

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ. Prof. Dr. Irene Esposito

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERWINDUNG DER
APOPTOSE-RESISTENZ IN
PANKREASKARZINOMZELLEN**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Franca Isabel Bergfelder

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. rer. nat. C. Mahotka

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. R. U. Jänicke

**“WIR MÜSSEN AUSDAUER UND VOR ALLEM VERTRAUEN IN UNS SELBST HABEN.
WIR MÜSSEN GLAUBEN, DASS WIR BEGABT SIND UND DASS WIR ETWAS ERREICHEN KÖNNEN.“**

MARIE CURIE

Zusammenfassung

Die Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod spielt eine wichtige Rolle in der Karzinogenese, für das Fortschreiten des Tumorwachstums sowie die Widerstandsfähigkeit gegenüber Chemotherapeutika. Ein Teil von aberrant exprimierten Proteinen sind die Inhibitoren von Apoptose-proteinen – sogenannte IAPs –, die an apoptotischen Signalwegen beteiligt sind. Die Wechselwirkungen zwischen IAPs und ihren zellulären Zielen, wie beispielsweise Caspase-3, -7, -8 oder Caspase-9, führen zur Inaktivierung und folglich auch zur Hemmung der Apoptose-Kernmaschinerie. Als natürlicher Gegenspieler der IAPs fungiert der *second mitochondria-derived activator of caspases* (Smac), der durch Bindung der IAPs die Aktivierung der Caspasen ermöglicht. In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe fanden sich einige Substanzen mit der Eigenschaft, die natürliche Funktion von Smac nachzuahmen. Eben diese Fähigkeit dieser neuartigen Moleküle spezifisch in Tumorzellen den Zelltod zu induzieren, macht sie zu vielversprechenden Kandidaten für die Behandlung von Pankreaskarzinomen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mechanismen der neu entwickelten IAP-Antagonisten im Hinblick auf ihre Möglichkeiten untersucht, die Resistenz des programmierten Zelltodes in zwei etablierten humanen Pankreaskarzinomzelllinien zu überwinden. Unsere Ergebnisse zeigen erhöhte Level der Apoptose-Inhibitoren in Bauchspeicheldrüsenkrebszellen, was auf eine verringerte Fähigkeit der Caspaseaktivierung und somit eine verringerte Induktion von Apoptose hinweisen kann.

Zur Bestimmung von Dosis-Wirkungskurven (IC_{50} -Werte) sowie für Untersuchungen zum Zellsterben unter Einzel- oder Kombinationsbehandlung wurden Proliferationsassays durchgeführt. Analysen zur Form des Zelltodes wurden mittels Bestimmung der intrazelluläre Caspaseaktivität sowie Durchflusszytometrie bestimmt. Zudem wurden Untersuchungen bezüglich der Degradation der IAPs nach der Behandlung mit den IAP-Antagonisten sowie dem weiteren Nachweis von Caspase-Spaltprodukten mittels Western Blot Analysen erstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine signifikante Reduktion der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten LBPS03/05 erreicht werden konnte. Darüber hinaus konnte eine signifikante Zunahme der intrazellulären Caspase-3-Aktivität in Zellen der Linie HUP-T3 detektiert werden, was für eine Aktivierung der Apoptose spricht. Zudem zeigen durchflusszytometrische Analysen von PI-gefärbten Zellkernen einen signifikanten Anstieg des hypodiploiden *DNA*-Gehalts (Nicoletti-Methode) in den Tumorzellen, die mit den beiden neuen Substanzen behandelt wurden, was ein weiteres Apoptosemerkmal darstellt. Spaltungen von Pro-Caspase-8 und PARP konnten in höheren Induktor-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Kombinationsbehandlung mit dem Zytokin TRAIL sowie den Substanzen LBPS03/05 als auch die Kombination mit dem IAP-Antagonisten YM155 weist einen deutlich verstärkten Effekt bezüglich der Proliferationshemmung in beiden Pankreaskarzinomzelllinien auf. Die Kombination von LBPS03 mit TRAIL zeigte in beiden Pankreaskarzinomzelllinien einen additiven und die Kombinationsbehandlung von LBPS05 und TRAIL sogar einen synergistischen Effekt auf die Proliferationshemmung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit einen wirksamen antiproliferativen Effekt der neuen IAP-Antagonisten auf Pankreaskarzinomzellen und stellen, vor allem in der Kombinationsbehandlung, einen vielversprechenden Ansatz dar. In der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 fanden sich zudem Hinweise auf einen apoptotisch-induzierten Zelltod durch die Substanz LBPS03. In beiden Pankreaskarzinomzelllinien scheint LBPS05 eine andere Form des Zellsterbens zu induzieren und konnte somit zwar als effektiver aber nicht-apoptotischer Induktor des Zelltodes identifiziert werden. LBPS05 stellt somit einen gut geeigneten Induktor bei Apoptose-resistenten Tumorzellen dar und schafft dadurch neue Optionen für die Definition von Apoptose-unabhängigen Behandlungsstrategien.

Summary

The resistance of programmed cell death plays an important role in carcinogenesis, tumor progression and resistance to chemotherapy. One part of aberrantly expressed proteins are the inhibitors of apoptosis proteins – so called IAPs –, which are involved in apoptotic pathways. The interaction between IAPs and their cellular targets, caspase-3, -7, -8 or caspase-9, results in inactivation and consequently in the inhibition of the apoptosis core machinery. As a natural opponent of IAPs acts the second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC), by binding the IAPs it permits the activation of caspases. Preliminary investigations by our group found some substances with the property of mimicking the natural function of Smac. This ability of these novel molecules makes them promising drug candidates for pancreatic cancer therapy. In this study the mechanisms of the newly developed IAP-antagonists were examined with regard to their possibilities to overcome cell death resistance in a set of established human pancreatic cancer cell lines. Our results show increased levels of apoptosis inhibitors in pancreatic cancer cells, which may indicate a reduced ability to activate caspases and thus a reduced induction of apoptosis.

Proliferation assays were performed to determine the dose response curves (IC₅₀-values) as well as for investigations on the proliferation under single treatment with the IAP-antagonists or in combination. Analyses of the form of cell death were performed by determination of intracellular caspase activity and flow cytometry. In addition, studies on the degradation of the IAPs after treatment with the IAP-antagonists as well as the detection of caspase cleavage products were examined by western blot.

The results of this study show a significant reduction of pancreatic cancer cell proliferation after treatment with the IAP-antagonists LBPS03/05. Moreover, a significant increase in intracellular caspase-3 activity in HUP-T3 cells, which indicates an activation of apoptosis, could be detected. In addition further flow cytometric analysis of PI-stained nuclei showed a hypodiploid DNA-content peak (Nicoletti method) in cells treated with the two new substances, which is another sign of apoptosis. Pro-Caspase-8 and PARP cleavages were detected in higher inducer concentrations. The combination treatment with the cytokine TRAIL and the substances LBPS03/05 as well as the combination with the IAP-antagonist YM155 has a significantly increased effect on the inhibition of proliferation in both carcinoma cells. The combination of LBPS03 with TRAIL showed an additive effect in both pancreatic carcinoma cell lines. The combination treatment of LBPS05 and TRAIL showed even a synergistic effect on the inhibition of proliferation.

In summary, the results of this work show an effective antiproliferative effect of the new IAP-antagonists on pancreatic carcinoma cells and represent a promising approach, especially in combination treatment in the pancreatic carcinoma cell line HUP-T3 there was also evidence of apoptotic-induced cell death by LBPS03. LBPS05 appears to induce a different form of cell death in both pancreatic carcinoma cell lines and could be identified as an effective but non-apoptotic inducer of cell death. LBPS05 is therefore a well-suited inducer for apoptosis-resistant tumor cells and creates new options for the definition of apoptosis-independent treatment strategies.

Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	g/100
α	alpha
β	beta
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol

A

A	Ampere
AIF	Apoptosis inducing factor
APAF-1	Apoptotic protease-activating factor-1
APO-1	Apoptosis antigen 1
APS	Ammoniumpersulfat
AVPI	Alanin Valin Prolin Isoleucin

B

BID	BH3 interacting-domain death agonist
BIR	baculovirus IAP repeat
BRUCE	BIR-containing ubiquitin conjugating enzyme
BSA	Bovine Serum Albumin

C

c	Konzentration des Stoffes
CARD	caspase recruitment domain
CD95	Cluster of differentiation 95
cIAP	cellular Inhibitor of apoptosis protein
cm²	Quadratzenimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid

D	
d	Schichtdicke der Küvette
DIABLO	Direct IAP binding protein with low PI
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E	
ϵ	Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
F	
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H	
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HtrA2/Omi	High temperature requirement protein A2

I	
I₀	Intensität des einstrahlenden Lichtes
I₁	Intensität des transmittierten Lichtes
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IBM	IAP binding motif
IPMN	Intraductal papillary mucinous neoplasia
K	
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K	Kontrolle
L	
L	Liter
LBPS	Ligand Based Pan-Selective
M	
M	Mol
mA	Milliampere
MCN	Mucinous cystic neoplasm
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLKL	Mixed lineage kinase domain-like protein
MMP	mitochondrial membrane permeabilization
mRNA	messenger RNA
N	
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NAIP	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein

NEA	Non-essential amino acids
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

O

Omi	Omi stress-regulated endoprotease
------------	-----------------------------------

P

PanIN	Pancreatic intraepithelial neoplasia
PanNET	Pancreatic neuroendocrine tumor
PBS	Phosphate-buffered saline
pH	potentia Hydrogenii
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid

R

RIP	Receptor-interacting threonine/serine protein kinase
RNA	Ribonucleic acid

S

SDS	Sodium dodecyl sulfate
Smac	Second mitochondrial-derived activator of caspases
SMDC	Small-molecule drug candidates

T

tBID	BH3 interacting-domain death agonist
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumor-Necrosis-Factor alpha
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor

TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
Ts-IAP	Testis-specific inhibitor of apoptosis protein

U

UICC	Union Internationale Contre le Cancer
-------------	---------------------------------------

X

XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
-------------	---

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1 - Signalkasaden des programmierten Zelltodes</i>	<i>5</i>
<i>Abb. 2 - Schematische Darstellung der acht Vertreter humaner Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs).....</i>	<i>9</i>
<i>Abb. 3 - Wachstumskinetik der Pankreaskarzinomzelllinie HUP T3.....</i>	<i>23</i>
<i>Abb. 4 - Wachstumskinetik der Zelllinie PaTu8902.....</i>	<i>24</i>
<i>Abb. 5 - Schematische Aufbau eines Semi Dry Blots</i>	<i>31</i>
<i>Abb. 6 - Dosis-Wirkungskurven der IAP Antagonisten LBPS03 und LBPS05</i>	<i>34</i>
<i>Abb. 7 - Wirkung der Substanzen LBPS03 und LBPS05 auf das Zellüberleben von Zellen der Linien HUP-T3 und PaTu8902 über 48 bzw. 72 Stunden.....</i>	<i>36</i>
<i>Abb. 8 - Durchflusszytometrische Untersuchung zur Aktivierung der intrazellulären Caspase-3/-7 Aktivität nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten.....</i>	<i>37</i>
<i>Abb. 9 - Relative Caspase-8 Aktivität nach Inkubation mit den IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05.....</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 10 - Relative Caspaseaktivität der Initiatorcaspasen-2/-8 und-9 nach Behandlung mit den neu entwickelten Substanzen</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 11 - Ermittlung der Apoptosehäufigkeit in der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05 mittels PI-Färbung</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 12 - Western Blot Analysen zur Spaltung von Caspasen und Caspase-Spaltprodukten nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten.....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 13 - Western Blot Analyse zur PARP-Spaltung nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05</i>	<i>43</i>
<i>Abb. 14 - Basale Expression der Apoptose-Inhibitoren in den Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902</i>	<i>44</i>
<i>Abb. 15 - Degradation von XIAP in Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05 mittels Western Blot Analysen.....</i>	<i>46</i>
<i>Abb. 16 - Western Blot Analyse als Untersuchung zur Degradation von cIAP2 in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902.....</i>	<i>47</i>
<i>Abb. 17 - Wirkung der Zytostatika Etoposid und Gemcitabin auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie HUP-T3.....</i>	<i>48</i>
<i>Abb. 18 - Einfluss des small molecule YM155 auf die Proliferation der Zelllinie HUP-T3.....</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 19 - Proliferationsanalysen der Zelllinie HUP-T3 nach Behandlung mit Zytokinen über 48 bzw. 72 Stunden</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 20 - Wirkung der Zytostatika auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902.....</i>	<i>52</i>
<i>Abb. 21 - Proliferationsanalysen der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 nach Behandlung mit dem Survivin-Inhibitor YM155</i>	<i>53</i>

*Abb. 22 - Behandlung der Pankreaskarzinomzellen über 48 Stunden mit den Todesrezeptor-
liganden TNF α und TRAIL..... 54*

*Abb. 23 - Einfluss der Zytokine TNF α , TRAIL und Fas-Ligand auf das Zellüberleben der
Linie PaTu8902 nach 3 Tagen Inkubation 56*

*Abb. 24 - Einfluss der Kombinationsbehandlungen auf das Zellüberleben der Pankreas-
karzinomzelllinie HUP-T3 58*

*Abb. 25 - Wirkung von LBPS03 und LBPS05 in Kombination mit den Zytokinen Fas-Ligand
und TNF α auf die Zellen der Linie HUP-T3..... 60*

*Abb. 26 - Einfluss der Kombinationstherapie von TRAIL mit den IAP-Antagonisten über
48 bzw. 72 Stunden..... 61*

*Abb. 27 - Wirkung von LBPS03 und LBPS05 in Kombination mit Zytostatika oder dem
Survivin-Inhibitor auf die Proliferation der PaTu8902-Zellen..... 63*

*Abb. 28 - Wirkung von LBPS03, LBPS05 und TRAIL auf das Zellüberleben der Pankreas-
karzinomzellen PaTu8902 nach 48 und 72 Stunden 64*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele..... 30

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Inhaltsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Fehlregulierte Zellhomöostase in Tumorzellen	1
1.2 Das Pankreas: Anatomie und Physiologie	2
1.3 Das Pankreaskarzinom.....	3
1.4 Der programmierte Zelltod und seine Rolle in Tumorzellen.....	4
1.5 <i>CysteinyI-aspartate specific proteases</i> (Caspasen).....	6
1.5.1 Die extrinsische Aktivierung der Apoptose.....	6
1.5.2 Der mitochondrial-vermittelte programmierte Zelltod	7
1.6 Agonisten und Antagonisten der Apoptose	8
1.7 <i>Smac mimetics</i> als IAP-Antagonisten in der Tumorthherapie	10
1.8 <i>Smac mimetics</i> als Kombinationstherapie in Tumorzellen	11
1.9 Ziele der Arbeit	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Material	13
2.1.1 Antikörper für Western Blot Analysen	13
2.1.2 Chemikalien	13
2.1.3 Gebrauchsfertige Lösungen	14
2.1.4 Kits	15
2.1.5 Laborgeräte	15
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	16
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.8 Zellkulturmedien und Zusätze	18
2.1.8.1 Zelllinie HUP-T3	18
2.1.8.2 Zelllinie PaTu-8902	18
2.1.9 Neu entwickelte IAP-Antagonisten	18
2.1.10 Software und Webtools.....	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zellbiologische Methoden	20
2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinie HUP-T3	20
2.2.1.2 Kultivierung der Zelllinie PaT8902	20
2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels <i>Automated Cell Counter</i>	21
2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels <i>DRAQ5™</i>	21
2.2.2 Analysen mittels Durchflusszytometrie.....	25
2.2.2.1 Bestimmung der intrazellulären Caspaseaktivität	25
2.2.2.2 Propidiumiodid-Färbung.....	26
2.2.3 Biochemische Methoden.....	27
2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus den Zelllinien HUP-T3 und PaTu8902	27
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	28
2.2.3.3 Western Blot.....	29
2.2.4 Signifikanzen	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte der IAP-Antagonisten	33

3.2 Einfluss der neuen IAP-Antagonisten auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902	34
3.3 Untersuchungen zum Zelltodmechanismus in der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3	37
3.3.1 Wirkung der Substanzen LBPS03 und LBPS05 auf die Aktivität der Initiator- und Effektor-Caspasen	37
3.3.2 Ermittlung der Apoptose-Häufigkeit nach Behandlung mit IAP-Antagonisten	39
3.4 Untersuchungen zur Caspaseaktivität in der Zelllinie PaTu8902 nach Behandlung mit IAP-Antagonisten durch Western Blot Analysen	40
3.5 Überprüfung der PARP-Spaltung in der Zelllinie HUP-T3 durch Aktivierung der Caspase-3 auf Proteinebene	42
3.6 Die Expression von cIAP1, cIAP2 und XIAP in den Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902	43
3.6.1 Bestimmung der Basalexpression von cIAP1, cIAP2 und XIAP	43
3.6.2 Untersuchungen zur Degradation von XIAP und cIAP-2 in den Zelllinien HUP-T3 und PaTu8902 nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05	45
3.7 Wirkung potentieller Kombinationspartner auf die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902	47
3.7.1 Untersuchungen des Einflusses von Zytostatika auf die Zelllinie HUP-T3	47
3.7.2 Wirkung des <i>small molecule</i> YM155 auf die Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3	49
3.7.3 Auswirkungen auf die Proliferation der Zelllinie HUP-T3 durch die Behandlung mit Zytokinen	50
3.7.4 Wirkung von Etoposid und Gemcitabin auf die Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902	51
3.7.5 Einfluss des Survivin-Inhibitors YM155 auf die Proliferation der PaTu8902-Zellen	53
3.7.6 Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 nach Behandlung mit Zytokinen	54
3.8 Einfluss der IAP-Antagonisten in Kombinationsbehandlungen auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen	57
3.8.1 Wirkung der kombinatorischen Anwendung von Zytostatika, YM155 mit LBPS03 und LBPS05 auf die Zelllinie HUP-T3	57
3.8.2 Einfluss der beiden LBPS-Substanzen in Kombination mit Todesrezeptorliganden auf das Zellüberleben in HUP-T3	59
3.8.3 Einfluss der IAP-Antagonisten auf die Proliferation der PaTu8902-Zellen in Kombination mit YM155, Etoposid oder Gemcitabin	62
3.8.4 Untersuchungen zum Zellüberleben von PaTu8902 nach Kombinationsbehandlung der IAP-Antagonisten mit TRAIL	64
4 Diskussion	66
4.1 Signifikante Zellzahlreduktion der Pankreaskarzinomzellen durch die neu entwickelten IAP-Antagonisten	66
4.2 Caspasen als Ursache für den Zelltod in Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902	68
4.3 Hinweise für Apoptose als Mechanismus	70
4.4 Die Relevanz von XIAP und cIAP2 für die IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05	72
4.5 Die Wirkung der IAP-Antagonisten in Kombinationsbehandlung	74
4.5.1 Verstärkte Wirkung der <i>Smac mimetics</i> durch die kombinatorische Behandlung mit Zytostatika	75
4.5.2 Starker anti-proliferativer Effekt durch die Kombinationsbehandlung mit Survivin- Inhibitor YM155	76
4.6 Verringerter Zellüberleben durch die Todesrezeptorliganden	77
4.6.1 Klinische Bedeutung der Kombinationsbehandlung von LBPS03 und LBPS05 mit Fas-Ligand sowie TNF α	78
4.6.2 Signifikante Reduktion der Zellzahl unter der Kombinationsbehandlung mit TRAIL ...	79
5 Literaturverzeichnis	82
Danksagung	89

1 Einleitung

1.1 Fehlregulierte Zellhomöostase in Tumorzellen

In allen Zellen adulter mehrzelliger Organismen liegt eine Zellhomöostase vor; ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen der Zellproliferation und dem Zellsterben. So ist eine Fehlregulation des geordneten Zelltodes in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen oder Tumorentstehung, zu beobachten (SOLARY ET AL., 1996). Kommt es in Zellen zur Akkumulation von Mutationen, kombiniert mit einer Zunahme der Proliferation sowie mangelndem Zelltod, kann dies zur Entwicklung einer Neoplasie und somit zur Tumorerkrankung führen (ASHKENAZI ET AL., 2008).

Im Jahr 2003 haben ANDREEF UND KOLLEGEN vier zelluläre Funktionen dargestellt, die in Neoplasien dazu tendieren, fehlreguliert zu sein. Zum einen sind die physiologischen Beschränkungen der Zellproliferation unzureichend und zum anderen ist die Zelldifferenzierung gestört. Hinzu kommen eine Destabilisierung der chromosomalen und genetischen Organisation sowie eine Dysregulation des streng regulierten Zelltodes. Im Gegensatz zu benignen Tumoren, die durch ihr verdrängendes Wachstum zur Kompression umliegender Gewebe führen können, wachsen maligne Neoplasien invasiv und zellschädigend. In dem Review „*The Hallmarks of Cancer*“ von HANAHAN UND WEINBERG werden sechs Veränderungen beschrieben, die zusammen für das Fortschreiten des malignen Wachstums verantwortlich sind. Neben der Eigenstimulation mit Wachstumssignalen und dem Sensibilitätsverlust gegenüber wachstumshemmenden Einflüssen, können Tumorzellen den programmierten Zelltod umgehen. Ferner besitzen sie die uneingeschränkte Möglichkeit zur Zellteilung, Angiogenese, Gewebsinvasion und Ausbildung von Metastasen (HANAHAN AND WEINBERG, 2000).

Dass die Karzinogenese ein multifaktorielles Geschehen ist und möglicherweise einem chemischen, physikalischen oder biologischen Einfluss oder der Kombination dieser Einflüsse auf die Zelle geschuldet ist, beschrieb PITOT 1993. Zehn Jahre später geht man davon aus, dass auch genetische und epigenetische Veränderungen für die Tumorentstehung ursächlich sein können (BALMAIN ET AL., 2003). So sind bei der Tumorentstehung Veränderungen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, Apoptosegenen und DNA-Reparaturgenen zu finden. Mutationen in Onkogenen führen zu einer verstärkten Aktivierung der Gene, hingegen resultieren Veränderungen in Suppressorgenen in einer verminderten Aktivität. Unterliegen diese Gene keinen Kontrollmechanismen mehr, führt dies zum unkontrollierten Zellwachstum und ist Kennzeichen einer Neoplasie beziehungsweise eines Tumors (HASCHEK ET AL., 2013).

1.2 Das Pankreas: Anatomie und Physiologie

Retroperitoneal und auf der Höhe des 2. Lendenwirbels liegt leicht quer verlaufend das Pankreas, übersetzt die Bauchspeicheldrüse. Es erstreckt sich mit einer Länge von ca. 15 cm vom Duodenum (Zwölffingerdarm) bis zum Milzhilus und bedeckt nach ventral die großen Bauchgefäße (*Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior*). Makroskopisch gliedert sich das Pankreas in kleine Läppchen und kann in drei Anteile unterschieden werden:

- *Caput pancreatis* (Pankreaskopf): rundlicher Pankreasanteil, der vom Duodenum umfasst wird und embryologisch aus einer ventralen und dorsalen Anlage besteht
- *Corpus pancreatis* (Pankreaskörper): schmaler und horizontal verlaufender Abschnitt mit enger topographischer Beziehung zu den Abdominalgefäßen
- *Cauda pancreatis* (Pankreasschwanz): länglicher, schmaler Anteil der Bauchspeicheldrüse, der bis zum Milzhilus reicht

Physiologisch gehört die Bauchspeicheldrüse zum Gastrointestinaltrakt und besitzt aufgrund seiner Funktion als Verdauungsorgan einen Ausführungsgang (*Ductus pancreaticus*), der gemeinsam mit dem *Ductus choledochus* (Hauptgallengang) in der *Papilla duodeni major* in das Duodenum mündet.

Funktionell lassen sich im Pankreas exokrines und endokrines Drüsengewebe unterscheiden. Zum größten Teil besteht die Verdauungsdrüse aus exokrinem Drüsengewebe, das sowohl aus Azinuszellen als auch aus Pankreasgangzellen besteht. Das Sekret der Azinuszellen enthält zum einen Enzyme zur Spaltung von Proteinen (Proteasen) oder Fetten (Lipasen) und zum anderen Kohlenhydrat-spaltende Enzyme. Die Epithelzellen der Pankreasgänge sezernieren Bikarbonat zur Regulation des pH-Wertes im Verdauungsssekret.

Direkt an das Blut werden Hormone aus den Langerhans-Inseln abgegeben, die dem endokrinen Anteil des Pankreasgewebe entsprechen. Hier können vier verschiedene hormonproduzierende Zelltypen nachgewiesen werden. Neben den A-Zellen (Glukagon), D-Zellen (Somatostatin) und PP-Zellen (pankreatisches Polypeptid) sind überwiegend die Insulin-produzierenden B-Zellen in den Langerhans-Zellen vorhanden (BENNINGHOFF AND DRENCKHAHN, 2004). Somit ist das Pankreas auf der einen Seite als Verdauungsdrüse Teil des Gastrointestinaltraktes und trägt zur Nahrungsaufnahme und auf der anderen Seite spielt es als Hormon-produzierendes Organ unter anderem in der Blutzuckerregulation eine entscheidende Rolle.

1.3 Das Pankreaskarzinom

Unter einem Pankreaskarzinom versteht man eine maligne (bösartige) Erkrankung der Bauchspeicheldrüse. Daten des ZENTRUMS FÜR KREBSREGISTERDATEN (ROBERT KOCH-INSTITUT) UND DER GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. zeigen, dass im Jahre 2014 ca. eine halbe Million Krebsneuerkrankungen zu verzeichnen waren. Geschätzte 17.130 waren dabei auf eine maligne Neubildung des Pankreas zurückzuführen. Wird die häufigste Tumorlokalisation untersucht, steht das Pankreaskarzinom bei Männern an zehnter Stelle (3,4 %), während hingegen bei Frauen 3,8 % der Krebsneuerkrankungen durch Bauchspeicheldrüsenkrebs hervorgerufen werden und somit an sechster Stelle zu finden sind. Als Todesursache stellte das Pankreaskarzinom 2014 die vierthäufigste Entität aller Krebssterbefälle sowohl beim männlichen als auch beim weiblichen Geschlecht dar. Betrachtet man die Mortalität der malignen Bauchspeicheldrüsenkrankung, zeigt sich eine hohe Sterberate mit der niedrigsten Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen (ROBERT KOCH-INSTITUT UND DIE GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., 2017).

Die Ursachen der Entstehung eines Pankreaskarzinoms sind bislang immer noch ungeklärt. Neben verschiedenen Risikofaktoren, wie eine positive Familienanamnese (Erkrankung der Eltern und/oder Geschwister), Diabetes mellitus, Adipositas oder eine chronische Pankreatitis, stellt das Rauchen den bekanntesten Risikofaktor zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms dar (MICHAUD, 2004). 2018 zeigte eine Metaanalyse, dass Rauchen das Risiko an einem Tumor der Bauchspeicheldrüse zu erkranken, mehr als verdoppelt (LUGO ET AL., 2018). Dagegen scheint Alkohol nicht ursächlich für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms zu sein (BAGNARDI ET AL., 2001), jedoch ist er mit einem erhöhten Risiko für eine chronische Pankreatitis assoziiert (WHITCOMB, 2004), die wiederum einen Risikofaktor darstellt. Ebenso haben Patienten mit hereditären Erkrankungen, wie dem hereditären Mamma- oder Ovarialkarzinom, dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC) oder der hereditären Pankreatitis eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, wie auch Patienten mit zystischer Fibrose (MCGUIGAN ET AL., 2018; MAISONNEUVE ET AL., 2007).

Der Ursprung eines Pankreaskarzinoms kann entweder im exokrinen Drüsengewebe liegen oder in den endokrinen Langerhans-Inseln. Den größten Anteil der pankreatischen Neoplasien machen die duktaalen Adenokarzinome aus, die am häufigsten im *Caput pancreaticus* lokalisiert sind (WARSHAW AND FERNANDEZ-DEL CASTILLO, 1992). Hier können drei Vorläuferläsionen des *pancreatic ductal adenocarcinoma* (PDAC) beschrieben werden: die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) und die muzinös zystischen Neoplasien (MCN) (GNONI ET AL., 2013). Neuroendokrine Pankreaskarzinome (PanNETs) kommen sehr selten vor und werden durch die Wirkungen der Überproduktion der entsprechenden Hormone des endokrinen Gewebes symptomatisch, z.B. Insulinom oder Gastrinom (AKIROV ET AL., 2019).

Klinisch präsentiert sich das Pankreaskarzinom häufig unspezifisch mit abdominellen Schmerzen oder Gewichtsverlust und die Patienten befinden sich bei Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung (CHU ET AL., 2017). Die Einteilung der Tumorerkrankung wird anhand der TNM-Klassifikation der „*Union Internationale Contre le Cancer*“ (UICC) vorgenommen. Hier beschreibt „T“ die Ausdehnung des Primärtumors, „N“ den Befall, das Fehlen bzw. das Ausmaß von regionärem Lymphknotenmetastasen sowie „M“ das Vorhandensein bzw. Fehlen von Fernmetastasen (SOBIN ET AL., 2011). Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 3 % ist das Pankreaskarzinom eine der aggressivsten Tumorerkrankungen und zeigt eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Radiotherapie. Die Widerstandsfähigkeit bezüglich konventioneller Therapien hängt in Pankreaskarzinomzellen von der Möglichkeit ab, den gerichteten Zelltod zu umgehen und scheint ihre Ursache in der abnormen Expression von Proteinen zu haben (LOPES ET AL., 2007). Somit scheinen neue Therapieansätze, die auf spezifische Proteine zielen, um in Tumorzellen wieder den gerichteten Zelltod hervorzurufen, vielversprechende Möglichkeiten zu sein (FULDA, 2015b).

