

Sektion Molekulare Onkologie
Institut für Experimentelle Tumorforschung im Krebszentrum Nord – CCC
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts Universität zu Kiel

**EINFLUSS VON CATECHINGALLAT AUF PROLIFERATION UND TRAIL-
VERMITTELTE APOPTOSE VON PANKREASTUMORZELLEN**

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

vorgelegt von

DANIEL HEISE

aus

Düsseldorf

Kiel (2012)

Referent: Priv.-Doz. Dr. Trauzold, Klinik für Allgemeine
Chirurgie und Thoraxchirurgie

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Burger, Sektion für
Stammzelltransplantation und Immuntherapie

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2013

Zum Druck genehmigt: 18.12.2013

INHALT

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	DAS DUKTALE ADENOKARZINOM DES PANKREAS.....	3
2.2	APOPTOSEVORGÄNGE IM PANKREASKARZINOM.....	4
2.2.1	Apoptoseinitiation	4
2.2.2	Proteinregulation der Apoptose	5
2.2.3	Antiapoptotische Signalkaskaden.....	7
2.3	CATECHINGALLATE	7
2.4	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	8
3	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1	BEZUGSQUELLE DER CHEMIKALIEN	10
3.2	ZELLKULTURMEDIEN UND ZUSÄTZE	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
3.4	LABORMATERIALIEN UND GERÄTE	13
3.5	ZELLINIEN.....	14
3.6	ZELLKULTUR.....	15
3.6.1	Langzeitlagerung der Zellen.....	15
3.6.2	Auftauen, Kultivieren und Passagieren von Zellen	15
3.6.3	Zählen von Zellen	16
3.6.4	Einfrieren von Zellen.....	16
3.6.5	Behandlung der Zellen.....	16
3.7	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	16

3.7.1	Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen – RIPA-Lysate	16
3.7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	17
3.7.3	Protein-Gelelektrophorese	17
3.8	WESTERN BLOT UND IMMUNDETEKTION	18
3.8.1	Western Blot	18
3.8.2	Immundetektion.....	19
3.9	ERMITTLUNG DER PROLIFERATIONSGESCHWINDIGKEIT	19
3.10	MESSUNG DER [³ H]-THYMININKORPORATION	20
3.11	VITALITÄTSMESSUNG DURCH KRISTALLVIOLETT-INKORPORATION	21
3.12	DNA-FRAGMENTATIONSASSAY (JAM-ASSAY)	21
3.13	ZYTOKIN-ARRAY	22
3.14	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ZELLYKLUSANALYSE.....	23
3.15	HÖCHST-FÄRBUNG	25
3.16	ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA).....	25
4	ERGEBNISSE	27
4.1	EFFEKTE VON CATECHINGALLAT AUF PROLIFERATION UND APOPTOSE VON PANCTUI UND BxPC3 ZELLEN.....	27
4.1.1	Catechingallat reduziert die Proliferationsgeschwindigkeit von PancTuI und BxPC3.....	27
4.1.2	Catechingallat hemmt den Einbau des Proliferationsmarkers [³ H]- Thymidin in die DNA von PancTuI und BxPC3.....	29
4.2	EINFLUSS VON CG AUF DIE ZYTOKINSEZERNIERUNG VON BxPC3 UND PANCTUI	34
4.3	CATECHINGALLAT SENSIBILISIERT PANCTUI UND BxPC3 GEGENÜBER TRAIL INDUZierter APOPTOSE	36
4.3.1	Einfluss von Catechingallat auf die antiapoptotischen Proteine XIAP, cIAP-2, Survivin und Bcl-X _L	43
4.3.2	Regulation von NF-κB und TRAF-2 durch Catechingallat.....	46
5	DISKUSSION	49

5.1	EINFLUSS VON CATECHINGALLAT AUF PROLIFERATION UND APOPTOSE VON PANKREASTUMORZELLEN.....	49
5.2	MODULATION DER ZY TOKINSEZERNIERUNG DURCH CG.....	53
5.3	EINFLUSS VON CG AUF DIE APOPTOSEKASKADE NACH TRAIL STIMULATION	56
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	60
7	LITERATUR.....	64
8	ANHANG.....	72
8.1	ZY TOKIN-ARRAY.....	72
9	DANKSAGUNGEN.....	74
10	LEBENS LAUF.....	75

1 Abkürzungsverzeichnis

AP-1	activator protein 1
BcL	B-cell lymphoma
BID	BH3 interacting domain death agonist
CG	catechingallate
clAP-2	cellular inhibitor of apoptosis protein 2
CXCL-16	CXC chemokine ligand
DISC	death inducing signaling complex
DMSO	dimethylsulfoxide
EC	epicatechin
ECG	epicatechin-3-gallate
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGC	epigallocatechin
EGCG	epigallocatechin-3-gallate
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMSA	electric mobility shift assay
FADD	Fas associated protein with death domain
Fas-L	Fas-Ligand
FCS	fetal calf serum
HCC-4	hemofiltrate CC-chemokine
hENT1	human equilibrative nucleoside transporter 1
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma

IAP	inhibitor of apoptosis protein
IL-6R	Interleukin-6 receptor
IL-9	Interleukin-9
JAM	just another method
MDC	macrophage derived chemokine
NF- κ B	nuclear factor – κ B
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PVDF	polyvinylidene fluoride
RING	really interesting new gene
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RT	Raumtemperatur
TBST	Tris-buffered saline with tween
TNF	tumor necrosis factor
TRAF	tumor necrosis factor receptor associated factor
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
XIAP	x-linked inhibitor of apoptosis protein

2 Einleitung

2.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom ist die häufigste Neoplasie des Pankreas und für 85 % der Tumorerkrankungen der Bauchspeicheldrüse verantwortlich (Li et al. 2004). Außerdem ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas ein hochmaligner Tumor mit einer sehr schlechten Prognose. Bei einer Inzidenz von 10 Fällen auf 100.000 Personen ist das Pankreaskarzinom bei Frauen die viert- und bei Männern die fünfthäufigste tumorbedingte Todesursache (Jemal et al. 2007). Die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit Pankreaskarzinom ist niedriger als 5 %, die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung etwa 6 Monate (Schneider et al. 2005). Gründe hierfür sind eine späte Diagnose wegen fehlender Frühsymptomatik sowie die frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung. Häufig wird der Tumor erst nach Auftreten eines Ikterus in fortgeschrittenem Stadium entdeckt. So sind beim Zeitpunkt der Diagnosestellung 50 % der Pankreaskarzinome bereits fernmetastasiert (Jemal et al. 2007). Der einzige kurative Therapieansatz ist weiterhin die chirurgische Duodenopankreatektomie. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt jedoch auch nach chirurgischer Therapie mit kurativem Ansatz nicht mehr als 20 % (Schneider et al. 2007). Ursache für die mangelnden Therapiealternativen ist die Resistenz des Pankreaskarzinoms gegen andere onkologische Behandlungen wie Chemotherapie, Radiatio oder Immuntherapie (von Bernstorff et al. 1999, Andren-Sandberg et al. 1997, Von Bernstorff et al. 2001). Die meisten Chemotherapien wirken über eine Induktion des kontrollierten Zelltodes, der „Apoptose“. Verantwortlich für die Resistenz des Pankreaskarzinoms gegenüber diesen Therapien ist hauptsächlich eine erhöhte Apoptoseunempfindlichkeit (Schulze-Bergkamen et al. 2004).

2.2 Apoptosevorgänge im Pankreaskarzinom

Die Apoptose beschreibt den programmierten Zelltod, der im Gegensatz zur Nekrose von der Zelle selbst aktiv durchgeführt wird und somit Teil des regulären Zellstoffwechsels ist. Die Apoptose ist unentbehrlich für die Eliminierung von überzähligen, beschädigten oder infizierten Zellen (Igney et al. 2002, Okada et al. 2004). Die zentrale Rolle bei der Ausführung der Apoptose spielen Enzyme mit proteolytischer Aktivität, die Caspasen. Caspasen werden in ihrer inaktiven Pro-Form synthetisiert und durch Spaltung aktiviert. Neben gegenseitigem Spalten und Aktivieren sind bestimmte Caspasen, die Effektorcaspasen, in der Lage die typischen morphologischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle wie Schrumpfen und Chromatinkondensierung durch Abbau von Lamin in der Zellkernmembran und von Aktin am Zytoskelett sowie durch Unterdrücken von DNA-Reparaturvorgängen zu induzieren. Die Hauptakteure dieser zellulären Vorgänge sind die Effektorcaspasen -3, -6, und -7 (Degterev et al. 2003).

2.2.1 Apoptoseinitiation

Die Einleitung der Apoptose erfolgt über zwei verschiedene Wege, einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg, die beide in einer Aktivierung der Effektorcaspasen münden. Beim intrinsischen Weg, auf den hier nicht weiter eingegangen werden soll, nimmt das Mitochondrium eine Schlüsselposition bei der Apoptoseinitiation ein. Der extrinsische Weg wird mithilfe von sogenannten Todesrezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie auf der Zelloberfläche vermittelt. Nach Binden von rezeptorspezifischen Liganden wie TNF- α , Fas-L oder TRAIL, kommt es zu einer Trimerisierung und anschließenden Rekrutierung von FADD, Procaspase-8 und -10 zur sogenannten Todesdomäne. Diese Domäne bildet über die Initiatorcaspase-8 den „death-inducing signaling complex“ (DISC) und aktiviert anschließend

die Effektorcaspase-3 (Walczak et al. 2000). Die aktivierte Initiatorcaspase-8 kann außerdem das proapoptotische Bcl-2 Protein BID spalten, das daraufhin an die Mitochondriummembran bindet und diese schädigt. Durch den Verlust des Membranpotentials werden apoptogene Faktoren freigesetzt (Igney et al. 2002). Dies bewirkt schließlich die Bildung des Apoptosoms, ein Multiproteinkomplex, der über die Initiatorcaspase-9 die Effektorcaspase-3 aktiviert (Adams et al. 2007).

Nach extrinsischer, ligandeninduzierter Apoptoseinitiation ist es also möglich Zellen hinsichtlich ihrer Apoptosekaskade in Typ I und Typ II Zellen zu charakterisieren. Bei Typ I Zellen reicht die alleinige Induktion einer Initiatorcaspase aus, um die Effektorcaspase zu aktivieren und die Apoptose auszulösen. Bei Typ II Zellen ist hingegen die Verstärkerfunktion des Mitochondriums essenziell, da hier auf Ebene des DISC, nur geringe Mengen der Initiatorcaspase-8 direkt aktiviert werden und dies nicht zur Fortführung der Apoptosekaskade ausreicht (Scaffidi et al. 1998). Zellen des duktales Adenokarzinoms des Pankreas können dem Typ II zugeordnet werden (Hinz et al. 2000).

2.2.2 Proteinregulation der Apoptose

Wie unter 2.2.1 beschrieben, bindet beim extrinsischen Weg der Todesrezeptor seinen Liganden zur Bildung des DISC, über den die Apoptose initiiert wird. Diese Liganden, insbesondere die TRAIL vermittelte Aktivierung dieser Form der Apoptosekaskade, sind Gegenstand intensiver Forschung. Walczak et al bemerkten 1999, dass Tumorzellen sensibel auf TRAIL vermittelte Apoptose reagieren, während sich normal differenziertes Gewebe TRAIL-unempfindlich verhält. Für das duktales Adenokarzinom des Pankreas wurde jedoch trotz einer Expression des TRAIL-Rezeptors auf der Zelloberfläche eine Resistenz gegen die TRAIL vermittelte Apoptose demonstriert (Hinz et al. 2000).

Dafür verantwortlich ist vor allem eine veränderte Proteinregulation der Apoptosekaskade. Antiapoptotische Proteine zeigten sich in vermehrter Konzentration, proapoptotische Proteine dagegen vermindert. Dies zeigt sich zum Beispiel in der Deregulation von Proteinen der Bcl-2 Familie. In Pankreastumorzellen konnte eine Überexpression von Bcl-X_L gezeigt werden. Bcl-X_L ist in der Lage, Pankreastumorzellen gegen die TRAIL-vermittelte Apoptose zu schützen, indem es den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verhindert und die Aktivität der Effektorcaspase-3 hemmt. Bei Inhibition von Bcl-X_L reagierten die Zellen mit erhöhter Apoptosesensitivität (Hinz et al. 2000). Eine andere Proteinfamilie, die Apoptose entgegenwirkt, ist die der Inhibitor of apoptosis proteins. Bei den IAPs XIAP und cIAP-2 handelt es sich um E3 Ubiquitin-Proteinligasen, die die in Pankreastumorzellen nicht dysregulierten Caspasen ubiquitinieren können und so deren Degradation auslösen (Gerhard et al. 2002, Suzuki et al. 2001). Nach Herunterregulation von cIAP-2 und XIAP mittels RNA-Interferenz konnte eine Sensibilisierung von Pankreastumorzellen gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin, Doxorubicin und Paclitaxel nachgewiesen werden (Lopes et al. 2007). Ein weiteres IAP ist das Protein Survivin, das selektiv in Pankreastumorzellen auftritt. In normal differenziertem Gewebe des Pankreas ist es hingegen bisher nicht nachgewiesen worden (Satoh et al. 2001). Survivin greift in die Kontrolle von Mitosevorgängen ein und ist so in der Lage Apoptose zu unterdrücken (Altieri et al. 2008). Wird Survivin mittels RNA-Interferenz herunterreguliert, so reagieren Pankreastumorzellen mit einer gesteigerten Sensitivität für TRAIL-vermittelte Apoptose. Survivin wird abhängig vom Zellzyklus exprimiert. In der späten G1-Phase ist es in nur niedriger Konzentration vorhanden, so dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit für TRAIL-vermittelte Apoptose aufweisen (Retzer-Lidl et al. 2007).

2.2.3 Antiapoptotische Signalkaskaden

Ein weiterer wichtiger Mechanismus für die Apoptoseresistenz des Pankreaskarzinoms ist die Induktion antiapoptotischer Signalkaskaden nach Binden des Liganden an den Todesrezeptor. In Pankreastumorzellen führt insbesondere die Aktivierung des Faktors NF- κ B zu einer erhöhten Resistenz gegen TRAIL-vermittelte Apoptose (Trauzold et al. 2001). NF- κ B ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus den Untereinheiten p50 und p65 besteht. Nach Translokation in den Zellkern bindet NF- κ B an die DNA und löst dort die vermehrte Expression seiner Zielgene aus. Dazu gehören unter anderem die oben beschriebenen antiapoptotischen Proteine Bcl-X_L und IAPs (Chen et al. 2000, Wang et al. 1998). Ein wichtiger Faktor bei der Aktivierung von NF- κ B sind Proteine der TRAF-Familie. TRAF-2 ist an der Transduktion des antiapoptotischen Signals nach Binden des Liganden an den Todesrezeptor beteiligt. Insbesondere in apoptoseresistenten Pankreastumorzellen ist TRAF-2 überexprimiert. Bei erhöhter TRAF-2 Expression kann sowohl eine erhöhte konstitutive NF- κ B Aktivität als auch ein gesteigertes Invasivitätspotential beobachtet werden (Trauzold et al. 2005).

2.3 Catechingallate

Aufgrund der immer noch hohen Mortalität und der niedrigen Überlebensrate des dukalen Adenokarzinoms des Pankreas werden verstärkt Alternativen zu etablierten Therapien gesucht. Als besonders vielversprechend gelten bestimmte polyphenole Inhaltsstoffe aus grünem Tee. Die Polyphenole des grünen Tees sind die Catechine, dazu gehören hauptsächlich Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin-3-gallat (ECG), Epicatechin (EC) und Catechingallat (CG) (Zeeb et al. 2000). Sie machen 30-42 % des Trockengewichts der Feststoffe von aufgegossenem grünem Tee aus (Mukhtar et al. 1999).

In einer Vielzahl von Studien konnte festgestellt werden, dass Catechine die Entwicklung von Tumoren verzögern und das Wachstum vorhandener Tumoren verlangsamen können (u.a. Khan et al. 2007). Die meisten Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Catechin EGCG, dessen antikarzinogene Effekte auch in experimentellen in-vitro Untersuchungen nachgewiesen werden konnten. Die Proliferation und das Invasivitätspotential der Pankreastumorzelllinien Panc-1, MIA PaCA-2 und BxPC3 war nach der Behandlung mit EGCG signifikant reduziert (Takada et al. 2002). Zudem induzierten Catechingallate die Membrandepolarisation von Mitochondrien von Pankreastumorzellen sowie die Caspase-abhängige Apoptose. Dieser Effekt wurde unter anderem auf eine Herunterregulation von XIAP zurückgeführt. (Qanungo et al. 2005). Für die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP konnte nach der Vorbehandlung mit EGCG eine Modulation der IAP und Bcl-2 Proteinexpression gezeigt werden, die zu einer Sensibilisierung für TRAIL-vermittelte Apoptose führte (Siddiqui et al. 2008).

Antiproliferative Effekte werden jedoch nicht nur von EGCG, sondern auch von Catechingallat (CG) ausgelöst. Beispielsweise konnte für Karzinome im Bereich der Mundhöhle gezeigt werden, dass CG ein höheres antiproliferatives Potential als EGCG besitzt (Babich et al. 2007).

2.4 Fragestellung der Arbeit

Zu Beginn dieser Untersuchung war über die Effekte von CG auf Pankreaskarzinomzellen noch nichts bekannt. Aufgrund der positiven Ergebnisse der obengenannten Arbeit von Babich et al. von 2007 bezüglich der Wirkung von CG auf Karzinome der Mundhöhle ließ sich vermuten, dass CG auch auf Pankreastumorzellen ein antikarzinogenes Potential aufweisen könnte.

In dieser Arbeit wurde das antikarzinogene Potential von CG anhand der

Wirkung auf die Pankreastumorzelllinien PancTul und BxPC3 untersucht. Im Vordergrund standen dabei folgende Fragestellungen:

- Ist mithilfe von CG eine Inhibition der Proliferation zu erreichen und auf welchem Mechanismus beruht diese?
- Welchen Einfluss hat CG auf die zelluläre Zytokinsekretion?
- Bewirkt CG eine Sensibilisierung für TRAIL-vermittelte Apoptose?
- Welche Wirkung hat CG auf die zelluläre Regulierung der Apoptosekaskade?
- Wie beeinflusst CG den Ablauf der antiapoptotischen Signalkaskade?

