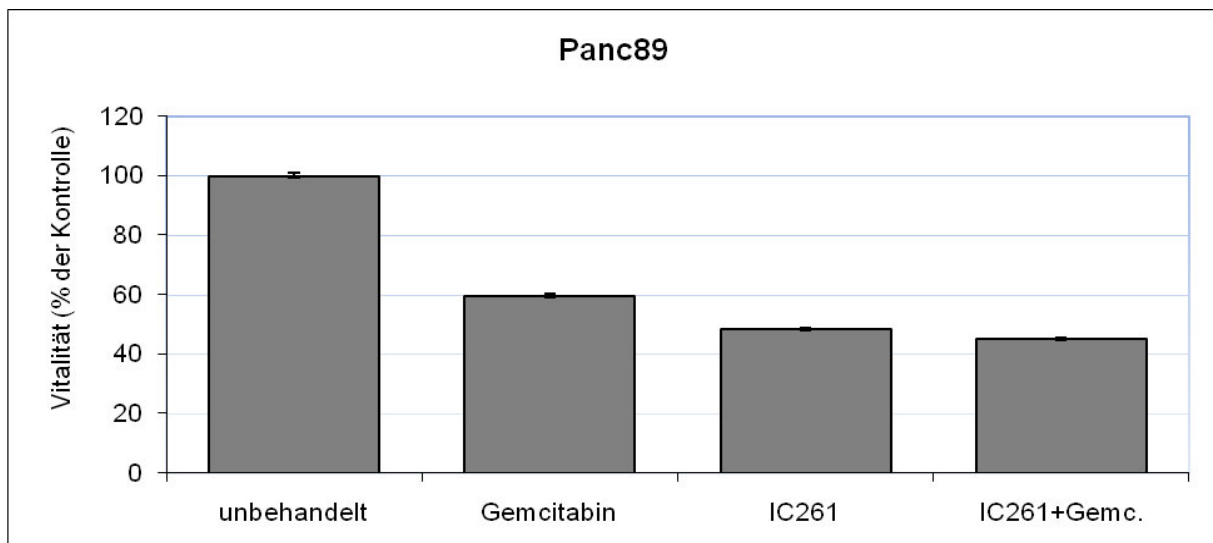


Abb. 11: Vitalitätsbestimmung mittels FACS-Analyse nach Behandlung von Panc89-Zellen mit Gemcitabin (10mg/ml) über 40h, sowohl mit, als auch ohne vorherige Inkubation mit IC261(1,25 μ M) über 6h.

Dargestellt wurden Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen mit den Standardabweichungen.

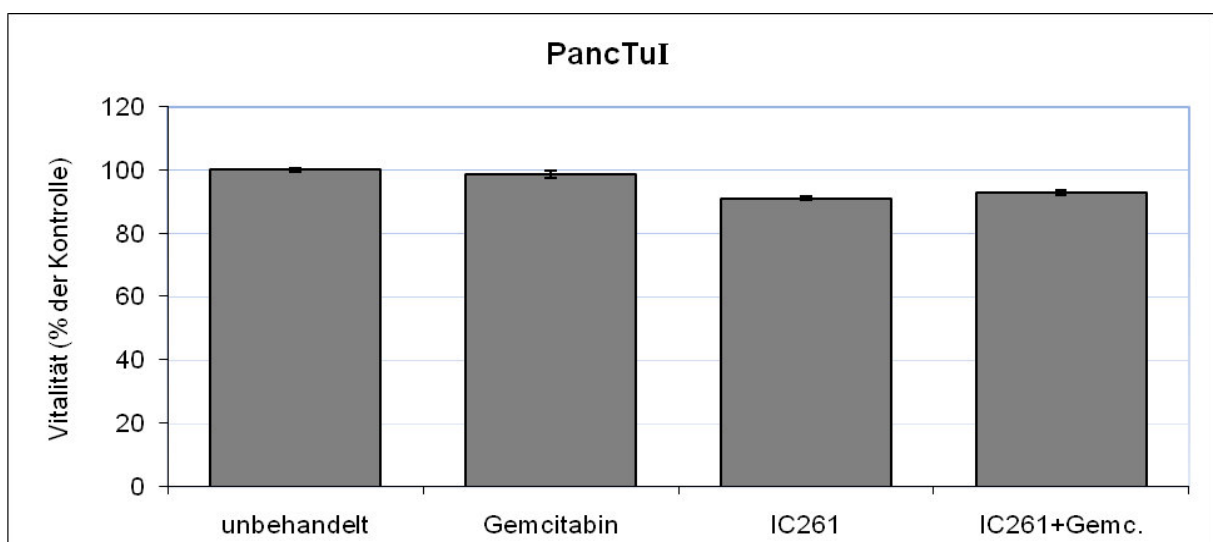


Abb. 12: Vitalitätsbestimmung mittels FACS-Analyse nach Behandlung von PancTuI-Zellen mit Gemcitabin (10mg/ml) über 40h, sowohl mit, als auch ohne vorherige Inkubation mit IC261(1,25 μ M) über 6h. Dargestellt wurden Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen mit den Standardabweichungen.