1.4 Der programmierte Zelltod und seine Rolle in Tumorzellen

Als eine Form des programmierten Zelltodes, der an der Regulation einer Zellpopulation beteiligt ist, wurde die Apoptose 1972 erstmalig von KERR, WYLLIE UND CURRIE beschrieben. Sie spielt in der Embryogenese, der Zellhomöostase sowie in pathologischen Prozessen und der Zellalterung eine wichtige Rolle (LOCKSHIN AND ZAKERI, 2007). In neurodegenerativen oder autoimmun-bedingten Erkrankungen ist eine ineffektive Apoptose auch ein wichtiger Faktor, wie ebenfalls in vielen Arten von Tumorerkrankungen (ELMORE, 2007).

Die Apoptose kann, als eine Form des Zelltodes, durch unterschiedliche Stimuli ausgelöst werden, zu denen Zytokine, Hormone, Viren oder toxische Schädigungen gehören (EARNSHAW ET AL., 1999). Zu Beginn des programmierten Zelltodes steht morphologisch zum einen die Zellschrumpfung und zum anderen die Verdichtung des Chromatins, auch als Pyknose bezeichnet. Anschließend werden die Zellfragmente in sogenannte Apoptosebläschen (*apoptotic bodies*) abgetrennt, die sowohl Zytoplasma als auch verdichtete Zellorganellen enthalten und teilweise nukleäre Anteile. Die *apoptotic bodies*, umgeben von einer intakten Plasmamembran, werden im Anschluss von Makrophagen phagozytiert (ELMORE, 2007). Erkannt werden die Bläschen von Makrophagen durch die Exposition von Phosphatidylserin an der äußeren Plasmamembran, das normalerweise auf der Innenseite exprimiert wird (FADOK ET AL., 1998). Dies führt dazu, dass durch den Mechanismus der Apoptose eine Aktivierung des Immunsystems vermieden wird und im Gegensatz zur Nekrose eine Entzündungsreaktion ausbleibt (EDINGER AND THOMPSON, 2004).

Zwei Hauptmechanismen, die unterschiedlich aktiviert werden können, lassen sich im programmierten Zelltod unterscheiden. Zum einen kann die Aktivierung über den extrinsischen Weg stattfinden, der über die Bindung eines Liganden an seinen Todes-Rezeptor die Apoptose initiiert und zum anderen über den intrinsischen Signalweg, der durch *DNA*-Schäden pro-apoptotische Signale aus den Mitochondrien freisetzt. Gemeinsam haben beide Signalwege die Aktivierung der Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*), die eine zentrale Rolle in der Apoptose spielen (HENGARTNER, 2000).

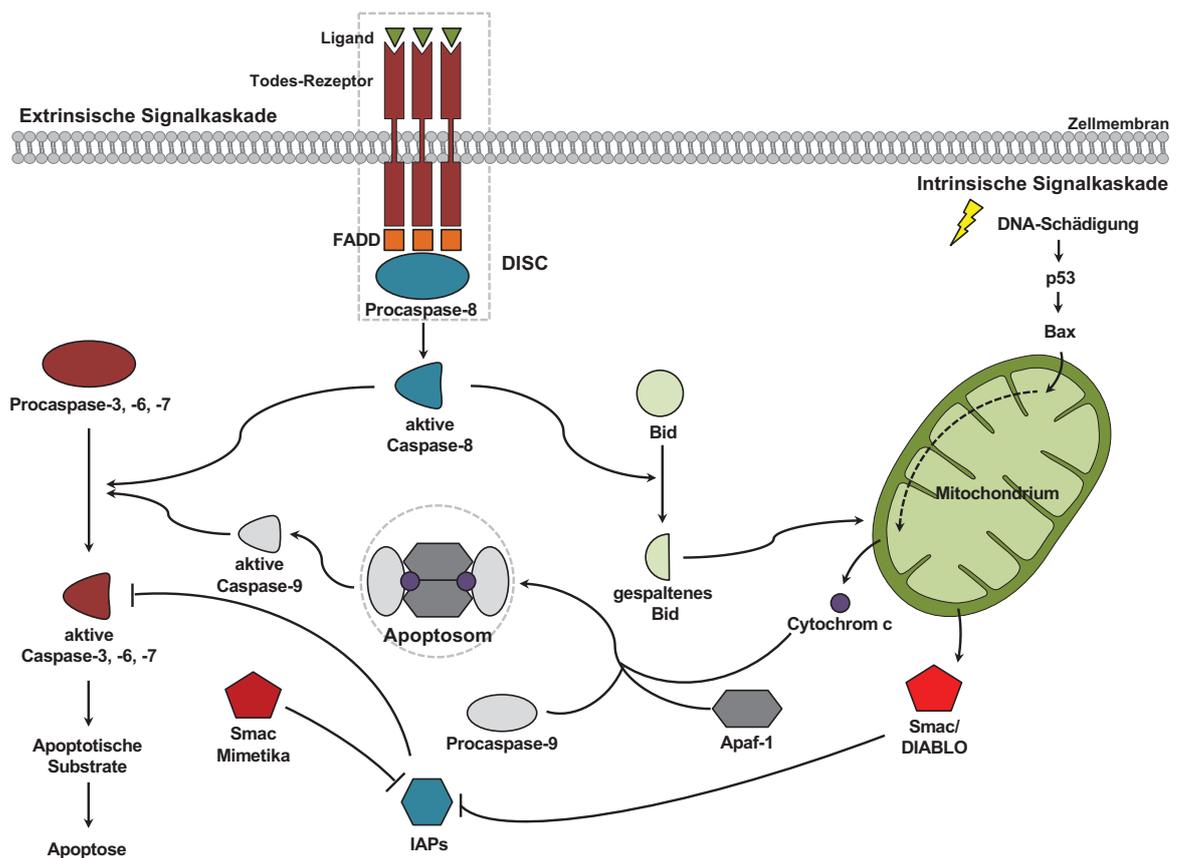


Abb. 1 - Signalkaskaden des programmierten Zelltodes

Durch die Bindung eines Todesliganden an seinen entsprechenden Todesrezeptor wird die extrinsische Signalkaskade initiiert. Es kommt zur Trimerisierung des Rezeptors und es bildet sich der *death-inducing signaling complex* (DISC). Dieser rekrutiert über Adaptermoleküle wie FADD (*Fas-associated death domain protein*) inaktive Initiator-Procaspasen-8, die über diese Interaktion autoproteolytisch aktiviert werden können. Anschließend spaltet die aktive Caspase-8 die Effektorcaspasen-3, -6 und -7, die wiederum apoptotische Substrate spalten und schlussendlich im apoptotischen Zelltod münden. Rezeptor-unabhängig findet die Aktivierung des intrinsischen Signalweges statt. Dies hat zur Folge, dass Cytochrom c und Smac/DIABLO aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien ausgeschüttet werden. Im Zytosol bildet Cytochrom c mit mehreren Molekülen Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) und Procaspase-9 das sogenannte Apoptosom. Durch die Bindung der Procaspase-9 an Apaf-1 kommt es bei der Initiatorcaspase zu einer Konformationsänderung und sie kann sich selbst aktivieren. Anschließend werden auch hier die Effektorcaspasen aktiviert und es erfolgt die Spaltung von Todesproteinen. Verbunden sind beide Signalkaskaden über die Caspase-8-vermittelte Spaltung von Bid, das zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt. Modifiziert nach (HENGARTNER, 2000).

1.5 Cysteinyl-aspartate specific proteases (Caspasen)

Heute sind zwölf humane Caspasen beschrieben, die am besten für ihre Funktion im programmierten Zelltod bekannt sind. Auf der C-terminalen Seite von Aspartat spalten die Enzyme vorzugsweise ihre Spaltprodukte, seltener auch hinter Glutamat (JULIEN AND WELLS, 2017). Anhand ihrer Funktion können die Caspasen in drei Gruppen unterschieden werden; so sind die Caspasen-1, -4, -5 und -12 an entzündlichen Prozessen beteiligt, wohingegen die Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10 als apoptotische Caspasen bezeichnet werden können. Hier können noch Effektor- und Initiatorcaspasen differenziert werden (SHALINI ET AL., 2015).

Als enzymatisch inaktive Zymogene werden die Caspasen synthetisiert und enthalten generell eine N-terminale Prodomäne, auf die eine große (p20) und eine kleine Untereinheit (p10) folgen. Wird das Enzym aktiviert, liegt es als Heterotetramer vor und besteht aus zwei aktiven Zentren sowie zwei p20/p10 Heterodimeren. In der Regel werden die Caspasen durch die Spaltung des Zymogens zwischen den Domänen p20 und p10 aktiviert (HENGARTNER, 2000).

Anhand ihrer Prodomänen können Caspasen in Initiator- oder Effektorcaspasen eingeteilt werden. Eine lange Prodomäne ist bei den Caspasen-2, -8, -9 und -10 zu finden, über die sie an ihre spezifischen Aktivatoren binden kann. Wird die Caspase-8 als Initiatorcaspase des extrinsischen Signalweges durch die Bindung eines Liganden an seinen Todesrezeptor aktiviert, kann sie *downstream* die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 spalten. Als Initiatorcaspase der intrinsischen Signalkaskade agiert die Caspase-9 und führt letztlich auch zur Aktivierung der Effektorcaspasen (NUNEZ ET AL., 1998). Die Caspasen-3, -6 und -7, mit jeweils einer kurzer Prodomäne, werden als Effektorcaspasen bezeichnet. Ihre Aktivierung durch die vorgeschalteten Initiatorcaspasen führt zu einer zu den morphologischen Zellveränderungen, die für die Apoptose kennzeichnend sind und zum anderen zur Spaltung verschiedener Substrate (FUENTES-PRIOR AND SALVESEN, 2004).

Reguliert wird die Aktivität sowie die Aktivierung der Caspasen unter anderem durch die Interaktion mit den *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs), die auch je nach Zelltyp unterschiedliche Expressionen aufweisen. Des Weiteren kann die Aktivität der Caspasen durch die Regulation der Genexpression der Procaspasen gesteuert werden oder durch die Hemmung der Todes-Rezeptor-induzierten Aktivierung (EARNSHAW ET AL., 1999).

1.5.1 Die extrinsische Aktivierung der Apoptose

Der extrinsische Signalweg des programmierten Zelltodes wird durch sogenannte Todes-Rezeptoren initiiert, die zur Superfamilie der *Tumor-Necrosis-Factor-Receptors* (TNFR) gehören. Als Typ-1 Transmembranproteine besitzen TNF-Rezeptoren extrazellulär mehrere Cystein-reiche Domänen, wobei die Todes-Rezeptoren zusätzlich eine Todes-Domäne enthalten, die aus etwa 70 Aminosäuren

besteht und im Zytoplasma lokalisiert ist (NAIR ET AL., 2014). Zu den Todes-Rezeptoren gehören *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) receptor-1 und -2 (TRAIL-R1/-2), *tumor necrosis factor* (TNF) receptor-1 (TNFR1) und CD95 (Apo-1/Fas). Binden nun entsprechende Liganden oder agonistische Antikörper an die Todes-Rezeptoren, werden diese aktiviert und können die Apoptose fördern (TUMMERS AND GREEN, 2017).

Durch die Bindung von $\text{TNF}\alpha$, FasL oder TRAIL an ihren jeweiligen Rezeptor, werden verschiedene Proteine rekrutiert und bilden den sogenannten *death-inducing signaling complex* (DISC). Hierbei binden Adaptermoleküle wie das *Fas-associated death domain protein* (FADD) an die Todesdomäne des Todes-Rezeptors und rekrutieren mehrere Moleküle der inaktiven Procaspase-8. Aufgrund der Interaktion von FADD mit der inaktiven Initiatorcaspase-8 am *death-inducing signaling complex* kann die Aktivierung der Procaspase-8 autoproteolytisch erfolgen (HENGARTNER, 2000; WESTPHAL AND KALTHOFF, 2003). Abhängig von dem jeweiligen Zelltyp können nun noch zwei verschiedene Mechanismen der extrinsischen Signalkaskade unterschieden werden. In Typ-I Zellen wird eine ausgeprägte Aktivierung der Caspase-8 am DISC ausgelöst, die zur sofortigen Aktivierung der Effektorcaspasen führt und schlussendlich im programmierten Zelltod endet (SCAFFIDI ET AL., 1998).

Eine deutlich geringere Aktivität der Initiatorcaspase-8 ist in Typ-II- Zellen zu verzeichnen und bedarf somit einer Verstärkung des Signals, um eine ausreichende Aktivierung der Effektorcaspasen zu gewährleisten. Durch die Spaltung von BID (*BH3 interacting-domain death agonist*) in *truncated* BID (tBID) wird die mitochondriale Signalkaskade eingeleitet und mündet letztlich in der Apoptose (NAIR ET AL., 2014). Durch die Caspase-8 vermittelte Spaltung von BID, sind die intrinsische und extrinsische Signalkaskade der Apoptose miteinander verbunden (HENGARTNER, 2000).

1.5.2 Der mitochondrial-vermittelte programmierte Zelltod

Wird die Apoptose über die intrinsische Signalkaskade induziert, vermitteln Rezeptor-unabhängige Stimuli, wie Oxidantien, Mangel an Wachstumsfaktoren, Calcium-Überschuss oder *DNA*-Schädigung, den programmierten Zelltod (HASSAN ET AL., 2014). Werden die Mitochondrien unter Stress gesetzt, kommt es zur *mitochondrial membrane permeabilization* (MMP) und es werden pro-apoptotische Proteine aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien ausgeschüttet. Zu diesen gehören das Cytochrom c, der *apoptosis inducing factor* (AIF), die Endonuklease G, Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI*) und das Protein Omi/HtrA2 (*Omi stress-regulated endoprotease/ High temperature requirement protein A2*) (KROEMER ET AL., 2007).

Im Zytosol bindet das freigesetzte Cytochrom c an Moleküle des *apoptotic protease-activating factor-1* (APAF-1), das in Anwesenheit von ATP/dATP in der Lage ist, die Initiatorcaspase-9 zu rekrutieren. Der Komplex aus Cytochrom c, neun Molekülen APAF-1 und neun Homodimeren

Caspase-9 wird als Apoptosom bezeichnet. Sobald Caspase-9 an den *apoptotic protease-activating factor-1* bindet, ist sie in der Lage, sich durch Konformationsänderung (allosterischer Effekt) selbst zu aktivieren. Anschließend erfolgt die Spaltung und somit die Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7 durch die Initiatorcaspase-9 (DANIAL AND KORSMEYER, 2004; TAYLOR ET AL., 2008) und endet schließlich in der Spaltung von Todesproteinen.

Um sicherzustellen, dass eine Zelle den Weg des programmierten Zelltodes geht, werden aus dem Intermembranraum der Mitochondrien die Proteine Smac/DIABLO freigesetzt. Diese binden die *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs), die natürlichen Gegenspieler der Caspasen und ermöglichen auf diese Weise einen reibungslosen Ablauf der Apoptose (HENGARTNER, 2000).

1.6 Agonisten und Antagonisten der Apoptose

1993 beschrieben CROOK UND SEINE KOLLEGEN erstmals die *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs), die in der Lage waren in Baculoviren die Apoptose zu verhindern und somit eine entscheidende Rolle im regulierten Zelltod zu spielen. Allen Mitgliedern dieser Familie ist das *baculovirus IAP repeat* (BIR-) *motif* gemein, das N-terminal lokalisiert ist und aus mehreren Aminosäuren besteht (BIRNBAUM ET AL., 1994). In einigen BIR-Domänen zeigt sich an der Oberfläche eine negativ geladene *IAP binding motif* (IBM) Furche, die mit Proteinen, die dieses Motiv enthalten, interagieren kann. Ebenso kann das *IAP binding motif* bei den natürlichen Gegenspielern der IAPs Smac/DIABLO und HtrA2 nachgewiesen werden (SCOTT ET AL., 2005).

Fünf der insgesamt acht humanen IAPs besitzen zusätzlich eine RING Domäne, die zum einen den eigenen Abbau katalysieren kann sowie zur Degradation von Proteinen, die durch Ubiquitinierung gekennzeichnet sind. (SALVESEN AND DUCKETT, 2002). Die zellulären IAPs cIAP1 und cIAP2 haben außerdem zusätzlich eine *caspase recruitment domain* (CARD), wodurch sie ihre E3 Ligase Aktivität hemmen können (SILKE AND MEIER, 2013).

Nachdem das erste IAP, das *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein* (NAIP), entdeckt wurde, sind heute insgesamt sieben weitere IAPs bekannt: die *cellular IAPs* (cIAP1 und cIAP2), das *X-linked Inhibitor of apoptosis protein* (XIAP), Survivin, BRUCE (*BIR-containing ubiquitin conjugating enzyme*), Livin und das *Testis-specific IAP* (Ts-IAP) (HUNTER ET AL., 2007).

Das *X-linked IAP* scheint jedoch das einzige humane IAP zu sein, das in der Lage ist, die Caspaseaktivität direkt zu hemmen. Über die BIR2 Domäne bindet XIAP die Effektorcaspase-3 und Effektorcaspase-7, wohingegen die dritte *baculovirus IAP repeat* Domäne das *IAP-binding motif* der Caspase-9 bindet (ECKELMAN ET AL., 2006). Die zellulären IAPs cIAP1 und cIAP2 haben eine Assoziation zur Komplexbildung mit dem TNF α -Rezeptor 2 und binden spezifisch an RIP1, das anschließend durch cIAP1/ cIAP2 ubiquitiniert wird (VASUDEVAN AND RYOO, 2015). Sie besitzen zwar ebenso die Fähigkeit Caspasen zu binden, jedoch bleibt die Inhibition der Caspaseaktivität aus (ECKELMAN AND SALVESEN, 2006).

Durch Mutationen in der Signalkaskade der Apoptose kann es zur Tumorentstehung, dem Fortschreiten oder der Streuung der bösartigen Erkrankung kommen. So sind die Expressionslevel verschiedener *Inhibitor of apoptosis proteins* in Tumorzellen häufig erhöht (DE ALMAGRO AND VUCIC, 2012), wie beispielsweise das *X-linked IAP* im Pankreaskarzinom (VOGLER ET AL., 2009).

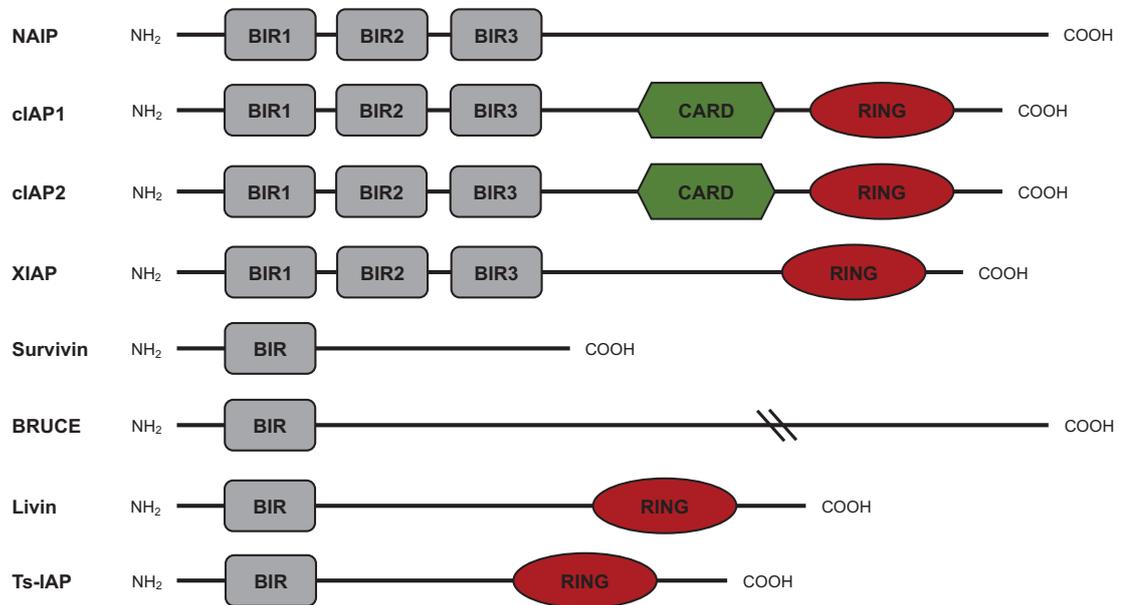


Abb. 2 - Schematische Darstellung der acht Vertreter humaner *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs)

Das Vorhandensein mindestens einer BIR (*Baculovirus IAP Repeat*)-Domäne ist das entscheidende Merkmal der IAPs. So besitzen das NAIP, die beiden zellulären IAPs und das XIAP insgesamt drei BIR-Domänen, im Gegensatz zu Survivin, Livin, BRUCE und Ts-IAP mit jeweils nur einer BIR-Domäne. Zusätzlich eine *Really Interesting New Gene* (RING) Domäne enthalten die cIAP1 und cIAP2, XIAP, Livin sowie das Ts-IAP. Einzig die beiden zellulären IAPs verfügen zusätzlich über die *caspase-recruitment domain* (CARD). Modifiziert nach (BEUG ET AL., 2012).

Als Gegenspieler der IAPs agiert das Protein Smac/DIABLO (*Second mitochondrial activator of caspases/ Direct IAP binding protein with low PI*), das mittels Aktivierung des intrinsischen Signalweges zusammen mit Cytochrom c aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien ausgeschüttet wird und die Fähigkeit besitzt, die IAP-vermittelte Caspaseinhibition zu verhindern (HUNTER ET AL., 2007). Als ein 239 Aminosäure-langes Vorläufermolekül wird Smac synthetisiert und in den Mitochondrien in seine reife Form überführt, indem N-terminal 55 Aminosäuren abgespalten werden (CHAI ET AL., 2000). Als reifes Protein enthält Smac an seinem Amino-Terminus das IBM-Motiv mit seinen vier Aminosäuren (Alanin, Valin, Prolin und Isoleucin), das nun an die Oberfläche der BIR-Domäne von IAPs binden kann (VUCIC AND FAIRBROTHER, 2007). Die Interaktion von Smac mit den *Inhibitor of apoptosis proteins* erfolgt über das A-V-P-I-Motiv und sowohl über die zweite als auch die dritte BIR-Domäne der IAPs, wodurch die Hemmung der Caspasen-3, -7 und -9 verhindert wird (HUNTER ET AL., 2007).

1.7 *Smac mimetics* als IAP-Antagonisten in der Tumorthherapie

Wie zu Beginn erwähnt, kann in malignen Erkrankungen eine Fehlregulation des streng geregelten programmierten Zelltodes vorliegen. Aufgrund dessen kommt es zur Akkumulation pathologisch veränderter Zellen und ebenso kann eine Resistenz gegenüber Therapiemöglichkeiten beobachtet werden (WELSH ET AL., 2016). Häufig liegt in Tumorzellen eine Überexpression anti-apoptotischer Proteine vor, wie den *Inhibitor of apoptosis proteins*, was zu weiterem Tumorwachstum, Metastasierung oder Therapieversagen führen kann. So konnte 2007 in der Arbeit von LOPES UND KOLLEGEN gezeigt werden, dass auch im Pankreaskarzinom erhöhte Expressionslevel von unter anderem XIAP und Survivin nachgewiesen werden konnten. Aus diesem Grund stellen die IAPs eine vielversprechende Möglichkeit der therapeutischen Zielstruktur in der Tumorbehandlung dar (WANG AND LI, 2014).

Der *second mitochondrial activator of caspases* (Smac) besitzt über seine Sequenz aus vier Aminosäuren (AVPI) die Fähigkeit, an die Furche der BIR-Domäne von IAPs zu binden und somit Caspasen zu verdrängen. Auf diese Weise können die *Inhibitor of apoptosis proteins* abgefangen und die Apoptose wieder aktiviert werden (WELSH ET AL., 2016). Das Wissen um das Alanin-Valin-Prolin-Isoleucin-Motiv in Smac, führte in vielen Arbeitsgruppen zur Entwicklung von sogenannten *small molecules*, die die entsprechende Sequenz nachahmen und darüber die IAPs binden können (MANNHOLD ET AL., 2010). Über die Bindung an die BIR3-Domäne von XIAP kann die Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges über die Caspase-9 wieder initiiert werden. Die Hemmung der Effektorcaspasen-3 und -7 kann zusätzlich aufgehoben werden, wenn die oberflächliche Furche der BIR2-Domäne vom *X-linked IAP* blockiert ist (RATHORE ET AL., 2017). Werden die zellulären IAPs cIAP1 und cIAP2 durch die *Smac mimetics* gebunden, verstärkt sich ihre E3 Ligase Aktivität und somit die Autoubiquitinierung sowie der proteasomale Abbau der cIAPs. Zusätzlich führt dies zur Aktivierung des nicht kanonischen NF- κ B-Signals und zur Hochregulation von TNF α , einem Zielgen von NF- κ B. TNF α triggert wiederum auto- bzw. parakrin die Aktivierung der Caspase-8 und endet schließlich in der Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) (FULDA, 2015a). Natürlicherweise entfaltet Smac seine Wirkung als bivalentes Protein, im Gegensatz zu den *Smac mimetics*, die strukturell sowohl in monovalente als auch bivalente Verbindungen unterschieden werden können. Während monovalente Mimetika eine Smac-imitierende Verbindung aufweisen, sind in bivalenten Verbindungen zwei AVPI-Motive über einen chemischen Linker verbunden. Durch die Möglichkeit, die BIR2- und BIR3-Domäne zeitgleich zu binden und zudem einer höheren Bindungsaffinität, weisen bivalente Verbindungen eine stärkere Wirksamkeit auf, als die Einfachverbindungen (FULDA, 2014). Monovalente *Smac mimetics* haben jedoch gegenüber den Zweifachverbindungen den Vorteil der oralen Verfügbarkeit, was die *Compliance* der Patienten erleichtern

könnte (SUN ET AL., 2008). Zudem kann das höhere Potenzial der bivalenten Verbindungen auch zu vermehrt toxischen Nebenwirkungen führen (FULDA, 2014).

Die Arbeitsgruppe um MANNHOLD ET AL. hat mittels einem *ligand-based virtual screening* Verfahren nach neuen *small molecules* gesucht, die zum einen XIAP und zum anderen die zellulären IAPs antagonisieren können. In dieser Arbeit wurden zwei monovalente, pan-selektive Smac Mimetika verwendet, die aus dem virtuellen Liganden-basierten *Screening* Verfahren stammen. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die neu entwickelten Substanzen sowohl eine hohe als auch eine spezifisch antiproliferative Aktivität aufweisen, als auch insbesondere eine geringe Wirkung auf normale Zellen zeigen. Basierend auf ihrer Entwicklung und Funktion der monovalenten Verbindungen werden sie als *ligand-based pan-selectiv* (LBPS03 bzw. LBPS05) bezeichnet (CAROSATI ET AL., 2015).

1.8 *Smac mimetics* als Kombinationstherapie in Tumorzellen

In Tumorzellen scheint eine Fehlregulation des programmierten Zelltodes einer der Hauptgründe für die Resistenz gegenüber konventionellen Therapien zu sein (SUN ET AL., 2011). Aufgrund der Überexpression der *Inhibitor of apoptosis proteins* in zahlreichen Tumoren, wie auch im Pankreaskarzinom und deren Beteiligung an der Regulation der Sensitivität bezüglich aktueller zytotoxischer Therapien, stellen sie ein relevantes therapeutisches Ziel dar. *Smac mimetics* ahmen die Funktion des natürlichen Gegenspielers der IAPs Smac nach und können selbst den Zelltod triggern beziehungsweise die Tumorzellen gegenüber Chemotherapie oder Radiotherapie sensibilisieren (FULDA, 2015a). So konnten 2011 AWASTHI UND KOLLEGEN zeigen, dass ein *Smac mimetic* zu einer verstärkten Apoptose führen kann, induziert durch ein konventionelles Chemotherapeutikum. Ebenso kann ein erhöhtes Level der IAPs in Tumorzellen mit der Resistenzentwicklung gegenüber dem *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) einhergehen und hier zeigen Untersuchungen von 2014 eine Sensibilisierung der resistenten Tumorzellen durch IAP-Antagonisten auf TRAIL (FINLAY ET AL., 2014).

Zur Überwindung der Resistenz von Tumorzellen gegenüber konventionellen Therapien stellen nicht nur Monotherapien mit den *Smac mimetics*, sondern vor allem die Kombinationstherapien vielversprechende Möglichkeiten in der Behandlung von malignen Erkrankungen dar.

1.9 Ziele der Arbeit

Das Pankreaskarzinom gehört noch heute zu den Krebserkrankungen mit einer der schlechtesten Prognosen, da oftmals zum Diagnosezeitpunkt bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium vorliegt. Durch Fehlregulationen in der Signalkaskade der Apoptose umgehen die Tumorzellen den kontrollierten Zelltod. Diese Störungen treten häufig durch eine Überexpression der *Inhibitor of apoptosis proteins* auf, was zum einen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika führt und zum anderen zu einer Hemmung sowohl der intrinsischen als auch der extrinsischen Signalkaskade durch vermehrte Bindung der pro-apoptotischen Caspasen.