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsquelle der Chemikalien

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
(-)-Catechin-3-gallat (CG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biochrom KG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
ECL™/ECL™plus (enhanced chemiluminescence)	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien
Ethanol	Merck, Darmstadt
Gelshift NFκB (Carcinoma) Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methyl- ³ H-Thymidin	Amersham, Braunschweig
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco's	Life Technologies, Eggenstein

Proteinase Inhibitor Cocktail	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rainbow Marker, RPN 756	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
RayBio Human Cytokine Antikörper Array (C Serie 1000)	Raybiotech, Hölzel Diagnostik GmbH, Köln
RNase A	Roche, Basel, Schweiz
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Life Technologies, Eggenstein
Tween	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

3.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Fötales Kälberserum (FCS)	Hyclone, Logan, UT, USA
L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
Natrium-Pyruvat	Life Technologies, Eggenstein
Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Life Technologies, Eggenstein
Trypsin 0,05 % - EDTA 0,02 %	Life Technologies, Eggenstein

3.3 Antikörper und rekombinante Proteine

3.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Wirt	Einsatz	Hersteller
Anti- β -Aktin	Maus (monoklonal)	Western Blot	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Anti-Bcl-X _L	Kaninchen (polyklonal)	Western Blot	PharMingen, Hamburg
Anti-Bid (C-20)	Ziege (polyklonal)	Western Blot	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Caspase-3	Maus (monoklonal)	Western Blot	BD Biosciences, New Jersey, USA
Anti-clAP2	Kaninchen (polyklonal)	Western Blot	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Survivin (6E4)	Maus (monoklonal)	Western Blot	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-TRAF2	Maus (monoklonal)	Western Blot	BD Pharmingen, Kalifornien, USA
Anti-XIAP	Kaninchen (polyklonal)	Western Blot	R&D Systems, Wiesbaden

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Kaninchen-HRP-gekoppelt	Esel (polyklonal)	Western Blot	Amersham Life Science, Braunschweig
------------------------------	-------------------	--------------	-------------------------------------

Anti-Maus-HRP-gekoppelt	Schaf (polyklonal)	Western Blot	Amersham Life Science, Braunschweig
Anti-Ziege-HRP-gekoppelt	Esel (polyklonal)	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-Maus, FITC-gekoppelt	Esel (polyklonal)	FACScan	Jackson Immuno Research Labs, USA

3.3.3 Rekombinante Proteine

TRAIL (Thr-95-Gly-281)	R&D Systems, Wiesbaden
------------------------	------------------------

3.4 Labormaterialien und Geräte

4-20 % Tris-Glycine SDS Gel	Life Technologies, Eggenstein
Aida Imaging Software	Raytest GmbH, Straubenhardt
Casy 1 Zellzähler	Schärfe System, Reutlingen
CCD-Kamera, LAS-3000	Fujifilm GmbH, Düsseldorf
CellQuest Software	BD Biosciences, New Jersey, USA
Hyperfilm RPN 1674K	Amersham Life Science, Braunschweig
Curix 60 Entwickler	Agfa, Dübendorf

FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
Liquid Scintillation Counter	Wallace Oy, Turku, Finnland
PVDF Membran, Immobilon-P	Milipore, Eschborn
Wet Blot-Kammer, Mini Trans Blot Cell	Bio Rad Laboratories, München
Zellharvester	Skatron, Lier, Norwegen

3.5 Zelllinien

Alle untersuchten Zelllinien sind menschlichen Ursprungs. Die angegebene Charakterisierung ist einer vergleichenden Veröffentlichung von Sipos et al. (2003) entnommen.

Zelllinie	Ursprung	Malignität	Erstbeschreiber
PancTul	Pankreaskarzinom Primärtumor	Grad II-III	M.v.Bülow, Deutschland
BxPC3	Pankreaskarzinom Primärtumor	Grad II	M.H. Tan, USA

3.6 Zellkultur

3.6.1 Langzeitlagerung der Zellen

Die Zellen wurden in fötalem Kälber-Serum (FCS) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigen Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt.

3.6.2 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 1420 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 15 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden nun erneut abzentrifugiert, in 5 ml Medium resuspendiert und in einer 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 untersucht 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 1 % 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 1420 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in Medium resuspendiert und die Zellen im Verhältnis 1:5 (BxPC3, PancTul) neu ausgesät oder bei Bedarf zu diesem Zeitpunkt für eine gezielte Aussaat gezählt (s. 3.6.3).

Alle zwei Wochen und vor jedem Einfrieren neuer Aliquots wurden die Zellen auf Kontamination mit Mycoplasmen mittels PCR (kommerzielles Mycoplasmen Testkit) getestet.

3.6.3 Zählen von Zellen

Die Zellen in den Kulturflaschen wurden trypsiniert und ein Aliquot (50 µl) für die Zellzählung mit dem automatischen Zellzähler Casy 1 verwendet. Das Aliquot wurde in 5 ml Casiton-Trägerflüssigkeit gegeben. Für die Zellzählung wurden 400 µl dieser verdünnten Suspension verwendet. Die endgültige Zellzahl in Zellen/ml wurde durch Multiplikation des gemessenen Wertes mit dem Faktor 100 ermittelt.

3.6.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden jeweils 1×10^6 Zellen auf 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 so bei –80 °C eingefroren. Innerhalb der nächsten sieben Tage wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

3.6.5 Behandlung der Zellen

Für die Behandlungen der Zellen wurde Catechingallat als reine Substanz in steriler wässriger Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Extraktion von Gesamtprotein aus Zellen – RIPA-Lysate

Zur Gewinnung von Gesamtprotein aus Zell-Lysaten wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und der Überstand abgesaugt. Zur

eigentlichen Lyse wurden die Zellen mit eiskaltem RIPA-Puffer (100 µl/6-Well) für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Verbesserung der Lysis-Effizienz wurden die Lysate nun für mindestens eine Stunde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, auf Eis langsam wieder aufgetaut, anschließend in Eppendorf Röhrchen überführt und zur Homogenisierung durch eine 26 Gauge Nadel zehnmal aspiriert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 1430 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der Überstand, das Zelllysat, in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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.

3.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein kommerzieller Proteinassay der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.7.3 Protein-Gelelektrophorese

Denaturierende diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)

Die qualitative und semiquantitative Überprüfung von Zellextrakten mittels Western-Blot-Analyse erforderte eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Für die Auftrennung wurden gebrauchsfertige ProGel-Tris-Glycin 4-20 % Polyacrylamid-Gradientengele verwendet. Die Proben (RIPA-Lysate) wurden mit 4x Lämmli Puffer versetzt, mit RIPA-Puffer auf gleiches Volumen gebracht, bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min denaturiert, kurz anzentrifugiert, aufgetragen und bei 125 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Identifikation der Proteingröße wurde ein Molekulargewicht Marker (Rainbow Marker)

verwendet.

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

3.8 Western Blot und Immundetektion

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

3.8.1 Western Blot

Für den Transfer der Proteine wurde das Wet-Verfahren unter Benutzung einer Blotting-Kammer angewendet. Als Ziel für die Proteine wurde 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-Kammereinsatzes. Ihr folgten zwei Lagen eines auf Gelmaße zugeschnittenen und mit Blotting-Puffer durchtränkten Whatman 3MM-Papieres. Weiterhin folgten die PVDF-Membran, das Gel und schließlich zwei weitere Lagen des Whatman 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 für 1 h bei 400 mA auf Eis.

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

3.8.2 Immundetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur bzw. für 12 h bei 4 °C mit Blockierungspuffer unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung nach Herstellerangaben entsprechend des Vorgehens bei der Blockierung. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit dem in Antikörperpuffer gelöstem sekundären Konjugat-Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Wiederholung des beschriebenen Waschvorganges wurde die Membran mit einem Chemilumineszenz Substrat (ECL™ bzw. ECLplus™) inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte nach Exposition der Membran gegenüber einem Röntgenfilm und anschließender Entwicklung. Die densitometrische Analyse der Banden erfolgte mit dem Programm ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)

Ein Liter TBST-Lösung (10x) enthält 12,11 g Tris, 87,66 g NaCl, 5 ml Tween-20.

Als Blockierungspuffer diente eine 5%ige Lösung aus Magermilchpulver in TBS-T (1x).

Antikörperpuffer enthält TBST (1x) und 0,5% Magermilchpulver.

3.9 Ermittlung der Proliferationsgeschwindigkeit

Zur Ermittlung der Proliferationsgeschwindigkeit wurden die Zellen mit einer Dichte von $2,8 \times 10^4$ pro Well auf eine 24-Well-Platte in FCS-haltigem Medium ausgesät. Nach 24 Std Wachstumszeit (Zeitpunkt 0) wurden die Zellen mit Catechingallat in Konzentrationen von 80, 20, 5 und 1,25 μM behandelt. Zum Zählen wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums

zunächst mit 300 µl PBS gewaschen und dann für 1 h bei Raumtemperatur mit 300 µl Accutase inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit einer Pipette 10 mal aspiriert. Die Zellzahl des so homogenisierten Aliquots wurde nun mit Hilfe des automatischen Zellzählers CASY 1 ermittelt. Außer zum Zeitpunkt 0 wurde die Zellzahl nach 7 h, 24 h, 31 h, 48 h und 55 h bestimmt. Aus dem Mittelwert von drei (je ein Well einer 24-Well-Platte) unabhängig voneinander gezählten Proben wurde anschließend das jeweilige Ergebnis ermittelt.

3.10 Messung der [³H]-Thymidininkorporation

Die Messung der [³H]-Thymidininkorporation wurde zur Quantifizierung der DNA-Syntheserate verwendet. Hierzu wurden auf einer 96well-Platte $1,0 \times 10^4$ Zellen von PancTul und BxPC3 ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit CG in unterschiedlichen Konzentrationen für weitere 24 Stunden behandelt. Nun wurden die Zellen mit dem radioaktiv markierten Nukleotid [³H]-Thymidin markiert („gelabelt“). Dazu wurden auf jedes Well 10 µl einer Lösung aus 9,5 µl Medium und 0,5 µl [³H]-Thymidin zupipettiert. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide in das Genom der Zellen erfolgte in 3 h. Die Inkubation wurde nun mit einer Lyse der Zellen beendet. Hierzu wurden 100 µl einer 0,1 %igen SDS-Lösung zu jedem Well pipettiert und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Die Inhalte der Wells mit den nun vollständig lysierten Zellen wurden in einem Zell-Harvester über eine Filtermatte gesogen, wobei fragmentierte DNA-Moleküle den Filter passieren konnten und unfragmentierte intakte DNA-Moleküle in der Filtermatte verblieben. Die eingebaute Radioaktivität dieser unfragmentierten DNA wurde mittels eines Flüssigkeitsszintillationszählers von der in einer Plastikfolie mit Szintillationsflüssigkeit eingeschweißten Filtermatte gemessen.

3.11 Vitalitätsmessung durch Kristallviolett-Inkorporation

Zellen wurden zu $0,6 \times 10^4$ Zellen pro Well auf eine 96-Well Platte in jeweils 100 μl Medium ausgesät und nach 24 h mit Catechingallat behandelt. Die Behandlung mit Catechingallaten erfolgte für weitere 24 h. Nun wurden die Zellen für 8 h mit TRAIL in einer Konzentration von 100 ng /ml stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und 50 μl Kristallviolettlösung (0,5 %) in jedes Well gegeben. Die Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur und unter leichtem Schwenken inkubiert, dann fünfmal mit H_2O gewaschen und für 2-3 h an der Luft getrocknet. Der Farbstoff wird sowohl von vitalen als auch von avitalen Zellen inkorporiert, kann aber aus den avitalen Zellen mit H_2O wieder ausgewaschen werden. Zur Extraktion des von den vitalen Zellen inkorporierten Farbstoffes wurden 200 μl Methanol in jedes Well gegeben, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen. Der ermittelte Wert korreliert direkt mit der Dichte und der Vitalität der Zellen.

Kristallviolett-Lösung: 0,5 % Kristallviolett, 20 % Methanol, Aqua dest.

Die Resultate dieser Experimente wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel 2007. Die Signifikanz wurde mittels eines heteroskedastischen t-Tests berechnet, wobei ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant bezeichnet wurde.

3.12 DNA-Fragmentationsassay (Jam-Assay)

Der JAM-Assay wurde zur Quantifizierung der Apoptose-Rate verwendet. Hierzu wurden auf einer 96 Well-Platte $2,0 \times 10^4$ Zellen von PancTul und BxPC3 ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem radioaktiv markierten Nukleotid [^3H]-Thymidin „gelabelt“. Dazu wurden auf jedes Well 10 μl einer

Lösung aus 9,5 µl Medium und 0,5 µl [³H]-Thymidin pipettiert. Der Einbau der radioaktiven Nukleotide in das Genom der Zellen erfolgte über 3 Stunden. Danach wurde der Überstand von den Wells abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 80 µM Catechingallat für weitere 24 h behandelt und für weitere 8 h mit TRAIL 100 ng/ml stimuliert. Als Kontrollgruppe dienten Zellen, die parallel ausschließlich mit 100 µl Medium pro Well inkubiert wurden. Die Inkubation wurde nach 8 h mit einer Lyse der Zellen beendet. Hierzu wurden 100 µl einer 0,1%igen SDS-Lösung zu jedem Well pipettiert und für 30 min im Brutschrank belassen. Die Inhalte der Wells mit den nun vollständig lysierten Zellen wurden in einem Zell-Harvester (Skatron, Lier, Norwegen) über eine Filtermatte gesogen, wobei fragmentierte apoptotische DNA-Moleküle den Filter passieren konnten und unfragmentierte intakte DNA-Moleküle in der Filtermatte verblieben. Die eingebaute Radioaktivität dieser unfragmentierten DNA wurde mittels eines „Liquid Scintillation Counters“ (Wallace Oy, Turku, Finnland) von der in einer Plastikfolie mit Szintillationsflüssigkeit eingeschweißten Filtermatte gemessen. Die Apoptose-Rate berechnet sich wie folgt: Apoptose in Prozent = $100 - (E/S) \times 100$, wobei E (experimentell) für den DNA-Gehalt (gemessen als cpm: counts per minute) von Proben mit induzierter Apoptose steht und S (spontan) den DNA-Gehalt natürlicher, zellspezifischer Apoptose darstellt.

Die Resultate dieser Experimente wurden als Mittelwert ± Standardabweichung beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von Microsoft Excel 2007. Die Signifikanz wurde mittels eines heteroskedastischen t-Tests berechnet, wobei ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant bezeichnet wurde.

3.13 Zytokin-Array

Der Nachweis von Zytokinen in Überständen von BxPC3- und PancTul-Zellen erfolgte mit einem Zytokin-Array der Firma Raybiotech. Die Analyse

erfolgte mit Membranen, auf denen immobilisierte Antikörper gegen 174 verschiedene Zytokine gebunden waren. Je Behandlung (sowohl Kontrolle als auch mit 80 μM CG) wurden drei Membranen (Arrays VI, VII, VIII) gegen jeweils 60 bzw. 54 unterschiedliche Zytokine eingesetzt.

Zunächst wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well auf 6-Well Platten ausgesät. Nach 24 stündigem Anwachsen wurden die Zellen für weitere 24 h mit 80 μM CG in 1,6 ml serumfreiem Medium behandelt. Die Überstände wurden bei 14300 rpm und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Die Membranen wurden nun bei 4 °C für ca. 12 h mit jeweils 1 ml Überstand unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Membranen gewaschen und mit je 1 ml Biotin-konjugiertem Anti-Zytokin Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur entsprechend dem sich auf der jeweiligen Membran befindlichen immobilisierten Zytokin-Antikörper inkubiert. Nach Waschen der Membranen wurden diese nun mit HRP-konjugiertem Streptavidin für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des im obengenannten Kit enthaltenen Detektionspuffers und Exposition der Membranen mit einem Röntgenfilm (Amersham Life Science, Braunschweig). Nach Entwicklung des Röntgenfilms wurde dieser mit einer Fuji CCD-Kamera fotografiert. Die Intensität der so gemessenen schwarzen Spots wurde mit Hilfe der Aida Imaging Software (Raytest GmbH, Straubenhardt) relativ zu einer Positivkontrolle berechnet.

3.14 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Die Quantifizierung der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Der DNA-Gehalt wurde durch Anfärben mit dem stöchiometrisch in die DNA interkalierenden Farbstoff Propidiumjodid analysiert. Aufgrund der Bindung von PI an doppelsträngige DNA können die Zellen anhand der detektierten Fluoreszenz den jeweiligen Phasen des Zellzyklus zugeordnet werden. PI bindet jedoch unspezifisch und

könnte daher auch doppelsträngige RNA anzeigen. Um dies zu vermeiden werden die Zellen vor FACS Analyse mit RNase behandelt. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers der Firma Beckton-Dickinson mit einem Argon-Laser. Die Fluoreszenz von Propidiumjodid in 1×10^4 Zellen wurde im FL2-Kanal bei einer Wellenlänge von 585 nm ermittelt. Zur Zellzyklusanalyse wurde der FL2-W Kanal gegen den FL2-A Kanal in einem Dichte-Plot aufgetragen. Durch ein Gitter wurde in diesem Plot der Bereich markiert, welcher der gewünschten Zellpopulation entsprach. Anschließend wurde diese Population in einem Histogramm-Plot dargestellt, bei dem die gezählten Zellen gegen die PI-Fluoreszenz (FL2-A Kanal) aufgetragen wurden. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit dem Programm CellQuest® der Firma BD Biosciences.

Vorbereitung der Zellen zur Durchflusszytometrie

PancTul wurden zu $2,0 \times 10^5$ Zellen/Well auf 6-Well Platten ausgesät und für 24 h mit 80 μ M CG behandelt. Nach Überführen des Überstandes in ein 15 ml Falcon Gefäß wurden die Zellen einmal mit 1 ml PBS / 5 mM EDTA gewaschen und mit 1 ml 1% Trypsin gelöst. PBS und die Zellsuspension wurden zurück zu den entsprechenden Überständen gegeben und für 7 min bei 1800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das so erhaltene Pellet zweimal mit je 1 ml PBS / 5 mM EDTA gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml PBS / 5mM EDTA resuspendiert, mit 1 ml Ethanol versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugieren wie oben beschrieben wurde das Pellet nun in 500 μ l PBS / 5 mM EDTA + 20 μ g RNase A aufgenommen und ein weiteres Mal für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 500 μ l PBS / PI (100 μ g / ml) in FACS Röhren resuspendiert und dann 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

3.15 Höchst-Färbung

Die zytomorphologische Analyse von PancTul- und BxPC3-Zellen nach Inkubation mit 80 μM CG erfolgte mit Hilfe der Höchst-Kernfärbung und anschließender mikroskopischer Betrachtung. Der dabei verwendete Farbstoff Höchst 33342 bindet an adenin- und thymidinreiche Sequenzen, so dass sich spezifisch DNA im Zellkern anfärben lässt. Bei apoptotischen Zellveränderungen wird die Kondensierung des Chromatins in Form sogenannter apoptotic Bodies sichtbar. Der Farbstoff fluoresziert bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 360 nm.

Zunächst wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well auf 6-Well Platten ausgesät, wobei jedes Well ein Deckgläschen enthielt. Nach 24 h Anwachsen wurden die Zellen für jeweils 48 h mit 80 μM CG in 2 ml 10% FCS haltigem Medium behandelt. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Deckgläschen entnommen, mit PBS gewaschen und für 10 min bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ mit kaltem Methanol inkubiert. Die Präparate wurden ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und mit 70 μl Höchst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) für 45 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ angefärbt. Nach Abziehen der Färbelösung und dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 15 min wurden die Präparate auf Objektträger übertragen. Danach erfolgte die mikroskopische Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Carl Zeiss Jena, Jena) bei 200x Vergrößerung.

3.16 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Um die NF- κB -DNA-Bindungsaktivität zu ermitteln wurden Kernextrakte präpariert und ein EMSA durchgeführt. Vor Präparation der Zellkernextrakte wurden die PancTul Zellen für 24 h mit 80 μM CG vorbehandelt und dann für 8 h mit TRAIL stimuliert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mithilfe von 300 μl Lysepuffer (10 mM Hepes [pH 7,9], 19 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 1mM DTT, Proteaseinhibitor Mischtablette [Roche]) lysiert. Die

Zellysate wurden in 40 µl Zellekernextraktionspuffer (20mM Hepes [pH 7,9], 0,4 M NaCl, 0,4 mM EDTA, 1 mM DTT und einer Proteaseinhibitortablette [Roche]) resuspendiert und anschließend für 20 min auf Eis geschüttelt. Die Kernextrakte wurden nun für 5 min bei 4 °C herunterzentrifugiert und der Überstand bei -80 °C eingefroren. Zur Analyse der Extrakte wurde ein EMSA mittels des Gelshift NFκB (Carcinoma) Kits durchgeführt. Dies geschah in Übereinstimmung mit dem Herstellerprotokoll (Active Motif, Rixensart, Belgien). Die Proben wurden auf 6 % Polyacrylamid Gelen in 0,25 x borhaltigem Tris / EDTA aufgetrennt und getrocknet. Schließlich wurde ein Röntgenfilm mittels Autoradiographie belichtet. Die Durchführung dieses Versuches erfolgte in Zusammenarbeit mit der Medizinisch-Technischen Laboratoriumsassistenz der Arbeitsgruppe um Dr. Trauzold von der Sektion Molekulare Onkologie des Instituts für Experimentelle Tumorforschung im Krebszentrum Nord (CCC).