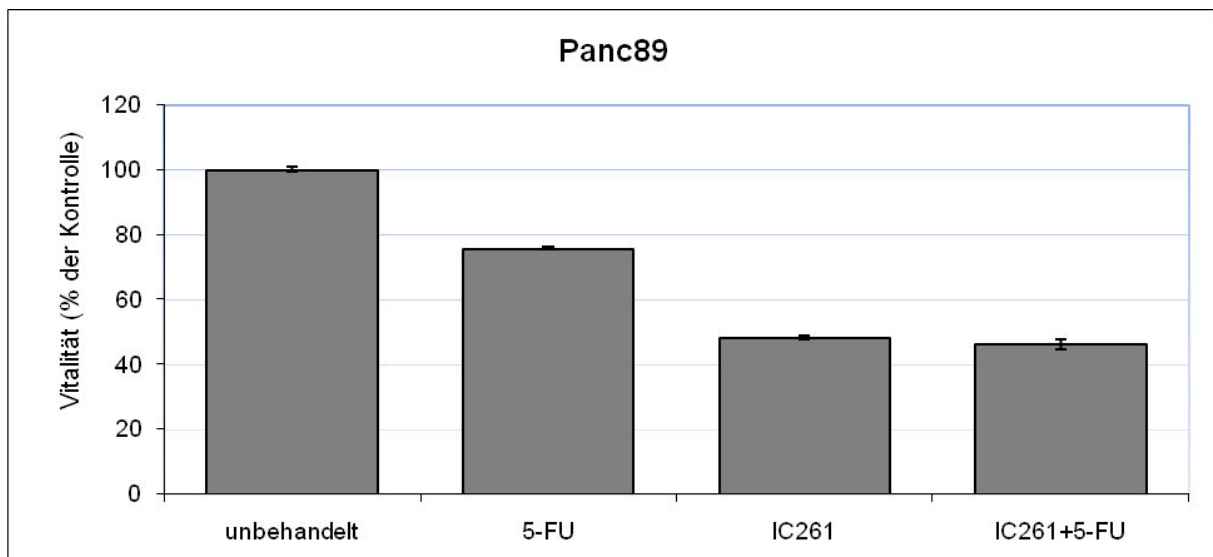


Abb. 13: Vitalitätsbestimmung mittels FACS-Analyse nach 5-FU-Behandlung (10mg/ml) von Panc89-Zellen über 40h, sowohl mit, als auch ohne vorherige Inkubation mit IC261 (1,25µM) über jeweils 6h. Dargestellt wurden Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen mit den Standardabweichungen.

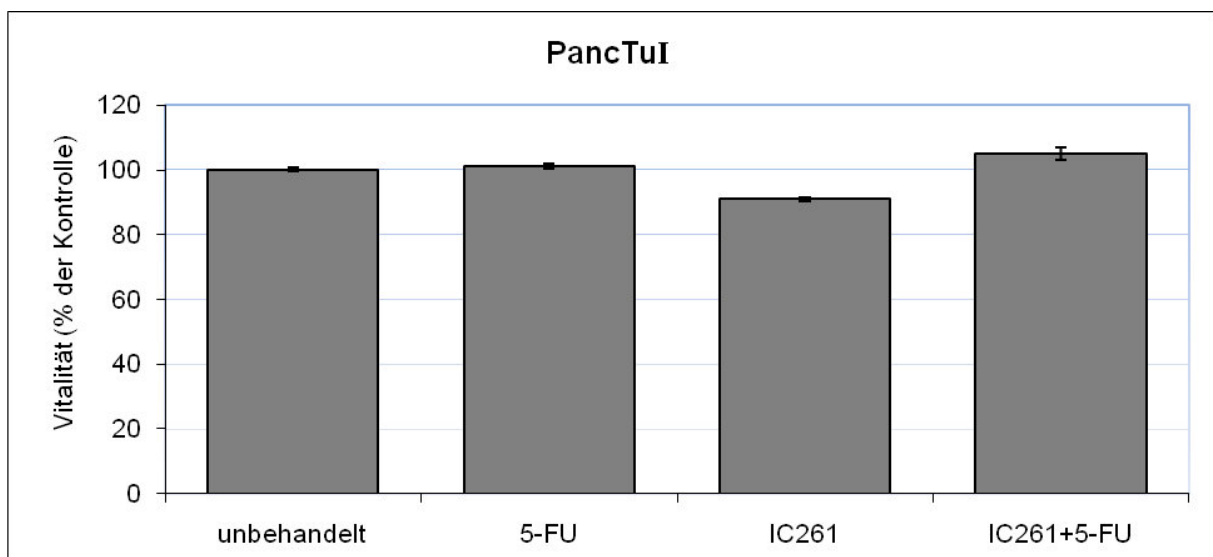


Abb. 14: Vitalitätsbestimmung mittels FACS-Analyse nach 5-FU-Behandlung (10mg/ml) von PancTuI-Zellen über 40h, sowohl mit, als auch ohne vorherige Inkubation mit IC261 (1,25µM) über jeweils 6h. Dargestellt wurden Ergebnisse von 3 unabhängigen Versuchen mit den Standardabweichungen.