Genau diesen Angriffspunkt macht man sich in der Tumorforschung zu Nutze und hat Substanzen entwickelt, die in der Lage sind, die Rolle des natürlichen IAP-Gegenspielers zu imitieren. Auf diesem Weg werden überexprimierte IAPs durch die Bindung der Substanzen inaktiviert, so dass Apoptose wieder Caspase-abhängig stattfinden kann. Eine andere Überlegung ist, dass die Behandlung mit sogenannten *Smac mimetics* die Tumorzellen wieder für Chemotherapeutika oder andere Substanzen sensibilisiert und auf die Art der kontrollierte Zelltod wieder induziert werden kann.

Ein Ziel dieser Arbeit ist, die Wirkung der neu entwickelten Mimetika bezüglich des Zellsterbens zweier Pankreaskarzinomzelllinien zu testen und in einem zweiten Schritt die Wirkung zeitabhängig zu untersuchen. Zudem ist es von großem Interesse, welche Form des Zelltodes durch die IAP-Antagonisten initiiert wird. Anhand der Bestimmung der intrazellulären Caspaseaktivität sowie dem Gehalt an hypodiploider *DNA*, können Aussagen zur Induktion von Apoptose getroffen werden.

Eine weitere wichtige Frage bezieht sich auf die Wirkung der Kombinationsbehandlung der *Smac mimetics* mit anderen Substanzen. Hierzu wurden zum einen zwei Zytostatika ausgewählt, die nach wie vor in der Behandlung des Pankreaskarzinoms eingesetzt werden und zum anderen verschiedene Zytokine der TNF-Superfamilie, wie TRAIL, TNF α und Fas-Ligand. Zusätzlich wurde noch der Einfluss der kombinatorischen Behandlung mit dem Survivin-Inhibitor YM155 auf die Wachstumsrate der Pankreaskarzinomzelllinien getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper für Western Blot Analysen

Antikörper	Quelle	Zielspezies	Verdünnung	Firma
Alpha-Tubulin	Maus	Mensch	1 : 4.000	Sigma-Aldrich
c-IAP2 (58C7)	Kaninchen	Mensch	1 : 200	Cell Signaling
c-IAP2 (H-85)	Maus	Mensch	1 : 100	Santa Cruz
Cleaved Caspase-8 (18C8)	Kaninchen	Mensch	1 : 1.000	Cell Signaling
Cleaved Caspase Substrate Motif	Kaninchen	Mensch	1 : 1.000	Cell Signaling
GAPDH	Maus	Mensch	1 : 4.000	Sigma-Aldrich
PARP	Kaninchen	Mensch	1 : 1.000	Cell Signaling
XIAP (A-7)	Maus	Mensch	1 : 200	Santa Cruz
XIAP (3B6)	Kaninchen	Mensch	1 : 1.000	Cell Signaling
Goat-Anti-Mouse	Ziege	Maus	1 : 10.000	LI-COR
Goat-Anti-Rabbit	Ziege	Kaninchen	1 : 10.000	LI-COR

2.1.2 Chemikalien

Chemikalien	Firma
Ammoniumpersulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (München)
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (München)
Dithiothreitol	Fermentas (Massachusetts, USA)
Eisessig 100 %	VWR (Pennsylvania, USA)
Ethanol 70 %	VWR (Pennsylvania, USA)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycine	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (München)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich (München)

Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (München)
SDS Pellets	Bio-Rad (München)
Sodium Pyruvat	Sigma-Aldrich (München)
Sucrose	Sigma-Aldrich (München)
TEMED	Amresco (Ohio, USA)
tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (München)
Triton-x-100	Sigma-Aldrich (München)
Trizma base 99 %	Sigma-Aldrich (München)
Tween-20	Merck (Darmstadt)

2.1.3 Gebrauchsfertige Lösungen

Gebrauchsfertige Lösungen	Firma
Blotting Grad Blocker	Bio-Rad (München)
Bradford Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad (München)
BSA	PAA Laboratories (Cölbe)
cOmplete, EDTA-free Proteaseinhibitor Cocktail	Roche (Basel, Schweiz)
DMSO	Carl Roth (Karlsruhe)
DRAQ5	biostatus (Leics, UK)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma-Aldrich (München)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich (München)
Etoposid	Sigma-Aldrich (München)
Fetal Calf Serum	Sigma-Aldrich (München)
Gemcitabin	Tocris (Bristol, UK)
Gibco TrypLE Express	Thermo Fisher (Massachussets, USA)
Horse Serum	Sigma-Aldrich (München)
Non-essential amino acids	Sigma-Aldrich (München)
Page Ruler Plus Prestained	Thermo Fisher (Massachussets, USA)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich (München)
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich (München)
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth (Karlsruhe)
TNF α (human recombinant)	HumanZyme (Manchester, UK)
SuperFASLigand TM	Enzo (Lausen, Schweiz)
SuperKillerTRAIL TM	Enzo (Lausen, Schweiz)
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich (München)
YM155	Selleckchem (München)

2.1.4 Kits

Kits	Firma
Caspase-2 staining Kit	Promokine (Heidelberg)
Caspase-3 staining Kit	Promokine (Heidelberg)
Caspase-8 staining Kit	Promokine (Heidelberg)
Caspase-9 staining Kit	Promokine (Heidelberg)

2.1.5 Laborgeräte

Geräte	Firma
Analysewaage	Kern&Sohn (Balingen)
Autoclav	Systemec (Wettenberg)
Durchflusszytometer CyFlow Space	Partec (Münster)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Inkubator	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Magnetrührer	IKA (Staufen)
Mikroskop Labovert FS	Leitz (Wetzlar)
Multikanalpipette	Eppendorf (Hamburg)
Mini-ProteanTetra Cell	Bio-Rad (München)
MiniSpin Plus Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Odyssey Infrared Imaging System	Li-COR Biosciences (Nebraska, USA)
pH-Meter edge®	HANNA Instruments (Vöhringen)
Pipetten	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
Pipettierhilfe Pipetboy acu®	Integra (Biebertal)
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann (Eberstadt)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Rollenmischer RM5	Labortechnik Fröbel (Lindau)
Sterilbank TYP DLF/BSS6	J.H. Schrader (Göttingen)
Sterilbank MSC-Advantage	Thermo Fisher (Massachusetts, USA)
TC20 Automated Cell Counter	Bio-Rad (München)
Thermomixer 5436	Biometra (Göttingen)
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments(Schwabach)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen		Zusammensetzung	
Blocking-Puffer		5 % (w/v)	Milchpulver in TBS-T
Hypotonischer PI-Lysepuffer		0,2 g	tri-NatriumCitrat-2-Hydrat
		2 ml	Triton-x-100
		10 mg	Propidiumiodid
			ad 200 ml Aqua dest.
Lämmli-Puffer		5 ml	β -Mercaptoethanol
		1 ml	Bromphenolblau
		10 ml	Glycerol
		2 g	SDS Pellets
		4 ml	Tris/HCl 1,5 M
Laufpuffer (10x)		288 g	Glycin
		20 g	SDS
		60 g	Tris
			ad 2000 ml Aqua dest.
Lyse-Puffer H	pH 7,4	5 ml	Glycerine
		1,5 ml	NaCl 5 M
		1,5 ml	Tris/HCl 1 M
		0,5 ml	Triton-x-100
			ad 50 ml Aqua dest.
Ponceau S		0,5 g	Ponceau S
		1 ml	Eisessig
			ad 100 ml Aqua dest. und filtrieren
PBS (10x)	pH 7,4	4 g	KCl
		4,8 g	KH ₂ PO ₄
		160 g	NaCl
		28,8 g	NaH ₂ PO ₄
			ad 2000 ml Aqua dest.
Sammelgel-Puffer	pH 6,8	30 g	Tris/HCl
			ad 500 ml Aqua dest.
SuperKillerTRAIL Storage Buffer		1 mM	DTT
		20 nM	HEPES
		300 nM	NaCl
		1 %	Sucrose
		0,01 %	Tween 20

TBS (10x)	pH 7,5	160 g NaCl 48,4 g Tris/HCl	ad 2000 ml Aqua dest.
Transfer-Puffer	pH 8,5	30,03 g Glycine 400 ml Methanol 6,06 g Tris base	ad 2000 ml Aqua dest.
Trenngel-Puffer	pH 8,8	90,75 g Tris/HCl	ad 500 ml Aqua dest.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Counter Slides Dual Chamber	Bio-Rad (München)
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcon Tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner (Frickenhäusen)
Nitrilhandschuhe	Ansell (München)
Nitrozellulosemembran	Whatman GmbH (Dassel)
Pipettenspitzen	StarLab (Hamburg)
Plastikküvetten	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße (0,2 – 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Stripetten Costar®	Corning (Kaiserslautern)
Whatman Papier	Whatman GmbH (Dassel)
Zellkulturflaschen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatten (6-Well)	Eppendorf (Hamburg)
Zellkulturplatten (96-Well)	Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)

2.1.8 Zellkulturmedien und Zusätze

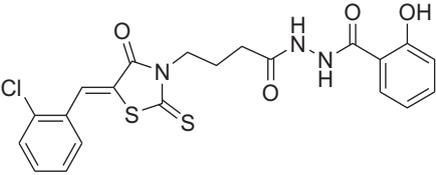
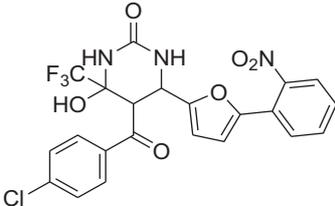
2.1.8.1 Zelllinie HUP-T3

Medium	Kulturmedium	FCS-reduziertes Medium
Dulbecco's MEM	90 %	98 %
FCS (Hitze-inaktiviert)	10 %	2 %
NEA	1 %	1 %
Pen/Strep	1 %	1 %
Sodium pyruvat	1 %	1 %

2.1.8.2 Zelllinie PaTu-8902

Medium	Kulturmedium	FCS-reduziertes Medium
Dulbecco's MEM	85 %	93 %
FCS (Hitze-inaktiviert)	10 %	2 %
Horse Serum	5 %	5 %
Pen/Strep	1 %	1 %

2.1.9 Neu entwickelte IAP-Antagonisten

Substanzen	Molekulares Gewicht [g/Mol]	Strukturformel
LBPS03	475,96	
LBPS05	509,06	

Die beiden oben aufgeführten IAP-Antagonisten stammen aus einer Auswahl an Substanzen, die von Prof. G. Cruciani und Dr. E. Carosati (Universität Perugia, Italien) über ein Liganden-basiertes virtuelles Screening identifiziert und anschließend in ihrer Arbeitsgruppe erstmals synthetisiert worden sind. Ihre Eigenschaft, mit hoher Affinität an IAP Molekülen zu binden, spiegelt sich in ihrer Abkürzungsbezeichnung LBPS für „*ligand-based-pan-selectiv*“ wieder. Gelöst wurden die Substanzen in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO), das für Versuchsdurchführungen so verdünnt wurde, dass eine Endkonzentration von 0,1 % im Zellkulturmedium erreicht wurde.

2.1.10 Software und Webtools

Software	Webtools
EndNote X9	PubMed (http://ncbi.nlm.gov/pubmed)
GraphPad Prism 8	
Image Studio Lite 4.0	
Microsoft Excel, PowerPoint, Word (16.32)	
FloMax Software (2.82)	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Zur Anfertigung meiner Dissertation wurden mir freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf die Zellreihen HUP-T3 und PaTu8902 zur Verfügung gestellt.

2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinie HUP-T3

Bei der Zelllinie HUP-T3 handelt es sich um adhärent wachsende Pankreaskarzinomzellen, die 1984 aus malignem Aszites eines 66-jährigen Mannes mit Pankreaskarzinom isoliert wurden.

Die Inkubation der Zelllinie erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, supplimentiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (NEA) und 1 % Natriumpyruvat, sowie bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

Zur Kultivierung wurden die Zellen in einer logarithmischen Wachstumsphase gehalten und alle 4-5 Tage passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt und der Zellrasen zweimal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Pankreaskarzinomzellen mit *TrypLE Express* vom Flaschenboden gelöst. Durch den Zusatz von Kulturmedium wurde die weitere Reaktion unterbrochen. In einer neuen 75 cm² Zellkulturflasche wurde FCS-reiches Medium vorgelegt und ein Teil der Zellsuspension überführt.

2.2.1.2 Kultivierung der Zelllinie PaT8902

Initial wurden die Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie PaTu8902 einer 44-jährigen Patientin entnommen, die 1985 an einem Adenokarzinom des Pankreas erkrankte.

In Zellkulturflaschen einer Grundfläche von 75 cm² wurden die Zellen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (4,5 g/L Glukose) kultiviert, das mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 5 % Pferdeserum und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Bei einer CO₂-Atmosphäre von 5 % mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C wurden die Zellen inkubiert.

Bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % wurden die Zellen passagiert, um sie zum einen in einer logarithmischen Wachstumsphase zu halten und zum anderen eine Synchronisation zu verhindern. Dafür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Mit *TrypLE Express* wurde der Zellrasen vom Flaschenboden gelöst und

durch das gleiche Volumen an Kulturmedium konnte die Reaktion gestoppt werden. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue Flasche überführt, in der FCS-reiches Medium vorgelegt wurde.

Anhand von Wachstumskinetiken für die Zellreihen HUP-T3 und PaTu8902 konnten die definierten Zellzahlen für die Versuche ermittelt und bei Durchführung in FCS-reduziertem Medium kultiviert werden. Um die Interaktion zwischen den Testsubstanzen und dem fetalen Kälberserum zu verringern, wurde die Reduktion des FCS-Gehaltes auf 2 % in entsprechendem Kulturmedium vorgenommen. Im Folgenden wird dieses Medium als FCS-Mangelmedium bezeichnet.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl mittels *Automated Cell Counter*

Die Versuchsreihen wurden mit einer definierten Zellzahl durchgeführt, wobei die Bestimmung der Zellzahl/ml mittels *Automated Cell Counter* erfolgte. Hierzu wurden die adhärennten Zellen mit *TrypLE Express* vom Flaschenboden gelöst und die Reaktion, durch den Zusatz von Kulturmedium in gleichem Volumen, unterbrochen. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension mit Trypanblau 0,4 % in gleichem Verhältnis verdünnt und auf eine spezielle Einmalzählkammer pipettiert. Das *Counter slide* wurde in den *Cell Counter* von BioRad eingeführt, der unterschiedliche Bereiche der Zählkammer analysiert hat. Durch den Zusatz von Trypanblau konnte zwischen vitalen und geschädigten Zellen unterschieden werden, wodurch mittels Algorithmus der *Automated Cell Counter* automatisch die Zellzahl pro Milliliter bestimmen konnte.

2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl mittels *DRAQ5™*

DRAQ5™ ist ein synthetisch hergestelltes Anthrachinon mit einem Fluoreszenzspektrum im Infrarotbereich. Es durchdringt die Zellmembran vitaler Zellen und interkaliert in A-T-Sequenzen doppelsträngiger *DNA*. Mithilfe eines Infrarot-Imager kann anschließend ein Bild der fluoreszierenden Zellen generiert werden. Über den gescannten Bereich wird nun, durch die entsprechende Auswertungssoftware, ein Gitter in Form einer 96-Well-Platte gelegt und die Fluoreszenz, als *Integrated Intensity* angegeben, in jedem *Well* der Mikrottestplatte ermittelt. Die Eigenfluoreszenz der 96-Well-Platte wurde vor der endgültigen Auswertung von den behandelten *Wells* subtrahiert.

Für die Versuche zum Zellsterben wurden in dieser Arbeit die Zelllinien HUP-T3 und PaTu8902 in einer definierten Zelldichte, entsprechend der Inkubationsdauer, auf einer 96-Well-Platte ausgesät und in FCS-reichem Kulturmedium über 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die adhärennten Zellen gemäß den Versuchsprotokollen weiterbehandelt.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl mittels DRAQ5™ wurde zunächst das Kulturmedium abpipettiert und der Zellrasen mit 100 µl PBS pro *Well* gewaschen. Nach sofortigem Verwerfen der Waschlösung wurden die Zellen mit 50 µl je *Well* der DRAQ5™-Färbelösung (10 µM) bedeckt und bei Dunkelheit sowie Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Es folgten das Entfernen des Farbstoffes sowie das unmittelbare Scannen der 96-Well-Platte mittels Infrarot-Imager.

Jeder Versuch zum Zellüberleben wurde mit 6 Replikaten pro Mikrottestplatte angesetzt und hieraus der Mittelwert bestimmt. Nach Subtraktion der Eigenfluoreszenz wurden die generierten Mittelwerte auf die Mittelwerte der Kontrolle bezogen.

Wachstumskurve der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3

Da die Zelllinie HUP-T3 kommerziell erhältlich ist, wurde für diese Arbeit exemplarisch eine Wachstumskinetik erstellt, um die Ähnlichkeit der Wachstumseigenschaften der hier verwendeten Zellen zu verifizieren. Das Wissen über das Wachstumsverhalten der Zellen und ihre Verdopplungszeit dienen der optimalen Versuchsplanung, um auch bei mehrtägiger Kultivierung die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 stets in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten und den Eintritt in die stationäre Phase zu vermeiden.

Zum Erstellen der Wachstumskurve wurden $1 \cdot 10^3$ Zellen je *Well* in sechs Replikaten auf insgesamt zehn 96-Well-Platten ausgesät und bei 5 % CO₂-Konzentration, 37 °C Temperatur und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach sechs Stunden waren die Zellen adhärent und die erste Messung konnte durch Bestimmung der Lebendzellzahl mittels DRAQ5™, wie oben beschrieben, erfolgen. Anschließend wurden die Messungen im Intervall von 24 Stunden durchgeführt.

Die Wachstumskurve kann in vier verschiedene Phasen unterteilt werden, die in Abbildung 3 dargestellt sind. Zu Beginn ist die *lag*-Phase zu beobachten, in der sich die Zellen an neue Bedingungen gewöhnen, um ab dem dritten Tag in die exponentielle Wachstumsphase überzutreten. Nach dem sechsten Tag stellen die Zellen aufgrund von Zelldichte und Nährstoffen die Proliferation ein, um mit dem achten Tag in die Phase des Absterbens überzugehen.

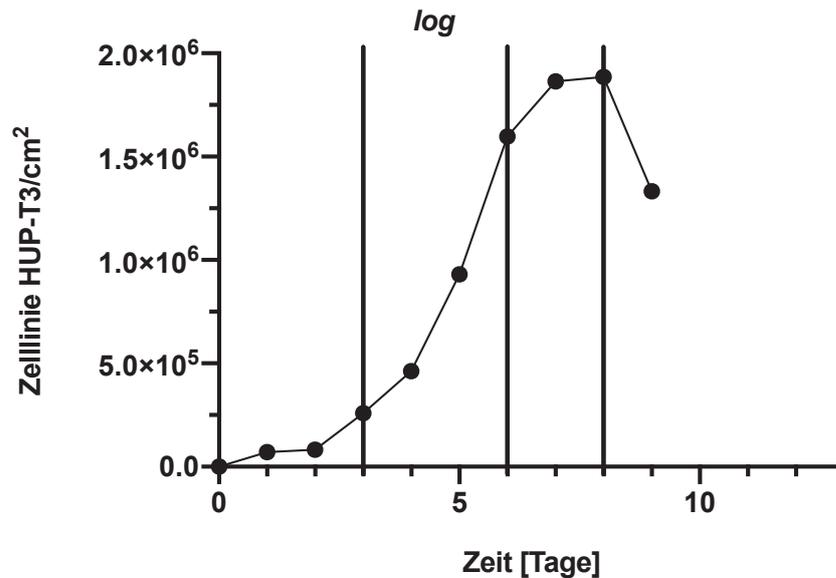


Abb. 3 - Wachstumskinetik der Pankreaskarzinomzelllinie HUP T3

Auf zehn 96-Well-Platten wurden $1 \cdot 10^3$ Zellen pro *Well* in 6 Replikaten ausgesät und nach sechs Stunden Inkubation erfolgte die erste Messung mittels DRAQ5™. Im Intervall von 24 Stunden wurden in den folgenden Tagen die weiteren Messungen durchgeführt.

Um die Verdopplungszeit der Pankreaszellen zu berechnen, wird durch die logarithmische Wachstumsphase eine Gerade gelegt, die nachfolgende Gleichung ergibt:

$$y = 524000x - 270250$$

Hier ergibt sich für die Zelllinie HUP-T3 unter normalen Inkubationsbedingungen mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37 °C eine Verdopplungszeit von ungefähr 36 Stunden, was den Angaben des Leibniz-Institutes DSMZ entspricht.

Wachstumskurve der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902

Nach Angaben des Leibniz-Institutes DSMZ entspricht die Verdopplungszeit der Zelllinie PaTu8902 zwischen 25-40 Stunden. Exemplarisch wurde für diese Arbeit mit diesen Zellen eine Wachstumskinetik erstellt, um die Ähnlichkeit der Wachstumseigenschaften der hier verwendeten Zellen zu überprüfen. Bei Versuchen mit mehrtägiger Inkubationsdauer sollen sich die Pankreaskarzinomzellen stets in der logarithmischen Phase befinden und der Übertritt in die stationäre Phase vermieden werden.

Für die Wachstumskurve wurden $0,2 \cdot 10^3$ Zellen je *Well* in sechs Replikaten auf insgesamt zehn 96-Well-Platten ausgesät und bei 5 % CO₂-Konzentration, 37 °C Temperatur und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach sechs Stunden waren die Zellen adhärent und die erste Messung

konnte durch Bestimmung der Lebendzellzahl mittels DRAQ5™, wie unter 2.2.1.4 beschrieben, erfolgen. Anschließend wurden die Messungen im Intervall von 24 Stunden durchgeführt.

In Abbildung 4 ist die Wachstumskurve, die in dieser Arbeit für die Zelllinie PaTu8902 ermittelt wurde, dargestellt. Auch hier können die vier unterschiedlichen Phasen voneinander abgegrenzt werden.

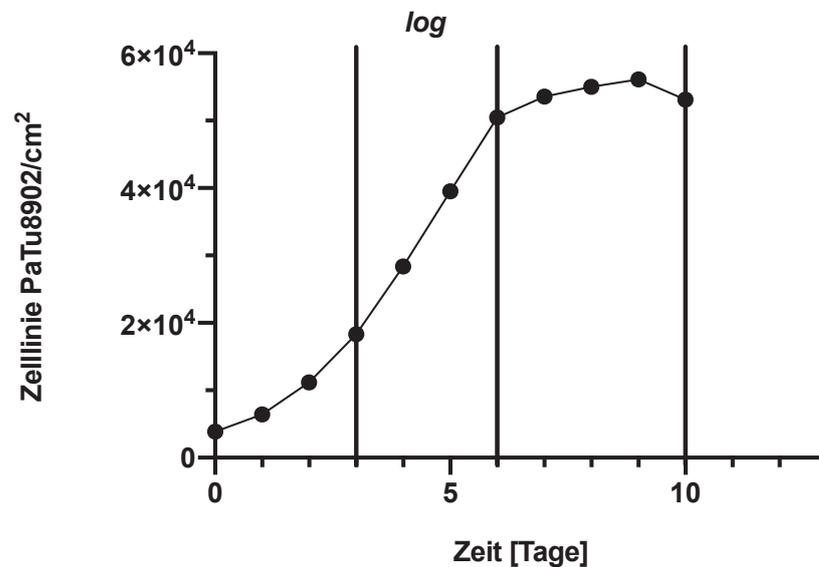


Abb. 4 - Wachstumskinetik der Zelllinie PaTu8902

Auf zehn 96-Well-Platten wurden $0,2 \cdot 10^3$ Zellen pro *Well* in 6 Replikaten ausgesät und nach sechs Stunden Inkubation konnte die erste Auswertung mittels DRAQ5™ erfolgen. Im Intervall von 24 Stunden wurden in den folgenden Tagen die weiteren Messungen durchgeführt.

Mithilfe einer Geraden durch die exponentielle Wachstumsphase der Zelllinie PaTu8902 ergibt sich die nachfolgende Gleichung:

$$y = 415,72x - 10332$$

Hier zeigt sich für die Pankreaskarzinomzellen, unter normalen Inkubationsbedingungen mit 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37 °C, eine Verdopplungszeit von ungefähr 29 Stunden, was mit den Angaben des Leibniz-Institutes DSMZ übereinstimmt.

Proliferationsversuche mit den Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 mit IAP-Antagonisten

Für Versuche zum Zellüberleben über 48 Stunden wurden die Zellen in einer Dichte von $7,8 \cdot 10^3$ Zellen/cm² und für Versuche über 72 bzw. 96 Stunden in einer Dichte von $4,7 \cdot 10^3$ Zellen/cm² zu je 100 µl pro *Well* auf 96-Well-Platten in Sechsfachbestimmung ausgesät und über 24 Stunden in FCS-reichem Kulturmedium unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Nährmedium entfernt und der Zellrasen einmalig mit 100 µl PBS

gewaschen. In FCS-reduziertem Medium wurden die IAP-Antagonisten in 10 μM (LBPS03) und 15 μM (LBPS05) auf den Zellrasen pipettiert. Als Lösungsmittelkontrolle diente das FCS-Mangelmedium mit einer Konzentration von 0,1 % DMSO. In Abhängigkeit der Versuche wurden die Zellen über Zeiträume von 48-96 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert und mittels Bestimmung der Lebendzellzahl durch DRAQ5™ am Infrarot-Imager ausgewertet.

Behandlung der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 mit IAP-Antagonisten

In einer Dichte von $6,3 \cdot 10^3$ Zellen/cm² wurden die Zellen für Proliferationsversuche über 48 Stunden und für Versuche über 72 bzw. 96 Stunden in einer Dichte von $3,1 \cdot 10^3$ Zellen/cm² zu je 100 μl pro *Well* auf 96-Well-Platten in Sechsfachbestimmung ausgesät und über 24 Stunden in FCS-reichem Kulturmedium unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Nährmedium entfernt und der Zellrasen einmal mit 100 μl PBS gewaschen, um im Folgenden mit den Mimetika in entsprechender Konzentration behandelt zu werden. Auch hier diente das FCS-Mangelmedium mit einer Konzentration von 0,1 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle. In Abhängigkeit der Versuche wurden die Zellen über Zeiträume von 48-96 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert und durch Ermittlung der Lebendzellzahl anhand DRAQ5™ am Infrarot-Imager ausgewertet.

2.2.2 Analysen mittels Durchflusszytometrie

Anhand der Durchflusszytometrie können verschiedene Eigenschaften der Zellen analysiert werden. Hierzu wird die Zellsuspension über eine dünne Kanüle aspiriert, wodurch die Zellen vereinzelt werden, um anschließend durch eine dünne Messkammer zu fließen. Hier passieren die Zellen einen Laserstrahl und über Detektoren kann das entstandene Streulicht oder Fluoreszenzsignal ausgewertet werden.

In dieser Arbeit konnten die durchflusszytometrischen Analysen lediglich mit der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 durchgeführt werden. Die Zellen und Zellkerne der Zelllinie PaTu8902 konnten, aufgrund der hohen *Clotting*-Neigung der Zellen, nicht ausreichend vereinzelt werden, was für die Versuchsdurchführungen ausschlaggebend ist.

2.2.2.1 Bestimmung der intrazellulären Caspaseaktivität

Mittels der *Caspase Stainig Kits* von PromoKine konnte die Aktivität verschiedener Caspasen in lebenden Zellen ermittelt werden. Hier wurden unterschiedliche Caspase-Inhibitoren *in situ* verwendet, die an FITC oder Sulforhodamin als Fluoreszenzmarker konjugiert sind. Die Inhibitoren

sind zellpermeabel, ungiftig und binden irreversibel an aktivierte Caspasen in apoptotischen Zellen. Die Konjugation an Fluoreszenzmarker erlaubt die Auswertung der Caspaseaktivität mittels Durchflusszytometrie.

Der Caspase-2 Inhibitor VDAD-FMK, Caspase-8 Inhibitor IETD-FMK und Caspase-9 Inhibitor LEHD-FMK sind an den Fluoreszenzmarker FITC konjugiert und die Messung der Fluoreszenzintensität, mittels Durchflusszytometrie, erfolgte bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 535 nm. Die Aktivität der Caspase-3 wurde mit Hilfe des Caspase-3 *Staining Kits* bestimmt. Hier ist der Inhibitor DEVD-FMK an Sulforhodamin gebunden, der eine Emission von 570 nm und eine Extinktion von 540 nm aufweist.

Für die Versuchsreihen wurde die Zelllinie HUP-T3, in Abhängigkeit der Inkubationszeiträume, auf 6-Well-Platten ausgesät und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Über einen Zeitraum von 48 Stunden betrug die Zelldichte $6,8 \cdot 10^3$ Zellen/cm² und bei Inkubationszeiten von 72 bzw. 96 Stunden wurden $4,1 \cdot 10^3$ Zellen/cm² ausgesät. Anschließend wurde das FCS-reiche Kulturmedium abgenommen, der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen und im Anschluss mit definierten Konzentrationen der IAP-Antagonisten in 2 % FCS-Kulturmedium behandelt. Als Lösungsmittelkontrolle dienten Zellen mit 0,1 % DMSO in FCS-reduziertem Medium. Über einen Zeitraum von 72 Stunden wurden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂-Konzentration und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Kulturmedium in ein 15 ml *Falcon*-Röhrchen überführt, der Zellrasen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und das PBS im *Falcon*-Röhrchen gesammelt. Zum Ablösen der Zellen wurden sie mit 500 µl Tryp/LE Express bedeckt und durch Zugabe von 500 µl Medium konnte die weitere Reaktion unterbrochen werden. Die Zellsuspension wurde ebenfalls in das *Falcon*-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 300 g sowie Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, die Zellpellets in 120 µl Medium, dem 0,4 µl der Inhibitoren zugefügt wurden, resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei geöffnetem Deckel wurden die Zellen für 45 Minuten im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurden die Zellen bei 100 g für 3 Minuten und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach erneuter dreiminütiger Zentrifugation bei Raumtemperatur und 100 g wurde der Waschschrift nochmals wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und die Proben, bis zur durchflusszytometrischen Auswertung, abgedunkelt auf Eis gelagert.