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von Catechingallat auf Proliferation und Apoptose von PancTul und BxPC3 Zellen

Bisher konnten wachstumshemmende Effekte von Polyphenolen außer Catechingallat auf in vitro Kulturen von Tumorzellen nachgewiesen werden (Khan et al. 2007). In dieser Arbeit wurde untersucht ob durch Catechingallat wachstumsinhibierende Effekte auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas beobachtet werden können. Im Folgenden wurde zunächst der Einfluss auf Proliferation und Apoptose der Pankreastumorzelllinien BxPC3 und PancTul genauer analysiert.

4.1.1 Catechingallat reduziert die Proliferationsgeschwindigkeit von PancTul und BxPC3

Zunächst wurde der Einfluss von Catechingallat auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien PancTul und BxPC3 untersucht. Um die Proliferationsgeschwindigkeit zu ermitteln, wurde die Anzahl der Zellen nach jeweils 7 h, 24 h, 31 h, 48 h und 55 h in Abhängigkeit der CG Konzentration gemessen und in Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Behandlung gesetzt. Sowohl bei PancTul als auch bei BxPC3 war ab einer Inkubationszeit von 24 h mit 80 μ M CG eine signifikante Hemmung der Proliferation nachzuweisen. Bei PancTul betrug die Zellzahl nach 48 h Behandlung mit 80 μ M CG nur noch 28,4 % der Kontrolle, bei BxPC3 waren es 62,8 % der Kontrolle. Nach 55 h stagnierte bei PancTul annähernd die Proliferation, während BxPC3 einen weiteren Rückgang der Zellzahl zeigte. Bei Inkubation mit niedrigeren CG-Konzentrationen wie 1,25 μ M, 5 μ M und 20 μ M CG konnte keine signifikante Reduktion der Proliferation festgestellt werden.

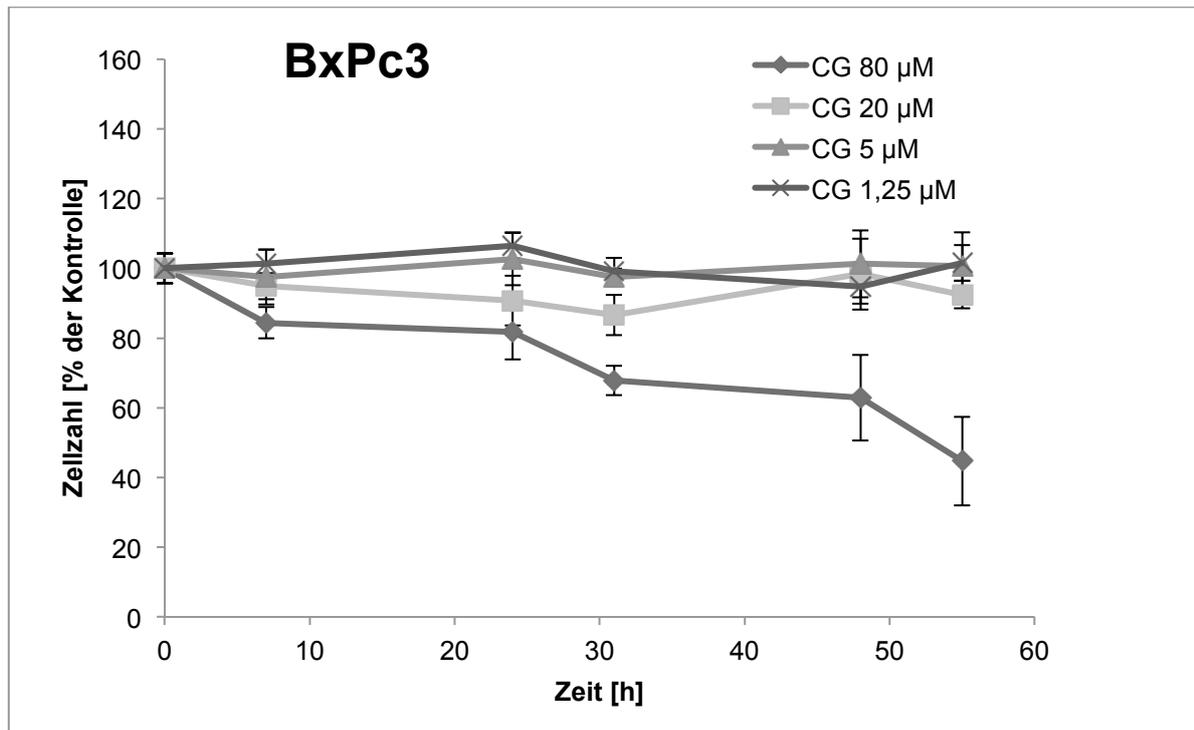


Abbildung 1: Einfluss von Catechingallat auf die Proliferationsgeschwindigkeit von BxPC3

BxPC3 Zellen wurden mit CG in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Anzahl der Zellen wurde mithilfe des Casy 1 Zählers nach 7 h, 24 h, 31 h, 48 h und 55 h bestimmt. Das jeweilige Ergebnis wurde aus dem Mittelwert dreier unabhängig voneinander gezählter Proben ermittelt.

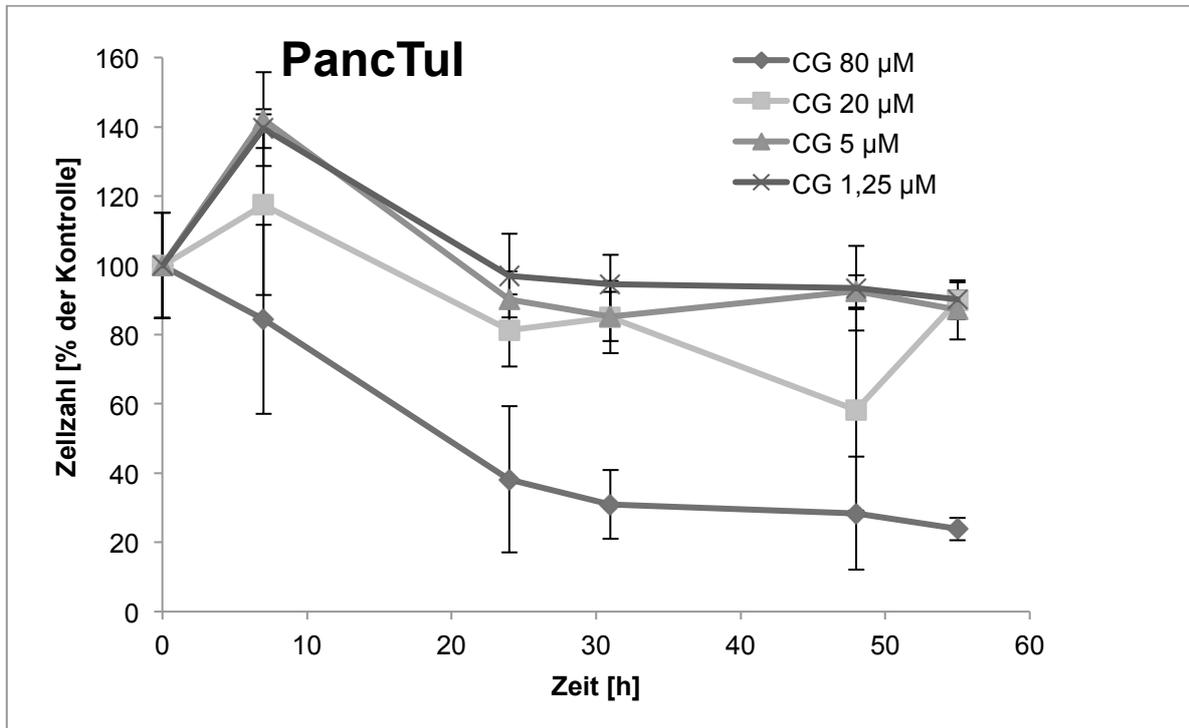


Abbildung 2: Einfluss von Catechingallat auf die Proliferationsgeschwindigkeit von PancTul

PancTul Zellen wurden mit CG in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Die Anzahl der Zellen wurde mithilfe des Casy 1 Zählers nach 7 h, 24 h, 31 h, 48 h und 55 h bestimmt. Das jeweilige Ergebnis wurde aus dem Mittelwert dreier unabhängig voneinander gezählter Proben ermittelt.

4.1.2 Catechingallat hemmt den Einbau des Proliferationsmarkers [³H]-Thymidin in die DNA von PancTul und BxPC3

Anschließend wurde untersucht, ob der beobachtete Effekt der reduzierten Proliferationsgeschwindigkeit auch in Form eines verringerten Einbaus des Proliferationsmarkers [³H]-Thymidin in die DNA der Pankreastumorzellen nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurde die [³H]-

Thymidininkorporation in Abhängigkeit der CG-Konzentration untersucht. Es zeigte sich sowohl bei PancTul als auch bei BxPC3 unter Einfluss von Catechingallat eine deutliche Reduktion des [³H]-Thymidineinbaus in die DNA, wobei PancTul bei CG-Konzentrationen von 0,1-5 µM sensitiver als BxPC3 reagierte. Bei einer Konzentration von 80 µM konnte keine [³H]-Thymidininkorporation mehr nachgewiesen werden. Da CG in dieser Konzentration die höchste Effektivität zeigte, wurden die weiteren Untersuchungen mit 80 µM CG durchgeführt.

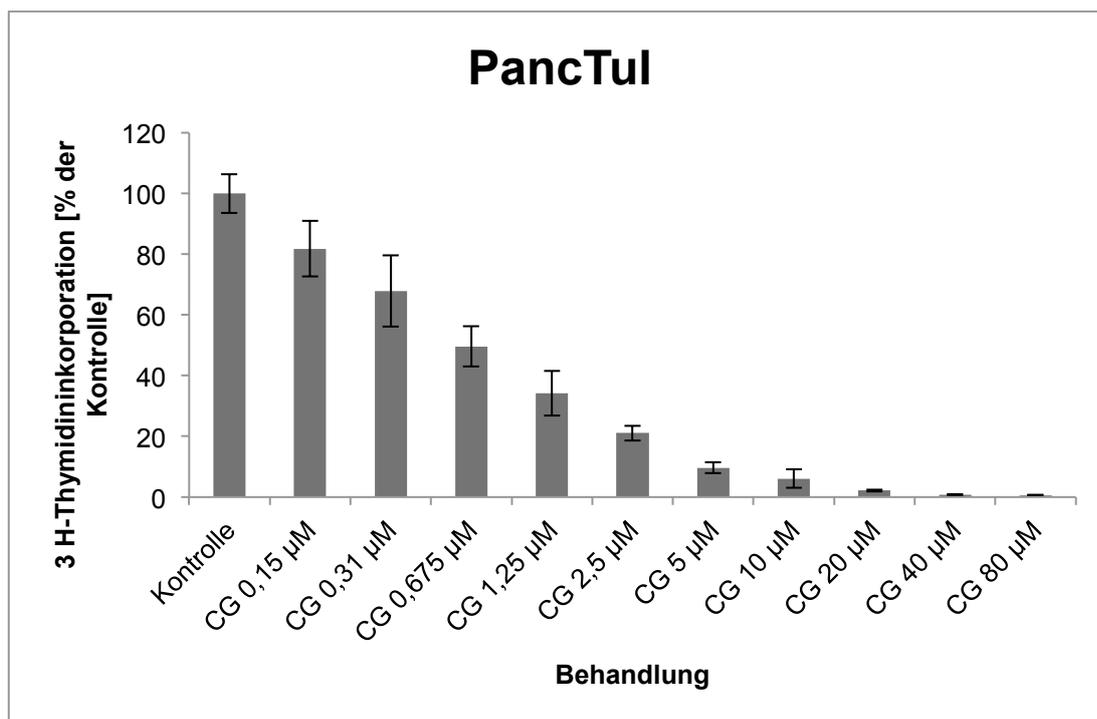


Abbildung 3: Einfluss von CG auf die DNA-Synthese in PancTul

PancTul Zellen wurden für 24 h mit CG in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Gemessen wurde die Inkorporation des Proliferationsmarkers [³H]-Thymidin. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Proben.

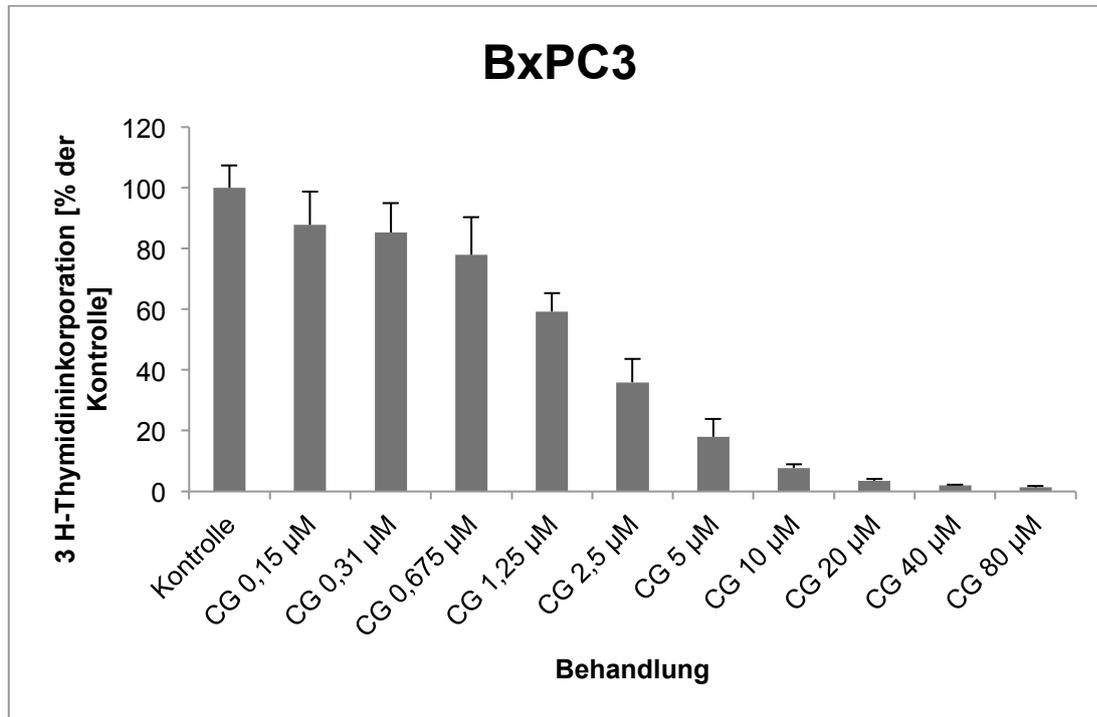


Abbildung 4: Einfluss von CG auf die DNA Synthese in BxPC3

BxPC3 Zellen wurden für 24 h mit CG in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Gemessen wurde die Inkorporation des Proliferationsmarkers [³H]-Thymidin. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Proben.

Ein weiterer Grund für die beobachtete Reduktion der Zellzahl könnte eine Induktion der Apoptose sein. Diese Annahme wurde durch eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie überprüft. Hierbei ist die Analyse der sub-G1-Fraktion von besonderem Interesse, das sie auf apoptotische Zellen hinweist, während ein Anstieg der Zellen in G1, S, G2 / M-Phase eher einen Zellzyklusarrest anzeigt.

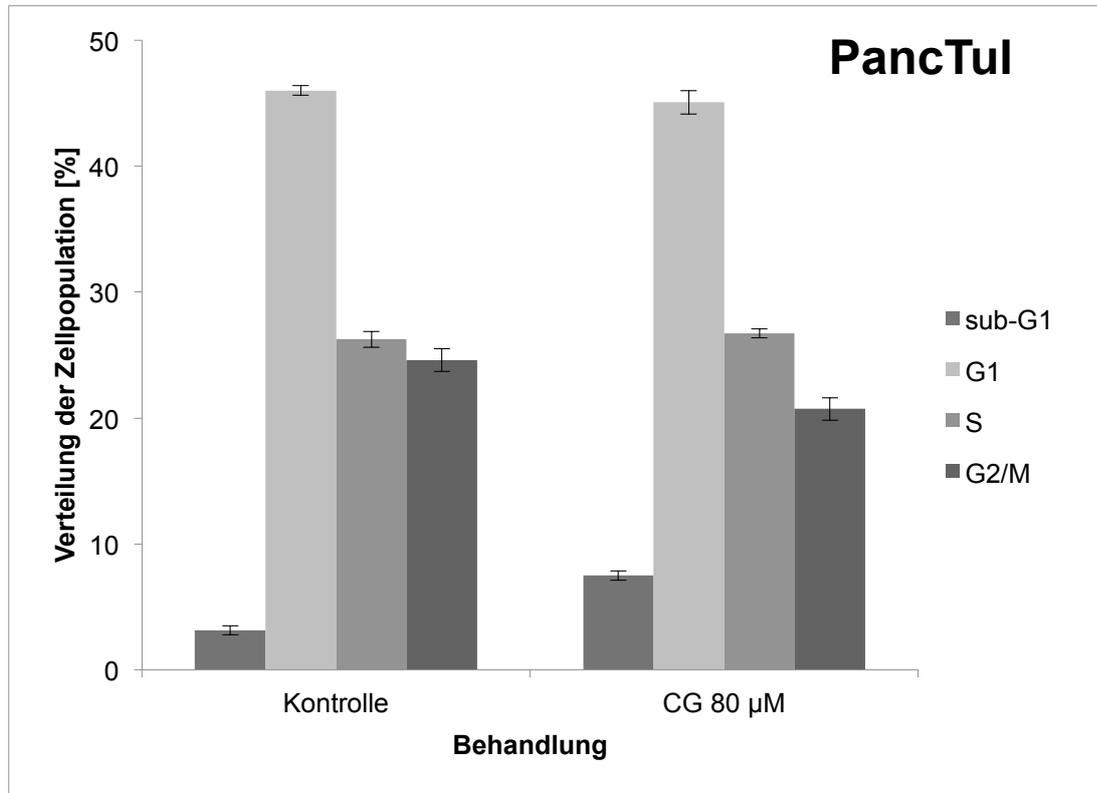
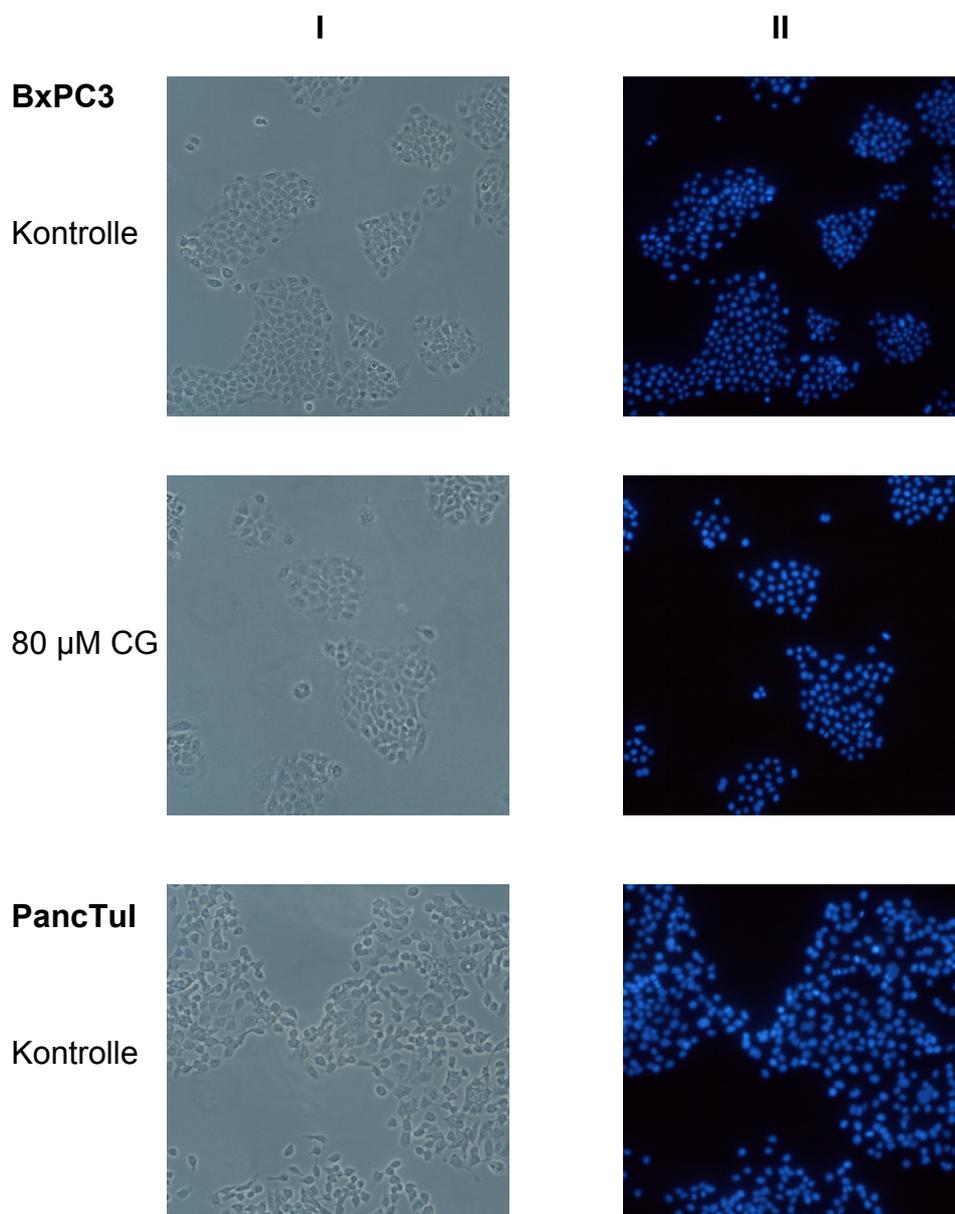


Abbildung 5: Zellzyklusanalyse von PancTul nach Behandlung mit 80 µM CG

PancTul Zellen wurden für 24 h mit 80 µM CG behandelt. Gemessen wurde die Fluoreszenz in jeweils 10^4 Zellen. Die erhaltenen Dichteplots wurden mit der Software CellQuest der Firma BD Biosciences ausgewertet. Die Werte sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Proben.