5. DISKUSSION

5.1. ROLLE DER CASEIN-KINASE 1 δ/ϵ BEI APOPTOSERESISTENZMECHANISMEN IN PANKREASKARZINOMZELLEN

Schnelles Wachstum, sowie ausgeprägte Apoptoseresistenz sind einige Charakteristika von Pankreas-Tumorzellen, die großen Anteil an der Malignität dieser Erkrankung haben.

Noch immer ist die Prognose dieser Erkrankung sehr schlecht und befriedigende Therapieansätze sind nicht vorhanden. Da sowohl chirurgische Interventionen, mit neoadjuvanten und adjuvanten medikamentösen oder auch radiologischen Behandlungsmaßnahmen als auch alleinige chemotherapeutische Therapiekonzepte in der aktuellen klinischen Behandlung keinen zufriedenstellenden Einfluß auf die Gesamtmortalität der betroffenen Patienten zeigten, wurde die Notwendigkeit zur Suche nach suffizienteren Therapiealternativen im Forschungsbereich intensiviert.

Große Bemühungen wurden deshalb zuletzt in die Erforschung der Signalwege und Schlüsselproteine, welche die intrazellulären Abläufe von Wachstum, Apoptose, DNA-Reparatur, Differenzierung und Proliferation wesentlich beeinflussen, investiert. Die Sektion Molekulare Onkologie des UKSH, Campus Kiel befasst sich intensiv mit der Erforschung möglicher Ursachen und Behandlungsstrategien der Apoptoseresistenz in Pankreaskarzinomzellen. In der Vergangenheit konnten bereits mehrere Mechanismen, die größtenteils auch synergistisch wirken, identifiziert werden [31][32][35][43][45][50].

Ergebnisse darunter zeigen, dass einige in die Regulationswege von Zellwachstum und Apoptose eingebundene Proteine in Pankreas-Tumorzellen beeinträchtigt sind, darunter PKC μ /PKD1 [31], p53 [37][38] und Ras [39][40][41]. Es kommt auch zur vermehrten Expression antiapoptotischer Proteine, wie beispielsweise XIAP, c-IAP 1 und 2, oder verminderter Bildung proapoptotischer Proteine wie Bid und FADD [35]. Derzeit existieren nur wenige pharmakologische Substanzen, die imstande sind, das Tumorstadium wirkungsvoll zu hemmen und gleichzeitig die Zellen für die Apoptose zu sensitivieren. Deshalb ist es notwendig, den Einsatz von Pharmazeutika in der Behandlung von Pankreas-Tumoren, testweise auf neue Zielstrukturen anzuwenden.

Die Mitglieder der CK1-Familie sind einige dieser neuen Zielstrukturen. Untersuchungen der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Uwe Knippschild, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Uniklinikum Ulm oder die Übersichtsarbeit von Price et al. aus dem Jahre 2006 weisen auf die große Bedeutung dieses Regulatorproteins bei verschiedenen intrazellulären Signalwegen hin [21][23]. Es konnte bereits in einer Veröffentlichung im Jahre 2005 gezeigt werden, dass eine Inhibition der Casein-Kinasen 1δ und ϵ zu einem Zellzyklusarrest oder gar Apoptose führen kann [30]. Seitdem durch Knippschild et al. Veränderungen in Aktivitäts- und Expressionslevels dieser Kinasen in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden konnten [21], gelten sie als mögliche Zielstrukturen zur suffizienteren Behandlung therapieresistenter Malignome, wie des Panreaskarzinoms.

5.2. DIE CASEIN-KINASEN 1δ UND ϵ WERDEN IN PANKREASKARZINOM-ZELLINIEN VERSTÄRKT EXPRIMIERT

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass CK1 δ/ϵ von Pankreas-Tumorzelllinien verstärkt exprimiert werden. Hierbei ist anzumerken, dass sich die Konzentrationen annähernd gleichen, es jedoch bei den niedriger malignen Phänotypen ASPC und Capan-1 leicht geringere Mengen zeigt.

Im Rahmen einer anderen Arbeit konnte durch Giamas et al. gezeigt werden, dass sich bei etwa gleichen Proteinlevels die kinasespezifische Aktivität jedoch um bis zum 6-fachen voneinander unterscheidet [49].

Es könnte also sein, dass eine höhere Konzentration der Casein-Kinasen oder eine gesteigerte Aktivität zu den Ausprägungsmerkmalen eines maligneren Phänotyps zählen.