2.2.2.2 Propidiumiodid-Färbung

Anhand der Färbung mit Propidiumiodid kann auf den Anteil einer definierten Zellpopulation rückgeschlossen werden, der apoptotischen Zellen entspricht. Hierbei handelt es sich um einen

Fluoreszenzfarbstoff, der an die *DNA* binden kann, in dem das Propidiumiodid zwischen den Basenpaaren interkaliert. Durch die Proportionalität von Basenanzahl und Fluoreszenzintensität, können mittels dieser Färbemethode Rückschlüsse auf den *DNA*-Gehalt einer Zelle gezogen werden und somit auch auf die Zellzyklusphase. Den höchsten Anteil an *DNA*-Gehalt findet man in Zellen, die sich in der G2-Phase des Zellzyklus befinden. Im Gegensatz dazu ist in der sub-G1-Phase der geringste Gehalt an *DNA* vorhanden, da diese durch Endonukleasen degradiert wird.

Zur Bestimmung der Apoptose-Rate der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 wurden diese in einer Dichte von $4,1 \cdot 10^3$ Zellen/cm² auf einer 6-Well-Platte ausgesät und über 24 Stunden in FCS-reichem Kulturmedium inkubiert. Nach der Vorinkubation wurde das Kulturmedium zunächst entfernt und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit den IAP-Antagonisten in 2 % FCS-Medium über einen Zeitraum von 72 Stunden bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂-Atmosphäre und 37 °C. Auch hier diente die Behandlung mit DMSO, in einer Konzentration von 0,1 %, als Lösungsmittelkontrolle. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde der Überstand in ein 15 ml *Falcon*-Röhrchen überführt und der Zellrasen zweimal mit jeweils 1 ml PBS, das ebenfalls gesammelt wurde, gewaschen. Mit 1 ml TrypLE Express wurden die Zellen vom Well-Boden gelöst und mit 1 ml Kulturmedium die weitere Reaktion unterbrochen. Die Zellsuspension wurde ebenso dem *Falcon*-Röhrchen hinzugefügt und bei 300 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das resultierende Zellpellet in 200 µl hypotonischem Propidiumiodid-Lysepuffer resuspendiert und die Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit sowie anschließend die Zugabe von 800 µl Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 1 ml. Die Auswertung erfolgte über durchflusszytometrische Messungen im FL2-Kanal.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus den Zelllinien HUP-T3 und PaTu8902

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 wurden diese in einer Dichte von $4,2 \cdot 10^3$ Zellen/cm² in Zellkulturflaschen mit 25 cm² Grundfläche zunächst in FCS-reichem Kulturmedium ausgesät. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden, unter Standardkulturbedingungen, wurde das Kulturmedium vollständig entfernt und der Zellrasen mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den IAP-Antagonisten LBPS03 (10 µM) und LBPS05 (15 µM) sowie der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) in FCS-reduziertem Medium behandelt und für 72 Stunden bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration kultiviert. Für die Proteingewinnung wurde das Kulturmedium in ein 15 ml *Falcon*-Röhrchen überführt und der Zellrasen zweifach mit je 1 ml PBS gewaschen, das ebenfalls

gesammelt wurde. Von dem Kulturflaschenboden wurden die Zellen mit 1 ml TrypLE Express gelöst, mit Kulturmedium im gleichen Volumen die weitere Reaktion unterbrochen und die gesamte Zellsuspension im *Falcon*-Röhrchen kollektiert. Nach der Zentrifugation von 5 Minuten bei 300 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellett in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Erneut wurden die Zellen bei 400 g sowie 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert und im Abschluss der Überstand verworfen. Der Waschschrift wurde weitere zwei Male wiederholt und das PBS anschließend vollständig abgenommen. In Abhängigkeit der Größe des resultierenden Pelletts wurden die Zellen in 50-70 µl Lysepuffer H resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Inkubationszeit wurden die Zellen regelmäßig mittels Vortexer durchmischt, um im Anschluss für 20 Minuten bei $2 \cdot 10^4$ g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert zu werden. Abschließend wurde der Überstand in ein neues 1 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, worin sich das Proteinlysat befindet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Für die Proteinextraktion aus den Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 wurden diese in einer Zelldichte von $2,8 \cdot 10^3$ Zellen/cm² in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² ausgesät. Nach 24 Stunden Kultivierung unter Standardbedingungen wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit 1 ml PBS gewaschen. In einer Konzentration von jeweils 25 µM wurden die IAP-Antagonisten in FCS-reduziertem Medium auf den Zellrasen pipettiert. Auch hier diente DMSO in einer Konzentration von 0,1 % als Lösungsmittelkontrolle. Für weitere 72 Stunden erfolgte die Inkubation der Zellen bei 5 % CO₂-Atmosphäre, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 37 °C. Die weitere Proteingewinnung wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford-Reagenz ist eine photometrische Methode, in der es zu einer Komplexbildung zwischen den Proteinseitenketten und dem Farbstoff „Coomassie-Brilliant-Blau G-250“ kommt. Die Interaktion zwischen Farbstoff und Protein führt zur Verschiebung des Absorptionsspektrums von 465 nm zu 595 nm (BRADFORD, 1976). Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz erfolgte die Messung der Absorption des Protein-Farbstoff-Komplexes gegen das freie Farbreagenz:

$$E = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon * c * d$$

mit:

- E = Extinktion
- I_0 = Intensität des einstrahlenden Lichtes
- I_1 = Intensität des transmittierten Lichtes
- ε = Extinktionskoeffizient
- c = Konzentration des Stoffes
- d = Schichtdicke der Küvette

Zu Beginn wurde eine Eichgerade mit dem Referenzprotein BSA (*Bovine Serum Albumin*) in einer Konzentration von 1 mg/ml erstellt. Hierzu wurden 1 μ l bis 10 μ l der BSA-Stocklösung auf 1000 μ l Bradford-Reagenz pipettiert und anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Aus den ermittelten Werten konnte eine Standardkurve generiert werden, anhand derer die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden konnte. Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurden 1000 μ l Bradford-Lösung mit 1 μ l des Proteinlysates versetzt und dessen Absorption gemessen.

2.2.3.3 Western Blot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die *SDS-Page* (englisch für *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), als biochemische Methode, dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse (LAEMMLI, 1970). Das Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese beruht auf den unterschiedlichen pH-Werten zweier Gele, wodurch sich die Proteine zunächst im Sammelgel konzentrieren und anschließend im Trenngel ihrer Größe entsprechend separiert werden.

Für den Nachweis der Proteine c-IAP2, PARP und XIAP wurden SDS-Gele in unterschiedlichen Polyacrylamid-Konzentrationen, entsprechend der Größe der nachzuweisenden Proteine, verwendet. Die Zusammensetzungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

	Sammelgel	8 % SDS-PAGE Trenngel	12 % SDS-PAGE Trenngel
H ₂ O	1,4	4,6	3,3
30 % Acrylamid mix	0,33	2,7	4,0
1,5 M Tris pH 6,8	0,25		
1,0 M Tris pH 8,8		2,5	2,5
10 % SDS	0,02	0,1	0,1
10 % APS	0,02	0,1	0,1
TEMED	0,002	0,009	0,004

Angaben in ml pro Gel

Tabelle 1 - Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Je Probe wurden 50 µg Gesamtprotein mit 5-fach Lämmli-Puffer versetzt und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Durch das, im Lämmli-Puffer enthaltene, β-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken von Proteinen reduziert und ermöglichen somit ihre Denaturierung. Im Anschluss wurden die Proben bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und auf die vorbereiteten SDS-Gele aufgetragen. Bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA pro Gel erfolgte die Auftrennung der Proteine, entsprechend ihres Molekulargewichtes, in SDS-Laufpuffer über 90 Minuten.

Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran

Die Methode des Western Blot dient der Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran. Hierzu werden die Proteine, auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, in einem elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (TOWBIN ET AL., 1979). In den Versuchen dieser Arbeit wurde das *Semi-Dry-Blot* Verfahren Trans-Blot® Turbo™ Transfer System von BIO RAD verwendet, in dem die negativ geladenen Proteine von dem Polyacrylamidgel Richtung Anode laufen und somit auf darunter liegende Nitrozellulosemembran transferiert werden (KYHSE-ANDERSEN, 1984). Hierbei wurden Kassettenboden (Anode) und Kassettendeckel (Kathode) jeweils mit Transferpuffer befeuchtet und anschließend Whatman-Filterpapier, Nitrozellulosemembran und Polyacrylamidgel, die zuvor 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert wurden, auf dem Kassettenboden positioniert. Der Aufbau im Einzelnen ist in Abbildung 5 dargestellt.

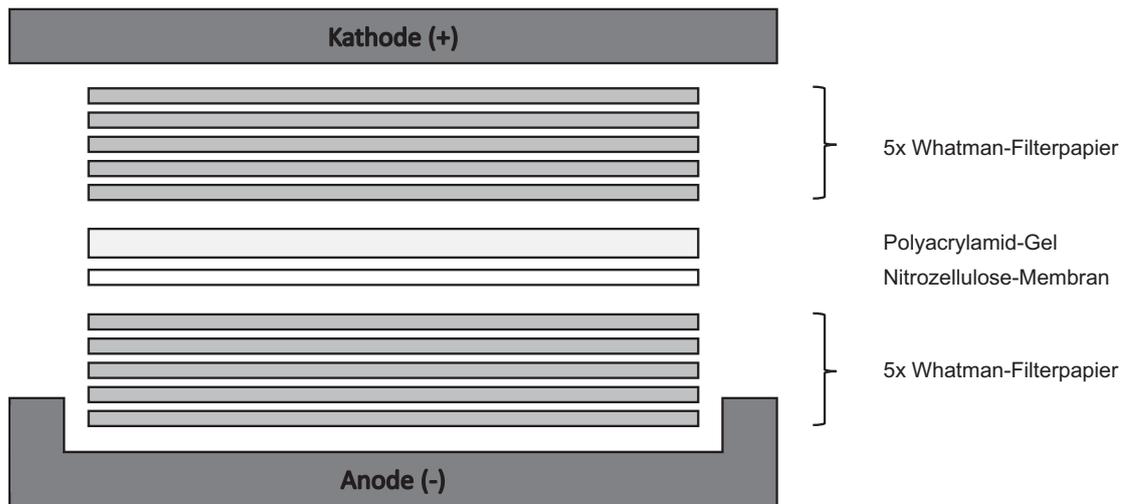


Abb. 5 - Schematische Aufbau eines Semi Dry Blots

Der Kassettenboden wird mit Transferpuffer befeuchtet. Anschließend werden fünf, in Transferpuffer getränkte, Whatman-Filterpapiere positioniert. Hierauf wird die äquilibrierte Nitrozellulosemembran gelegt und blasenfrei mit dem Polyacrylamidgel bedeckt. Den Abschluss bilden wieder fünf getränkte Filterpapiere. Die Kassette wird mit der Kathode verschlossen und in den Trans-Blot® Turbo™ von BIO RAD eingebracht.

Bei einer konstanten Stromstärke von einem Ampere erfolgte über 40 Minuten der Transfer der Proteine auf die Zellulosemembran.

Färbung mit Ponceau S

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran für 10 Minuten mit dem Farbstoff Ponceau S schüttelnd inkubiert, um den Transfer zu überprüfen. Dieser Azofarbstoff bindet reversibel an die Seitenketten der Proteine und macht diese somit auf der Membran sichtbar. Nach erfolgter Färbung wurde das Ponceau S wieder abgenommen und die Nitrozellulosemembran solange mit TBS auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen, bis der Farbstoff vollständig entfernt wurde.

Immundetektion verschiedener Proteine über spezifische Antikörper

Zu Beginn wurde die Nitrozellulosemembran über 60 Minuten bei Raumtemperatur in 5 %-iger Milchpulver-Lösung auf dem Taumel-Rollmischer inkubiert. Dieser Vorgang diente zur Reduktion unspezifischer Bindungen der Primärantikörper an unspezifische Proteinbindestellen. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran in ein lichtundurchlässiges 50 ml *Falcon*-Röhrchen überführt, der nachzuweisende Primärantikörper, wie unter 2.1.1 beschrieben, verdünnt und die Membran über

Nacht bei 4 °C auf dem Taumel-Rollmischer mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal mit jeweils 10 ml TBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Zum Abschluss erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der $1:10 \cdot 10^4$ über eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Milchpulverlösung gelöst wurde. Nach drei weiteren Waschschritten, wie oben beschrieben, konnte der Proteinnachweis am Infrarot-Imager mit den Welllängen 685 nm und 785 nm erfolgen.

Um die Expressionslevel der Proteine quantifizieren zu können, wurden stets *housekeeping*-Proteine (GAPDH oder α -Tubulin) nachgewiesen. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Rollmischer inkubiert und im Anschluss mit einem Fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Die Detektion der *housekeeping*-Proteine konnte nach drei Waschschritten ebenfalls am Infrarot-Imager erfolgen.

2.2.4 Signifikanzen

Mithilfe des *Students t*-Testes wurden alle Signifikanzen in dieser Arbeit berechnet und die p-Werte in den Abbildungen als Sterne [*] gekennzeichnet. Hier gilt bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ [*], $p \leq 0,01$ [**], $p \leq 0,001$ [***] und $p \leq 0,0001$ [****]. Mit n.s. wurden nicht signifikante Ergebnisse gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Im Rahmen unserer Arbeitsgruppe wurde die Wirkung der neu entwickelten Substanzen bereits auf Jurkat-Zellen und Nierenkarzinomzellen untersucht. Hier zeigte sich, dass lediglich eine geringe Konzentration der IAP-Antagonisten notwendig war, um einen ausgeprägten anti-proliferativen Effekt zu erwirken. Im Gegensatz hierzu, mussten die Substanzen auf Pankreaskarzinomzellen in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um einen ähnlichen Effekt zu erzielen.

3.1 Bestimmung der IC₅₀-Werte der IAP-Antagonisten

In Anlehnung an die Ergebnisse der Vorversuche erfolgte die Bestimmung der IC₅₀-Werte über eine Inkubationszeit von fünf Tagen. Der IC₅₀-Wert beschreibt die Konzentration eines Hemmstoffes, die zur halbmaximalen Hemmung führt und in diesem Fall auf das Tumorwachstum bezogen wurde. Hierzu wurden die Zellen mit den Substanzen in acht unterschiedlichen Konzentrationen (max. 50 µM) über einen Zeitraum von fünf Tagen inkubiert. Mithilfe der *GraphPad Prism Software* wurden zum einen die Dosis-Wirkungskurven erstellt und zum anderen erfolgte über diese *Software* die Ermittlung der IC₅₀-Werte.

Im Vergleich konnten in der Zelllinie HUP-T3 geringere IC₅₀-Werte bestimmt werden. Nach einer Inkubationsdauer von fünf Tagen ergab sich für LBPS03 eine halbmaximale Hemmung von $10,21 \pm 0,7 \mu\text{M}$ und für LBPS05 von $14,6 \pm 3,4 \mu\text{M}$. Im Gegensatz dazu lagen die IC₅₀-Werte der IAP-Antagonisten in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 bei $22,8 \pm 5,4 \mu\text{M}$ (LBPS03) und $24,8 \pm 5,4 \mu\text{M}$ (LBPS05). Zur leichteren Handhabung wurden für folgende Versuche für die Zellen HUP-T3 die Konzentrationen 10 µM (LBPS03) und 15 µM (LBPS05) sowie jeweils 25 µM für die Zelllinie PaTu8902 eingesetzt.

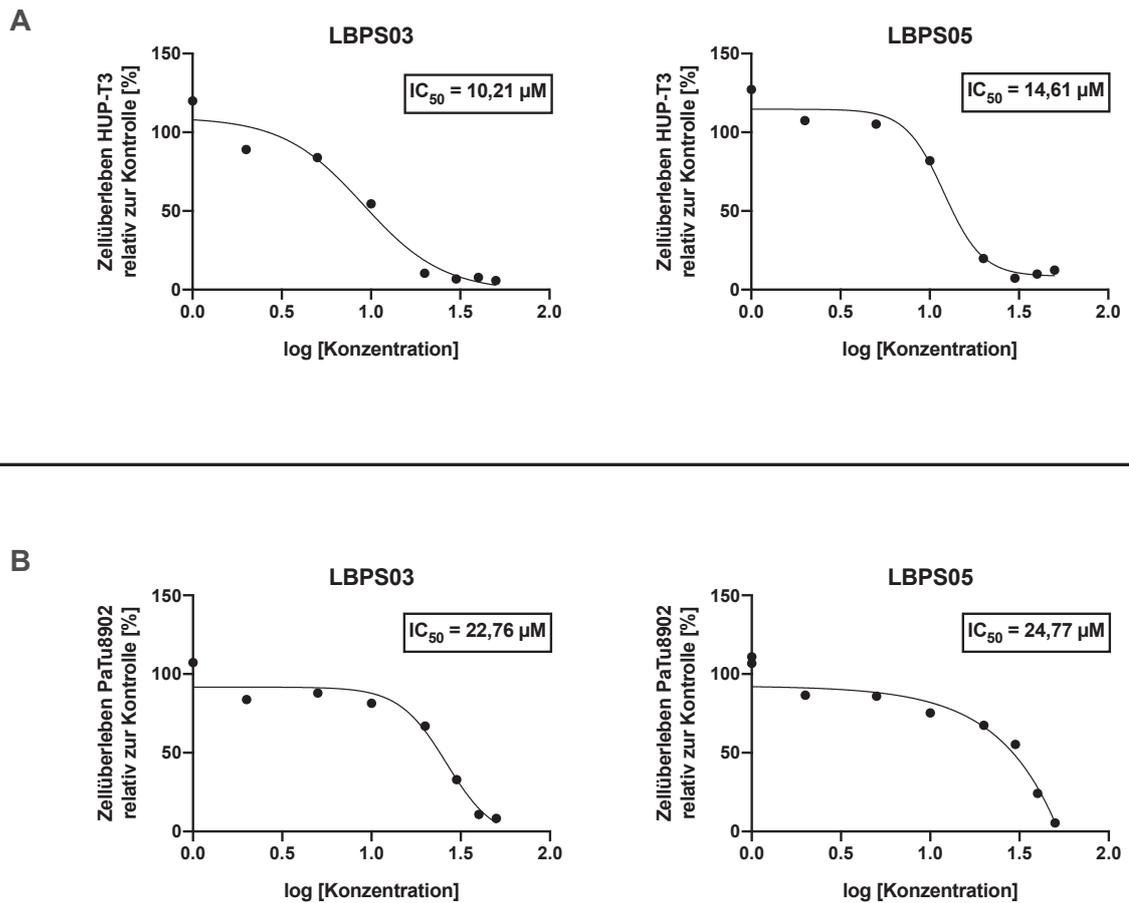


Abb. 6 - Dosis-Wirkungskurven der IAP Antagonisten LBPS03 und LBPS05

Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte wurden die Pankreaskarzinomzelllinien über fünf Tage mit acht unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der Proliferationsanalysen mittels DRAQ5TM und die Bestimmung der IC_{50} -Werte mithilfe der Software von GraphPad Prism. Die Versuche wurden unabhängig voneinander dreimal durchgeführt. **A)** Hier sind die Dosis-Wirkungskurven der Zelllinie HUP-T3 dargestellt. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte ergab für LPBS03 einen Wert von 10,21 μM und für den IAP-Antagonisten LBPS05 einen IC_{50} -Wert von 14,61 μM . **B)** Höhere IC_{50} -Werte wurden bei der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 ermittelt. Hier ergaben die Berechnungen einen Wert von 22,76 μM für LBPS03 und 24,77 μM für LBPS05.

3.2 Einfluss der neuen IAP-Antagonisten auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung der IAP-Antagonisten auf das Zellüberleben zweier Pankreaskarzinomzelllinien untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen der Linien HUP-T3 und PaTu8902 in ihren definierten Zelldichten auf 96-Well-Platten ausgesät und entsprechend ihrer IC_{50} -Werte, deren Bestimmung unter 3.1 zu finden ist, über einen Zeitraum von 72 Stunden behandelt. Das Zellüberleben wurde mittels DRAQ5TM-Färbung und die Auswertung durch den Infrarot-Imager ermittelt. Die Mittelwerte der behandelten Zellen wurden in Relation zu den gemittelten Werten der Kontrollzellen gesetzt, die jeweils auf 100 % festgelegt wurden.

Wurden die Zellen der Linie HUP-T3 mit LBPS03 in einer Konzentration von 10 μM über 48 Stunden inkubiert, zeigte sich eine Reduktion der Zellzahl auf $65,0 \pm 5,7 \%$. LBPS03 in der fünffachen Dosierung führte zu einem Zellüberleben von $13,7 \pm 4,0 \%$. Nach zwei Tagen Behandlung mit 15 μM LBPS05 verringerte sich die Proliferationsrate der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 um $31,5 \pm 0,7 \%$ und auf $9,0 \pm 3,5 \%$ sank das Zellüberleben, nachdem die Zellen mit LBPS05 in 50 μM über 48 Stunden behandelt wurden (Abb. 7A).

In Abbildung 7B ist dargestellt, dass die Behandlung der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 über einen Zeitraum von 3 Tagen mit LBPS03 in einer Konzentration von 10 μM das Zellüberleben signifikant auf einen Wert von $44,0 \pm 8,0 \%$ reduzierte. Die Inkubation der Zellen mit dem IAP-Antagonisten LBPS05 in einer Konzentration von 15 μM über selbige Zeitspanne verringerte das Proliferationsverhalten um $30,5 \pm 5,8 \%$.

Die Inkubation der PaTu8902-Zellen über 48 Stunden mit LBPS03 in 25 μM führte zu einer Reduktion der Zellzahl um $25,8 \pm 9,4 \%$. Wurden die Zellen mit der doppelten Konzentration von LBPS03 behandelt, konnte eine Proliferationsrate von $37,8 \pm 7,9 \%$ ermittelt werden. Die Behandlung mit dem IAP-Antagonisten LBPS05 in 25 μM über selbige Zeitspanne verzeichnete ein Zellüberleben von $79,8 \pm 9,8 \%$ und nach der Inkubation mit LBPS05 in einer Konzentration von 50 μM sind noch $39,7 \pm 8,5 \%$ der Zellen vital (Abb. 7C).

In einer Konzentration von 25 μM und Inkubationsdauer von 72 Stunden dezimierte LBPS03 das Zellüberleben der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 auf $57,2 \pm 6,8 \%$ signifikant. Die Wirkung von LBPS05, das in einer Konzentration von 25 μM eingesetzt wurde, reduzierte die Proliferation nach dreitägiger Behandlungsdauer lediglich um $24,2 \pm 6,9 \%$ im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen (Abb. 7D).

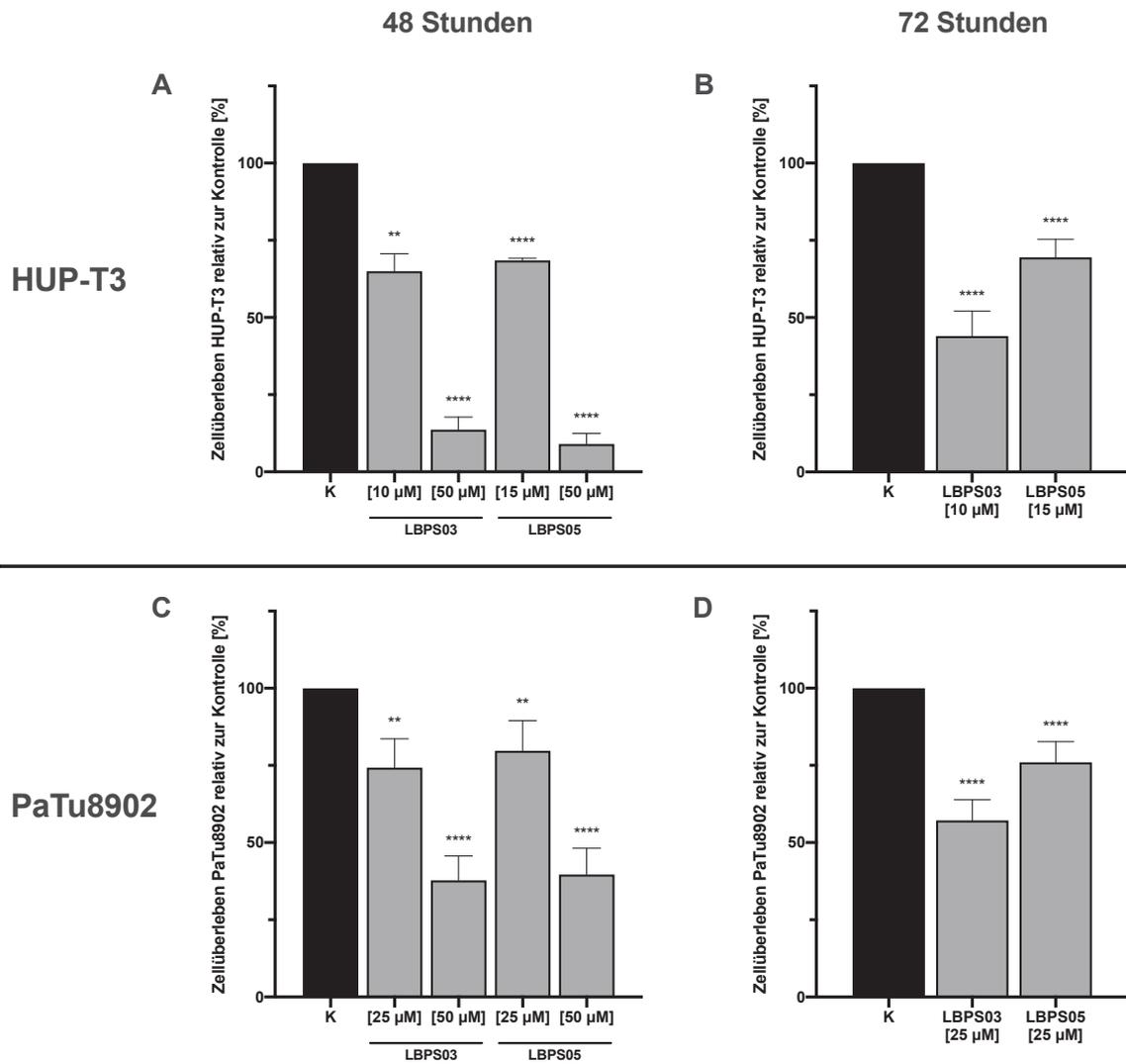


Abb. 7 - Wirkung der Substanzen LBPS03 und LBPS05 auf das Zellüberleben von Zellen der Linien HUP-T3 und PaTu8902 über 48 bzw. 72 Stunden

A) Die Zellen der Linie HUP-T3 wurden mit den IAP-Antagonisten in den Konzentrationen 10 μ M (LBPS03), 15 μ M (LBPS05) sowie LBPS03 und LBPS05 in jeweils 50 μ M über eine Zeitspanne von zwei Tagen behandelt. **B)** Für die Behandlungsdauer von 72 Stunden wurden die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 in entsprechender Dichte ausgesät und mit den Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen behandelt, die auf der x-Achse dargestellt sind. **C)** Die Zellen der Linie PaTu8902 wurden auf einer 96-Well-Platte ausgesät und mit LBPS03 sowie LBPS05 in jeweils 25 μ M und 50 μ M für 48 Stunden inkubiert. **D)** Die Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 wurden für diesen Versuch über 72 Stunden mit den neuen Substanzen in einer Konzentration von jeweils 25 μ M unter Standardbedingungen inkubiert. In allen Versuchen dienten als Kontrollzellen Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) inkubiert wurden. Die Auswertung der Proliferationsversuche erfolgte mithilfe der *DRAQ5*TM-Färbung. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. K = Kontrolle, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$.

3.3 Untersuchungen zum Zelltodmechanismus in der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3

3.3.1 Wirkung der Substanzen LBPS03 und LBPS05 auf die Aktivität der Initiator- und Effektor-Caspasen

Anhand von Aktivierung unterschiedlicher Caspasen, die mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden kann, besteht die Möglichkeit, Hinweise auf die Art des induzierten Zelltodes durch die Substanzen zu erlangen. Die beiden IAP-Antagonisten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden so konzipiert, dass sie in der Lage sind, pan-selektiv IAPs zu inaktivieren und somit in Tumorzellen den Ablauf des programmierten Zelltodes wieder ermöglichen. Hinweisend auf einen apoptotischen Zelltodmechanismus ist eine Aktivierung der Effektorcaspase-3/-7, die über verschiedene Initiatorcaspasen aktiviert werden kann. Ferner kann durch Ermittlung der Aktivität der Initiatorcaspasen differenziert werden, welcher Signaltransduktionsweg der Apoptose am ehesten initiiert wird.

Die Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 wurde über die Zeiträume 48, 72 und 96 Stunden mit den Substanzen LBPS03 (10 μM) und LBPS05 (15 μM) behandelt und anschließend deren intrazelluläre Caspaseaktivität mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Ergebnisse der Aktivierung der Effektorcaspase-3/-7 sind in Abbildung 8 dargestellt sowie die Ergebnisse der Untersuchungen zur Initiatorcaspase-8 in Abbildung 9.