Nach der Behandlung mit CG zeigte sich ein mäßiger Anstieg der sub-G1 Fraktion von 3,1 % auf 7,5 %, während der Anteil der Zellen in der G2 / M Phase von 24,6 % auf 20,7 % sank. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Apoptoseinduktion als Grund für die beobachtete Reduktion der Zellzahl, da der Anteil apoptotischer Zellen nach 24 h Inkubation mit CG weiterhin auf niedrigem Niveau verblieb. Eine spezifische Proliferationsinhibition im Sinne eines Arrests in einer bestimmten Phase des Zellzyklus konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Zur Untermauerung dieses Ergebnisses wurden PancTul- und BxPC3-Zellen nach 24h Inkubation mit 80 μ M CG mikroskopisch analysiert. Um Veränderungen im Apoptoseverhalten sichtbar zu machen wurden die Zellen mit dem DNA spezifischen Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Fluoreszenzmikroskopisch zeigten sowohl PancTul- als auch BxPC3-Zellen nach Behandlung mit 80 μ M CG nur vereinzelte apoptotische Chromatinkondensierungen. Lichtmikroskopisch konnte hingegen in beiden Zelllinien eine deutliche Reduktion der Zelldichte beobachtet werden, wobei PancTul im Vergleich zu BxPC3 sensitiver auf 80 μ M CG reagierte.



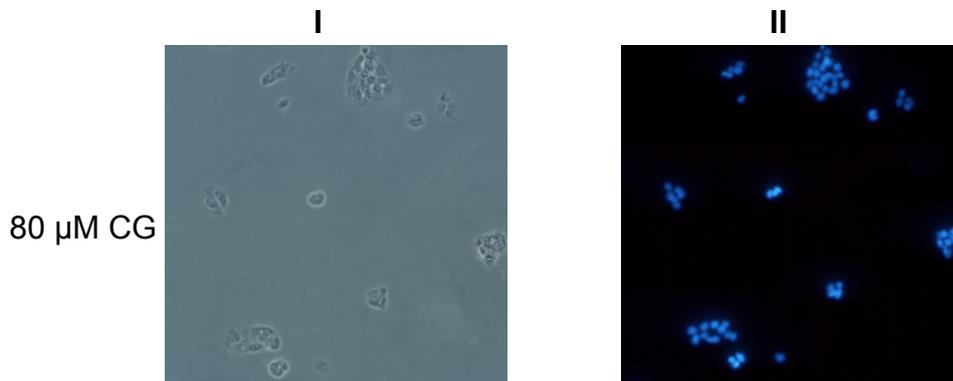


Abbildung 6: Mikroskopische Analyse von BxPC3 und PancTul nach Behandlung mit 80 µM CG

BxPC3 und PancTul Zellen wurden für jeweils 24 h mit 80 µM CG behandelt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch (I) und nach Chromatinfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 (II). Maßstab 1:200.

4.2 Einfluss von CG auf die Zytokinsekretion von BxPC3 und PancTul

Die Proliferation von Pankreastumorzellen wird unter anderem durch Sekretion von autokrin wirkenden Zytokinen reguliert. Auch der proliferationshemmende Effekt von 80 µM CG auf BxPC3 und PancTul könnte durch einen veränderten Zytokinspiegel in der Wachstums Umgebung der Tumorzellen hervorgerufen werden. Um dies zu untersuchen wurde ein Zytokinarray der Firma RayBiotech eingesetzt, der den Zytokinspiegel im serumfreien Wachstumsmedium der Pankreastumorzellen mit Hilfe von membrangebundenen, immobilisierten Antikörpern analysiert. Insgesamt wurde der Spiegel von 174 Zytokinen pro Zelllinie ermittelt. Die aussagekräftigsten Ergebnisse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt.

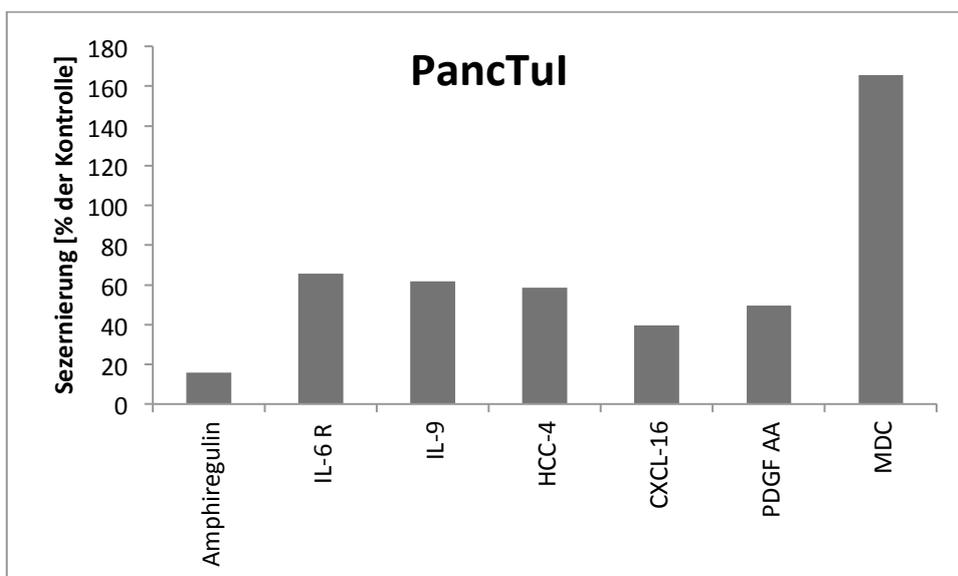
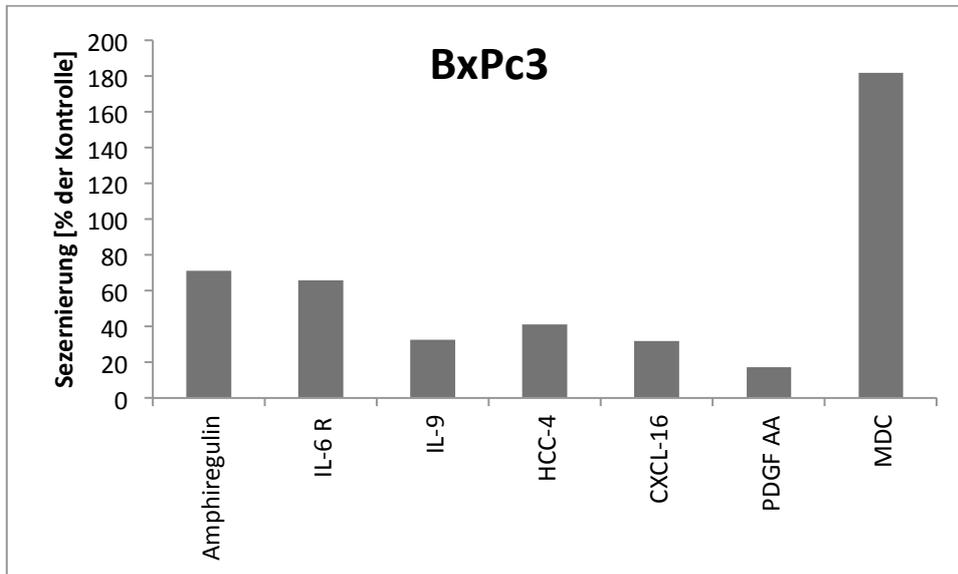


Abbildung 7 und 8: Veränderung der Zytokinsezernierung von BxPC3 und PancTul nach Behandlung mit 80 μ M CG

Der Nachweis von Zytokinen in Überständen von BxPC3- und PancTul-Zellen nach 24 h Behandlung mit 80 μ M CG erfolgte mit einem Zytokin-Array der Firma Raybiotech. Die Analyse erfolgte mit Membranen, auf denen immobilisierte Antikörper gegen 174 verschiedene Zytokine gebunden waren. Der Zytokinspiegel ist jeweils in Prozent der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Werte wurden pro Zytokin jeweils doppelbestimmt.

Bei Auswertung dieses Zytokinscreenings fielen besonders die Zytokine auf, bei denen sowohl bei BxPC3, als auch bei PancTul nach CG Behandlung eine gleichgerichtete Regulationstendenz zu beobachten war. Zytokine die eine solche Regulation zeigten und für den antiproliferativen Effekt von CG verantwortlich sein könnten waren MDC, HCC-4, CXCL-16, PDGF AA, Amphiregulin, IL-6 R sowie IL-9. Eine Übersicht über alle getesteten Zytokine findet sich im Anhang.

4.3 Catechingallat sensibilisiert PancTul und BxPC3 gegenüber TRAIL induzierter Apoptose

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die antiproliferativen Effekte von Catechingallat auf PancTul und BxPC3 gegenüber den apoptoseinduzierenden Effekten überwiegen, wurde nun eine mögliche Sensibilisierung der Pankreastumorzellen für die TRAIL vermittelte Apoptose untersucht. Hierzu wurde zunächst eine Vitalitätsmessung mithilfe eines Kristallviolettinkorporationsassays durchgeführt. PancTul und BxPC3 wurden jeweils für 24 h mit 80 μ M CG vorbehandelt und anschließend für 8 h mit TRAIL stimuliert. Zunächst konnte bei beiden Zelllinien eine geringgradige Reduktion der Vitalität nach alleiniger Stimulation mit TRAIL gezeigt werden. Bei PancTul waren nach der TRAIL Behandlung noch 87,6 % der Zellen vital, bei BxPC3 waren 71,1 % vitale Zellen zu beobachten. Nach 24 h Vorbehandlung mit 80 μ M CG und anschließender TRAIL Stimulation konnte bei beiden Zelllinien eine signifikante Abnahme des Anteils vitaler Zellen beobachtet werden. Bei PancTul konnte eine Reduktion der Vitalität nach Vorbehandlung mit 80 μ M CG und TRAIL Stimulation gegenüber alleiniger TRAIL-Stimulation von 52,7 % ($P < 0,01$) beobachtet werden, bei BxPC3 betrug dieser Wert 34,5 % ($P < 0,01$).

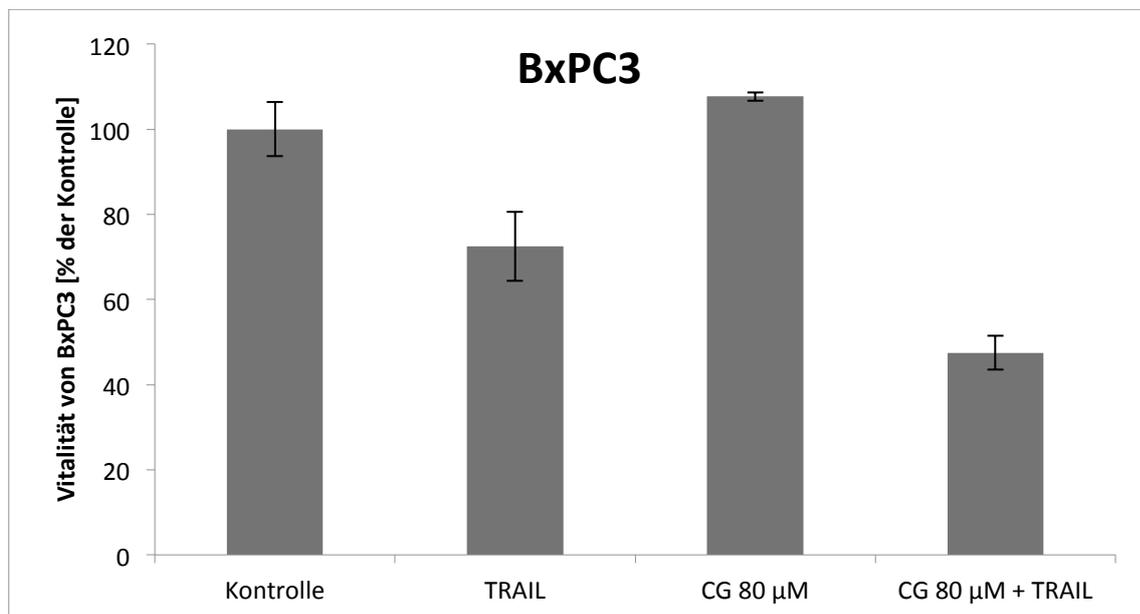
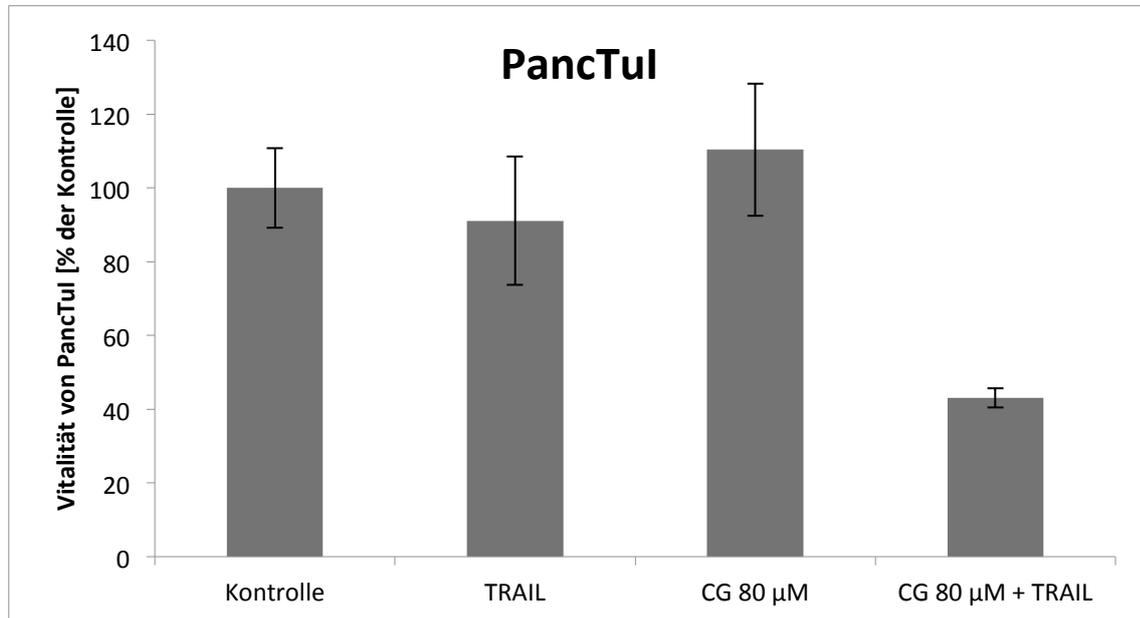


Abbildung 9 und 10: Effekte von 80 µM CG auf die Vitalität von PancTul und BxPC3 nach TRAIL-Stimulation

Die Vitalität wurde nach Vorbehandlung mit 80 µM CG und anschließender TRAIL-Stimulation (100 ng/ml) mit der Kristallviolettinkorporation gleichgesetzt und der jeweiligen Kontrolle gegenübergestellt. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 verschiedenen Messungen.

Als nächstes stellte sich die Frage, ob es sich bei der beobachteten Vitalitätsreduktion wirklich um eine Sensibilisierung für die TRAIL-vermittelte Apoptose durch Catechingallat handelt oder ob auch hier eine Proliferationsinhibition der Grund für die Zellreduktion sein könnte. Daher wurde ein DNA-Fragmentationsassay (JAM-Assay) durchgeführt, welches PancTul und BxPC3 spezifisch auf ihre TRAIL vermittelte Apoptosesensitivität untersucht. Nach Vorbehandlung mit 80 μM CG für 24 h und anschließender Stimulation mit TRAIL wird der Anteil der vitalen Zellen mithilfe radioaktiv markierter DNA gemessen. Nach Einbau des radioaktiv markierten Nukleotids [^3H]-Thymidin in die DNA der Pankreastumorzellen wurden diese lysiert und der Anteil der unfragmentierten DNA bestimmt. Dieser Anteil wurde mit dem Anteil der vitalen Zellen gleichgesetzt.