5.3. DIE BEHANDLUNG MIT IC261 HEMMT DAS WACHSTUM VON PANKREASKARZINOM-ZELLEN

In Analogie zur der Hypothese, dass höhere Konzentrationen und vermehrte Aktivität der Casein-Kinasen einem maligneren Phänotyp bedingen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer Enzymihibition durch IC261 an Panc89-Zellen untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass CK1 δ/ϵ Einfluss auf Zellzyklus und –

teilung, sowie Apoptose haben kann [42][30]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von CK1 δ/ϵ -Inhibition auf Zellzyklus und Vitalität von Panc89-Zellen untersucht.

Die Inhibition von CK1 δ/ϵ durch IC261 hemmte effektiv das Zellwachstum der analysierten Zelllinie. Unsere FACS-Analyse legte deutlich offen, dass der überwiegende Anteil der Zellen 24 Stunden nach IC261-Behandlung in den G2/M-Zellarrest übergingen, und dass die Anzahl der toten Zellen in der sub-G1-Phase in den folgenden 24h nun deutlich anstieg. Allerdings konnten dosisabhängige Effekte von IC261 auf den Verlauf des Zellzyklus und die Apoptose festgestellt werden, wodurch die Rolle von zellulären Faktoren nochmals betont wurde [30][42].

5.4. BEHANDLUNG MIT IC261 UND CK1-7 SENSITIVIERT PANKREASKARZINOM-ZELLEN FÜR DEN CD95-VERMITTELTEN APOPTOSEWEG

Wie bereits erwähnt ist die Resistenz gegen die CD95-vermittelte Apoptose ein Charakteristikum von Pankreaskarzinom-Zellen [51]. In der Vergangenheit konnten durch die Arbeitsgruppe der Sektion für molekulare Onkologie am UKSH, Campus Kiel mehrere Ursachen hierfür gefunden werden und es wurde gezeigt, dass es über den CD95-vermittelten Apoptoseweg sogar zu einem schnelleren und vermehrt invasivem Wachstum kommen kann [45].

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels FACS-Analyse der bisherige Kenntnisstand bestätigt: Die untersuchten Tumorzelllinien zeigen sich weitgehend resistent gegen die CD95-vermittelte Apoptose. Nach vorheriger Behandlung mit den Kinase-Inhibitoren IC261 und CK1-7 zeigt sich jedoch eine Sensitivierung durch die Behandlung mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11. Es kommt zum vermehrten Zelltod. Durch das Zufügen des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk ist dieser Effekt weitgehend reversibel und wird daher als apoptotisch eingestuft.

5.5. BEHANDLUNG MIT IC261 UND CK1-7 FÜHRT ZUR VERMEHRTEN BID-SPALTUNG

Was könnte für die verbesserte Ansprechbarkeit der Tumorzellen für den CD95-vermittelten Apoptoseweg nach Inhibition der Casein-Kinase 1 δ/ϵ ursächlich sein? PDAC sind in Bezug auf die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose sogenannte Typ-II-

Zellen [43], womit sie, um die Apoptose einzuleiten, auf eine mitochondriale Signalverstärkung angewiesen sind. Eines der Schlüsselproteine in diesem Signalweg ist das im Zytosol vorkommende Bid, welches durch die Caspase 8 gespalten werden muss, um die mitochondriale Apoptosereaktion auszulösen [44]. Jüngst konnte nachgewiesen werden, dass CK1 und CK2 Bid-Protein phosphorylieren können, und dass die Aminosäuren, die phosphoryliert werden, in Nachbarschaft zur Caspase 8-Spaltstelle liegen [26]. Eine vermehrte Spaltung von Bid nach Behandlung mit IC261 und CK1-7 deutet darauf hin, dass die Casein-Kinasen δ und ϵ genau diese Schnittstelle durch Caspase 8 phosphoryliert und damit maskiert hatten.

5.6. BEHANDLUNG MIT IC261 UND CK1-7 FÜHRT ZUR VERMINDERTEN BILDUNG ANTIAPOPTOTISCHER PROTEINE

Die Fähigkeit der CK1 δ/ϵ -Inhibitoren Pankreastumorzellen für die CD95-vermittelte Apoptose zu sensitivieren, könnte ferner mit ihrer Wirkung, die antiapoptotischen Proteine, unter ihnen Bcl-xL und Mitglieder der IAP-Familie (c-IAP1, c-IAP2 und XIAP), die als direkte Caspaseinhibitoren wirken, herunterzuregulieren verbunden sein. Es wurde gezeigt, dass apoptoseresistente Pankreas-Tumorzellen verschiedene und synergistische Veränderung im Expressionslevel antiapoptotischer Proteine aufweisen [31][43]. Unter ihnen sind IAPs und Bcl-xL am häufigsten überexprimiert und tragen maßgeblich zum überaus resistenten Phänotyp bei.

Außerdem führt eine CD95-Stimulation in apoptoseresistenten Zellen eher zu vermehrter Invasivität, anstatt zum Zelltod [45].