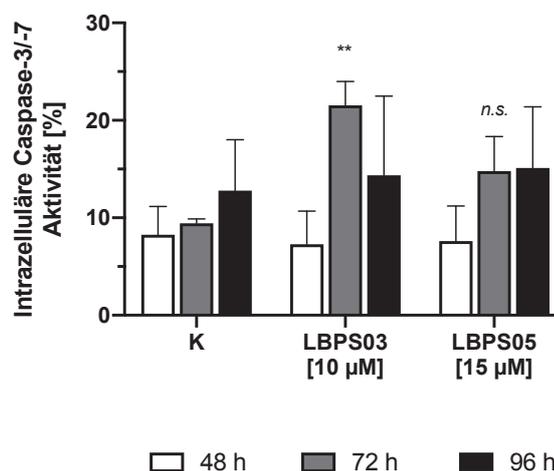


Abb. 8 - Durchflusszytometrische Untersuchung zur Aktivierung der intrazellulären Caspase-3/-7 Aktivität nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten

Die Zellen der Zelllinie HUP-T3 wurden über einen Zeitraum von 48 bis 96 Stunden mit LBPS03 in einer Konzentration von 10 μM und LBPS05 in einer Konzentration von 15 μM inkubiert. Die Bestimmung der intrazellulären Caspaseaktivität erfolgte mit Hilfe des Caspase-Staining Kits von Promokine mittels Durchflusszytometrie. Alle Werte stellen die gemittelten Werte aller durchgeführten Messungen dar. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollwerte. K = Kontrolle, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, n.s. = nicht signifikant. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

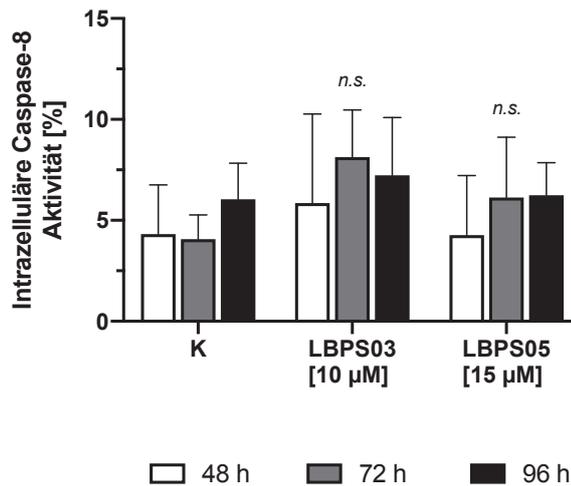


Abb. 9 - Relative Caspase-8 Aktivität nach Inkubation mit den IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05
 Über einen Inkubationszeitraum von 48 bis 96 Stunden wurden die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 mit den Substanzen LBPS03 (10 µM) und LBPS05 (15 µM) behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der intrazellulären Caspase-8-Aktivität mittels Caspase-Staining Kits von Promokine mittels Durchflusszytometrie. Alle Werte stellen die gemittelten Werte aller durchgeführten Messungen dar. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollwerte. K = Kontrolle, n.s. = nicht signifikant. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

In den, mit LBPS03 behandelten, Pankreaskarzinomzellen zeigte sich nach 72 Stunden Inkubation mit der Substanz eine signifikante Steigerung der Aktivität der Effektorcaspase-3/-7. Hier lag die relative Aktivität bei $21,5 \pm 2,4 \%$, im Vergleich zur Aktivität in der Kontrollbehandlung, in der die Aktivität nur halb so hoch lag. Ferner war zu beobachten, dass eine längere Inkubationsdauer keine Steigerung der Caspaseaktivität bewirkte, sondern hier die Werte auf $14,4 \pm 8,1 \%$ fielen. Die Behandlung mit LBPS05 in einer Konzentration von 15 µM zeigte nach 3 Tagen eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung der intrazellulären Caspase-3/-7-Aktivität auf $14,8 \pm 3,5 \%$, wobei hier die Behandlung über 96 Stunden eine stabile Aktivierung zeigte und keine Regredienz, wie bei der Behandlung mit LBPS03 (Abb. 8).

Die intrazelluläre Aktivität der Initiatorcaspase-8 zeigte über sämtliche Inkubationszeiträume keine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Die gemessenen Werte geben jedoch Hinweise auf eine leichte Zunahme, ebenfalls nach 72 Stunden nach Behandlung mit LBPS03 und LPSS05 (Abb. 9).

Abbildung 10 zeigt die durchflusszytometrischen Untersuchungen zur intrazellulären Caspaseaktivität der Initiatorcaspasen, die für eine Aktivierung über den intrinsischen Weg der Apoptose sprechen würden. Hier zeigte sich nach der Behandlung der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 mit LBPS03 und LBPS05 über einen Zeitraum von 72 Stunden sowohl für die Caspase-2 als auch für die Caspase-9 keine Steigerung der Aktivität. Lediglich die intrazelluläre Caspase-8 Aktivität wies, wie oben beschrieben, eine leichte Aktivitätssteigerung auf.

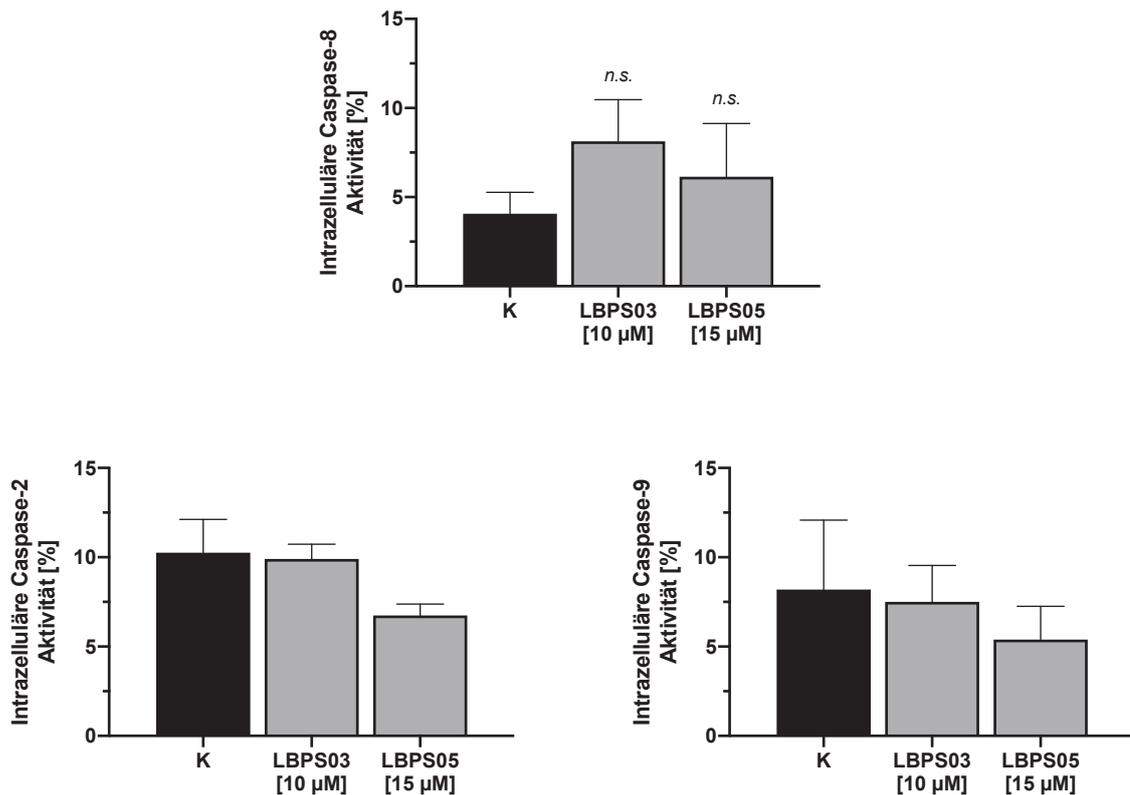


Abb. 10 - Relative Caspaseaktivität der Initiatorcaspasen-2/-8 und-9 nach Behandlung mit den neu entwickelten Substanzen

Die Zellen der Zelllinie HUP-T3 wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit LBPS03 in einer Konzentration von 10 µM und LBPS05 in einer Konzentration von 15 µM inkubiert. Die Bestimmung der intrazellulären Caspaseaktivität der Initiatorcaspasen-2/-8 und -9 erfolgte mit Hilfe des Caspase-Staining Kits von Promokine mittels Durchflusszytometrie. Alle Werte stellen die gemittelten Werte aller durchgeführten Messungen dar. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollwerte. n.s. = nicht signifikant. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

3.3.2 Ermittlung der Apoptose-Häufigkeit nach Behandlung mit IAP-Antagonisten

Die Untersuchungen zur Caspaseaktivität nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05 ergaben Hinweise auf einen apoptotisch-induzierten Zelltod. In einem nächsten Schritt wurden die vorausgegangenen Ergebnisse weiter untersucht. Mittels Färbung der behandelten Zellen mit Propidiumiodid, kann der Zellanteil bestimmt werden, der in der Durchflusszytometrie einen hypodiploiden *Peak* aufweist und für apoptotische Zellen charakteristisch ist.

Über einen Zeitraum von drei Tagen wurden die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 mit den Substanzen LBPS03 in einer Konzentration von 10 µM und LBPS05 von 15 µM unter Standardbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PI-Lysepuffer lysiert und es erfolgte die Messung mittels Durchflusszytometrie. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1 % ebenfalls über 72 Stunden inkubiert wurden.

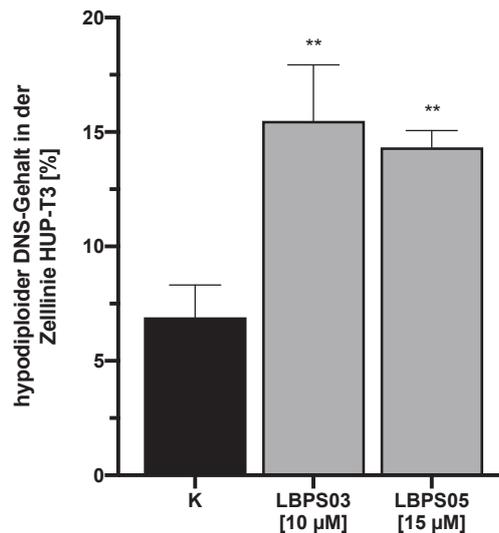


Abb. 11 - Ermittlung der Apoptosehäufigkeit in der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05 mittels PI-Färbung

Die Zellen der Zelllinie HUP-T3 wurden über 72 Stunden mit den IAP-Antagonisten unter Standardbedingungen behandelt. Anschließend wurde der Anteil an apoptotischen Zellen mittels PI-Färbung nach Nicoletti am Durchflusszytometer bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1 % über den gleichen Zeitraum behandelt wurden. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf die Kontrollwerte. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Auswertung zeigte einen signifikanten Anstieg des hypodiploiden *DNA*-Gehaltes nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden mit dem IAP-Antagonisten LBPS03 auf $15,5 \pm 2,5$ % der Zellpopulation. Im Vergleich dazu war der Anteil an apoptotischen Zellen nach der Behandlung mit LBPS05 mit $14,3 \pm 0,7$ % nur minimal geringer, aber ebenso signifikant bezogen auf die Kontrollzellen (Abb. 11).

3.4 Untersuchungen zur Caspaseaktivität in der Zelllinie PaTu8902 nach Behandlung mit IAP-Antagonisten durch Western Blot Analysen

Aufgrund der Einschränkungen, die Zelllinie PaTu8902 durchflusszytometrisch zu analysieren, wurden Untersuchungen zur Aktivität der Caspasen mittels Western Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 72 und 96 Stunden mit den Substanzen LBPS03 und LBPS05 jeweils in einer Konzentration von 25 µM unter Standardbedingungen inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Jurkat-Zellen, die für fünf Stunden mit 50 µM Etoposid behandelt und inkubiert wurden (FUJINO ET AL., 2002). Anschließend erfolgte die Proteinextraktion der Pankreaskarzinomzellen, wie unter 2.2.3.1 beschrieben.

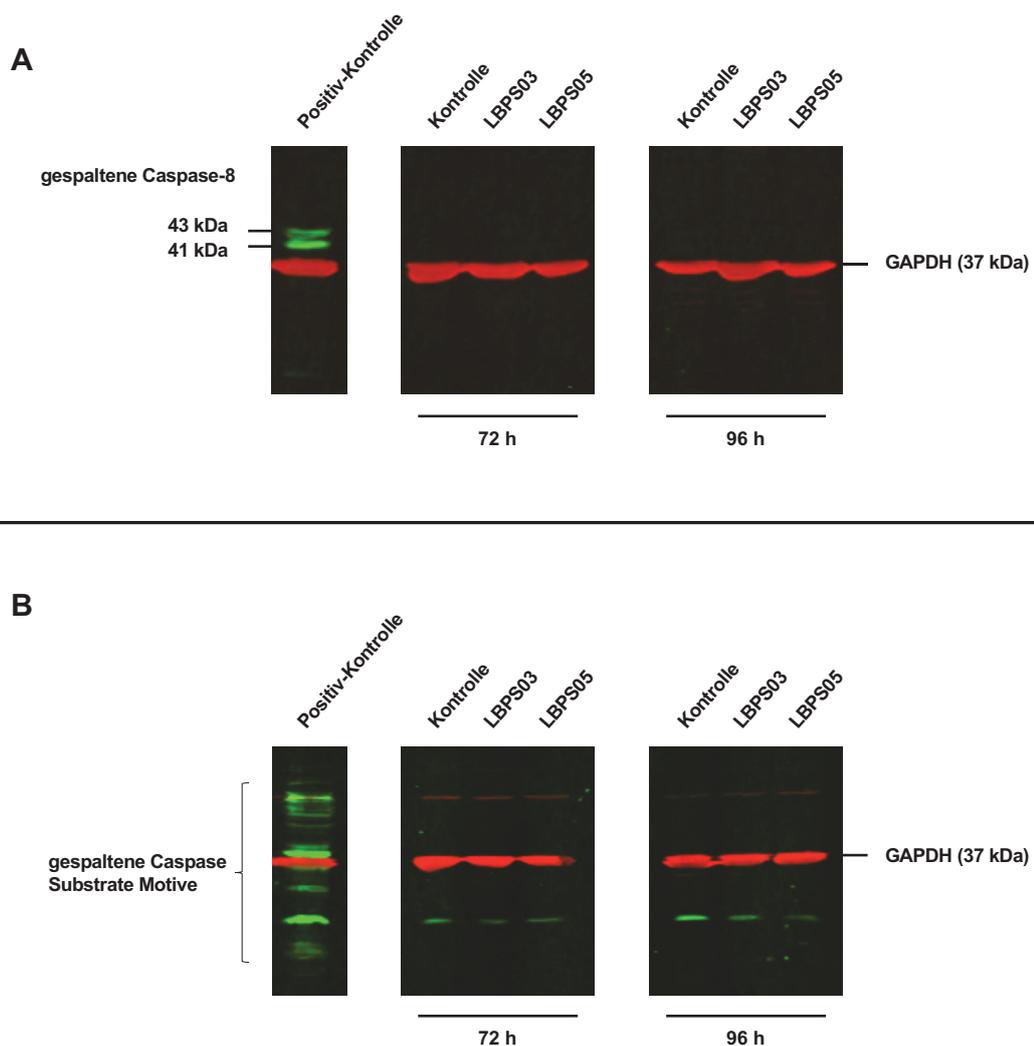


Abb. 12 - Western Blot Analysen zur Spaltung von Caspasen und Caspase-Spaltprodukten nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten

Zellen der Zelllinie PaTu8902 wurden über 72 und 96 Stunden mit LBPS03 und LBPS05 jeweils mit einer Konzentration von 25 μ M inkubiert und im Anschluss erfolgte die Extraktion der Proteine. Zellen, die über die gleichen Zeiträume mit dem Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1 % behandelt wurden, dienen als Kontrollzellen. Als Positivkontrolle dienen Jurkat-Zellen, die über einen Zeitraum von fünf Stunden mit 50 μ M Etoposid behandelt wurden. **A)** Auf eine 15 %-ige SDS-PAGE wurden jeweils 50 μ g Protein aufgetragen und anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt. Über Nacht wurde die Zellulosemembran bei 4 °C mit dem Primärantikörper in einer Konzentration von 1:1.000 inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung mittels Infrarot-Imager, nach Behandlung mit dem Sekundärantikörper. (n = 2) **B)** Zur Analyse der *Cleaved Caspase Substrate Motif* wurden 50 μ g PaTu8902-Protein auf eine 12 %-ige SDS-PAGE aufgetragen und ebenfalls gelelektrophoretisch separiert. Ausgewertet wurde der Western Blot ebenfalls mit dem Infrarot-Imager. (n = 2) In beiden Versuchen diente GAPDH als *house-keeping* Protein.

Im Falle einer Aktivierung der Procaspase-8 können die Fragmente p43 mit einem Molekülgewicht von 43 kDa und p41 mit 41 kDa mittels Western Blot nachgewiesen werden. Nach einer Behandlungszeit von 72 und 96 Stunden mit den IAP-Antagonisten konnten keine Spaltprodukte der Procaspase-8 in den Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden, lediglich in der Positivkontrolle wurden die beiden Fragmente detektiert (Abb. 12A).

In Abbildung 12B wurde die Wirkung von LBPS03 und LBPS05 in einer Konzentration von 25 μM auf unterschiedliche Spaltprodukte von Caspasen dargestellt. Hier zeigte sich sowohl nach drei als auch nach vier Tagen Behandlung kein Nachweis der Spaltung von Caspase-Substraten. In den, mit Etoposid behandelten, Jurkat-Zellen konnte die Bindungsfähigkeit des Antikörpers nachgewiesen werden.

3.5 Überprüfung der PARP-Spaltung in der Zelllinie HUP-T3 durch Aktivierung der Caspase-3 auf Proteinebene

Da die Untersuchungen zur Aktivität der Effektorcaspase-3 einen signifikanten Anstieg zeigten, folgte die Überprüfung des Spaltsubstrates Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) der Caspase-3 auf Proteinebene. In der Western Blot Analyse können sowohl das gespaltene PARP bei 89 kDa als auch das unfragmentierte PARP bei 116 kDa detektiert werden. Hierfür wurden die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 über 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Anschließend erfolgte die Extraktion der Proteine, wie in 2.2.3.1 beschrieben. Als Nachweis der Bindungsfähigkeit des Antikörpers wurden Zellen der Linie Jurkat über fünf Stunden mit 50 μM Etoposid behandelt und als Positivkontrolle auf das Gel aufgetragen (FUJINO ET AL., 2002).

Die Auswertung der Western Blot Analyse zeigte in der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 nach einer Behandlungsdauer von drei Tagen mit LBPS03 (10 μM) und LBPS05 (15 μM) keine Spaltung des Caspase-3-Substrates PARP. In der Positivkontrolle konnte das unfragmentierte PARP mit einer Molekülgröße von 116 kDa sowie dessen Spaltprodukt mit 89 kDa nachgewiesen werden (Abb. 13).

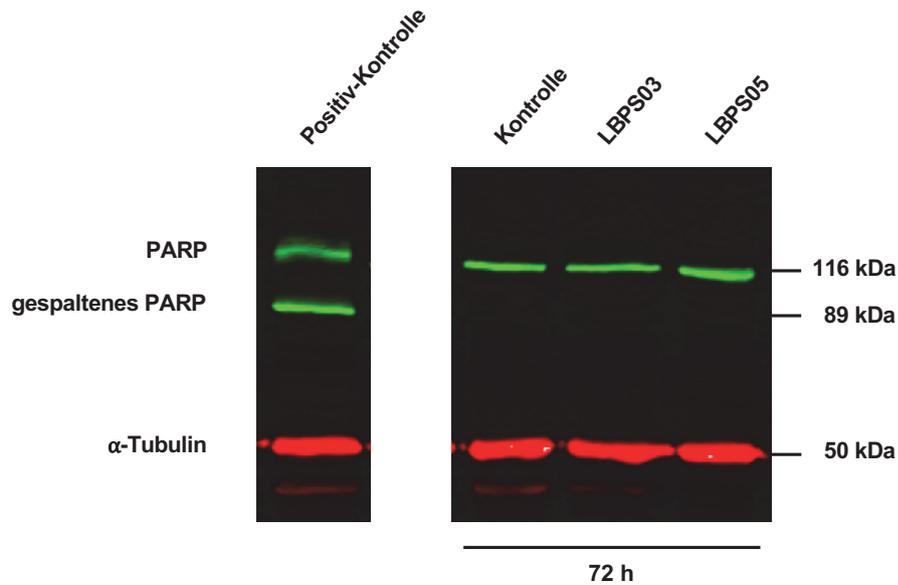


Abb. 13 - Western Blot Analyse zur PARP-Spaltung nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05

Zellen der Linie HUP-T3 wurden in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² ausgesät und über drei Tage mit den Substanzen LBPS03 in einer Konzentration von 10 µM und LBPS05 von 15 µM unter Standardbedingungen inkubiert. Zellen, die über die gleichen Zeiträume mit dem Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1 % behandelt wurden, dienten als Kontrollzellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Lyse der Zellen sowie die Extraktion der Proteine. Für die Gelelektrophorese wurden 50 µg Proteinextrakt auf eine 8 %-ige SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle wurden Zellen einer T-Zelleukämie-Linie (Jurkat M) über fünf Stunden mit 50 µM Etoposid behandelt und anschließend deren Proteine isoliert. Ausgewertet wurde der Western Blot mit dem Infrarot-Imager. (n = 2) Der Nachweis von α-Tubulin diente in diesem Versuch als Ladungskontrolle.

3.6 Die Expression von cIAP1, cIAP2 und XIAP in den Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902

3.6.1 Bestimmung der Basalexpression von cIAP1, cIAP2 und XIAP

Zur Quantifizierung der Apoptose-Inhibitoren in den hier verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902 wurde die Basalexpression von cIAP1, cIAP2 und XIAP in Relation zur Basalexpression in den Nierenzellkarzinomzellen ClearCa-2 bestimmt. In diesen Zellen wurde das anti-apoptotisch wirksame XIAP als stark überexprimiert nachgewiesen (RAMP ET AL., 2004). Sie dienten für diese Versuche als Vergleichszellen.

Mittels Western Blot Analysen konnte die Quantifizierung der Zielproteine XIAP, cIAP1 und cIAP2 aus unbehandelten Zellen erfolgen, indem zuerst die Expression der Apoptose-Inhibitoren in Relation zur Expression der jeweiligen Ladungskontrolle GAPDH gesetzt und anschließend das Expressionslevel der Kontrollzellen ClearCa-2 auf 100 % festgesetzt wurde. Die ermittelten Proteinlevel aus den behandelten Pankreaskarzinomzellen wurden dann ins Verhältnis zu dem Proteinlevel der Nierenzellkarzinomzellen gesetzt.

Die Auswertung der basalen Expression von XIAP in beiden Pankreaskarzinomzellen zeigte ein erhöhtes Level des Apoptose-Inhibitors, im direkten Vergleich zu der bereits verstärkten Expression in den Zellen der Linie ClearCa-2. Das Niveau der Proteinexpression war in der Zelllinie HUP-T3 um 78 % höher, verglichen mit den Kontrollzellen. Das Ergebnis zur Untersuchung des basalen Levels von XIAP in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 zeigte mit 149 % einen, um mehr als das Doppelte erhöhten Wert (Abb. 14A). Bezogen auf das Niveau der zellulären IAPs wird in Abbildung 14B ersichtlich, dass diese in Gegenüberstellung zu den Nierenkarzinomzellen nicht vermehrt exprimiert wurden. Aufgrund der teils hohen Standardabweichungen sind die Ergebnisse als Tendenz zu werten.

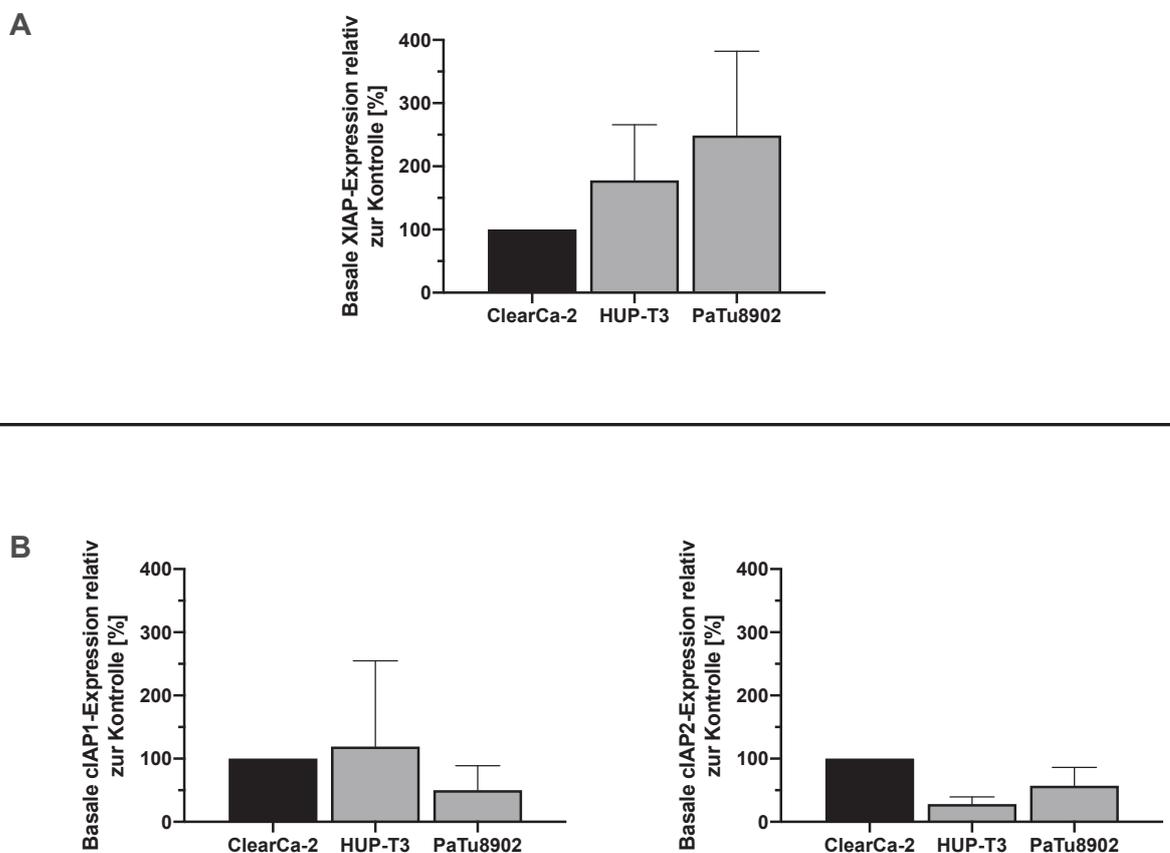


Abb. 14 - Basale Expression der Apoptose-Inhibitoren in den Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902

Aus den unbehandelten Zelllinien ClearCa-2, HUP-T3 und PaTu8902 erfolgte die Lyse der Zellen sowie im Anschluss die Isolation der Proteine. Für Gelelektrophorese wurden je 50 µg Protein auf eine 12 %-ige SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Über Nacht wurde die Zellulosemembran bei 4 °C mit dem Primärantikörper für den Nachweis von XIAP (A) sowie von cIAP1 und cIAP2 (B) inkubiert. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mithilfe der Expression des Proteins in Relation zum *housekeeping*-Protein GAPDH und die y-Achse beschreibt in allen drei Graphen die relative Expression des Zielproteins zur Expression in den Kontrollzellen ClearCa-2. Als Auswertungshilfe diente die Software von *Odyssey® Image Studio Lite*.

3.6.2 Untersuchungen zur Degradation von XIAP und cIAP-2 in den Zelllinien HUP-T3 und PaTu8902 nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05

Die Untersuchungen zur Basalexpression der Apoptose-Inhibitoren in den beiden Pankreaskarzinomzelllinien zeigten eine verstärkte Expression von XIAP. Aufgrund dessen wurde mittels weiterer Western Blots analysiert, ob Veränderungen im Expressionslevel des Zielproteins erfolgen, wenn die Zellen mit den Substanzen behandelt werden. Hierzu wurden die Zelllinien HUP-T3 und PaTu8902 entsprechend ihrer zuvor definierten Zelldichten in Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² ausgesät und anschließend über einen Zeitraum von 72 Stunden mit den Substanzen LBPS03 und LBPS05 in ihren spezifischen Konzentrationen, unter Standardbedingungen, inkubiert. Darauf folgte die Extraktion der Proteine sowie im Anschluss die Durchführung von Western Blot Analysen. Für beide Zelllinien diente der Nachweis des *housekeeping*-Proteins GAPDH als Ladungskontrolle.

Abbildung 15A zeigt nach der Behandlung der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 mit den IAP-Antagonisten in den Konzentrationen 10 µM (LBPS03) und 15 µM (LBPS05) über eine Zeitspanne von 3 Tagen keine visualisierbare Degradation des Zielproteins XIAP auf Höhe von 53 kDa, im Vergleich zu den Kontrollzellen. Als Kontrolle dienten hier Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit dem Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1 % behandelt wurden.