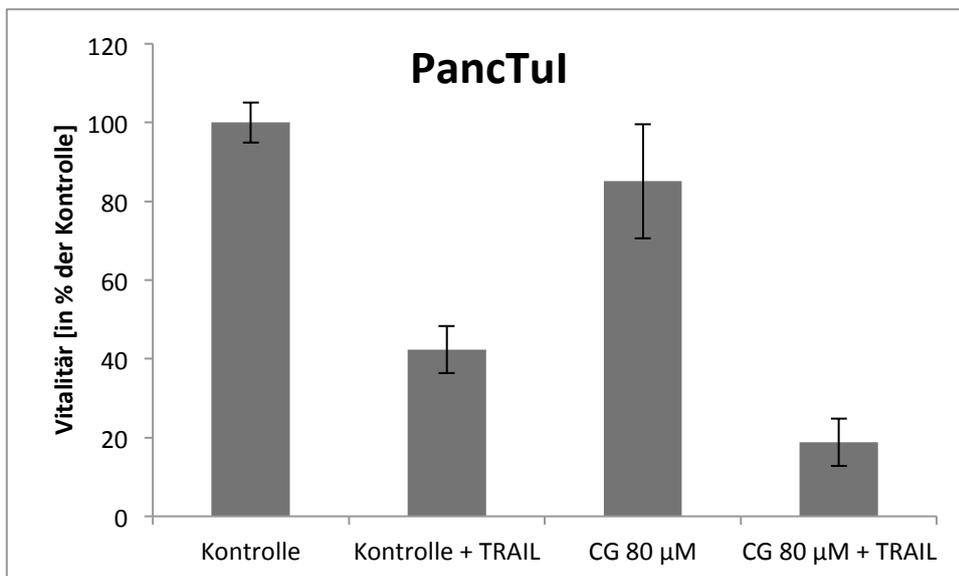


Abbildung 11: Sensibilisierung von PancTul gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose

Nach Aussaat von PancTul Zellen wurde deren DNA mithilfe von [^3H]-Thymidin radioaktiv markiert. Danach erfolgte die Vorbehandlung mit 80 μM CG für 24 h und die Apoptoseinduktion durch eine 8stündige Stimulation mit TRAIL (100 ng/ml). Die Vitalität der Zellen wurde mithilfe eines DNA-Fragmentationsassays quantifiziert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Messungen.

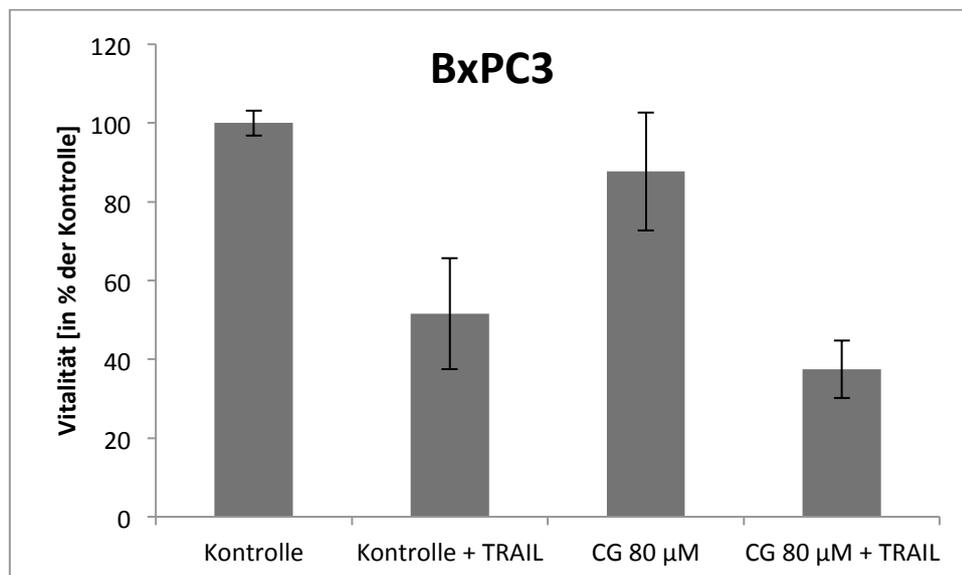


Abbildung 12: Sensibilisierung von BxPC3 gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose

Nach Aussaat von BxPC3 Zellen wurde deren DNA mithilfe von [³H]-Thymidin radioaktiv markiert. Danach erfolgte die Vorbehandlung mit 80 µM CG für 24 h und die Apoptoseinduktion durch eine 8stündige Stimulation mit TRAIL (100 ng/ml). Die Vitalität der Zellen wurde mithilfe eines DNA-Fragmentationsassays quantifiziert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus mindestens 5 Messungen.

Es konnte sowohl für PancTul als auch für BxPC3 gezeigt werden, dass die im Vorversuch mittels Kristallviolettassay gezeigte Vitalitätsreduktion der Pankreastumorzellen hauptsächlich auf einer Sensitivierung durch Catechingallat für die TRAIL vermittelte Apoptose beruht. Analog zum Vorversuch wurde nach 24 h Vorbehandlung mit 80 µM CG und anschließender Apoptosestimulation mit TRAIL ein Abfall des Anteils unfragmentierter DNA gegenüber den Pankreastumorzellen ohne Vorbehandlung mit 80 µM CG beobachtet. Bei PancTul wurde ein Rückgang der Zellvitalität nach Stimulation mit TRAIL von 42,3 % auf 18,7 % ($P < 0,01$) unter Einfluss von 80 µM CG gemessen. Bei BxPC3 wurde ein Rückgang von 51,6 % auf 37,4 % ($P = 0,03$) ermittelt. Zudem konnte mithilfe dieses Assays analog zur bereits in Kapitel 4.1.2 beschriebenen durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse gezeigt werden, dass eine 24 h

Behandlung der Tumorzellen mit 80 μ M CG ohne anschließende Stimulation mit TRAIL nur geringgradige Apoptose zur Folge hat. Bei PancTul betrug der Anteil unfragmentierter DNA nach Vorbehandlung noch 85,1 % der unbehandelten Kontrolle, bei BxPC3 waren es 87,7 %.

Es konnte also quantitativ nachgewiesen werden, dass CG in der Lage ist, Pankreastumorzellen für TRAIL-vermittelte Apoptose zu sensibilisieren. Nun stellte sich die Frage, auf welchen molekularen Mechanismen dieser Effekt beruht. Hierzu wurden sowohl die Proteine der Apoptosekaskade selbst als auch die Regulatoren dieser Signalkette mittels Western Blot analysiert. Diese Untersuchungen wurden an der Zelllinie PancTul durchgeführt.

Wichtige Stationen in der Apoptosekaskade von Pankreastumorzellen sind die Initiatorcaspase-8, die Effektorcaspase-3 und Bid, ein Protein der Bcl-2 Familie. Hierbei handelt es sich um Proteine, die bei Ablauf der Apoptosekaskade gespalten werden und dann ihr aktives Spaltprodukt entlassen. Die Western Blot-Analyse von Bid zeigte nach 24 h Vorbehandlung mit 80 μ M CG und anschließender TRAIL-Stimulation keine erhöhte Überführung von inaktivem Bid in gespaltenes aktives Bid. Beobachtet werden konnte hier, dass bereits nach TRAIL-Stimulation der unbehandelten Kontrolle der Proteinspiegel von inaktivem ungespaltenen Bid erheblich abnahm. Dies konnte nach Vorbehandlung mit 80 μ M CG nicht heraufreguliert werden. Analog dazu zeigte sich bei Western Blot-Analyse von Caspase-3 bereits nach TRAIL-Stimulation der unbehandelten Kontrolle eine Abnahme der inaktiven Form. Nach 24h Vorbehandlung mit 80 μ M CG und anschließender TRAIL-Stimulation wurde hier gegenüber der Kontrolle ein etwas erhöhter Spiegel der inaktiven Caspase-3 beobachtet. Bei Western Blot-Analyse von Caspase-8 wurden sowohl die inaktive Form, als auch die aktiven Spaltprodukte untersucht. Hierbei zeigte sich bei der inaktiven Form von Caspase-8 nach TRAIL-Stimulation eine Abnahme des Proteinspiegels. Dies konnte sowohl bei Analyse der Kontrolle als auch nach Vorbehandlung

mit 80 μM CG beobachtet werden. Der Proteinspiegel der aktiven gespaltenen Form zeigte sich sowohl bei TRAIL-Stimulation der unbehandelten Kontrolle, als auch der mit 80 μM CG vorbehandelten Probe unverändert.

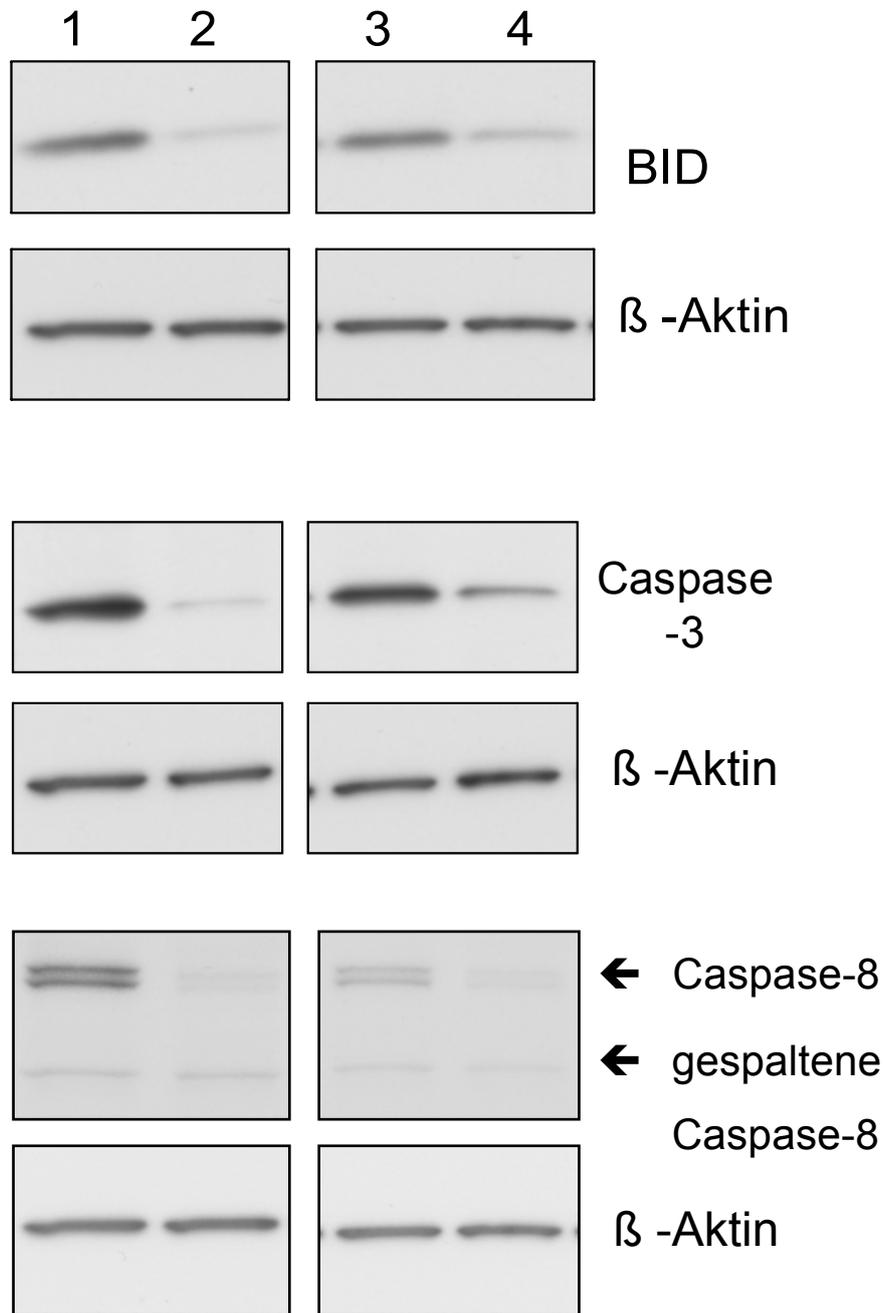


Abbildung 13: BID, Caspase-3 und Caspase-8 Spaltung nach CG-Behandlung

PancTul wurden für 24 h mit 80 μ M CG behandelt und anschließend mit TRAIL (100 ng/ml) für 8 h stimuliert. Der Proteinspiegel wurde mittels Western Blot gemessen. 1: Kontrolle, 2: Kontrolle mit TRAIL, 3: 80 μ M CG, 4: 80 μ M CG mit TRAIL

4.3.1 Einfluss von Catechingallat auf die antiapoptotischen Proteine XIAP, cIAP-2, Survivin und Bcl-X_L

Eine wichtige Rolle für die Chemotherapieresistenz des Pankreaskarzinoms spielen Proteine der IAP Familie, hierbei insbesondere XIAP, cIAP-2 und Survivin. Für diese Proteine konnte eine Dysregulation in Pankreastumorzellen nachgewiesen werden (Lopes et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit die gezeigte Sensibilisierung der Zellen für TRAIL-vermittelte Apoptose aus einer Veränderung im Regulationsprofil der IAPs durch die vorherige CG Behandlung hervorgeht. Bei XIAP zeigte sich im Western Blot gegenüber der Kontrolle keine Veränderung des Proteinspiegels nach einer Behandlung mit 80 µM CG für 24 h. Für das IAP cIAP-2 konnte eine deutlichere Abnahme nach CG-Behandlung nachgewiesen werden. Die stärkste Veränderung des Proteinspiegels ergab sich bei Analyse von Survivin. Dieses IAP war gegenüber der Kontrolle nach CG-Behandlung stark herunterreguliert.

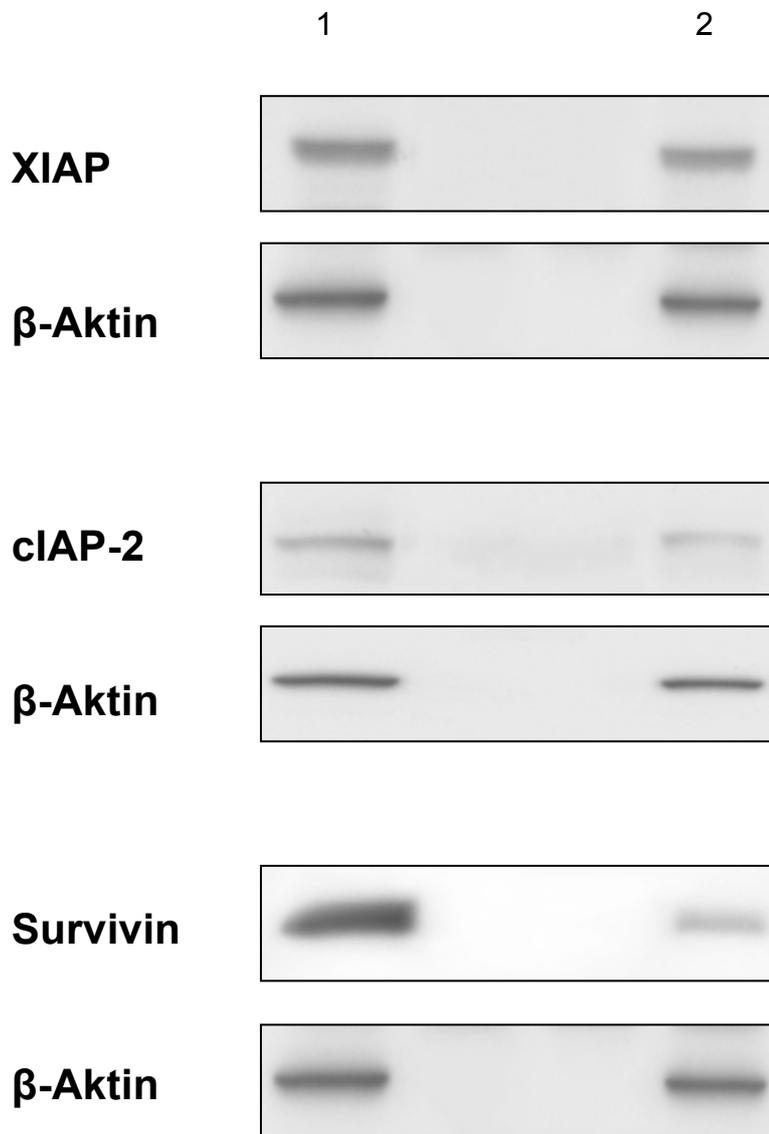


Abbildung 14: Regulation von XIAP, cIAP-2 und Survivin nach Behandlung mit 80 μ M CG

PancTul wurden für 24 h mit 80 μ M CG behandelt. Die Proteinspiegel von XIAP, cIAP2 und Survivin wurden mithilfe des Western Blot-Verfahrens bestimmt. Zur Sicherstellung der gleichmäßigen Gelbeladung erfolgte die Bestimmung des β -Aktinspiegels. 1: Kontrolle; 2: 80 μ M CG

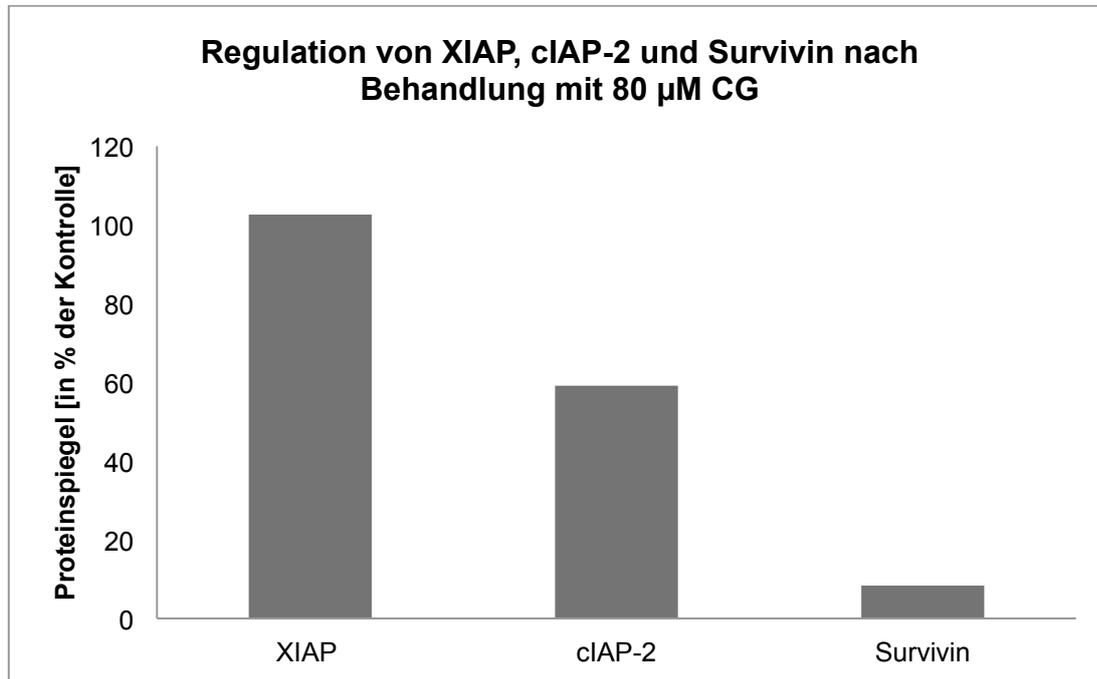


Abbildung 15: Densitometrische Analyse der Regulation von XIAP, cIAP-2 und Survivin nach Behandlung mit 80 µM CG

PancTul wurden für 24 h mit 80 µM CG behandelt. Die Proteinspiegel von XIAP, cIAP2 und Survivin wurden mithilfe des Western Blot-Verfahrens bestimmt. Die densitometrische Analyse erfolgte mit dem Programm ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

Eine weitere Proteinfamilie, die für die Apoptoseresistenz des Pankreaskarzinoms relevant ist, sind die Bcl-2 Proteine. Bei Inhibition des Proteins Bcl-X_L aus der Familie der Bcl-2 Proteine wurde eine erhöhte Apoptosesensitivität bei Pankreastumorzellen beobachtet (Hinz et al. 2000). In der hier durchgeführten Western Blot Analyse zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine deutliche Herunterregulation dieses Proteins nach 24 h Vorbehandlung mit 80 µM CG (Abb. 16).