Dies könnte *in vivo* wichtige Konsequenzen haben, nachdem bei Patienten, die an einem Pankreas-Tumor litten, erhöhte Serumspiegel von CD95-Liganden gemessen werden konnten [46]. Überdies könnten die von Zellen des Immunsystems produzierten CD95-Liganden, die Malignität von Tumor-Zellen gar erhöhen. Genau aus diesen Gründen könnte die medikamentöse Sensitivierung von Pankreas-Tumorzellen für die CD95-vermittelte Apoptose durch CK1-Inhibitoren, speziell IC261 und CK1-7 mit seiner proliferationshemmenden Wirkung und der Herunterregulation antiapoptotischer Proteine, einen großen zusätzlichen therapeutischen Nutzen mit sich bringen.

5.7. BEHANDLUNG MIT IC261 FÜHRT NICHT ZU VERBESSERTER ANSPRECHBARKEIT AUF GEMCITABIN ODER 5FU BEI PANKREASKARZINOM-ZELLEN

Im Gegensatz zum CD95-vermittelten Apoptoseweg konnte durch die Behandlung mit dem Casein-Kinase-Inhibitor IC261 keine Verbesserung der Ansprechbarkeit auf die Antimetabolite Gemcitabin und 5-Fluoruracil erreicht werden. Für die Versuchsreihe wurden neben Panc89-Zellen PancTuI-Zellen ausgewählt, die sich durch ihre besondere Chemoresistenz auszeichnen. In der durchgeführten FACS-Analyse konnte der Kombinationstherapie keine Überlegenheit zur Monotherapie attestiert werden.

5.8. FAZIT UND AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Hemmung Casein Kinasen $1\delta/\epsilon$ durch die Inhibitoren IC261 und CK1-7 das Wachstum von Pankreastumorzellen hemmt und die charakteristische Resistenz dieser Zellen gegen die CD95-vermittelte Apoptose reduziert. Die Behandlung mit IC261 und CK1-7 führt zu einem ansteigen proapoptotischer und einer Reduktion antiapoptotischer Proteine in Tumorzellen, jedoch nicht zu einer Effektivitätssteigerung im Sinne synergistischer Effekte bei der Kombinationstherapie mit den Chemotherapeutika Gemcitabin und 5-FU.

In der Publikation unserer Arbeitsgruppe, in der auch Teile dieser Arbeit veröffentlicht wurden, wurde analog zu den *in vitro*-Ergebnissen die Inhibition der antiapoptotischen und wachstumsstimulierenden Funktionen der Casein Kinasen $1\delta/\epsilon$ durch IC261 *in vivo* betrachtet. Hier fanden sich in immunhistochemischen Untersuchungen der Lymphknotenmetastasen von Pankreastumoren erhöhte Nachweisbarkeit von CK1 δ/ϵ , was vermuten lässt, dass eine Überexpression von CK1 zu aggressiverem Tumorwachstum führt [52]. Zudem konnte im Xenotransplantationsmodell mit Mäusen, denen PancTuI-Zellen subcutan injiziert wurden, gezeigt werden, dass Behandlungen mit IC261 oder Gemcitabin zu einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums und der Zellproliferation führten, die Kombinationstherapie mit beiden Substanzen jedoch keine additive Wirkung zeigte [52].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Ergebnisse der *in-vivo*-Versuche zeigen das Potential, durch die Inhibition der Casein Kinasen $1\delta/\epsilon$ das Wachstum von Pankreastumorzellen zu hemmen. Die Kombinationstherapie mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11 und IC261 kann derzeit aufgrund der systemischen Toxizität von CH11 nur *in-vitro* durchgeführt werden. Hier könnten jedoch weiterführende Therapieansätze Erfolg versprechen, die sich diese Erkenntnisse zu nutze machen. Außerdem könnte die tiefergehende Erforschung der genauen Strukturen, über die CK1 in intrazelluläre Regulationsmechanismen eingreift, neue Behandlungsansätze für die Therapie des apoptoseresistenten Pankreaskarzinoms darstellen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas ist ein in seiner Häufigkeit seltener auftretender, jedoch hochmaligner Tumor. Neben nicht ausreichenden Möglichkeiten zur Frühdiagnostik, besteht als wichtiger Malignitätsfaktor eine ausgeprägte Apoptoseresistenz. Tumorzellen entziehen sich dem CD95-vermittelten Signalweg zum programmierten Zelltod oder sprechen schlecht auf Chemotherapie wie z.B. mit Gemcitabin an. Als Ursache der Apoptose-Defizienz werden Veränderungen in den intrazellulären Signalkaskaden vermutet.

In dieser Arbeit wurden die Casein-Kinasen CK1 δ und ϵ als Schlüsselenzyme für die erhöhte Apoptoseresistenz identifiziert. Die Untersuchung verschiedener Pankreastumor-Zelllinien ergab, dass die Kinasen in allen stark exprimiert werden. Die in den Versuchreihen durchgeführte Hemmung der CK1 δ und ϵ durch die spezifischen Kinaseinhibitoren IC261 und CK1-7 führte zum einen in der Monotherapie zu einem verringerten Zellwachstum mit Zellzyklusarrest und vermehrter Apoptose und zum anderen in der Kombination mit dem CD95-Liganden CH11 zu einem verbesserten Ansprechen auf die CD95-vermittelte Apoptose.