Die Auswertung der Western Blot Analyse zeigte in der Zelllinie PaTu8902 ebenfalls keine quantifizierbare Degradation des Antiapoptoseproteins XIAP nach Behandlung mit den Substanzen, jeweils in einer Konzentration von 25 µM. Hierzu wurden die Zellen über 72 Stunden mit LBPS03 und LBPS05 behandelt, anschließend lysiert und deren Proteine mittels Western Blot analysiert. Der Ablauf der Gelelektrophorese und die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran ist in 2.2.3.3 beschrieben. Die Fluoreszenz der Banden konnte mithilfe des Infrarot-Imager dargestellt werden. Hier zeigte sich im Vergleich zu den PaTu8902-Zellen, die mit DMSO 0,1 % behandelt wurden, keine Degradation von XIAP in den Pankreaskarzinomzellen, die über 3 Tage mit den Substanzen inkubiert wurden (Abb. 15B).

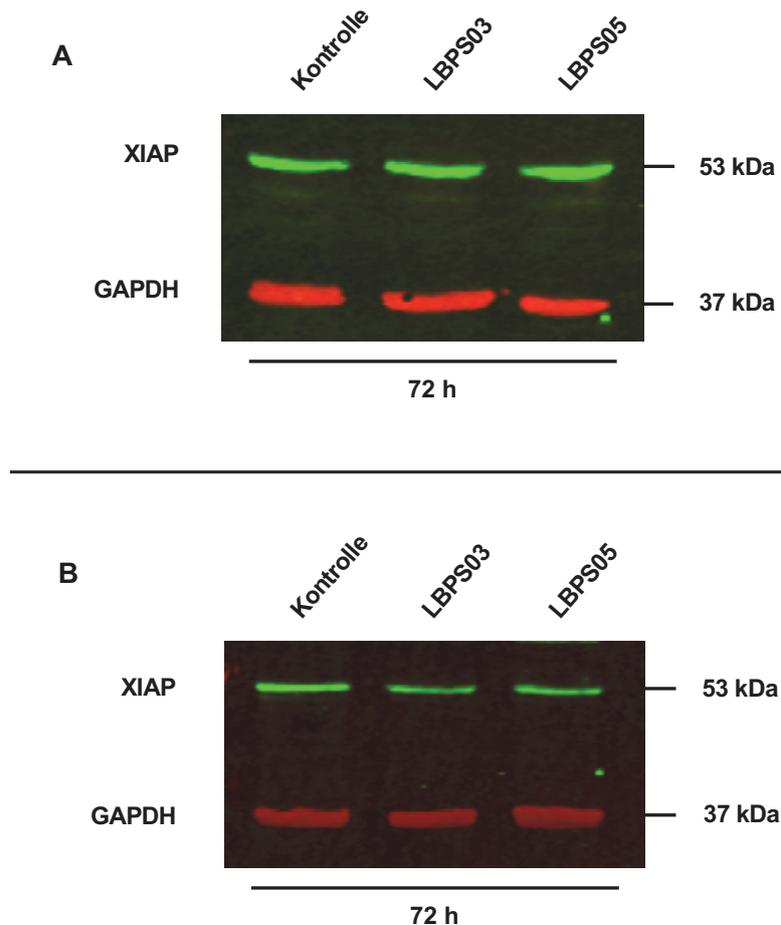


Abb. 15 - Degradation von XIAP in Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05 mittels Western Blot Analysen

A) In einer Dichte von $4,2 \cdot 10^3$ Zellen/cm² wurden die Zellen der Linie HUP-T3 in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² ausgesät und über drei Tage mit den Substanzen LBPS03 in einer Konzentration von 10 µM und LBPS05 von 15 µM unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Analyse der Proteine mittels Western Blot. (n = 2) **B)** Die Pankreaskarzinomzellen der Linie PaTu8902 wurden in einer Dichte von $2,8 \cdot 10^3$ Zellen/cm² in Zellkulturflaschen einer Grundfläche von 25 cm² ausgesät und mit den neuen IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05 jeweils in einer Konzentration von 25 µM über 72 Stunden behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression untersucht. (n = 3).

Für beide Zelllinien dienten Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit dem Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1 % behandelt wurden, als Kontrollzellen. In beiden Versuchen wurden 50 µg Proteinextrakt auf eine 12 %-ige SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Analyse der Proteinexpression wurde am Infrarot-Imager ausgewertet. Als Ladungskontrolle diente jeweils der Nachweis von GAPDH auf Höhe von 37 kDa.

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass cIAP2 in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902, verglichen mit der Zelllinie HUP-T3, eine leicht erhöhte Basalexpression aufweist. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich eine Inkubation mit den IAP-Antagonisten auf das Expressionslevel dieses Proteins auswirkt. Hierzu wurden die Zellen über 72 Stunden mit jeweils 25 µM LBPS03 und LBPS05, unter Standardbedingungen, inkubiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und es wurden 50 µg Proteinextrakt auf eine 12 %-ige SDS-PAGE aufgetragen. Die Ergebnisse des anschließenden Western Blot wurden am Infrarot-Imager ausgewertet.

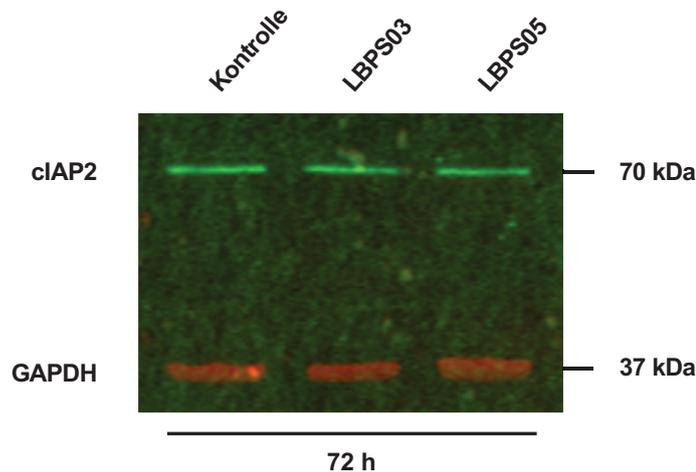


Abb. 16 - Western Blot Analyse als Untersuchung zur Degradation von cIAP2 in der Pankreas-karzinomzelllinie PaTu8902

In einer Dichte von $2,8 \cdot 10^3$ Zellen/cm² wurden die Zellen der Linie PaTu8902 in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 25 cm² ausgesät und nach einer 24 stündigen Vorinkubation in FCS-reichem Kulturmedium über drei Tage mit den Substanzen LBPS03 und LBPS05 in jeweils 25 µM, unter Standardbedingungen, inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Lyse der Zellen sowie die Extraktion der Proteine. (n = 2). Als Kontrollzellen dienten Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit dem Lösungsmittel DMSO in einer Konzentration von 0,1 % behandelt wurden. Es wurden 50 µg Proteinextrakt auf eine 12 %-ige SDS-PAGE aufgetragen und ein Western Blot durchgeführt. Die Proteindetektion und die Auswertung erfolgten am Infrarot-Imager. Als Ladungskontrolle diente jeweils der Nachweis von GAPDH bei 37 kDa.

In Abbildung 16 ist dargestellt, dass nach dreitägiger Behandlung mit den IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05 in je 25 µM in den behandelten Proben ein gleich starkes Fluoreszenzsignal des zellulären IAP2 auf Höhe von 70 kDa detektiert wurde, wie in den Kontrollzellen. Die Ladungskontrolle mit GAPDH zeigte eine gleichmäßige Auftragung der Proteine.

3.7 Wirkung potentieller Kombinationspartner auf die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902

3.7.1 Untersuchungen des Einflusses von Zytostatika auf die Zelllinie HUP-T3

Im Rahmen der chemotherapeutischen Behandlung des Pankreaskarzinoms werden häufig die beiden Zytostatika Etoposid und Gemcitabin eingesetzt. Im Hinblick auf die potentielle Kombinationsmöglichkeit mit den neu entwickelten Substanzen, wurde die Wirkung der beiden Zytostatika auf die Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 untersucht. Hierzu wurden die Zellen über 72 Stunden mit Etoposid in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels DRAQ5™-Verfahren. Hier zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 1 µM eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens auf $85,0 \pm 6,3$ % in Relation zu den Kontrollzellen. Mit

zunehmender Konzentration verstärkte sich die antiproliferative Wirkung auf die Pankreaskarzinomzellen bis zu einer Verminderung der Zellzahl um $89,8 \pm 0,5$ % bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$.

Für die Evaluation der Wirkung des Zytostatikums Gemcitabin auf die Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 wurden die Zellen ausgesät und ebenfalls über 72 Stunden mit aufsteigender Konzentration der Substanz behandelt. Die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DRAQ5™ diente nach Abschluss der Inkubationszeit als Auswertung des relativen Zellüberlebens. Behandelt mit einer Konzentration von einem Nanomolar des Zytostatikums Gemcitabin, war nach drei Tagen Inkubationsdauer kein signifikanter Rückgang des Proliferationsverhalten der Zellen zu detektieren. Bei 5 nM konnte eine deutliche Abnahme der Zellproliferation auf einen Wert von $44,6 \pm 6,1$ % verzeichnet werden ($p < 0,0001$). Ab einer Konzentration von 10 nM bis zu einem Maximum von 50 nM veränderte sich das Proliferationslevel der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 nicht mehr merklich. Um $71,0 \pm 1,0$ % reduziert sich das Zellüberleben bei 10 nM und bei 50 nM liegt das Zellsterben mit $68,7 \pm 1,4$ % geringfügig niedriger (Abb. 17).

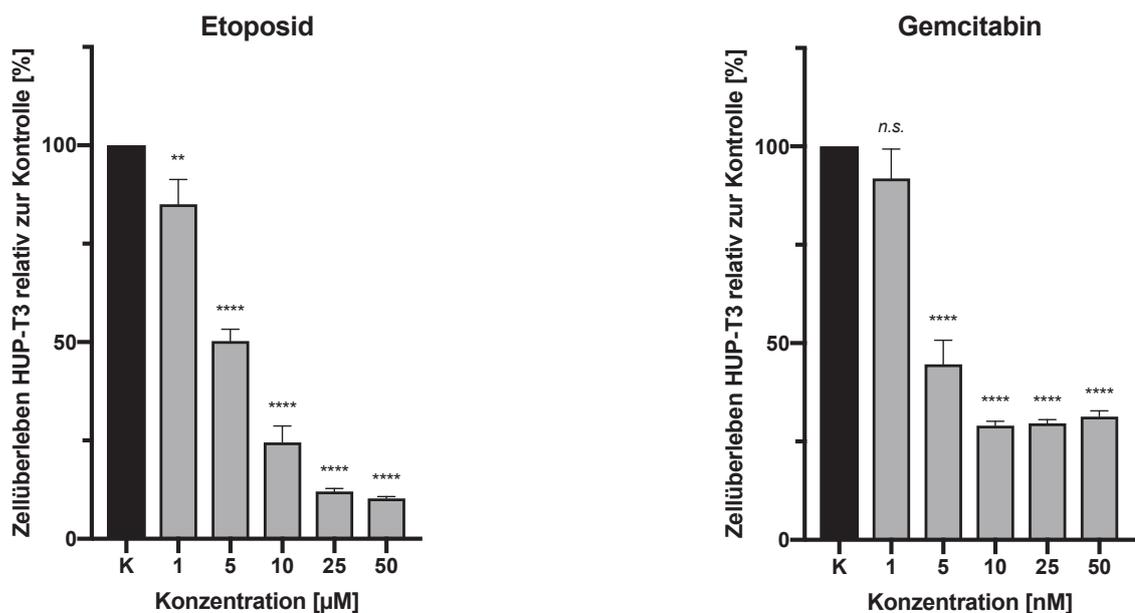


Abb. 17 - Wirkung der Zytostatika Etoposid und Gemcitabin auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie HUP-T3

Zellen der Linie HUP-T3 wurden auf 96-Well-Platten ausgesät und über einen Zeitraum von 72 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen Etoposid und Gemcitabin inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit DRAQ5™ und Auswertung des Proliferationsversuches am Infrarot-Imager. Als Kontrolle dienten jeweils Zellen, die über dieselbe Zeitspanne mit dem Lösungsmittel der Chemotherapeutika DMSO in einer Konzentration von 0,1 % inkubiert und zu denen die behandelten Pankreaskarzinomzellen anschließend in Relation gesetzt wurden. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. K = Kontrolle, n.s. = nicht signifikant, ** = $p < 0,003$, **** = $p < 0,0001$.

3.7.2 Wirkung des *small molecule* YM155 auf die Pankreas-karzinomzelllinie HUP-T3

Teil dieser Arbeit war es, mögliche Kombinationspartner für die neu entwickelten Substanzen zu finden und bei bekannter Überexpression der IAPs in Pankreaskarzinomzellen, stellte der Survivin-Inhibitor YM155 einen vielversprechenden Partner dar. Zunächst wurde die alleinige Wirkung auf die Zellen der Linie HUP-T3 untersucht. Hierzu wurden die Zellen auf einer 96-Well-Platte ausgesät und über einen Zeitraum von 48 Stunden mit dem Inhibitor in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Anschliessend erfolgte die Detektion des Fluoreszenzsignals mittels Infrarot-Imager.

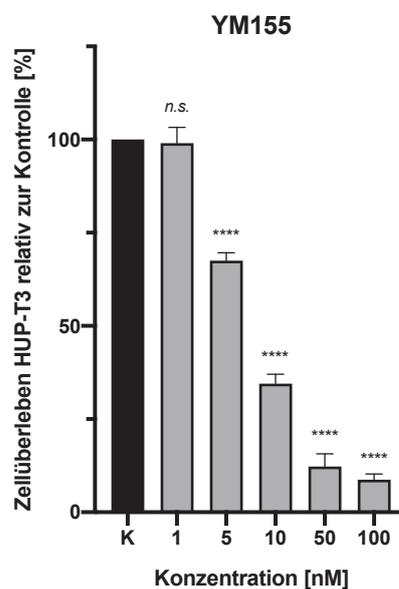


Abb. 18 - Einfluss des *small molecule* YM155 auf die Proliferation der Zelllinie HUP-T3

Es wurden Pankreaskarzinomzellen der Linie HUP-T3 mit der Substanz YM155 in aufsteigender Konzentrationen über einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Auswertung mittels DRAQ5™-Verfahren sowie am Infrarot-Imager. Als Kontrollen wurden mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) behandelte Zellen verwendet und zu diesen die behandelten Pankreaskarzinomzellen in Relation gesetzt. Der Versuch wurde unabhängig voneinander mindestens dreimal durchgeführt. K = Kontrolle, n.s. = nicht signifikant, **** = $p < 0,0001$.

In Abbildung 18 ist der Einfluss des Survivin-Inhibitor YM155 auf das Proliferationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 als Balkendiagramm dargestellt. Zu sehen ist eine signifikante Reduktion der Zellzahl um $32,5 \pm 2,1$ % bei einer Konzentration von 5 nM und einer Inkubationsdauer von zwei Tagen. Wird die Konzentration doppelt so hoch eingesetzt (10 nM), reduziert sich das Zellüberleben um weitere 33 % und liegt somit bei $34,5 \pm 2,5$ %. Die Behandlung mit 50 nM und 100 nM des Survivin-Inhibitors führt nach 48 Stunden zu einer stark signifikanten Abnahme des Zellüberlebens der Pankreaskarzinomzellen auf Werte von $12,3 \pm 3,4$ % bzw.

$8,8 \pm 1,5 \%$ ($p < 0,0001$). Bei 1 nM liegt die Proliferation der Zellen mit $99,0 \pm 4,2 \%$ vergleichsweise gleich zur Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde.

3.7.3 Auswirkungen auf die Proliferation der Zelllinie HUP-T3 durch die Behandlung mit Zytokinen

Durch erhöhte Level der *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) in Tumorzellen ist die Induktion des natürlichen Zelltodes gestört und genau hier sollen die neu entwickelten Substanzen ansetzen. Die Behandlung mit LBPS03 und LBPS05 könnte die Resensibilisierung für unterschiedliche Zytokine wiederherstellen und somit die Initiierung der Apoptose ermöglichen. Hierzu wurden die Pankreas-karzinomzellen HUP-T3 über 48 beziehungsweise 72 Stunden mit verschiedenen Zytokinen in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt, um anschließend mittels DRAQ5™-Auswertung die Lebendzellzahl in Relation zur Kontrolle zu bestimmen.

Die Behandlung der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 mit TRAIL, über einen Zeitraum von zwei Tagen, zeigte bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml keine signifikante Reduktion des Zellüberlebens, in Relation zu den Kontrollzellen. Hingegen bei 1 ng/ml nimmt die Proliferationsrate der Zellen signifikant um $64,0 \pm 6,0 \%$ ab. Unter Einfluss von 5 ng/ml des Zytokins TRAIL lag das relative Zellüberleben bei $7,7 \pm 1,5 \%$ in Relation zur Kontrolle (Abb. 19A). Wurden die Pankreaskarzinomzellen über 72 Stunden mit 1 ng/ml des Apoptose-induzierenden Zytokins behandelt, reduzierte sich die Proliferation um weitere 7,5 % auf ein relatives Zellüberleben von $28,5 \pm 9,3 \%$. Die Inkubation mit der 10-fachen und 50-fachen Konzentration von TRAIL, über eine Zeitspanne von drei Tagen, zeigte eine Abnahme der Zellzahl um $91,3 \pm 1,0 \%$ bzw. $93,0 \pm 1,4 \%$ im Vergleich zu der Kontrollbehandlung (Abb. 19D).

Abbildung 19B stellt die Wirkung des Todesrezeptorliganden TNF α nach 48 Stunden Inkubation auf die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 dar. Hier wurde mit einer Reduktion um $36,4 \pm 2,8 \%$ die stärkste Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 25 ng/ml detektiert. Bei jeweils 10 ng/ml und 50 ng/ml liegen die Proliferationsraten etwas höher, $69,1 \pm 5,6 \%$ der Zellen überleben bei 10 ng/ml und $64,1 \pm 4,9 \%$ sind unter Behandlung mit einer Konzentration von 50 ng/ml noch vital.

Ein weiteres Apoptose-induzierendes Zytokin ist der Fas-Ligand, das über einen Behandlungszeitraum von 72 Stunden auf Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 inkubierte. Beginnend mit einer Konzentration von 1 ng/ml bis zu einer Konzentration von 50 ng/ml wurde die Zellproliferation in Relation zur Kontrolle ermittelt. Die Behandlung mit der niedrigsten Dosierung des Fas-Ligand zeigte eine signifikante Reduktion des Zellüberlebens um $25,0 \pm 5,0 \%$. Mit aufsteigender Konzentration reduzierte sich die Proliferationsrate bis zu einem Minimum von $9,0 \pm 1,8 \%$ vitalen Zellen nach der Behandlung mit 50 ng/ml des Todesliganden. (Abb. 19C).

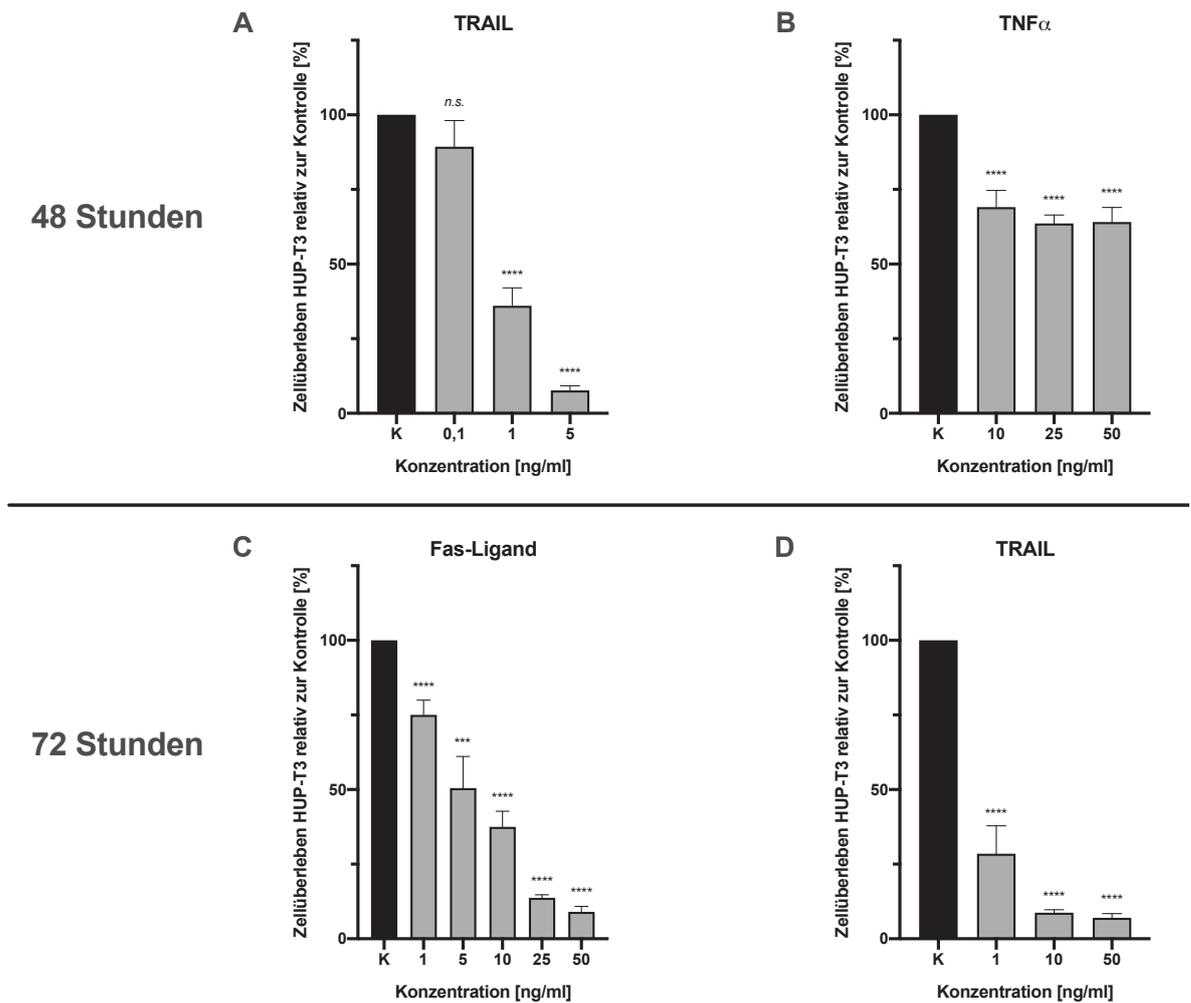


Abb. 19 - Proliferationsanalysen der Zelllinie HUP-T3 nach Behandlung mit Zytokinen über 48 bzw. 72 Stunden

A und B) Für einen Behandlungszeitraum von 48 Stunden wurden die Zellen mit den Zytokinen TRAIL und TNFα in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Als Kontrollzellen dienten bei der Inkubation mit TRAIL Zellen, die über den gleichen Zeitraum mit *Storage Buffer* in einer Konzentration von 0,1 % inkubierten. Bei der Behandlung mit TNFα diente als Lösungsmittelkontrolle die Inkubation der Pankreaskarzinomzellen mit PBS (0,1 %) über zwei Tage. **C und D)** Die Zellen der Linie HUP-T3 wurden mit dem Fas-Ligand und TRAIL in aufsteigenden Konzentrationen behandelt. Als Lösungsmittelkontrollen dienten jeweils Zellen, die mit *Storage Buffer* (TRAIL) oder PBS (Fas-Ligand) in einer Konzentration von 0,1 % behandelt wurden. Alle Proliferationsversuche sind nach Ablauf der Inkubationszeit mittels DRAQ5™-Verfahren und am Infrarot-Imager ausgewertet worden. Die Analysen wurden unabhängig voneinander mindestens dreimal durchgeführt. K = Kontrolle, n.s. = nicht signifikant, *** = p = 0,0004, **** = p < 0,0001.

3.7.4 Wirkung von Etoposid und Gemcitabin auf die Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902

Um die Wirkung der beiden Zytostatika auf die Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 zu untersuchen, wurden die Versuche zum Zellüberleben über einen Behandlungszeitraum von 72 Stunden durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit Etoposid sowie Gemcitabin in aufsteigenden Konzentrationen behandelt. Als Kontrollen dienten Zellen der Linie PaTu8902, die über selbige

Zeitspanne mit dem Lösungsmittel der Zytostatika DMSO in einer Konzentration von 0,1 % behandelt wurden. Nach einer dreitägigen Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte die Auswertung mittels Fluoreszenzdetektion von DRAQ5™ am Infrarot-Imager.

Die Auswertungen der Proliferationsanalysen zeigten eine starke Abnahme der Zellzahl auf $60,0 \pm 2,0$ % bei einer Behandlung mit Etoposid in der niedrigsten Konzentration (1 μM). Mit zunehmender Konzentration des Zytostatikums halbierten sich die Zellpopulationen nahezu und erreichten bei 50 μM eine maximale Reduktion um $92,7 \pm 0,5$ % (Abb. 20).

Die Wirkung des Nukleosid-Analogons Gemcitabin trat in Konzentrationen im nanomolaren Bereich ein und zeigte somit eine 1:1.000 stärkere Wirkung als Etoposid. Der Einsatz von 1 nM Gemcitabin über 72 Stunden zeigte eine signifikante Abnahme der Lebendzellzahl auf $79,0 \pm 11,4$ % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die fünffache Konzentration des Chemotherapeutikums bewirkte eine stark signifikante Reduktion der Proliferation um $59,2 \pm 2,2$ % und konzentrationsabhängig war eine weitere Verringerung der Lebendzellzahl bis zu $19,3 \pm 2,5$ % bei 50 nM zu detektieren (Abb. 20).

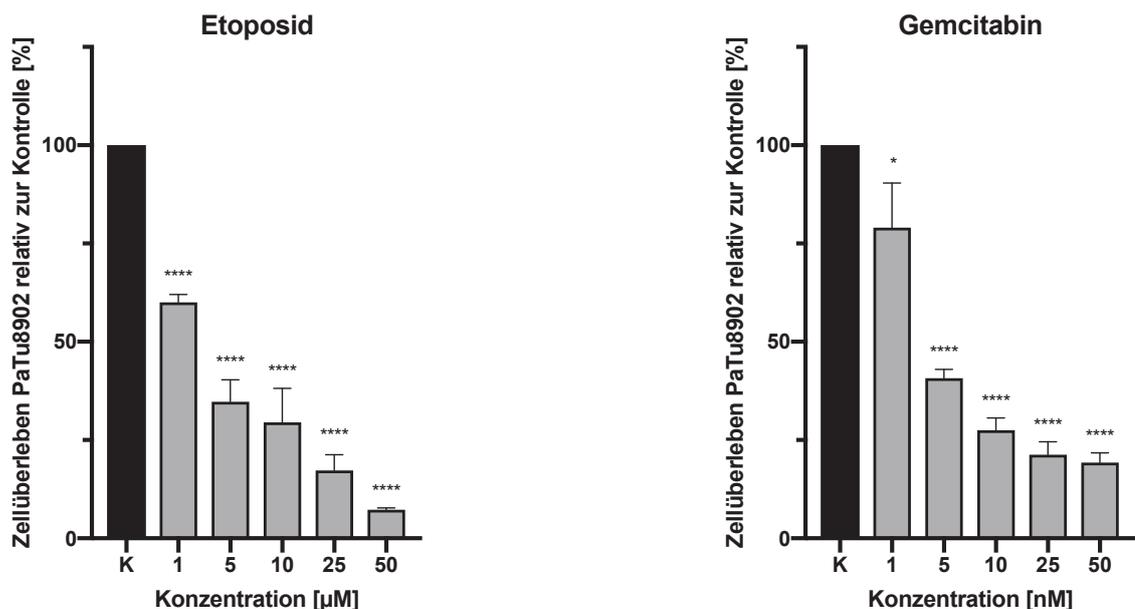


Abb. 20 - Wirkung der Zytostatika auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902

Zellen der Linie PaTu8902 wurden mit Etoposid und Gemcitabin in unterschiedlichen Konzentrationen über 72 Stunden unter Standardbedingungen behandelt. Es folgte im Anschluss die Analyse der Zellzahl in Relation zu den, mit 0,1 % DMSO inkubierten, Kontrollzellen. K = Kontrolle, * = $p < 0,05$, **** = $p < 0,0001$. Die Versuche wurden jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

3.7.5 Einfluss des Survivin-Inhibitors YM155 auf die Proliferation der PaTu8902-Zellen

Im Hinblick auf Hinweise einer Überexpression der *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) in Pankreaskarzinomzellen, zu denen auch das Protein Survivin gezählt wird, wurde der Einfluss des Survivin-Inhibitors YM155 auf die Proliferation der PaTu8902-Zellen zunächst ohne Kombination mit den neu entwickelten Substanzen untersucht. Hierzu wurden die Pankreaskarzinomzellen mit dem *small molecule* YM155, in aufsteigenden Konzentrationen, über 48 Stunden behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein DRAQ5™ Assay durchgeführt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte mithilfe des Infrarot-Imager.