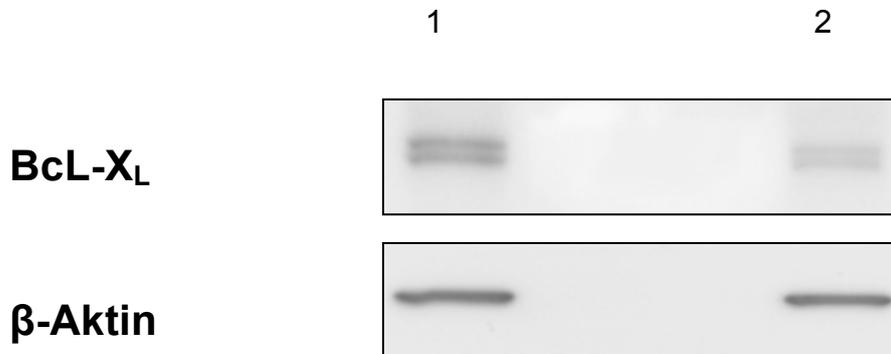


Abbildung 16: Verhalten von Bcl-X_L nach CG-Behandlung

PancTul-Zellen wurden für 24 h mit 80 μM CG behandelt. Zur Ermittlung des Bcl-X_L Spiegels wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. 1: Kontrolle; 2: 80 μM CG

4.3.2 Regulation von NF-κB und TRAF-2 durch Catechingallat

Ein Schlüsselfaktor bei der durch TRAIL ausgelösten antiapoptotischen Signalkaskade ist NF-κB. Dieser Transkriptionsfaktor ist an der Regulation der antiapoptotischen Proteine der IAP Familie und von Bcl-X_L beteiligt (Wang et al. 1998, Chen et al. 2000). Wie unter 4.3.1 beschrieben, werden antiapoptotische Proteine durch CG herunterreguliert. Ein Zusammenhang mit einer veränderten NF-κB-Signalgebung wurde durch eine Analyse der NF-κB-DNA-Bindungsaktivität mittels EMSA überprüft. Es zeigte sich gegenüber der Kontrolle eine Erhöhung der NF-κB-Bindungsaktivität nach TRAIL-Stimulation (Abb. 17; vgl. Spur 1 und 3). Bei Vorbehandlung der Zellen für 24 h mit 80 μM CG und anschließender Stimulation mit TRAIL dagegen zeigte sich eine deutliche Verminderung der Bindungsaktivität von NF-κB gegenüber der alleinigen TRAIL-Stimulation (vgl. Spur 3 und 4).

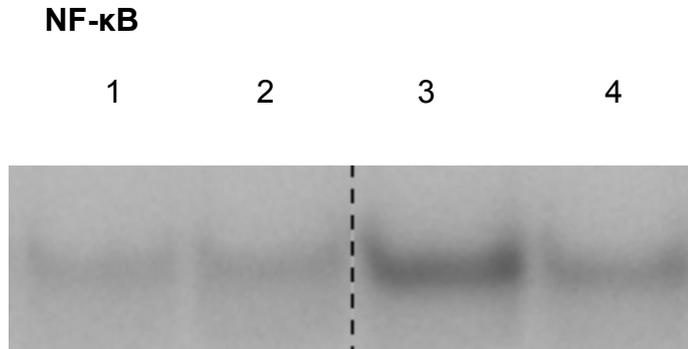


Abbildung 17: Regulation der DNA-Bindungsaktivität von NF-κB durch Vorbehandlung mit 80 μM CG

PancTul Zellen wurden für 24h mit 80 μM CG vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit TRAIL (100 ng/ml) für 8 h. Das Verhalten der DNA Bindungsaktivität von NF-κB wurde mithilfe eines EMSA ermittelt. 1: Kontrolle; 2: 80 μM CG; 3: Kontrolle + TRAIL; 4: 80 μM CG + TRAIL

Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von NF-κB mit konsekutiver Erhöhung der DNA Bindungsaktivität spielen Proteine der TRAF-Familie. Ein direkter Zusammenhang konnte für TRAF-2 gezeigt werden, bei dessen Überexpression in Pankreastumorzellen eine erhöhte Invasivität des Tumorwachstums sowie eine erhöhte konstitutive NF-κB-Aktivität beobachtet werden konnte (Trauzold et al. 2005). In PancTul Zellen zeigte sich allerdings nach 24 h Behandlung mit 80 μM CG nur eine marginale Herunterregulation des TRAF-2 Spiegels (Abb. 18).

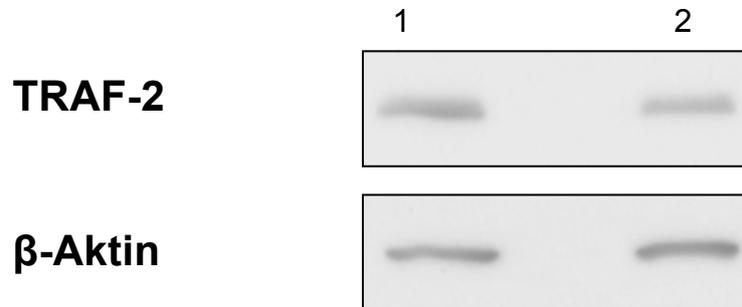


Abbildung 18: Verhalten von TRAF-2 nach CG-Behandlung

PancTul wurden für 24 h mit 80 μ M CG behandelt. Der TRAF-2-Spiegel wurde mithilfe des Western Blot-Verfahrens ermittelt. Zur Sicherstellung der gleichmäßigen Gelbeladung erfolgte die Messung des β -Aktin-Spiegels. 1: Kontrolle 2: 80 μ M CG

5 Diskussion

5.1 Einfluss von Catechingallat auf Proliferation und Apoptose von Pankreastumorzellen

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des antikarzinogenen Potentials des Catechins Catechingallat (CG) auf Pankreastumorzelllinien. Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist aufgrund der schlechten Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von unter 5 % (Schneider et al. 2005) Gegenstand intensiver molekularbiologischer und klinischer Untersuchungen. In mehreren Studien konnten bereits durch Polyphenole des grünen Tees vermittelte tumorinhibierende Effekte beobachtet werden (Khan et al. 2007). Dabei wurde hauptsächlich das Catechin EGCG untersucht. Zu Beginn dieser Arbeit waren über tumorinhibierende Effekte von CG noch keine molekularbiologischen Untersuchungen an Pankreastumorzellen durchgeführt worden.

Für die Versuche unter in vitro Bedingungen wurden zwei verschiedene Zelllinien des duktales Adenokarzinoms des Pankreas ausgewählt. Der Grund für diese Herangehensweise ist die Heterogenität der Pankreastumorzelllinien. Sie unterscheiden sich zum einen morphologisch hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades sowie in Abhängigkeit dieses Differenzierungsgrades auch in der durchschnittlichen Populationsverdopplungszeit. Zudem wurden auch unterschiedliche genetische Aberrationen bei den einzelnen Pankreastumorzelllinien nachgewiesen (Sipos et al. 2003). Dies führt zu der Annahme, dass die beobachteten Effekte von Catechingallaten auf eine bestimmte Zelllinie nur eingeschränkt auf eine andere übertragbar sind. Für diese Untersuchung wurden die Zelllinien PancTul und BxPC3 ausgewählt, die sich sowohl in

Differenzierungsgrad, als auch hinsichtlich genetischer Aberration voneinander unterscheiden (Sipos et al. 2003). Es zeigte sich, dass bei den Untersuchungen der Proliferationsgeschwindigkeit und der Apoptose unter Einfluss von Catechingallat, sowie bei Analyse des TRAIL-vermittelten Apoptoseverhaltens nach Vorbehandlung mit CG die Zelllinie PancTul sensibler reagierte als BxPC3. Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten sind bisher nicht genau bekannt, sodass eine Untersuchung der für dieses Ergebnis verantwortlichen molekularen Mechanismen für weitere Therapieansätze von großem Wert wäre. Besonders im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz von CG wären Biomarker hilfreich, welche einen CG-resistenten Phänotyp des Pankreaskarzinoms anzeigen könnten.

In den bisher durchgeführten in vitro Untersuchungen mit Polyphenolen des Grünen Tees wurde meist das Catechingallat EGCG verwendet (Khan et al. 2008). Vorversuche unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch bei Pankreastumorzellen eine höhere Effektivität von CG gegenüber EGCG.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CG in Abhängigkeit der Konzentration auf die Proliferationsgeschwindigkeit der Pankreaskarzinomzelllinien PancTul und BxPC3 untersucht. Sowohl bei PancTul als auch bei BxPC3 war bei Inkubation mit 80 μM CG eine signifikante Hemmung der Proliferation nachzuweisen. In vivo ist dieses Ergebnis allerdings nur eingeschränkt reproduzierbar, da diese Konzentration bisher nur schwer erreicht werden kann. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit des Catechins EGCG ergaben nach Konsum von 3 g in 500 ml Wasser gelösten Teeextrakten eine maximale Plasmakonzentration von 0,7 μM , die sich durch Erhöhen der konsumierten Menge nicht mehr steigern ließ (Yang et al. 1998). Mithilfe von Nanolipidpartikeln war es möglich, die Bioverfügbarkeit von EGCG in Ratten zu erhöhen. Die maximale Plasmakonzentration war hier allerdings 1,4 μM , während bei den hier durchgeführten Untersuchungen mit Konzentrationen bis 80 μM gearbeitet

wurde (Smith et al. 2010, Dube et al. 2010). Der nächste Schritt bei weiteren Studien ist die Untersuchung der in vivo Stabilität und Bioverfügbarkeit von Catechingallaten, insbesondere von CG. Verkomplizierend für eine pharmakologische Anwendung von Catechingallaten kommt hinzu, dass Catechine in Lösung instabil und sehr anfällig für autooxidative Prozesse sind (Mochizuki et al. 2002). Wichtig für einen potentiellen therapeutischen Einsatz von CG ist also die in vivo Verfügbarkeit in einer pharmakologischen Dosierung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zudem mit den Gründen für die Inhibition der Proliferation von PancTul und BxPC3. Hierfür wurde zunächst eine rein quantitative Proliferationsanalyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich insbesondere bei PancTul nach 24 h eine Reduktion der Proliferation gegenüber der Kontrolle. Dieser Effekt war jedoch erst ab einer Konzentration von 80 µM CG zu beobachten. Bei Konzentrationen von 20 µM oder weniger kam es hier nur zu einer leichten Proliferationsinhibition. Zur Überprüfung der DNA-Syntheseleistung wurde eine Analyse der Inkorporation des Proliferationsmarkers [³H]-Thymidin durchgeführt. Es zeigte sich sowohl bei PancTul als auch bei BxPC3 unter Einfluss von Catechingallat eine erhebliche Reduktion der [³H]-Thymidinaufnahme. Dies steht insofern im Widerspruch zu den Ergebnissen des zuvor diskutierten Versuchs, als dass die Inkorporation des Proliferationsmarkers [³H]-Thymidin bereits bei CG Konzentrationen von 2,5 µM sowohl bei PancTul, als auch bei BxPC3 nur noch weniger als 20% der Kontrolle betrug. Bei der quantitativen Proliferationsanalyse waren solche Effekte erst ab einer Konzentration von 80 µM zu beobachten. Ein Grund für die beobachtete Diskrepanz könnte eine verminderte Aufnahme von [³H]-Thymidin über den hENT1 Transporter sein. Bei Studien über den möglichen Einsatz von [³H]-Thymidin als PET-basierten Proliferationstracer zeigte sich, dass [³H]-Thymidin im Gegensatz zu anderen Nukleosidtracern nicht diffundiert, sondern entlang eines Konzentrationsgradienten bidirektional über hENT1 transportiert wird (Plotnik

et al. 2010). Ein Erklärungsansatz für die verminderte [³H]-Thymidininkorporation ist die Herunterregulation der hENT1 Expression auf der Zelloberfläche durch die erfolgte Vorbehandlung mit 80 µM CG und damit eine verminderter Membrantransport. Dies ist von Relevanz, da das Chemotherapeutikum Gemcitabin ebenfalls über Nukleosidtransporter aufgenommen wird (Mackey et al. 1998). Die Monotherapie mit Gemcitabin ist die Standardtherapie des fortgeschrittenen und des metastasierten duktales Adenokarzinom des Pankreas (Burris et al. 1997). Pankreastumorzellen mit einer geringen hENT1 Expression zeigen eine erhöhte Resistenz gegen Gemcitabine (Nakano et al. 2007). In klinischen Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass die hENT1 Expression auf Pankreastumorzellen ein prädiktiver Faktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit unter Gemcitabintherapie ist (Marechal et al. 2009). Ein Ansatz für weitere Untersuchungen wäre nun die Analyse der hENT1 Expression in Pankreastumorzellen unter Einfluss von Catechingallat. Eine Minderung der Expression von hENT1 nach Vorbehandlung mit CG könnte auf die Prognose des Pankreaskarzinoms unter Gemcitabintherapie Einfluss nehmen.

Ein Grund für die quantitativ nachgewiesene Minderung der Proliferation mit CG Konzentrationen von mehr als 20 µM könnte eine erhöhte Induktion von Apoptose nach 24 h Vorbehandlung mit 80 µM CG sein. Um dies nachzuweisen wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Nach Inkubation mit Catechingallat zeigte sich kein Anstieg der apoptotischen Zellen, ein Arrest in einer spezifischen Phase des Zellzyklus konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Für das Catechin ECG in einer Konzentration von 50 µM konnte beim Kopf-Hals-Karzinom (HNSCC) im Gegensatz dazu sowohl eine Apoptoseinduktion, als auch ein spezifischer Zellzyklusarrest in der G1 Phase gezeigt werden (Lim et al. 2006). Die Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Behandlung von PancTul und BxPC3 mit CG eher zu einem Arrest in der Phase des Zellzyklus, in der sich die Zelle jeweils gerade

befindet, führt. Dies kann mit dem gewählten Versuchsaufbau allerdings so nicht bewiesen werden. Zur Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse wurde zudem eine mikroskopische Analyse des Apoptose- und Proliferationsverhaltens durchgeführt. Diese ergab analog zum Vorversuch eine deutlich sichtbare Proliferationsinhibition, jedoch nur geringgradig Anhalt für Apoptoseinduktion nach 24 h CG-Behandlung von PancTul und BxPC3 in Form von apoptosetypischen Chromatinkondensierungen.

5.2 Modulation der Zytokinsezernierung durch CG

Ein wichtiges Regulativ der Zellproliferation sind autokrin sowie parakrin wirkende Zytokine. Daher wurden auch die Veränderung des Zytokinspiegels im die Zellen umgebenden serumfreien Wachstumsmedium nach Inkubation mit CG untersucht. Die Spiegelveränderung bei PancTul und BxPC3 wurde nach 24 h Behandlung mit CG von insgesamt 175 Zytokinen untersucht. Das Augenmerk wurde insbesondere auf die Zytokine gelegt, die analog zum Proliferationsverhalten eine bei beiden Zelllinien gleichgerichtete Regulationstendenz zeigten. Diese konnte bei den Zytokinen Amphiregulin, IL-6 R, IL-9, HCC-4, CXCL-16, PDGF-AA und MDC nachgewiesen werden:

- Amphiregulin ist ein Ligand des epidermalen Wachstumsrezeptors, der eine wichtige Rolle bei einer Reihe von zellulären Proliferations- und Differenzierungsvorgängen spielt (Citri et al. 2006). Fehlgesteuerte Aktivierung des EGFR durch ständige autokrine Sezernierung von Liganden wie Amphiregulin kann zu einer Überexpression von EGFR führen. Diese stellt einen schlechten prognostischen Faktor bei einer Reihe von epithelialen Tumorerkrankungen, inklusive des Pankreaskarzinoms (Salomon et al. 1995). Die Herunterregulation von Amphiregulin mittels siRNA in Pankreastumorzellen der Zelllinie ASPC1 bewirkte eine signifikant erhöhte Zahl von apoptotischen Zellen, sowie eine geringere

Aktivierungsrate des EGFR (Yotsumoto et al. 2008). Eine verminderte Sekretion von Amphiregulin nach 24 h Behandlung mit 80 μ M CG konnte sowohl bei PancTul als auch bei BxPC3 beobachtet werden. Eine weitergehende Analyse der Aktivität des EGFR könnte hier Aufschluss über den Effekt der Amphiregulinregulation auf PancTul und BxPC3 geben.

- Ein weiteres Zytokin, bei dem eine Herunterregulation beobachtet wurde, war der IL-6-Rezeptor. Hier konnte sowohl bei PancTul, als auch bei BxPC3 eine Herunterregulation auf 65,7% beziehungsweise 65,9% der Kontrolle beobachtet werden. Der IL-6 Rezeptor ist in fortgeschrittenem Stadium eines Pankreaskarzinoms in einer erhöhten Konzentration im Serum nachweisbar (Barber et al. 1991). Der lösliche IL-6 Rezeptor fungiert beim multiplen Myelom als Agonist und verstärkt die biologische Aktivität von IL-6 (Kyrtonis et al. 1996). In weiteren Untersuchungen wäre daher die Wirkung von an seinen löslichen Rezeptor gebundenem IL-6 auf die Pankreaskarzinomzelllinien PancTul und BxPC3 zu überprüfen.
- IL-9 konnte im serumfreien Medium nach 24 h Behandlung von PancTul und BxPC3 mit 80 μ M CG ebenfalls in einer verringerten Konzentration nachgewiesen werden. Über die Rolle von IL-9 im Zusammenhang mit dem Pankreaskarzinom gibt es bisher keine relevanten Untersuchungen. Dieser Mediator wird von TH2-Lymphozyten sezerniert und spielt eine Rolle bei Entwicklung eines Hodgkin-Lymphoms (Renauld et al. 2004).
- Das Chemokin HCC-4 konnte gleichermaßen in einer bei PancTul auf 58,6 % sowie bei BxPC3 auf 41,2 % reduzierten Konzentration nachgewiesen werden. Die Rolle, die dieses Chemokin in Bezug auf das Pankreaskarzinom spielt, ist bisher unklar. Es konnte gezeigt werden, dass HCC-4 ein chemotaktischer Faktor für Monozyten ist

(Hedrick et al. 1998).

- Auch bei CXCL-16 zeigte sich ein geminderter Spiegel. CXCL-16 ist als Teil der immanenten Immunität zur chemotaktischen Aktivierung von T- sowie NK-Zellen bekannt (Tohyama et al. 2007). Ein Zusammenhang zum duktalem Adenokarzinom des Pankreas konnte bisher nicht hergestellt werden.
- Der Wachstumsfaktor PDGF-AA zeigte sich ebenfalls vermindert im die Pankreastumorzellen umgebenden Medium nach 24 h Behandlung mit 80 μ M CG. Für PDGF konnte bisher ein im Gegensatz zu differenziertem Gewebe erhöhter Spiegel bei den Pankreastumorzelllinien Panc-1 und HPAF nachgewiesen werden (Ebert et al. 1995). Eine erhöhte Synthese von PDGF AA führt schließlich zur Entwicklung eines neoplastischen Wachstumsverhaltens (Heldin et al. 1999). Auch hier wäre eine weitere Analyse der Wirkung von 80 μ M CG auf Pankreastumorzellen wünschenswert, beispielsweise hinsichtlich der Veränderung der Oberflächenexpression des PDGF-Rezeptors. Mithilfe des PDGF Rezeptortyrosinkinase-Inhibitors Imatinib wird die PDGF Signalgebung schon in klinischen Studien als Ansatz einer chemotherapeutischen Behandlung des Pankreaskarzinoms verwendet (Gharibo et al. 2005).
- Ein weiteres Chemokin, dessen Spiegel nach 80 μ M CG Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhöht war ist MDC. Dieser Faktor wird von verschiedenen Pankreastumorzelllinien sezerniert, genaueres über den direkten Effekt auf das Tumorstadium ist bis jetzt nicht bekannt (Monti et al. 2004).