Als mögliche Ursachen hierfür konnte eine vermehrte Spaltung des proapoptotischen Bid-Proteins, sowie eine verminderte Bildung antiapoptotischer Proteine nach Inhibition der CK1 δ/ϵ identifiziert werden.

Eine verbesserte Sensitivität der Tumorzellen gegenüber den etablierten Chemotherapeutika in der adjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms – dem Gemcitabin und dem 5-Fluoruracil – konnte durch die Behandlung mit IC261 nicht erreicht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten Antworten auf die Frage geben, welche Mechanismen möglicherweise mit zur Entstehung des apoptoseresistenten Phänotyp des Pankreaskarzinoms beitragen und an welchen Punkten eine Therapie zur wirksamen Behandlung dieser und anderer schwerer Erkrankungen ansetzen könnte.

7. LITERATUR

- [1] Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW (2005) **Annual report to the nation on the status of cancer, 1975 – 2002, featuring population-based trends in cancer treatment.** J Natl Cancer Inst, 97:1407-27
- [2] RKI und GEKID (2008), **Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends.** Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 6. überarbeitete Auflage
- [3] Sternheim ET, Voigt J, Kaspar W, Dippold WG (2000) **Das Pankreaskarzinom.** Der Internist, 41: 848-59
- [4] Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF (1996) **Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. Clinicopathologic analysis of 5-year survivors.** Ann Surg, 223: 273-9
- [5] Spitz FR, Abbruzzese JL, Lee JE, Pisters PW, Lowy AM, Fenoglio CJ, Cleary KR, Janjan NA, Goswitz MS, Rich TA, Evans DB (1997) **Preoperative and postoperative chemoradiation strategies in patients treated with pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma of the pancreas.** J Clin Oncol 15: 928-37
- [6] Schnall SF, MacDonald JS (1996) **Chemotherapy of adenocarcinoma of the pancreas.** Semin Oncol, 23: 220-8
- [7] Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, von Hoff DD (1997) **Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as firstline therapy for patients with advanced pancreatic cancer. A randomized trial.** J Clin Oncol, 15: 2403-13
- [8] Hart AR, Kennedy H and Harvey I (2008) **Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation.** Clin Gastroenterol Hepatol, 6: 275-82
- [9] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics.** Br J Cancer, 26: 239-57
- [10] Miyashita T and Reed JC (1993) **Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line.** Blood 81: 151-57
- [11] Igney FH and Krammer PH (2002) **Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.** Nature Rev Cancer, 2: 277-88
- [12] Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) **Cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.** EMBO J, 14: 5579-88

- [13] Esposti MD (2002) **The roles of Bid.** Apoptosis, 7: 433-40
- [14] Rathmell JC and Thompson CB (1999) **The central effectors of cell death in the immune system.** Annu Rev Immunol, 17: 781-828
- [15] Butler LM, Hewett PJ, Butler WJ and Cowled PA (1998) **Down-regulation of Fas gene expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement.** Br J Cancer, 77:1454-59
- [16] Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC, Liavaag PG, Jonsson R (1999) **Suppression of Fas receptor and negative correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma.** J Oral Pathol Med, 28: 82-87
- [17] Pulgar V, Tapia C, Vignolo P, Santos J, Sunkel CE, Allende CC, Allende JE (1996) **The recombinant alpha isoform of protein kinase CK1 from Xenopus laevis can phosphorylate tyrosine in synthetic substrates.** European Journal Biochem, 242: 519-28
- [18] Tuazon PT, Traugh JA (1991) **Casein kinase I and II – multipotential serine proteine kinases: structure, function and regulation.** Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 23: 123-64
- [19] Liu W, Xu ZH, Luo D, Xue HW (2003) **Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity.** Plant J, 36: 189-202
- [20] Gross SD, Anderson RA (1998) **Casein Kinase I. Spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family.** Cell Signal, 10: 699-711
- [21] Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Löhler J, Stöter M (2005) **The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes.** Cell Signal, 17: 675-89
- [22] Meek DW, Knippschild U (2003) **Posttranslational modification of mdm2.** Mol Cancer Res, 1: 1017-26
- [23] Price MA (2006) **CKI there's more than one: casein kinase 1 family members in Wnt and Hedgehog signaling.** Genes Dev, 20: 399-410