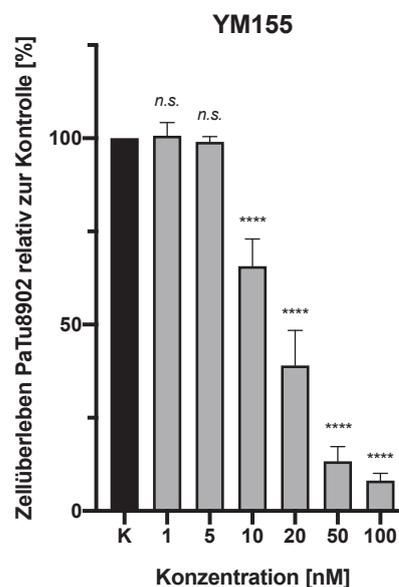


Abb. 21 - Proliferationsanalysen der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 nach Behandlung mit dem Survivin-Inhibitor YM155

Pankreaskarzinomzellen der Linie PaTu8902 wurden über einen Zeitraum von 2 Tagen mit dem *small molecule* YM155 in aufsteigenden Konzentrationen unter Standardbedingungen inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die ebenfalls über 48 Stunden mit dem Lösungsmittel DMSO in 0,1 % behandelt und zu denen die mit YM155 behandelten Zellen in Relation gesetzt wurden. Die Auswertung erfolgte mittels DRAQ5™ und dem Infrarot-Imager. K = Kontrolle, n.s. = nicht signifikant, **** = $p < 0,0001$. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass unter der Behandlung mit niedrigen Konzentrationen des Survivin-Inhibitors die Proliferationsraten der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 nahezu der Proliferationsrate der Kontrollzellen entsprechen. Die Inkubation mit 10 nM YM155 über 48 Stunden zeigte einen stark signifikanten Einfluss auf das Zellüberleben. Hier konnte eine Proliferationsrate von $65,7 \pm 7,3$ % verzeichnet werden. Mit zunehmender Konzentration des *small molecules* wurde eine konstante Abnahme der Lebendzellzahl auf bis zu $8,2 \pm 1,9$ % bei 100 nM in Relation zur Kontrolle beobachtet (Abb. 21).

3.7.6 Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der Pankreas- karzinomzelllinie PaTu8902 nach Behandlung mit Zytokinen

Die Behandlung mit spezifischen Zytokinen, sogenannten Todesrezeptorliganden, induziert in Tumorzellen effektiv Apoptose und soll in späteren Versuchen, in Kombination mit den neuen IAP-Antagonisten, untersucht werden. Zu Beginn wurde jedoch das Proliferationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 nach alleiniger Inkubation mit den drei verschiedenen Todesrezeptorliganden getestet. Für die unterschiedlichen Behandlungszeiträume wurden die Zellen in ihrer definierten Zelldichte ausgesät und mit den Zytokinen in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert. In Relation zu den Kontrollzellen, die mit dem jeweiligen Lösungsmittel in 0,1 % über die gleiche Dauer behandelt wurden, wurden die PaTu8902-Zellen gesetzt, die mit den Todesrezeptorliganden behandelt wurden. Die Auswertung erfolgte über die Detektion des Fluoreszenzsignals des Infrarot-Farbstoffes DRAQ5™ mittels Infrarot-Imager.

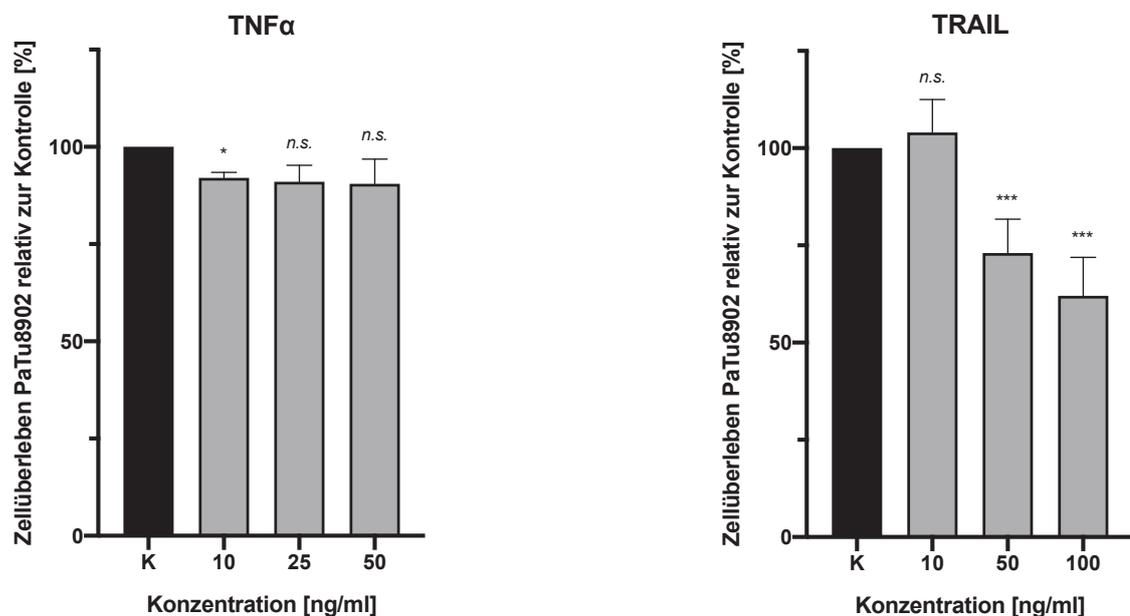


Abb. 22 - Behandlung der Pankreaskarzinomzellen über 48 Stunden mit den Todesrezeptorliganden TNF α und TRAIL

Zellen der Linie PaTu8902 wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Zytokine unter Standardbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DRAQ5™ behandelt und anschließend am Infrarot-Imager das Fluoreszenzsignal zu detektieren. Die behandelten Zellen wurden zu den Kontrollzellen in Relation gesetzt ($n \geq 2$). K = Kontrolle, n.s. = nicht signifikante Änderung der Lebendzellzahl, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$.

In Abbildung 22 zeigte sich, dass nach der Behandlung mit dem Todesrezeptorliganden TNF α über einen Zeitraum von 48 Stunden und in Konzentrationen von 10 bis 50 ng/ml lediglich eine leichte Abnahme der Zellzahl um maximal $9,7 \pm 6,0$ % zu verzeichnen war. Unter der Inkubation mit 50 ng/ml TRAIL über einen Zeitraum von zwei Tagen sank das Proliferationsniveau der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 signifikant auf $73,0 \pm 8,8$ %, im Vergleich zur Kontrolle. Bei

einem Fünftel der Konzentration (10 ng/ml) konnte kein Einfluss des Zytokins auf das Zellüberleben detektiert werden, hingegen bei 100 ng/ml eine verstärkte Reduktion der vitalen Zellen um $38,0 \pm 9,9 \%$.

Wurden die Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 über 72 Stunden mit Apoptose-Induktor $\text{TNF}\alpha$ behandelt, konnte bei einer Konzentration von 25 ng/ml eine Reduktion des Zellüberlebens um $18,5 \pm 2,4 \%$ detektiert werden. Bei 10 ng/ml lag die Proliferationsrate der Zellen bei $89,3 \pm 3,1 \%$ in Relation zu den PBS behandelten Kontrollzellen und mit dem Einfluss von 50 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ auf die Pankreaskarzinomzellen verringert sich die Zellzahl um weitere 3,8 %, im Vergleich zur niedrigsten Konzentration (Abb. 23).

Die Wirkung von 10 ng/ml TRAIL zeigte auch nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden keine signifikante Abnahme des Zellüberlebens von PaTu8902, verglichen mit den Kontrollzellen. Wurde der Todesrezeptorligand in einer fünffachen Konzentration mit den Pankreaskarzinomzellen inkubiert, konnte eine signifikante Reduktion der Zellzahl um $35,5 \pm 7,9 \%$ gemessen werden. Eine Inkubation der Zellen mit 100 ng/ml des Zytokins über einen Zeitraum von drei Tagen zeigte, dass ungefähr die Hälfte des Proliferationsniveaus der Kontrollzellen erreicht wurde und lag somit bei $51,3 \pm 7,6 \%$.

Ein Einfluss des Fas-Liganden auf die Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 war nach dreitägiger Inkubation in den Konzentrationen von 1 bis 10 ng/ml nur minimal zu verzeichnen. Das Zellüberleben beim Einsatz von 25 ng/ml des Todesrezeptorliganden lag in Relation zu den mit PBS behandelten Kontrollzellen bei $87,3 \pm 7,6 \%$ und die Behandlung mit der doppelten Konzentration (50 ng/ml) des Fas-Liganden über 72 Stunden führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl um $24,7 \pm 9,0 \%$ (Abb. 23).

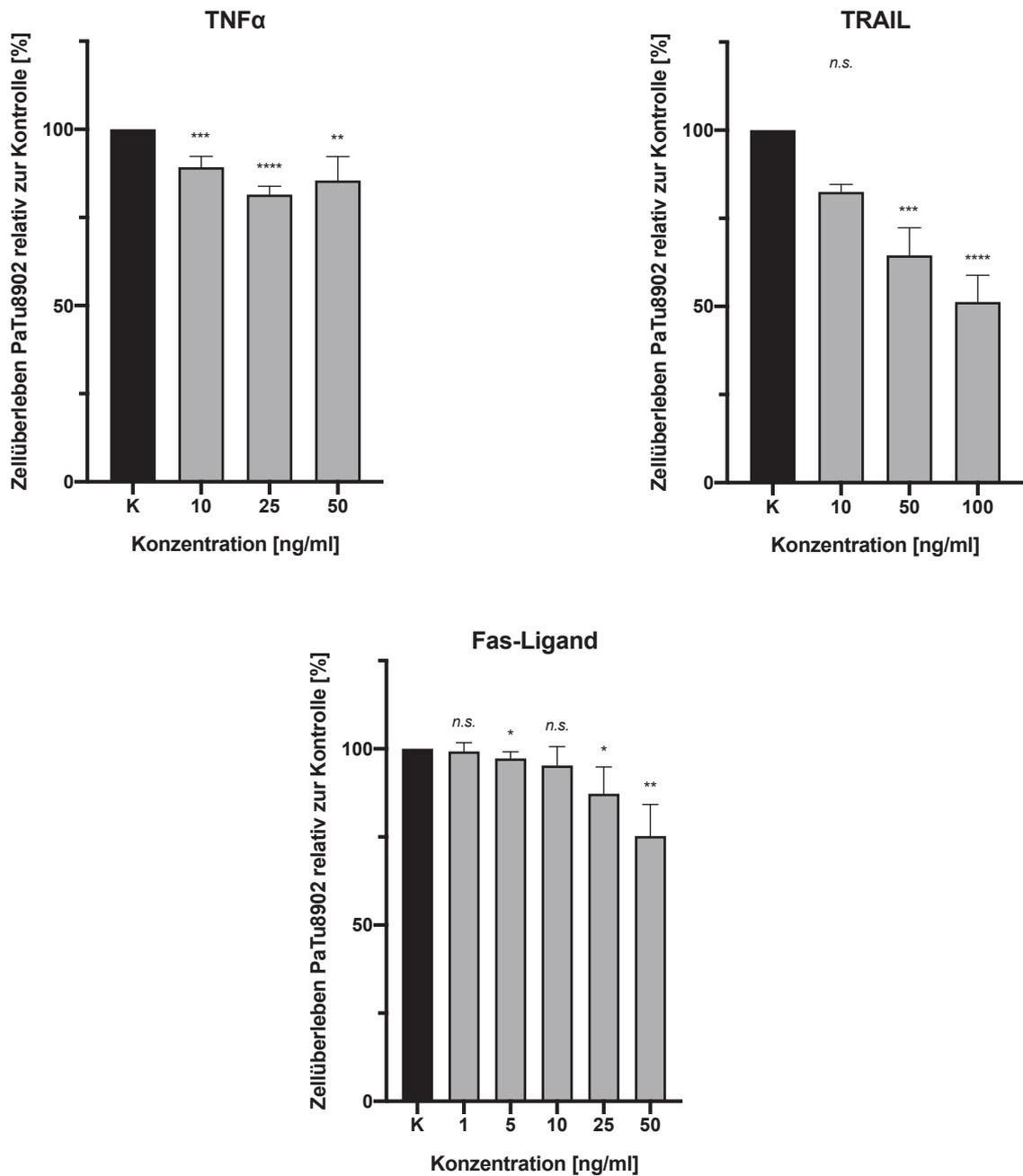


Abb. 23 - Einfluss der Zytokine TNF α , TRAIL und Fas-Ligand auf das Zellüberleben der Linie PaTu8902 nach 3 Tagen Inkubation

Die Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 wurden für die Behandlungsdauer von 72 Stunden mit den Todesrezeptorliganden in unterschiedlichen Konzentrationen unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zugabe von 0,1 % *Storage Buffer* zum FCS-reduziertem Medium diente bei der Behandlung mit TRAIL als Lösungsmittelkontrolle. TNF α und Fas-Ligand wurden jeweils in PBS gelöst und somit stellten PaTu8902-Zellen, die über 3 Tage mit 0,1 % PBS inkubiert haben, hier die Lösungsmittelkontrollen dar. Die Zellproliferation wurde relativ zur definierten Lösungsmittelkontrolle bestimmt und mittels DRAQ5™-Verfahren am Infrarot-Imager gemessen. Die Versuche wurden jeweils mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Ko = Kontrolle, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

3.8 Einfluss der IAP-Antagonisten in Kombinationsbehandlungen auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen

Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902, unter der Behandlung mit den neu entwickelten Substanzen LBPS03 und LBPS05 in Kombination mit gängigen Zytostatika, dem Survivin-Inhibitor YM155 oder unterschiedlichen Todesrezeptorliganden, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

3.8.1 Wirkung der kombinatorischen Anwendung von Zytostatika, YM155 mit LBPS03 und LBPS05 auf die Zelllinie HUP-T3

Hierzu wurden in Vorversuchen, deren Ergebnisse in 3.7 dargestellt sind, die Konzentrationen von Etoposid, Gemcitabin und dem Survivin-Inhibitor YM155 ermittelt, die in folgenden Versuchen zur Behandlung, in Kombination mit den IAP-Antagonisten, dienten. Für die Behandlungszeiträume von 48 bzw. 72 Stunden wurden die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 mit den Substanzen LBPS03 und LBPS05 in 10 μM und 15 μM behandelt, wohingegen das Zytostatikum Gemcitabin und der Survivin-Inhibitor YM155 jeweils in 8 nM eingesetzt wurden sowie Etoposid in einer Konzentration von 2,5 μM . Mittels DRAQ5TM-Färbung und Detektion des Fluoreszenzsignals am Infrarot-Imager konnte die Proliferationsrate nach entsprechender Inkubationszeit ermittelt werden.

Wurden die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 über 72 Stunden mit 10 μM LBPS03 und dem Zytostatikum Etoposid in 2,5 μM behandelt, zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die Zellproliferation, verglichen mit der Einzelbehandlung durch LBPS03. Der Einsatz von 15 μM LBPS05 in Kombination mit Etoposid war mit einer Abnahme der Proliferation um $15,0 \pm 8,2 \%$ im Vergleich zur Behandlung alleine mit LBPS05 als signifikant zu verzeichnen ($p = 0,02$) (Abb. 24A).

In Abbildung 24B wurde die alleinige Wirkung des Nukleosid-Analogon Gemcitabin in 8 nM sowie in Verbindung mit den IAP-Antagonisten abgebildet. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellzahl auf $29,5 \pm 2,4 \%$ unter der kombinatorischen Behandlung von LBPS03 und Gemcitabin, verglichen mit der Inkubation allein mit LBPS03. Die Überlebensrate der Zellen HUP-T3 unter 15 μM LBPS05 lag nach drei Tagen bei $70,5 \pm 7,2 \%$, in Relation zu den Kontrollzellen. Zusammen mit dem Nukleosid-Analogon verringerte sich die Überlebensrate um weitere $17,8 \pm 4,3 \%$.

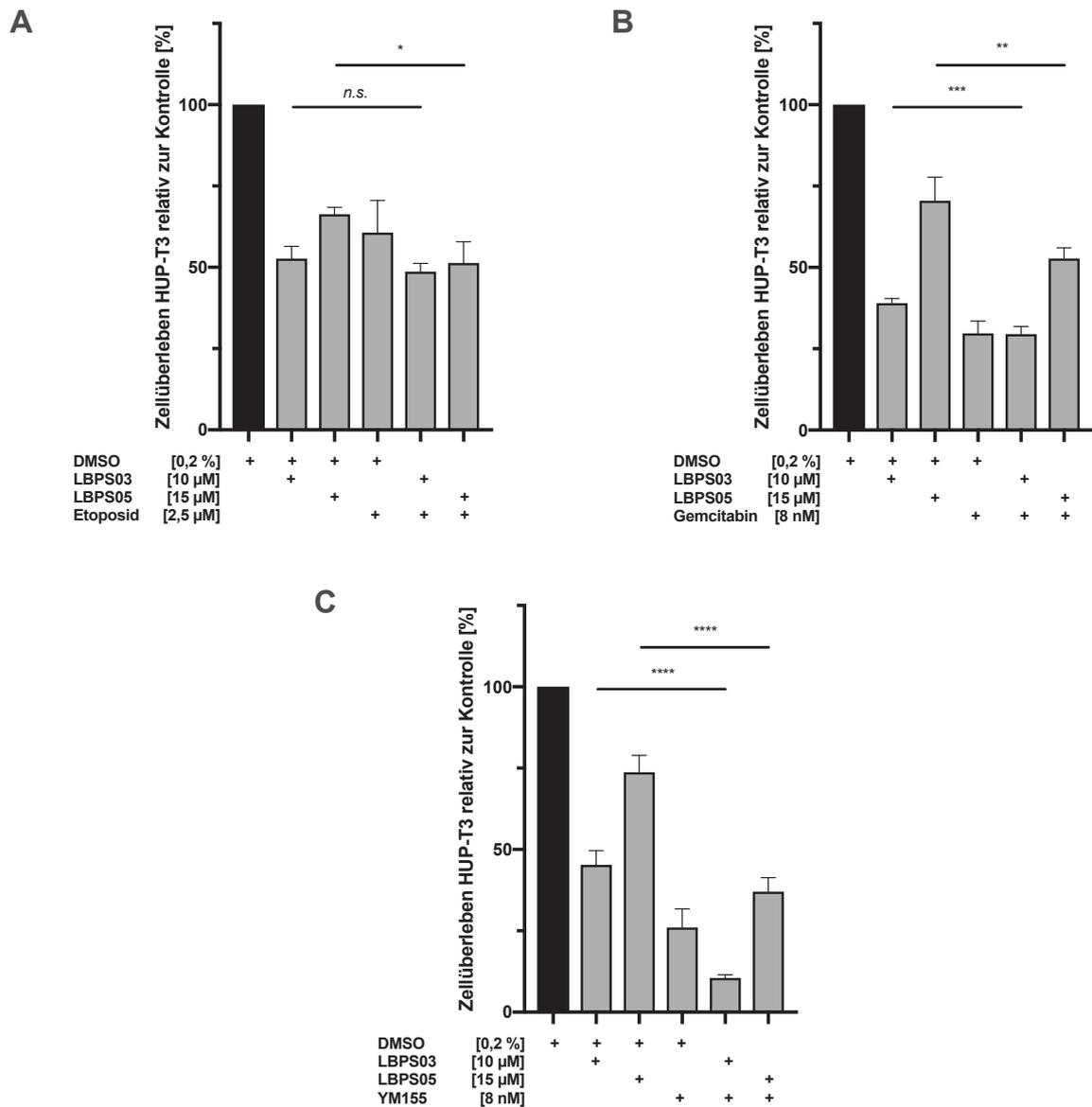


Abb. 24 - Einfluss der Kombinationsbehandlungen auf das Zellüberleben der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3

A und B) Die Kombinationsbehandlung mit Etoposid und Gemcitabin erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen. Die Zellen der Linie HUP-T3 wurden mit den Chemotherapeutika und den IAP-Antagonisten einzeln und jeweils in Kombination inkubiert. Auf der x-Achse ist das Behandlungsschema mit den entsprechenden Konzentrationen aufgeführt. **C)** Für die Inkubation über 48 Stunden wurden die Zellen mit YM155 und den IAP-Antagonisten behandelt. In allen Versuchen dienten HUP-T3-Zellen, die mit dem Lösungsmittel DMSO in 0,2 % über den gleichen Zeitraum inkubierten, als Kontrollen. Den Einzelbehandlungen wurde jeweils ebenfalls zusätzlich 0,1 % DMSO hinzugefügt, so dass in allen Proben die gleichen Voraussetzungen gegeben waren. Kontrolle = schwarzer Balken, * = $p = 0,02$, ** = $p < 0,01$, *** = $p = 0,0005$, **** = $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant. Die Versuche wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Wirkung der Kombinationsbehandlung vom YM155 mit den beiden neuen Substanzen auf das Zellüberleben der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 wiesen jeweils eine starke Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur Einzelbehandlung auf. LBPS03 in einer Konzentration von 10 µM verringerte die Anzahl an vitalen Zellen um $54,8 \pm 4,3$ %, kombiniert mit 8 nM des

Survivin-Inhibitors reduzierte sich die Überlebensrate der HUP-T3-Zellen um weitere 34,8 % auf $10,5 \pm 1,0$ %. Ausgehend von einem Proliferationslevel von $73,8 \pm 5,2$ % durch die Inkubation mit $15 \mu\text{M}$ LBPS05, konnte bei der Zweifach-Behandlung der Zellen mit IAP-Antagonist und YM155 eine signifikante Abnahme um $36,8 \pm 1,8$ % detektiert werden (Abb. 24C).

3.8.2 Einfluss der beiden LBPS-Substanzen in Kombination mit Todesrezeptorliganden auf das Zellüberleben in HUP-T3

Die hier verwendeten Substanzen LBPS03 und LBPS05 wurden so konzipiert, dass sie die *Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)* binden können und auf diesem Weg die Apoptose in Tumorzellen wieder induziert werden kann. Daher wurde der Einfluss der Kombinationsbehandlung von IAP-Antagonisten mit einem der Todesrezeptorliganden auf das Proliferationsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 bestimmt. Die Konzentrationen, in denen die Zytokine eingesetzt wurden, wurden in vorangegangenen Versuchen ermittelt und sind dem Kapitel 3.7 zu entnehmen.

Zunächst wurden die Pankreaskarzinomzellen entsprechend den Inkubationszeiträumen von 48 beziehungsweise 72 Stunden in definierten Zelldichten ausgesät und einzeln mit $10 \mu\text{M}$ LBPS03, $15 \mu\text{M}$ LBPS05 sowie den Zytokinen Fas-Ligand ($2,5 \text{ ng/ml}$) und $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) behandelt. Zusätzlich wurden die Kombinationsbehandlungen aus LBPS und Zytokinen auf die 96-Well-Platten aufgetragen. Anschließend wurden die Zellproliferationen der behandelten Zellen, in Relation zu den Kontrollzellen, mittels Infrarot-Imager ermittelt. Als Kontrollzellen dienten jeweils HUP-T3-Pankreaskarzinomzellen, die mit DMSO und PBS in $0,1$ %-iger Konzentration über die gleichen Behandlungszeiträume inkubiert wurden.

Die Ergebnisse zeigten in der Kombinationsbehandlung von LBPS03 in $10 \mu\text{M}$ mit $2,5 \mu\text{M}$ des Fas-Liganden eine stark signifikante Abnahme der Lebendzellzahl um $74,8 \pm 1,5$ %, im Vergleich zur Kontrollbehandlung nach einer Inkubation von 72 Stunden. Im Gegensatz dazu führte die Einzelbehandlung mit dem IAP-Antagonisten LBPS03, mit einer Verringerung um $52,0 \pm 6,6$ %, zu einer geringeren Reduktion der Proliferation als die Zweifachtherapie. Wurden die Zellen mit $15 \mu\text{M}$ LBPS05 über drei Tage inkubiert, ließ sich eine Abnahme der Zellpopulation auf $59,3 \pm 2,3$ % in Relation zur Kontrolle ermitteln. In Kombination mit dem Todesrezeptorliganden verringerte sich das Zellüberleben signifikant um weitere $23,8 \pm 2,5$ % und lag somit bei $35,5 \pm 9,0$ % (Abb. 25A).

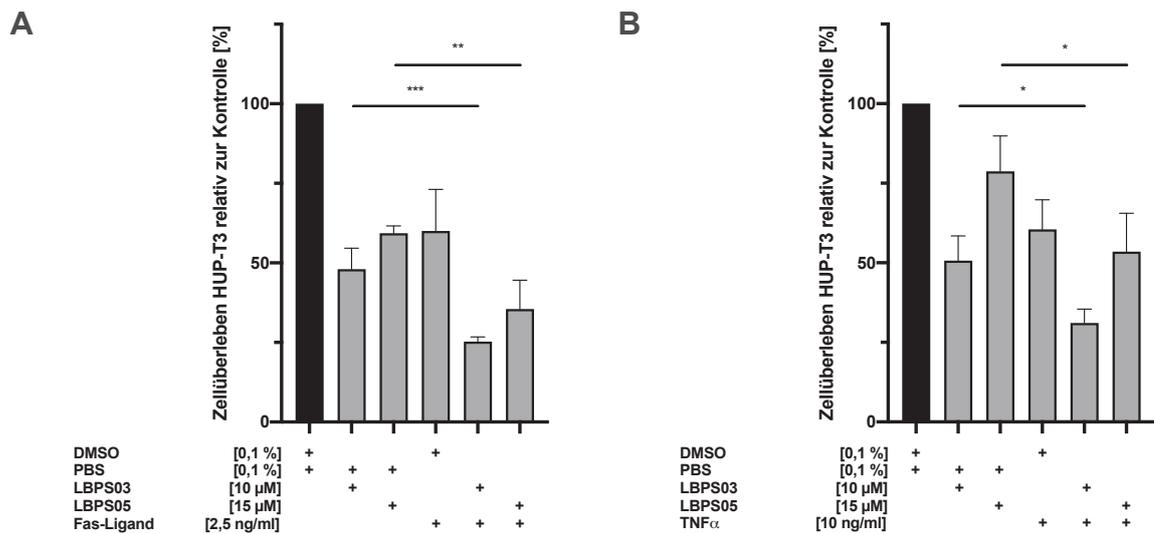


Abb. 25 - Wirkung von LBPS03 und LBPS05 in Kombination mit den Zytokinen Fas-Ligand und TNFα auf die Zellen der Linie HUP-T3

A) Für die Behandlung mit dem Fas-Ligand wurden die Zellen sowohl einzeln mit den IAP-Antagonisten und dem Zytokin als auch in Kombination über 72 Stunden behandelt. Anschließend wurde ein Proliferationsassay mit dem Fluoreszenzfarbstoff DRAQ5™ durchgeführt. Die Ermittlung des Fluoreszenzsignals erfolgte mithilfe des Infrarot-Imager. B) Die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 wurden über zwei Tage mit dem Todesrezeptorliganden TNFα behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde, wie unter A) beschrieben, weiter verfahren. Die Kontrollzellen wurden für beide Versuche mit jeweils 0,1 % der Lösungsmittel DMSO und PBS über die gleichen Behandlungszeiträume behandelt. Um einen genaueren Vergleich zu erhalten, wurden den Proben zusätzlich das fehlende Lösungsmittel DMSO oder PBS in einer Konzentration von 0,1 % zugefügt. Eine detaillierte Zusammensetzung der Proben mit den jeweiligen Konzentrationsangaben ist auf der x-Achse dargestellt. Kontrolle = schwarzer Balken, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. Unabhängig voneinander, wurden die Versuche jeweils dreimal durchgeführt.

Abbildung 25B stellt die Ergebnisse der Proliferationsanalysen nach der Behandlung der Zellen HUP-T3 mit den neu entwickelten Substanzen und dem Todesrezeptorliganden TNFα einzeln und kombiniert, nach einer 48-stündigen Inkubation, dar. Hier wurde durch die Behandlung mit LBPS03 eine Verringerung der vitalen Zellen auf $50,8 \pm 7,7\%$ verzeichnet. Wurde der IAP-Antagonist gemeinsam mit 10 ng/ml TNFα auf die Zellen pipettiert, reduzierte sich das Zellüberleben nochmals um $19,7 \pm 5,2\%$ und erreichte ein Proliferationsniveau von $31,1 \pm 4,5\%$. Die Kombinationsbehandlung von 10 ng/ml Todesrezeptorligand mit 15 μM LBPS05 führte zu einer Abnahme der Zellzahl auf $53,6 \pm 11,9\%$ und war im Vergleich zu der Reduktion durch die Einzelbehandlung mit LBPS05 als signifikant zu erkennen. Der Einsatz von 15 μM des IAP-Antagonisten zeigte ein Zellüberleben von $79,0 \pm 11,0\%$.