Es zeigen sich hier eine Reihe von Ansatzpunkten für weitere Untersuchungen. Bei den gewonnenen Daten handelt es sich um Ergebnisse aus einem kommerziellen Zytokinarray. Die Messung für das jeweilige Zytokin erfolgte in Form einer Doppelbestimmung, eine statistische

Auswertung war so nicht möglich. Nötig wäre zunächst eine Verifizierung der Ergebnisse mittels ELISA, um im Anschluss weitergehende Untersuchungen durchführen zu können.

5.3 Einfluss von CG auf die Apoptosekaskade nach TRAIL Stimulation

Die mögliche Sensibilisierung für TRAIL-vermittelte Apoptose durch 24 h Vorbehandlung von PancTul und BxPC3 mit 80 μ M CG war ein weiterer Punkt der vorliegenden Untersuchung. Es zeigte sich in dem zunächst durchgeführten Kristallviolettassay eine Abnahme der Zellvitalität nach 24 h Vorbehandlung mit 80 μ M CG und anschließender 8 h Zellstimulation mit TRAIL gegenüber der alleinigen TRAIL-Stimulation ohne Vorbehandlung. Dies war sowohl bei PancTul als auch bei BxPC3 zu beobachten. Die beobachteten Effekte sind am ehesten mit einer Sensibilisierung der Pankreastumorzellen für TRAIL-vermittelte Apoptose durch die erfolgte Vorbehandlung mit 80 μ M CG zu erklären. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde ein JAM-Assay durchgeführt, der zeigte, dass die Vitalitätsreduktion hauptsächlich auf einer Sensibilisierung der Pankreastumorzellen für Apoptose und nicht auf einer Proliferationsinhibition beruht. Zur weiteren Verifizierung des beobachteten Effektes wurde nun die Apoptosekaskade der Pankreastumorzelllinie PancTul untersucht. Analysiert wurde die Veränderung des Proteinspiegels von Caspase-8, Caspase-3 und BID, jeweils repräsentativ für bestimmte Ebenen der Apoptosekaskade. Eine verminderte Konzentration der jeweiligen Proteinspiegel wäre ein Indikator für eine erhöhte Spaltungsaktivität in diesen Ebenen der Apoptosekaskade. Bei PancTul zeigte sich keine signifikante Veränderung im Sinne einer Steigerung der Apoptoseaktivität unter der CG-Behandlung gegenüber der alleinigen Stimulation mit TRAIL. Caspase-3 konnte hingegen nach CG-Behandlung und TRAIL Stimulation in höherer Konzentration nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der Grund für die im

JAM-Assay erfasste verstärkte Apoptose nach Vorbehandlung mit 80 μM CG in diesem Fall in einer veränderten Regulierung der Apoptosekaskade liegt und nicht in einer vermehrten Aktivierung der Kaskade mit konsekutiv erhöhter Spaltungsaktivität der Caspasen. Eine wichtige Rolle bei der Apoptoseregulierung nehmen hier die Proteine der IAP-Familie ein, die in der Lage sind Caspasen spezifisch zu inhibieren (Deveraux et al. 1999). Für das duktale Adenokarzinom des Pankreas konnte eine Überexpression der IAPs XIAP, cIAP-2 und Survivin gezeigt werden (Hamacher et al. 2008). Ein Grund für das hier beobachtete veränderte Apoptoseverhalten der Pankreastumorzellen könnte also in einer Veränderung der Expression der IAPs durch Catechingallat liegen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das Vorkommen von XIAP, cIAP-2 und Survivin in Pankreastumorzellen nach 24 h Behandlung mit 80 μM CG gegenüber der Kontrolle untersucht. Hierbei zeigte sich tatsächlich eine Herunterregulation von cIAP2 und in wesentlichem Maße von Survivin. Die Effekte von cIAP2 und Survivin auf das Apoptoseverhalten sind allerdings grundverschieden.

Dies ist zunächst strukturell bedingt. cIAP-2 gehört zu den Klasse 1-IAPs, die homologe BIR-Domänen und ein RING-Finger-Motiv enthalten und so in der Lage sind, Caspasen direkt zu binden und zu inhibieren (Deveraux et al. 1998). Neben dieser direkten Inhibition ist cIAP-2 außerdem in der Lage mit TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren zu interagieren (Rothe et al. 1995). Durch Binden an TRAF-2 können sowohl cIAP-1 als auch cIAP-2 TNFR Signalkomplexe bilden, welche die Aktivität der Initiatorcaspase-8 regulieren können (Wang et al. 1998). TRAF-2 ist ein Adapterprotein, das eine wichtige Rolle in der Signalübertragung der Apoptosekaskade des TNF-Rezeptors spielt. In Pankreastumorzellen ist TRAF-2 überexprimiert und sorgt für eine erhöhte Apoptoseresistenz und ein erhöhtes Invasivitätspotential (Trauzold et al. 2005). Daher erfolgte eine Untersuchung der Regulation des TRAF-2-Spiegels in der Pankreastumorzelllinie PancTul nach Behandlung mit 80 μM CG. Hierbei zeigte sich allerdings keine signifikante Veränderung.

Survivin hingegen gehört zu den Klasse 3-IAPs, die ebenfalls eine BIR-Domäne, jedoch kein RING-Finger Motiv enthalten. Eine Caspaseninhibition durch direkte Bindung ist ihnen nicht möglich. Die Funktion von Survivin ist äußerst komplex, neben der antiapoptotischen Aktivität nimmt Survivin Einfluss auf die Zytokinese sowie die Formation der Mitosespindel (Yang et al. 2004, Pennati et al. 2008). Survivin ist in einer Reihe von Tumorzelltypen überexprimiert (Altieri 2003). Für Zellen des Pankreas konnte eine erhöhte Expression von Survivin bereits im Stadium der intraepithelialen Neoplasie als Vorstufe des duktales Adenokarzinoms gezeigt werden (Bhanot et al. 2006).

Pankreastumorzellen gehören hinsichtlich ihres Apoptoseweges zu den Typ II Zellen, die bei Initiation der extrinsischen Apoptosekaskade auf die Enhancer-Funktion des Mitochondriums angewiesen sind (Hinz et al. 2000). Die Proteine der Bcl-2-Proteinfamilie sind auf dieser mitochondrialen Ebene für die Apoptoseresistenz von Pankreastumorzellen verantwortlich (Kroemer 1997). Die Inhibition des in auf dieser mitochondrialen Ebene in Pankreastumorzellen überexprimierten Bcl-2-Proteins Bcl-X_L sorgt für eine Sensitivierung für TRAIL-vermittelte Apoptose. Bcl-X_L schützt durch Stabilisierung der Mitochondrienmembran vor Apoptose (Hinz et al. 2000). In der durchgeführten Untersuchung konnte für PancTul eine Herunterregulation von Bcl-X_L nach 24 h Behandlung der Zellen mit 80 µM CG gezeigt werden.

All diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass CG Einfluss auf eine Reihe von apoptoseregulierenden Prozessen nimmt. Ein Apoptoseresistenz vermittelnder Transkriptionsfaktor ist NF-κB. Für PancTul konnte eine TRAIL Rezeptor vermittelte Aktivierung von NF-κB gezeigt werden, die zu einer erhöhten Apoptoseresistenz führte (Trauzold et al. 2001). Zielgene dieses Transkriptionsfaktors sind unter anderem die Gene der antiapoptotischen Proteine Bcl-X_L, Survivin und cIAP-2 (Shishodia et al. 2002). Hier stellt sich

die Frage, inwieweit die beobachteten Regulationsprozesse durch 80 μ M CG auf einer Veränderung der NF- κ B-Signalgebung beruhen. Die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B nahm nach TRAIL-Stimulation deutlich zu, bei vorheriger Behandlung von PancTul mit 80 μ M CG zeigte sich hingegen nach der anschließenden TRAIL-Stimulation keine eindeutige Erhöhung der Aktivität von NF- κ B. Dies deutet daraufhin, dass ein Mechanismus der Sensitivierung durch 80 μ M CG für TRAIL-vermittelte Apoptose in der Regulation der NF- κ B Aktivität liegt. Es gibt jedoch noch eine Reihe anderer Vorgänge im Rahmen der Apoptosekaskade, bzw. deren Regulation, die durch Polyphenole des grünen Tees verändert werden. So hat das Polyphenol EGCG beispielsweise auch Einfluss auf die Rezeptortyrosinkinasen EGFR und HER2 und hemmt die Transkriptionsaktivität von AP-1 (Shimizu et al. 2005). Es zeigt sich durch die vorliegende Untersuchung, dass die Regulationsprozesse, die durch 80 μ M CG ausgelöst werden in die verschiedensten Richtungen gehen und ein bestimmter Mechanismus nicht allein für die Apoptosesensitivierung verantwortlich gemacht werden kann. Ein weiterer Aspekt ist der kombinatorische Einfluss von TRAIL und CG auf die Apoptoseregulation. Für die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP konnte gezeigt werden, dass TRAIL und das Polyphenol EGCG synergistisch die Expression von Bcl-X_L hemmen (Siddiqui et al. 2008). Hier wären weitere Untersuchungen zur Frage der Modulation der apoptoseregulierenden Prozesse durch CG wünschenswert.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist eine hochmaligne Erkrankung mit hoher Letalität. Dies liegt an der erst in fortgeschrittenem Stadium auftretenden klinischen Symptomatik und dadurch oft erst späten Diagnosestellung sowie der frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung. Einziger kurativer Therapieansatz ist die chirurgische Duodenopankreatektomie. Die therapeutischen Optionen begrenzen sich jedoch häufig aufgrund eines bereits organüberschreitenden Tumorwachstums bei Diagnose auf eine palliative Chemotherapie und Radiatio. Gegen die mithilfe dieser Therapien induzierte Apoptose zeigen Pankreastumorzellen im Gegensatz zu anderen soliden Karzinomen eine erhöhte Resistenz. Ein Grund dafür ist eine Proteindysregulation der Apoptosekaskade auf molekularer Ebene durch Proteine der Bcl-2 Familie, IAPs sowie NF- κ B und TRAF-2.

Epidemiologisch konnte gezeigt werden, dass Polyphenole des grünen Tees die Entwicklung von Tumoren verzögern können. Auch unter in vitro Bedingungen konnten antikarzinogene Effekte dieser Catechine nachgewiesen werden. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Auswirkungen einer Behandlung von Pankreastumorzellen mit dem Catechin Catechingallat (CG) noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit wurde das antikarzinogene Potential von CG unter in vitro Bedingungen auf die sich hinsichtlich ihres Malignitätsgrades unterscheidenden Pankreastumorzelllinien BxPC3 und PancTul analysiert.

Hierzu wurde zunächst der Einfluss von Catechingallat in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation der beiden Pankreastumorzelllinien untersucht. Außerdem wurde die Inkorporation des Proliferationsmarkers [3 H]-Thymidin in Abhängigkeit der CG-Konzentration analysiert. Zur näheren Verifizierung dieser Ergebnisse wurde eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse sowie lichtmikroskopische Untersuchungen nach Färbung

mit dem DNA-spezifischen Farbstoff Hoechst 33342 durchgeführt. Ein möglicher Regulationsprozess, der zu einer Proliferationsverlangsamung führen kann, ist die Sezernierung autokrin wirkender Zytokine. Dies wurde mithilfe eines Arrays untersucht, welches den Zytokinspiegel in serumfreiem Wachstumsmedium nach CG-Behandlung mithilfe von membrangebundenen, immobilisierten Antikörpern untersucht. Weiterhin wurde eine mögliche Sensibilisierung der Pankreastumorzellen durch CG für TRAIL-vermittelte Apoptose untersucht. Hierzu wurde die Kristallviolettinkorporation als Maß für die Zellvitalität nach CG Behandlung und anschließender TRAIL-Stimulation analysiert. Die Untersuchung der molekularen Regulationsmechanismen einer Sensibilisierung gegenüber TRAIL vermittelter Apoptose nach CG Behandlung erfolgte durch Western Blot Analyse. Mittels eines EMSA wurde außerdem die DNA Bindungsaktivität von NF- κ B nach CG-Behandlung dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass CG die Proliferation von BxPC3 und PancTul *in vitro* verlangsamt. Insbesondere bei einer Konzentration von 80 μ M CG zeigte sich die Proliferationsrate der Pankreastumorzellen verringert. Auch die Inkorporation des Proliferationsmarkers [3 H]-Thymidin war nach Behandlung mit 80 μ M CG deutlich reduziert. Ein phasenspezifischer Zellzyklusarrest oder Induktion von Apoptose konnte in der daraufhin durchgeführten durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse nicht nachgewiesen werden. Auch lichtmikroskopisch zeigte sich kein Anhalt für eine Apoptoseinduktion. Die Proliferation wird durch Sezernierung von autokrin wirkenden Zytokinen durch die Pankreastumorzellen reguliert. Hierbei zeigten sich aufgrund einer bei beiden Tumorzelllinien gleichgerichteten Regulationstendenz nach CG-Behandlung spezifische Zytokine, die für den antiproliferativen Effekt von CG verantwortlich sein können. Hierbei handelte sich um die Zytokine MDC, HCC-4, CXCL-16, PDGF-AA, Amphiregulin, IL-6R sowie IL-9.

Nachdem unter alleinigem CG-Einfluss eine Proliferationsverlangsamung nachgewiesen werden konnte, wurde nun eine mögliche Sensibilisierung der Pankreastumorzellen für ligandeninduzierte Apoptose durch TRAIL untersucht. Hierbei zeigte sich eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Sensibilität für TRAIL-vermittelte Apoptose nach Vorbehandlung mit 80 μ M CG. Die Proteine BID, Caspase-3 und Caspase-8 der Apoptosekaskade selbst zeigten keine erheblichen Veränderungen. Bei den apoptoseregulierenden IAPs cIAP-2 und Survivin konnte unter Einfluss von CG eine deutliche Minderung des Proteinspiegels nachgewiesen werden. Auch das Protein der Bcl-2-Familie Bcl-X_L, welches eine Apoptoseresistenz bei Pankreastumorzellen anzeigt, war nach Behandlung mit 80 μ M CG herunterreguliert. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist über die Regulation der IAPs und der Bcl-2 Proteine an antiapoptotischen Signalkaskaden im Rahmen von TRAIL-vermittelter Apoptose beteiligt. Nach Vorbehandlung mit 80 μ M CG und anschließender Apoptosestimulation mit TRAIL konnte eine deutliche Verminderung der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B gegenüber alleiniger TRAIL-Stimulation gezeigt werden. Das an der NF- κ B-Signalgebung beteiligte TRAF-2 war unter CG Einfluss unverändert.

Ausblickend lässt sich festhalten, dass sich bei den zunächst durchgeführten Analysen zur Proliferation und Apoptose unter Einfluss von Catechingallat sowie auch bei den Untersuchungen zur Modulation der TRAIL-vermittelten Apoptose nach CG-Vorbehandlung Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität der Pankreastumorzelllinien PancTul und BxPC3 zeigten.

Wünschenswert wären weitere Untersuchungen hinsichtlich der molekularen Mechanismen dieses unterschiedlichen Verhaltens, insbesondere auch wegen des unterschiedlichen Differenzierungsgrades der Tumorzelllinien. Ein Ansatz wäre die Entwicklung von Biomarkern, welche eine Therapieresistenz anzeigen können, wie es beispielsweise schon molekularbiologisch mit hENT1 für das Chemotherapeutikum Gemcitabin gelungen ist. Dieser scheint

auch eine Relevanz für den Einfluss von Catechingallat auf das Proliferationsverhalten von Pankreastumorzellen zu haben. In dieser Arbeit konnte nach CG-Behandlung eine Herunterregulation der [³H]-Thymidininkorporation gezeigt werden. Ein Erklärungsansatz für die verminderte [³H]-Thymidininkorporation ist die Herunterregulation der hENT1 Expression auf der Zelloberfläche nach erfolgter CG-Behandlung.

In Studien zur oralen Bioverfügbarkeit von EGCG zeigte sich nach Konsum von in Wasser gelösten Teeextrakten eine maximale Plasmakonzentration von 0,7 µM. Die hier eingesetzten Konzentrationen betragen bis zu 80 µM CG, wie sie auch in anderen vergleichbaren in vitro Untersuchungen verwendet wurden. Erforderlich wären hier Analysen der Bioverfügbarkeit und in vivo Stabilität von CG. Bei den durchgeführten Western Blot Analysen der Apoptosekaskade, sowie deren Modulation zeigten sich bei Initiation der TRAIL-vermittelten Apoptose nach CG-Vorbehandlung insbesondere bei den IAPs cIAP-2 und Survivin eine Herunterregulation. Auch bei dem Transkriptionsfaktor NF-κB, sowie dem Protein der BcL-2 Familie BcL-X_L zeigten sich Regulationstendenzen, die eine Sensitivierung von Pankreastumorzellen für TRAIL-vermittelte Apoptose mittels Catechingallat erklären.

Insgesamt erwies sich das grüne Tee Polyphenol Catechingallat als eine vielversprechende Substanz sowohl im Hinblick auf eine Proliferationsinhibition als auch hinsichtlich einer Apoptosesensitivierung von Pankreastumorzellen. So scheint eine Effizienzsteigerung etablierter und experimenteller Tumorthérapien mittels Catechingallat möglich. Die untersuchten in vitro Mechanismen rechtfertigen ein weitergehende Analyse an in vivo Modellen. Ein Teil der gewonnenen Erkenntnisse wurde bereits in einer Fachzeitschrift veröffentlicht.

7 Literatur

- ADAMS, J. M. & CORY, S. (2007) Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*, 19, 488-96.
- ALTIERI, D. C. (2003) Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*, 22, 8581-9.
- ALTIERI, D. C. (2008) Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*, 8, 61-70.
- ANDREN-SANDBERG, A., BACKMAN, P. L. & ANDERSSON, R. (1997) Results of adjuvant therapy in resected pancreatic cancer. *Int J Pancreatol*, 21, 31-8.
- BABICH, H., ZUCKERBRAUN, H. L. & WEINERMAN, S. M. (2007) In vitro cytotoxicity of (-)-catechin gallate, a minor polyphenol in green tea. *Toxicol Lett*, 171, 171-80.
- BARBER, M. D., FEARON, K. C. & ROSS, J. A. (1999) Relationship of serum levels of interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and tumour necrosis factor receptors to the acute-phase protein response in advanced pancreatic cancer. *Clin Sci (Lond)*, 96, 83-7.
- BURRIS, H. & STORNILOLO, A. M. (1997). Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer*, 33 Suppl 1, S18-22.
- CHEN, C., EDELSTEIN, L. C. & GELINAS, C. (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*, 20, 2687-95.
- CHOW, H. H., CAI, Y., ALBERTS, D. S., HAKIM, I., DORR, R., SHAHI, F., CROWELL, J. A., YANG, C. S. & HARA, Y. (2001) Phase I pharmacokinetic study of tea polyphenols following single-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 53-8.

-
- CITRI, A. & YARDEN, Y. (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 505-16.
- DEGTEREV, A., BOYCE, M. & YUAN, J. (2003) A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-67.
- DEVERAUX, Q. L., ROY, N., STENNICKE, H. R., VAN ARSDALE, T., ZHOU, Q., SRINIVASULA, S. M., ALNEMRI, E. S., SALVESEN, G. S. & REED, J. C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J*, 17, 2215-23.
- DEVERAUX, Q. L., STENNICKE, H. R., SALVESEN, G. S. & REED, J. C. (1999) Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol*, 19, 388-98.
- DUBE, A., NICOLAZZO, J. A. & LARSON, I. (2010) Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate. *Eur J Pharm Sci*, 41, 219-25.
- EBERT, M., YOKOYAMA, M., FRIESS, H., KOBRIN, M. S., BUCHLER, M. W. & KORC, M. (1995) Induction of platelet-derived growth factor A and B chains and over-expression of their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 62, 529-35.
- EVANS, J. D., CORNFORD, P. A., DODSON, A., GREENHALF, W., FOSTER, C. S. & NEOPTOLEMOS, J. P. (2001) Detailed tissue expression of Bcl-2, bax, bak and Bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas. *Pancreatology*, 1, 254-62.
- GERHARD, M. C., SCHMID, R. M. & HACKER, G. (2002) Analysis of the cytochrome c-dependent apoptosis apparatus in cells from human pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*, 86, 893-8.
- GHARIBO, M., PATRICK-MILLER, L., ZHENG, L., GUENSCH, L., JUVIDIAN, P. & POPLIN, E. (2008) A phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic pancreatic cancer. *Pancreas*, 36, 341-5.