- [24] Cordenonsi M, Montagner M, Adorno M, Zaccigna L, Martello G, Mamidi A, Soligo S, Dupont S, Piccolo S (2007) **Integration of TGF-beta and Ras/MAPK signalling through p53 phosphorylation.** Science, 315: 840-3
- [25] Tsai IC, Woolf M, Neklason DW, Branford WW, Yost HJ, Burt RW, Virshup DM (2007) **Disease-associated casein kinase 1 delta mutation may promote adenomatous polyps formation via a Wnt/beta-catenin independent mechanism.** Int J Cancer, 120: 1005-12
- [26] Desagher S, Osen-Sand A, Montessuit S, Magnenat E, Vilbois F, Hochmann A, Journot L, Antonsson B, Martinou JC (2001) **Phosphorylation of Bid by casein kinase I and II regulates its cleavage by caspase 8.** Mol Cell, 8: 601-11
- [27] Izeradjene K, Douglas L, Delaney AB, Houghton JA (2004) **Casein Kinase I attenuates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by regulating the recruitment of Fas-associated death domain and procaspase-8 to the death-inducing signaling complex.** Cancer Res, 64: 8036-44.
- [28] Badura L, Swanson T, Adamowicz W, Adams J, Cianfrogna J, Fisher K, Holland J, Kleiman R, Nelson F, Reynolds L, St Germain K, Schaeffer E, Tate B, Sprouse J (2007) **An Inhibitor of casein kinase I ϵ induces phases delays in circadian rhythms und free-running and entrained conditions.** J Pharmacol Exp Ther, 322: 730-8
- [29] Mashhoon N, DeMaggio AJ, Tereshko V, Bergmeier SC, Egli M, Hoekstra MF, Kuret J (2000) **Crystal structure of a conformation-selective casein kinase I inhibitor.** J Biol Chem, 275: 20052-60
- [30] Stöter M, Bamberger AM, Aslan B, Kurth M, Speidel D, Löning T, Frank HG, Kaufmann P, Löhler J, Henne-Bruns D, Deppert W, Knippschild U (2005) **Inhibition of casein kinase I delta alters mitotic spindle formation and induces apoptosis in trophoblast cells.** Oncogene, 24: 7964-75

- [31] Trauzold A, Schmiedel S, Sipos B, Wermann H, Westphal S, Röder C, Klap- per W, Arlt A, Lehnert L, Ungefroren H, Johannes FJ, Kalthoff H (2003) **PKC μ prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells.** *Oncogene*, 22: 8939-47
- [32] Trauzold A, Wermann H, Arlt A, Schütze S, Schäfer H, Oestern S, Röder C, Ungefroren H, Lampe E, Heinrich M, Walczak H, Kalthoff H (2001) **CD95 and TRAIL receptor mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells.** *Oncogene*, 20: 4258-69
- [33] Sanz L, Sanchez P, Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Moscat J (1999) **The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation.** *Embo J*, 18: 3044-53
- [34] Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) **The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases.** *Embo J*, 16: 6914-25
- [35] Trauzold A, Schmiedel S, Röder C, Tams C, Christgen M, Oestern S, Arlt A, Westphal S, Kapischke M, Ungefroren H, Kalthoff H (2003) **Multiple and syner- gistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells.** *Br J Cancer*, 89: 1714-21
- [36] Westphal S, Kalthoff H, (2003) **Apoptosis: Targets in pancreatic cancer.** *Mol Cancer*; 2: 6
- [37] Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN (1994) **K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions.** *Cancer Res*, 54: 1556-60

- [38] Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE (1997) **Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma.** *Cancer Res*, 57: 1731-34
- [39] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M (1988) **Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes.** *Cell*, 53: 549-54
- [40] Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE (1994) **Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia.** *Cancer Res*, 54: 3568-73
- [41] DiGiuseppe JA, Hruban RH, Offerhaus GJ, Clement MJ, van den Berg FM, Cameron JL, van Mansfeld AD (1994) **Detection of K-ras mutations in mucinous pancreatic duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma.** *Am J Pathol*, 144: 889-95
- [42] Behrend L, Milne DM, Stöter M, Deppert W, Campbell LE, Meek DW, Knipschild U (2000) **IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and-epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects.** *Oncogene*, 19: 5303-13
- [43] Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, Walczak H, Kalthoff H, Ungefroren H (2000) **Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis.** *Oncogene*, 19: 5477-86
- [44] Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH, Peter ME (1998) **Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways.** *Embo J*, 17: 1675-87
- [45] Trauzold A, Röder C, Sipos B, Karsten K, Arlt A, Jiang P, Martin-Subero JI, Siegmund D, Mürköser S, Pagerols-Raluy L, Siebert R, Wajant H, Kalthoff H