-
- HAMACHER, R., SCHMID, R. M., SAUR, D. & SCHNEIDER, G. (2008) Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*, 7, 64.
- HEDRICK, J. A., HELMS, A., VICARI, A. & ZLOTNIK, A. (1998) Characterization of a novel CC chemokine, HCC-4, whose expression is increased by interleukin-10. *Blood*, 91, 4242-7.
- HELDIN, C. H. & WESTERMARK, B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 79, 1283-316.
- 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.
- IGNEY, F. H. & KRAMMER, P. H. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2, 277-88.
- JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD, E., MURRAY, T., XU, J. & THUN, M. J. (2007) Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, 57, 43-66.
- KHAN, N. & MUKHTAR, H. (2008). Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett*, 269, 269-80.
- KHAN, N. & MUKHTAR, H. (2007) Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci*, 81, 519-33.
- KNOOPS, L. & RENAULD, J. C. (2004) IL-9 and its receptor: from signal transduction to tumorigenesis. *Growth Factors*, 22, 207-15.
- KROEMER, G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*, 3, 614-20.
- KYRTSONIS, M. C., DEDOISSIS, G., ZERVAS, C., PERIFANIS, V., BAXEVANIS, C., STAMATELOU, M. & MANIATIS, A. (1996) Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R), a new prognostic factor in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 93, 398-400.

- LI, D., XIE, K., WOLFF, R. & ABBRUZZESE, J. L. (2004) Pancreatic cancer. *Lancet*, 363, 1049-57.
- LIM, Y. C., LEE, S. H., SONG, M. H., YAMAGUCHI, K., YOON, J. H., CHOI, E. C. & BAEK, S. J. (2006) Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. *Eur J Cancer*, 42, 3260-6.
- LOPES, R. B., GANGESWARAN, R., MCNEISH, I. A., WANG, Y. & LEMOINE, N. R. (2007) Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy. *Int J Cancer*, 120, 2344-52.
- MACKEY, J. R., MANI, R. S., SELNER, M., MOWLES, D., YOUNG, J. D., BELT, J. A., CRAWFORD, C. R. & CASS, C. E. (1998). Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res*, 58, 4349-57.
- MARECHAL, R., MACKEY, J. R., LAI, R., DEMETTER, P., PEETERS, M., POLUS, M., CASS, C. E., YOUNG, J., SALMON, I., DEVIERE, J. & VAN LAETHEM, J. L. 2009. Human equilibrative nucleoside transporter 1 and human concentrative nucleoside transporter 3 predict survival after adjuvant gemcitabine therapy in resected pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 15, 2913-9.
- MOCHIZUKI, M., YAMAZAKI, S., KANO, K. & IKEDA, T. (2002) Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim Biophys Acta*, 1569, 35-44.
- MONTI, P., MARCHESI, F., RENI, M., MERCALLI, A., SORDI, V., ZERBI, A., BALZANO, G., DI CARLO, V., ALLAVENA, P. & PIEMONTE, L. (2004) A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile. *Virchows Arch*, 445, 236-47.
- MUKHTAR, H. & AHMAD, N. (1999) Cancer chemoprevention: future holds in multiple agents. *Toxicol Appl Pharmacol*, 158, 207-10.
- NAKANO, Y., TANNO, S., KOIZUMI, K., NISHIKAWA, T., NAKAMURA, K., MINOGUCHI, M., IZAWA, T., MIZUKAMI, Y., OKUMURA, T. & KOHGO, Y. 2007. Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with

- gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells. *Br J Cancer*, 96, 457-63.
- OKADA, H. & MAK, T. W. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 4, 592-603.
- PENNATI, M., FOLINI, M. & ZAFFARONI, N. (2008) Targeting Survivin in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 12, 463-76.
- PLOTNIK, D. A., EMERICK, L. E., KROHN, K. A., UNADKAT, J. D. & SCHWARTZ, J. L. (2010). Different modes of transport for 3H-thymidine, 3H-FLT, and 3H-FMAU in proliferating and nonproliferating human tumor cells. *J Nucl Med*, 51, 1464-71.
- QANUNGO, S., DAS, M., HALDAR, S. & BASU, A. (2005) Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*, 26, 958-67.
- RETZER-LIDL, M., SCHMID, R. M. & SCHNEIDER, G. (2007) Inhibition of CDK4 impairs proliferation of pancreatic cancer cells and sensitizes towards TRAIL-induced apoptosis via downregulation of Survivin. *Int J Cancer*, 121, 66-75.
- ROTHE, M., PAN, M. G., HENZEL, W. J., AYRES, T. M. & GOEDDEL, D. V. (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83, 1243-52.
- SALOMON, D. S., BRANDT, R., CIARDIELLO, F. & NORMANNO, N. (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 19, 183-232.
- SATOH, K., KANEKO, K., HIROTA, M., MASAMUNE, A., SATOH, A. & SHIMOSEGAWA, T. (2001) Expression of Survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer*, 92, 271-8.
- SCHNEIDER, G., SIVEKE, J. T., ECKEL, F. & SCHMID, R. M. (2005) Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology*, 128, 1606-25.

- SCHULZE-BERGMANN, H. & KRÄMMER, P. H. (2004) Apoptosis in cancer--implications for therapy. *Semin Oncol*, 31, 90-119.
- SHIMIZU, M., DEGUCHI, A., LIM, J. T., MORIWAKI, H., KOPELOVICH, L. & WEINSTEIN, I. B. (2005) (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res*, 11, 2735-46.
- SHISHODIA, S. & AGGARWAL, B. B. (2002) Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol*, 35, 28-40.
- SIDDIQUI, I. A., MALIK, A., ADHAMI, V. M., ASIM, M., HAFEEZ, B. B., SARFARAZ, S. & MUKHTAR, H. (2008) Green tea polyphenol EGCG sensitizes human prostate carcinoma LNCaP cells to TRAIL-mediated apoptosis and synergistically inhibits biomarkers associated with angiogenesis and metastasis. *Oncogene*, 27, 2055-63.
- SIPOS, B., MOSER, S., KALTHOFF, H., TOROK, V., LOHR, M. & KLOPPPEL, 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.
- SMITH, A., GIUNTA, B., BICKFORD, P. C., FOUNTAIN, M., TAN, J. & SHYTLE, R. D. (2010) Nanolipidic particles improve the bioavailability and alpha-secretase inducing ability of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for the treatment of Alzheimer's disease. *Int J Pharm*, 389, 207-12.
- SUZUKI, Y., NAKABAYASHI, Y. & TAKAHASHI, R. (2001) Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8662-7.
- TAKADA, M., NAKAMURA, Y., KOIZUMI, T., TOYAMA, H., KAMIGAKI, T., SUZUKI, Y., TAKEYAMA, Y. & KURODA, Y. (2002) Suppression of human pancreatic carcinoma cell growth and invasion by epigallocatechin-3-gallate. *Pancreas*, 25, 45-8.

- TOHYAMA, M., SAYAMA, K., KOMATSUZAWA, H., HANAKAWA, Y., SHIRAKATA, Y., DAI, X., YANG, L., TOKUMARU, S., NAGAI, H., HIRAKAWA, S., SUGAI, M. & HASHIMOTO, K. (2007) CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. *Int Immunol*, 19, 1095-102.
- TRAUZOLD, A., RODER, C., SIPOS, B., KARSTEN, K., ARLT, A., JIANG, P., MARTIN-SUBERO, J. I., SIEGMUND, D., MUERKOSTER, S., PAGEROLS-RALUY, L., SIEBERT, R., WAJANT, H. & KALTHOFF, H. (2005) CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *Faseb J*, 19, 620-2.
- TRAUZOLD, A., WERMANN, H., ARLT, A., SCHUTZE, S., SCHAFER, H., OESTERN, S., RODER, 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.
- VON BERNSTORFF, W., SPANJAARD, R. A., CHAN, A. K., LOCKHART, D. C., SADANAGA, N., WOOD, I., PEIPER, M., GOEDEGEBUURE, P. S. & EBERLEIN, T. J. (1999) Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand. *Surgery*, 125, 73-84.
- VON BERNSTORFF, W., VOSS, M., FREICHEL, S., SCHMID, A., VOGEL, I., JOHNS, C., HENNE-BRUNS, D., KREMER, B. & KALTHOFF, H. (2001) Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*, 7, 925s-932s.
- WALCZAK, H. & KRAMMER, P. H. (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res*, 256, 58-66.
- WALCZAK, H., MILLER, R. E., ARIAIL, K., GLINIAK, B., GRIFFITH, T. S., KUBIN, M., CHIN, W., JONES, J., WOODWARD, A., LE, T., SMITH, C., SMOLAK, P., GOODWIN, R. G., RAUCH, C. T., SCHUH, J. C. & LYNCH, D. H. (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, 5, 157-63.

WANG, C. Y., MAYO, M. W., KORNELUK, R. G., GOEDDEL, D. V. & BALDWIN, A. S., JR. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281, 1680-3.

WANG, C. Y., MAYO, M. W., KORNELUK, R. G., GOEDDEL, D. V. & BALDWIN, A. S., JR. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281, 1680-3.

YANG, C. S., CHEN, L., LEE, M. J., BALENTINE, D., KUO, M. C. & SCHANTZ, S. P. (1998) Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7, 351-4.

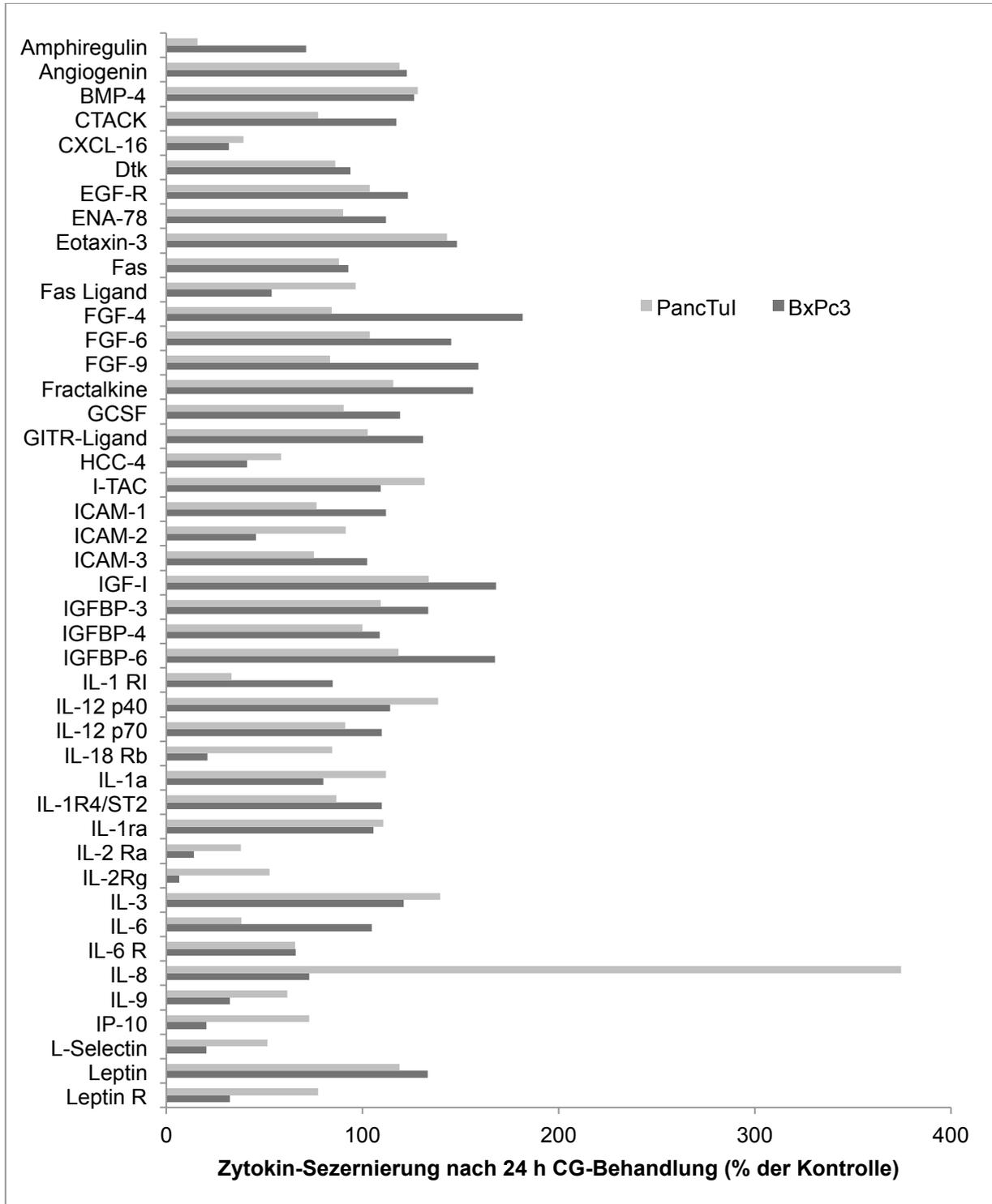
YANG, D., WELM, A. & BISHOP, J. M. (2004) Cell division and cell survival in the absence of Survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15100-5.

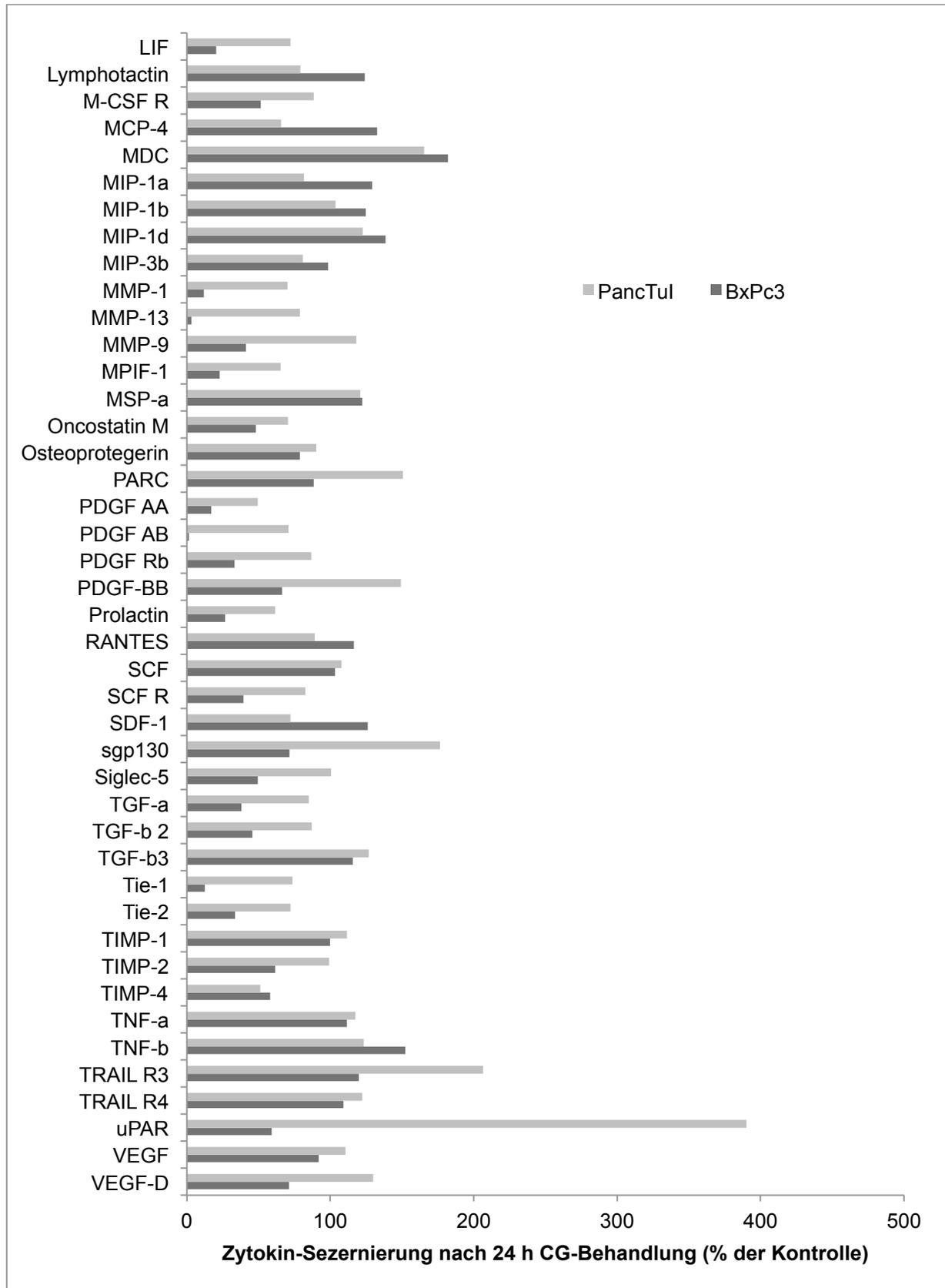
YOTSUMOTO, F., YAGI, H., SUZUKI, S. O., OKI, E., TSUJIOKA, H., HACHISUGA, T., SONODA, K., KAWARABAYASHI, T., MEKADA, E. & MIYAMOTO, S. (2008) Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 365, 555-61.

ZEEB, D. J., NELSON, B. C., ALBERT, K. & DALLUGE, J. J. (2000) Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Chem*, 72, 5020-6.

8 Anhang

8.1 Zytokin-Array





9 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anna Trauzold für die Vergabe des interessanten Themas sowie die kontinuierliche und zielgerichtete Betreuung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Röder für Anregungen und Unterstützung bei Planung und Auswertung der Versuche bedanken.

Herrn Prof. Dr. Kalthoff danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Laboratorien der Sektion Molekulare Onkologie des Instituts für Experimentelle Tumorforschung für die freundliche Zusammenarbeit danken.

Schließlich danke ich meinen Eltern für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

10 Lebenslauf

Name: Daniel Heise
Geburtstag/-ort: 11.07.1982 in Düsseldorf

Berufliche Tätigkeit

01/2010 – 12/2011 Arzt in Weiterbildung Basischirurgie
Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und
Endokrine Chirurgie
Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf

Seit 01/2012 Arzt in Weiterbildung Allgemeinchirurgie
Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und
Endokrine Chirurgie
Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf

Ausbildung

08/1995 – 07/2002 Erzbischöfliches St. Ursula Gymnasium
Düsseldorf

10/2003 – 11/2009 Studium der Humanmedizin
Christian-Albrechts Universität zu Kiel

02/2007 – 08/2007 Studium der Humanmedizin
Universita degli Studi di Roma „Tor Vergata“
Italien (ERASMUS Stipendium)

Examen

08/2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2009 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Veröffentlichung

Kürbitz C, Heise D, Redmer T, Goumas F, Arlt A, Lemke J, Rimbach G,
Kalthoff H, Trauzold A
Epicatechin gallate and catechin gallate are superior to epigallocatechin
gallate in growth suppression and anti-inflammatory activities in pancreatic
tumor cells. Cancer Sci. 2011 Apr;102(4):728-34