(2005) **CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells.**

FASEB J, 19: 620-22

- [46] Bellone G, Smirne C, Carbone A, Mareschi K, Dughera L, Farina EC, Alabiso O, Valente G, Emanuelli G, Rodeck U (2000) **Production and pro-apoptotic activity of soluble CD95 ligand in pancreatic carcinoma.** Clin Cancer Res, 6: 2448-55
- [47] Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, Farraye FA, Joo HG, Goedegebuure PS, Eberlein TJ (2002) **Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape.** Cancer, 94: 2552-60
- [48] Sipos B, Möser S, Kalthoff H, Török V, Löhr M, Klöppel G (2003) **A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform.** Virchows Arch, 442: 444-52
- [49] Giamas G, Hirner H, Shoshiashvili L, Grothey A, Gessert S, Kühl M, Henne-Bruns D, Vorgias CE, Knippschild U, (2007) **Phosphorylation of CK1delta: identification of SER370 as the major phosphorylation site targeted by PKA in vitro an in vivo.** Biochem J, 406: 389-98
- [50] Ungefroren H, Kruse ML, Trauzold A, Roeschmann S, Roeder C, Arlt A, Henne-Bruns D, Kalthoff H (2001) **FAP-1 in pancreatic cancer cells: functional and mechanistic studies on its inhibitory role in CD95-mediated apoptosis.** J Cell Sci, 114(Pt 15): 2735-46
- [51] Ungefroren H, Voss M, Jansen M, Roeder C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H (1998) **Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis.** Cancer Res, 58: 1741-49
- [52] Brockschmidt C, Hirner H, Huber N, Eismann T, Illenbrand A, Giamas G, Radunsky B, Ammerpohl O, Böhm B, Henne-Bruns D, Kalthoff H, Leithäuser F, Trauzold A, Knippschild U (2008) **Anti-apoptotic and growth-stimulatory func-**

tions of CK1 delta and epsilon in ductal adenocarcinoma of the pancreas are inhibited by IC261 in vitro and in vivo. Gut, 57: 799-806

C U R R I C U L U M V I T A E



Benjamin Bohm

Humboldtstr. 125
D – 28203 Bremen

Telefon 0179 / 51 35 830
E-Mail b.bohm@web.de

Geburtstag 10. April 1980
Geburtsort Kiel
Nationalität deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1987 – 1991	Friedrich-Junge-Schule, Kiel
1991 – 1999	Gymnasium Kronshagen, Kiel
1999 – 2000	Kieler Gelehrtenschule, Kiel mit Abschluss Abitur (1,9)

Wehrdienst

2000 – 2001	Bundesmarine, Zerstörer „Lütjens“
-------------	-----------------------------------

Berufsausbildung

2001 – 2006	Vorklinisches Studium und Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel (Notendurchschnitt der Leistungsnachweise 1,9)
Aug 2006	Beginn des Praktischen Jahres Westküstenklinikum Heide – Innere Medizin Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel – Chirurgie Kantonsspital St. Gallen – Klinik für operative Orthopädie
April 2008	Medizinisches Staatsexamen, Note: Sehr gut

Berufserfahrung

Juni 2008 – Juni 2011	Assistenzarzt am Klinikum Links der Weser Sektion für Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie
-----------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------

Seit Juli 2011	Assistenzarzt an der Rolandklinik Bremen, Fachzentren für Wirbelsäulenchirurgie, Endoprothetik, Kinderorthopädie und allgemeine Orthopädie
Seit Januar 2013	Assistenzarzt am Lubinus Clinicum Kiel, Department Endoprothetik

Zusatzqualifikationen

November 2008	Erwerb des Fachkundenachweises „Strahlenschutz“
April bis November 2010	Teilnahme an Grund- und Aufbaukursen für Ultraschalldiagnostik des Abdomens, der Gefäße und des Bewegungsapparates (DEGUM-Zertifikat)
November 2010	Kurs Grundlagen der Intensivmedizin
Dezember 2010	Abschluss des chirurgischen „Common trunks“
Ab Oktober 2011	Weiterbildungscurriculum „Manuelle Medizin“
Februar 2012	Erwerb der Zusatzbezeichnung „Notfallmedizin“
April 2012	Zusatzqualifikation „Transfusionswesen“

Promotion

Seit 2004	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für molekulare Onkologie, Universitätsklinikum Kiel, Prof. Dr. Kalthoff Thema: Deaktivierung von Apoptoseresistenzmechanismen beim duktalem Pankreasadenokarzinom Publiziert in „GUT – International Journal of Gastroenterology and Hepatology“, 2008 57:799-806
-----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

EDV – Kenntnisse

SAP, PACS, MS-Office, Internet-Erfahrungen

Sprachkenntnisse

Englisch	Sehr gut in Wort und Schrift
Französisch	Grundkenntnisse

Sonstiges

Hobbies	Hockey (2004/5 zusätzlich Jugendtrainer), Skifahren, Kochen
---------	-------------------------------------------------------------

Kiel, November 2013

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Brockschmidt C, Hirner H, Huber N, Eismann T, Hillenbrand A, Giamas G, Radunsky B, Ammerpohl O, Bohm B, Henne-Bruns D, Kalthoff H, Leithäuser F, Trauzold A, Knippschild U
„Anti-apoptotic and growth-stimulatory functions of CK 1 delta and epsilon in ductal adenocarcinoma of the pancreas are inhibited by IC261 in vitro and in vivo.“
Gut, Jun 2008