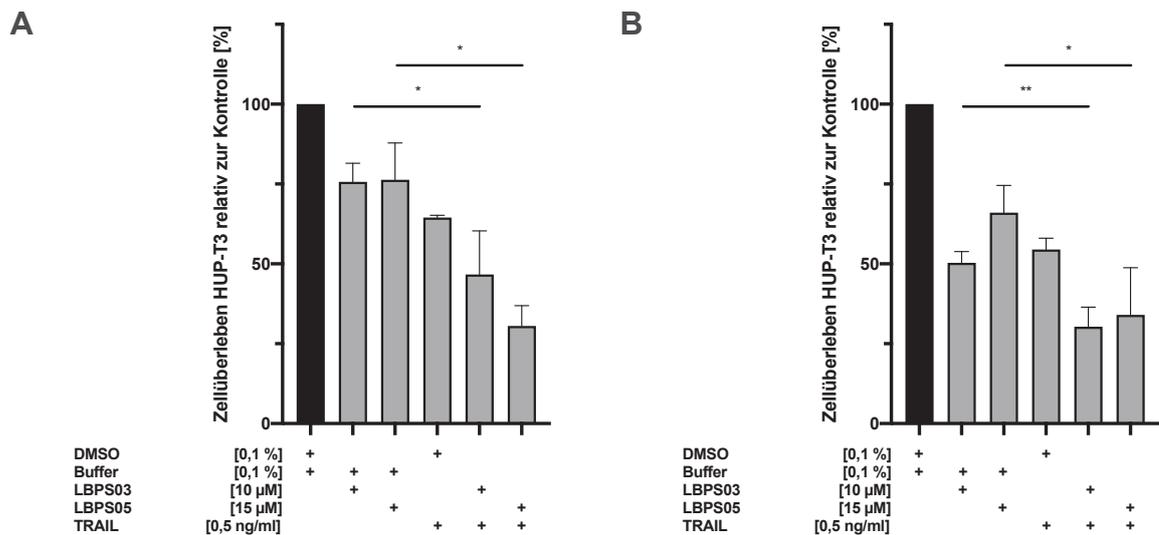


Abb. 26 - Einfluss der Kombinationstherapie von TRAIL mit den IAP-Antagonisten über 48 bzw. 72 Stunden

Die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 wurden mit LBPS03, LBPS05 und TRAIL in FCS-reduziertem Medium über 2 bzw. 3 Tage unter Standardbedingungen. Das Behandlungsschema sowie die ermittelten Konzentrationen sind auf der x-Achse dargestellt. Die Kontrollzellen wurden über die gleichen Zeiträume mit beiden Lösungsmitteln in 0,1 % inkubiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Proben so vorbereitet, dass in jeder 0,1 % DMSO und 0,1 % Buffer enthalten waren. Die Versuche sind mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt worden. Kontrolle = schwarzer Balken, * = $p < 0,05$, ** = $p = 0,008$.

Die Auswertungen der Proliferationsanalysen der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 stellten eine signifikante Reduktion der Zellzahl, verglichen mit den Einzelbehandlungen, unter der Kombinationstherapie von LBPS03 und LBPS05 mit dem Todesrezeptorliganden TRAIL sowohl über 48 Stunden als auch 72 Stunden dar. Während die Inkubation der Zellen mit 10 µM LBPS03 über 2 Tage zu einem Zellüberleben von $75,7 \pm 5,9$ % führte, war bei der kombinierten Behandlung eine signifikante Abnahme um weitere $29,0 \pm 14,7$ % zu verzeichnen. Nach der Inkubation der HUP-T3-Zellen mit 0,5 ng/ml TRAIL und 15 µM LBPS05 über 48 Stunden konnte eine Proliferationsrate von $30,5 \pm 6,4$ % detektiert werden. Im Vergleich hierzu lag das Zellüberleben bei der Behandlung mit LBPS05 alleine bei $76,3 \pm 11,5$ % (Abb. 26 A).

In Abbildung 26B ist der gleiche Versuchsaufbau wie in Abbildung 26A dargestellt, lediglich wurde die Inkubationsdauer um weitere 24 Stunden verlängert. Hier zeigte sich bei 10 µM LBPS03 ein Anteil von $50,3 \pm 3,5$ % vitaler Zellpopulation in Relation zur Kontrolle. Kombiniert mit dem Todesrezeptorliganden, in einer Konzentration von 0,5 ng/ml, sank das Zellüberleben der Pankreaskarzinomzellen um weitere $20,0 \pm 4,4$ %. Die Kombinationsbehandlung von LBPS05 mit TRAIL wies mit $34,0 \pm 14,8$ % ein ähnlich niedriges Proliferationslevel auf, wie die Zweifachtherapie mit LBPS03 und TRAIL. Verglichen mit der Inkubation mit 15 µM des IAP-Antagonisten LBPS05, die zu einer Reduktion der Zellzahl auf $66,0 \pm 8,5$ % führte, ist die Abnahme mittels Kombinationsbehandlung als signifikant zu werten ($p = 0,03$).

3.8.3 Einfluss der IAP-Antagonisten auf die Proliferation der PaTu8902-Zellen in Kombination mit YM155, Etoposid oder Gemcitabin

Die Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 wurden mit den Zytostatika, YM155 und den IAP-Antagonisten behandelt. LBPS03 sowie LBPS05 wurden jeweils in Konzentrationen von 25 μM eingesetzt, um den Einfluss sowohl der Einzelbehandlung als auch in Kombination mit den anderen Substanzen auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen zu ermitteln. Hierfür wurde ein DRAQ5TM Assay durchgeführt und anschließend das Fluoreszenzsignals am Infrarot-Imager detektiert.

Die Ergebnisse der Proliferationsanalysen der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 wiesen nach der kombinatorischen Behandlung der Zellen mit 25 μM LBPS03 und dem Zytostatikum Etoposid in einer Konzentration von 1 μM keine signifikante Reduktion der Zellzahl auf, im Vergleich zu der Inkubation mit LBPS03 allein. Die Inkubation mit dem IAP-Antagonisten LBPS05 führte nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden zu einer Abnahme des Zellüberlebens um $30,5 \pm 0,7 \%$. In Kombination mit 1 μM Etoposid verringerte sich die Zellzahl der Zelllinie PaTu8902 signifikant um weitere $43,5 \pm 3,5 \%$ ($p = 0,005$) und lag bei einem Zellüberleben von $26,0 \pm 4,2 \%$ (Abb. 27A). Wurde das Nukleosid-Analogon Gemcitabin in einer Konzentration von 4 nM über eine Inkubationszeit von 3 Tagen mit jeweils 25 μM LBPS03 oder LBPS05 kombiniert, war in beiden Versuchsreihen eine signifikante Reduktion der Anzahl an vitalen Pankreaskarzinomzellen zu beobachten ($p < 0,05$). Zu einem Zellüberleben von $37,3 \pm 5,6 \%$ führte die Behandlung mit LBPS03 und zusätzlich mit Gemcitabin behandelt, reduzierte sich die PaTu8902-Zellzahl nochmals um $9,8 \pm 5,9 \%$. Nach der Inkubation mit 25 μM LBPS05 und 4 nM Gemcitabin konnte eine Proliferationsrate von $50,8 \pm 10,1 \%$ gemessen werden und war, im Vergleich zur Einzelbehandlung mit dem IAP-Antagonisten LBPS05, um $17,0 \pm 12,1 \%$ signifikant verringert (Abb. 27B).

In Abbildung 27C sind die Auswertungen der Proliferationsanalysen nach der Kombinationstherapie von den neu entwickelten Substanzen mit dem Survivin-Inhibitor YM155 dargestellt. Behandelte man die Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 über 48 Stunden mit 25 μM LBPS03, konnte eine Abnahme des Zellüberlebens um $41,0 \pm 2,6 \%$, im Vergleich zur Kontrollbehandlung beobachtet werden. Kombiniert mit dem *small molecule* YM155 in einer Konzentration von 10 nM, führte dies zu einer höchst signifikanten Reduktion der Lebendzellzahl auf $25,0 \pm 1,7 \%$ ($p < 0,0001$). Ebenso wies die Behandlung von YM155 mit 25 μM LBPS05 eine starke Abnahme des Zellüberlebens um $42,3 \pm 2,1 \%$ auf. Nach der Inkubation mit dem IAP-Antagonisten allein, waren noch $69,7 \pm 5,9 \%$ der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 in Relation zur Kontrolle vital.

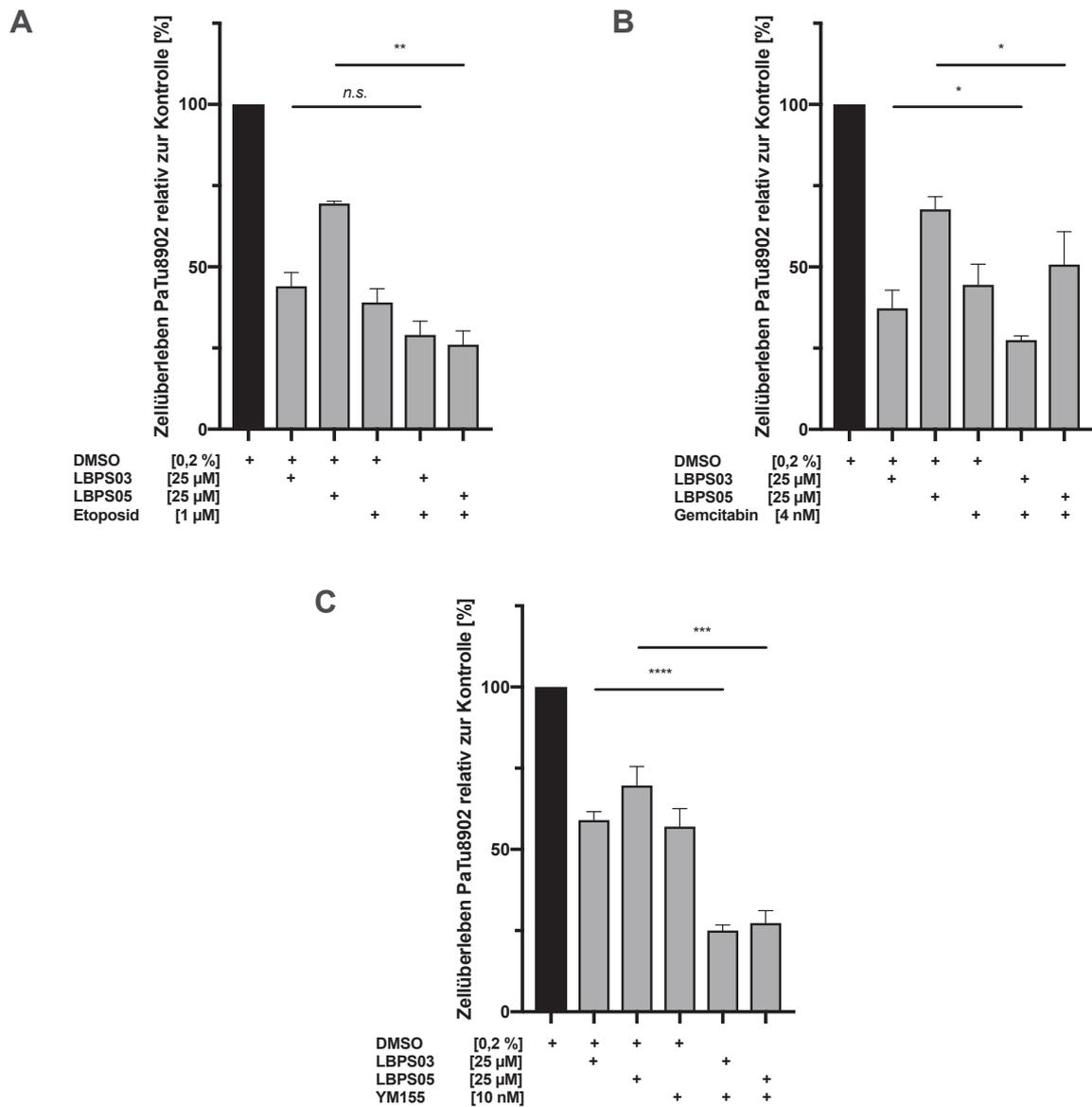


Abb. 27 - Wirkung von LBPS03 und LBPS05 in Kombination mit Zytostatika oder dem Survivin-Inhibitor auf die Proliferation der PaTu8902-Zellen

Die Pankreaskarzinomzellen wurden für die Behandlungszeiträume von zwei bzw. drei Tagen in definierten Zelldichten auf 96-Well-Platten ausgesät und nach einer 24-stündigen Vorinkubation mit den IAP-Antagonisten in Einzel- und Kombinationsbehandlung in FCS-Mangelmedium inkubiert. Auf der x-Achse ist das Behandlungsschema mit den ermittelten Konzentrationen detailliert dargestellt. Als Kontrollbehandlung dienten Zellen, die mit 0,2 % DMSO über selbige Zeiträume behandelt wurden, und zur besseren Vergleichbarkeit wurde jede Probe so vorbereitet, dass sie insgesamt 0,2 % des Lösungsmittels beinhaltet. Kontrolle = schwarzer Balken, * = $p < 0,05$, ** = $p = 0,005$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, n.s. = nicht signifikant. **A**) $n = 2$, **B und C**) $n \geq 3$.

3.8.4 Untersuchungen zum Zellüberleben von PaTu8902 nach Kombinationsbehandlung der IAP-Antagonisten mit TRAIL

Die Voruntersuchungen zeigten, dass relativ hohe Konzentrationen der Todesrezeptorliganden Fas-Ligand und TNF α notwendig waren, um eine Reduktion der Proliferation der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 zu bewirken. Somit wurde für die Versuche zur Kombinationsbehandlung mit Zytokinen ausschließlich der Todesrezeptorligand TRAIL verwendet.

Hierzu wurden die Zellen der Linie PaTu8902 in definierten Zelldichten für die entsprechenden Behandlungszeiträume ausgesät und mit den IAP-Antagonisten sowie TRAIL sowohl einzeln als auch kombiniert behandelt. Im Anschluss wurde mittels DRAQ5TM-Färbung das Fluoreszenzsignal am Infrarot-Imager bestimmt. Als Kontrollzellen dienten PaTu8902-Zellen, die über die gleichen Zeiträume mit den beiden Lösungsmitteln DMSO und *Storage Buffer* in jeweils in 0,1 % inkubiert wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden zusätzlich alle Proben so vorbereitet, dass sie immer 0,1 % DMSO und 0,1 % *Storage Buffer* enthalten haben.

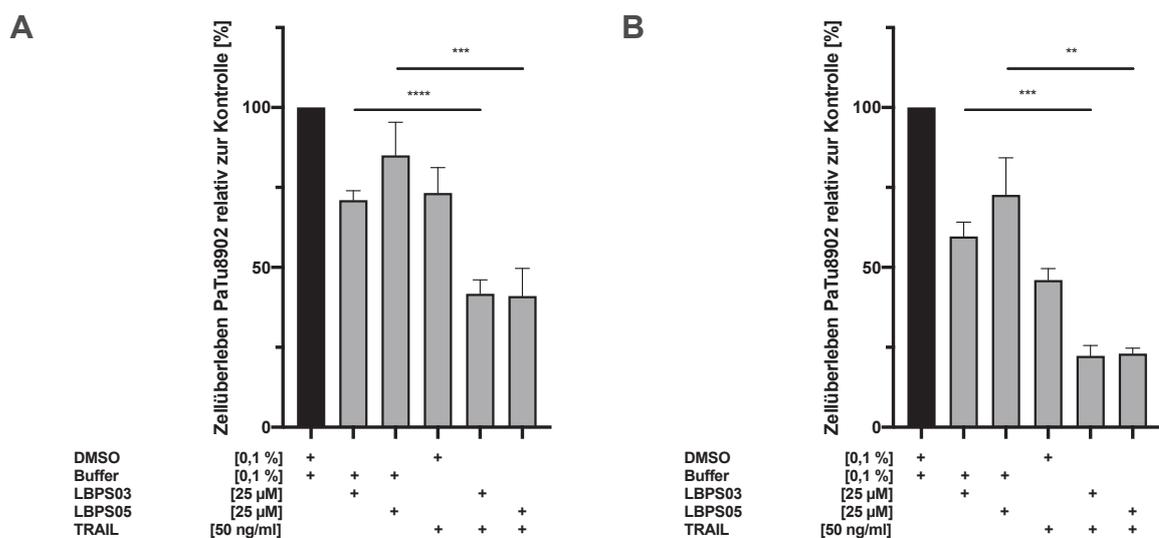


Abb. 28 - Wirkung von LBPS03, LBPS05 und TRAIL auf das Zellüberleben der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 nach 48 und 72 Stunden

A) Die Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 wurden entsprechend dem, auf der x-Achse dargestellten, Behandlungsschema über zwei Tage inkubiert. **B)** Für die Inkubationsdauer von drei Tagen wurden die Zellen, wie oben beschrieben, behandelt. Anschließend erfolgte die Detektion des Fluoreszenzsignals und daraus ermittelt dem Proliferationsverhalten der PaTu890-Zellen am Infrarot-Imager. Die Versuche wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Kontrolle entspricht dem schwarzen Balken, ** = $p = 0,002$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

Sowohl nach zwei als auch nach drei Tagen Kombinationstherapie war eine starke Reduktion der Zellzahlen der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 zu beobachten. Während nach 48 Stunden Einzelbehandlung mit 25 μM LBPS03 eine Abnahme der Proliferation um $29,0 \pm 2,9$ % detektiert werden konnte, sank die Zellzahl unter der Kombinationsbehandlung mit 50 ng/ml TRAIL bis auf

ein Zellüberleben von $41,8 \pm 4,3$ % in Relation zur Kontrolle ($p < 0,0001$). Die Inkubation über zwei Tage mit LBPS05 in einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$, kombiniert mit dem Zytokin TRAIL, bewirkte eine Reduktion der Lebendzellzahl um $59,0 \pm 8,7$ %. Verglichen mit der LBPS05-Einzelbehandlung, die zu einer Abnahme um $15,0 \pm 10,4$ % der vitalen PaTu8902-Zellen führte, war die Änderung durch die Kombinationstherapie stark signifikant ($p < 0,001$).

Wurden die Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 24 Stunden länger mit gleichem Behandlungsschema inkubiert, verringerten sich die Proliferationsraten der Zellen weiterhin. So war nach 72 Stunden unter Kombinationsbehandlung von LBPS03 ($25 \mu\text{M}$) und TRAIL (50 ng/ml) ein Zellüberleben von $22,3 \pm 3,2$ % zu verzeichnen. Die Inkubation mit LBPS03 allein führte zu einem Anteil an vitalen Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 von $59,7 \pm 4,5$ %, relativ zur Kontrollbehandlung. Die Wirkung von $25 \mu\text{M}$ LBPS05 stellte sich mit $72,7 \pm 11,6$ %, im Gegensatz zu LBPS03, etwas geringer dar. Inkubierten die Zellen jedoch mit dem IAP-Antagonist, kombiniert mit 50 ng/ml des Todesrezeptorliganden TRAIL, konnte eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate um $77,0 \pm 1,7$ % ermittelt werden ($p = 0,002$) (Abb. 28).

4 Diskussion

Das Pankreaskarzinom stellt noch heute eine der Krebserkrankungen mit einer der schlechtesten Prognosen dar. Zum einen werden die malignen Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse häufig erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und sind somit meistens inoperabel. Zum anderen weisen Pankreaskarzinome größtenteils Resistenzen gegenüber konventionellen Therapiemethoden auf. Die Widerstandsfähigkeit kann unter anderem auf eine Überexpression der *Inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) in Tumorzellen zurückgeführt werden, die durch Bindung der Caspasen die Signalkaskade der Apoptose unterbinden und auf diesem Weg den Zelltod inhibieren (MOHAMED ET AL., 2017). Als natürlicher Gegenspieler der IAPs agiert das pro-apoptotische Protein Smac/DIABLO, das durch entsprechenden Stimulus aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien ausgeschüttet wird und seinerseits die Funktionen der IAPs unterbinden kann.

Basierend auf diesem Wissen, stellen *Smac mimetics* einen vielversprechenden Ansatz in der Entwicklung neuer Substanzen in der Tumorthherapie dar. Sie wurden daher so entwickelt, dass sie unter anderem eine AVPI-ähnlich Struktur besitzen und hierüber mit den BIR-Domänen der *Inhibitor of apoptosis proteins* interagieren können. Auf diese Weise sollen die überexprimierten IAPs in Tumorzellen inhibiert und so die Möglichkeit des Caspase-induzierten Zelltodes wiederhergestellt werden.

In dieser Arbeit sollte sowohl die Wirksamkeit neu entwickelter IAP-Antagonisten auf das Zellüberleben von Pankreaskarzinomzellen analysiert, als auch nach Hinweisen auf die Art des induzierten Zelltodes gesucht werden. Des Weiteren sind Untersuchungen zur Wirkung der Kombinationsbehandlung mit den neuen Substanzen und verschiedenen Kombinationspartnern auf die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen von besonders großem Interesse.

4.1 Signifikante Zellzahlreduktion der Pankreaskarzinomzellen durch die neu entwickelten IAP-Antagonisten

Aufgrund von Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurden zunächst für beide Zelllinien die IAP-Antagonisten in den Konzentrationen 10 μM eingesetzt (CAROSATI ET AL., 2015; STEVENS, 2017). Die Bestimmungen der IC_{50} -Werte zeigten jedoch, dass die Pankreaskarzinomzelllinien mit höheren Dosierungen der Substanzen LBPS03 und LBPS05 behandelt werden müssen, um per se Zelltod zu induzieren. Während die Zelllinie HUP-T3 mit 10,2 μM für LBPS03 und 14,6 μM für LBPS05 etwas niedrigere IC_{50} -Werte verzeichnete, lagen diese in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 bei ungefähr 25 μM (detailliert: LBPS03 22,8 μM ; LBPS05 24,8 μM). Zur leichteren

Anwendung wurde für weitere Versuche mit der Zelllinie HUP-T3 LBPS03 in 10 μM eingesetzt und LBPS05 in 15 μM sowie jeweils 25 μM bei den PaTu8902-Zellen.

Behandelte man nun die beiden Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902 über unterschiedliche Zeiträume mit verschiedenen Konzentrationen der pan-selektiven IAP-Antagonisten LBPS03 sowie LBPS05, zeigte sich in allen Auswertungen eine signifikante Reduktion der Zellzahl. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass eine weitere Verringerung der Zellzahl nur durch die längere Behandlung mit LBPS03 induziert werden konnte. Eine Inkubationszeit über 72 Stunden mit dem IAP-Antagonisten LBPS05 führte zu keiner weiteren Reduktion des Zellüberlebens (vgl. Abb. 7).

Die Ergebnisse der Wirkung auf das Zellüberleben zeigten zum einen, dass die Pankreaskarzinomzellen der Linie HUP-T3 in geringeren Konzentrationen auf die IAP-Antagonisten ansprachen und zum anderen eine zeitabhängige Wirkung der Substanz LBPS03, die jedoch bei beiden Pankreaskarzinomzelllinien zu beobachten war. So reduzierte sich das Zellüberleben von HUP-T3 und PaTu8902 nach einer 72-stündigen Behandlung mit LBPS03, in geringerer Konzentration, um nochmals ungefähr 20 %, verglichen mit einer zweitägigen Inkubationsdauer. Auch in der Arbeit von JIANG UND KOLLEGEN konnte 2016 gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem *small-molecule* Antagonisten AT-406, einem monovalenten Smac Mimetikum in Phase I/II klinischer Studien (MOHAMED ET AL., 2017), vor allem einen zeitabhängigen Einfluss auf die Zellviabilität von Pankreaskarzinomzellen hat. Nach der verlängerten Behandlung der beiden Pankreaskarzinomzelllinien mit dem IAP-Antagonisten LBPS05 konnte lediglich eine minimale Verringerung der Zellzahl detektiert werden; jedoch zeigten Untersuchungen zur zeitabhängigen Wirkung der Substanzen auf Nierenzellkarzinomzellen von J. Stevens eine weitere Reduktion nach 96 Stunden (STEVENS, 2017). Somit wären zusätzlich Proliferationsanalysen nach der Behandlung der Pankreaskarzinomzellen mit LBPS03 und LBPS05 über vier Tage von großem Interesse.

Erhöhte man die Konzentration der neu entwickelten IAP-Antagonisten auf jeweils 50 μM , statt die Behandlungsdauer zu variieren, konnte in beiden Pankreastumorzelllinien eine signifikante Verringerung der Zellzahl ermittelt werden. Vergleicht man hier Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Wirkung von LBPS03 und LBPS05 auf das Überleben der Nierenkarzinomzellen Clear-Ca2, so zeigte sich vor allem unter der Behandlung mit LBPS03 ein konzentrationsabhängiger Einfluss (STEVENS, 2017). Im Gegensatz dazu, konnte hier jedoch in beiden Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902 eine verstärkte Wirkung sowohl durch LBPS03 als auch LBPS05 in höherer Konzentration beobachtet werden. Erhöhte Expressionslevel der *Inhibitor of apoptosis proteins* in den Pankreaskarzinomzellen könnten dafür verantwortlich sein (LOPES ET AL., 2007), dass hier, im Vergleich zu den Nierenzellkarzinomzellen ClearCa-2, höhere Konzentrationen der Substanzen für eine stärkere Wirkung notwendig sind.

Ein Ziel der Entwicklung neuer Substanzen in der Therapie von malignen Erkrankungen sowie dem Pankreaskarzinom, ist, das Tumorgewebe zu schädigen, mit möglichst geringer Wirkung auf

Normalgewebe. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die Wirkung der neu entwickelten IAP-Antagonisten auf normales Pankreasgewebe zu untersuchen. In den Masterarbeiten von N. van den Höfel und J. Stevens konnte jedoch gezeigt werden, dass LBPS03 und LBPS05 in einer Konzentration von jeweils 10 μM nur eine geringe Wirkung sowohl auf PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) als auch auf normale Nierenepithelzellen ausüben (CAROSATI ET AL., 2015; STEVENS ET AL., 2014).

4.2 Caspasen als Ursache für den Zelltod in Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902

Die *Smac mimetics* dieser Arbeit, LBPS03 und LBPS05, sind so entwickelt worden, dass sie in der Lage sind, über Nachahmung des AVPI-Bindemotivs von Smac/DIABLO mit der BIR-Domäne von IAPs zu interagieren, somit die Hemmung der Caspasen aufzuheben und letztendlich die Induktion der Apoptose zu ermöglichen (MANNHOLD ET AL., 2010). Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Aktivität der Effektor- und Initiatorcaspasen nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten über unterschiedliche Zeiträume erstellt. Werden die Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 über 72 Stunden mit LBPS03 und LBPS05 inkubiert, kann eine leichte Zunahme der intrazellulären Caspase-3 Aktivität in den LBPS03-behandelten HUP-T3-Zellen nachgewiesen werden. So war die relative Caspase-3/-7 Aktivität mit $21,0 \pm 2,4 \%$ ungefähr doppelt so hoch, wie in den Kontrollzellen. Eine verlängerte Inkubationsdauer mit dem IAP-Antagonisten LBPS03 zeigte jedoch keine zunehmende Aktivität der Effektorcaspase. Die Messungen der intrazellulären Caspase-3/-7 Aktivität nach Inkubation mit 15 μM LBPS05 ergaben zu keinem Zeitpunkt (24, 48 und 96 Stunden) eine signifikante Zunahme. Lediglich nach einer längeren Inkubationsdauer war die Tendenz der Caspaseaktivität leicht zunehmend. Da die Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Wirkung von LBPS03 und LBPS05 eine deutliche Reduktion der Zellzahlen beider Pankreaskarzinomzelllinien nach Behandlung über 48 Stunden zeigten, waren die hier eingesetzten Konzentrationen möglicherweise nicht ausreichend. Somit könnte, um eine ausgeprägte Aktivierung der Caspasen detektieren zu können, die intrazelluläre Caspaseaktivität nach zwei Tagen Inkubation mit 50 μM LBPS03 und LBPS05 noch zusätzlich bestimmt werden. Beispielsweise konnte in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 eine konzentrationsabhängige Zunahme der Caspaseaktivität nach Behandlung mit dem *Smac mimetic* AT-406 beobachtet werden (JIANG ET AL., 2016). Für LBPS05 geben Ergebnisse von anderen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe Hinweise auf einen nicht-apoptotisch-induzierten Zelltod durch die neu entwickelte Substanz (CAROSATI ET AL., 2015; STEVENS, 2017). So konnte auch in Nierenkarzinomzellen keine vermehrte intrazelluläre Caspase-3/-7-Aktivität nach zwei- bzw. dreitägiger Behandlung mit LBPS05 detektiert werden (STEVENS, 2017).

Die leicht erhöhte Aktivität der Effektorcaspasen, nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten über drei Tage, könnte eine Aktivierung der *Upstream*-Initiatorcaspasen vermuten lassen. So würde eine

Steigerung der Aktivität der Caspase-8 für die extrinsische und somit Rezeptor-vermittelte Aktivierung sprechen, beziehungsweise über die Zunahme der Caspase-2/-9 Aktivität für die intrinsische Signalkaskade, die die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranspalt zur Folge hat. Nach 72 Stunden konnte in den Pankreaskarzinomzellen HUP-T3, die mit LBPS03 behandelt wurden, zwar eine Verdopplung der Caspase-8 Aktivität im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen werden, aber diese lag mit $8,1 \pm 2,3$ % relativ niedrig und war nicht signifikant. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach der Inkubation mit LBPS05 in einer Konzentration von 15 μ M. Allerdings gehören Pankreaskarzinomzellen grundsätzlich zu den Typ-II-Zellen, in denen nur eine geringe Aktivierung der Caspase-8 stattfindet und die mitochondriale Signalverstärkung zur Apoptose-Induktion notwendig ist (TRAUZOLD ET AL., 2003). Der fehlende Nachweis einer Aktivitätssteigerung der Caspase-8 in den HUP-T3-Zellen könnte auch darin begründet sein. Die zusätzliche Überexpression des anti-apoptotischen Bcl-X_L (HINZ ET AL., 2000), das in die mitochondriale Signalkaskade integriert ist, könnte die ausbleibende Aktivierung der Caspase-2 und Caspase-9 nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten erklären. In den Nierenkarzinomzellen CleaCa-2 dagegen konnte nach der Behandlung mit LBPS03 eine Steigerung der intrazellulären Caspase-2- und Caspase-9-Aktivität beobachtet werden (STEVENS, 2017), weisen aber möglicherweise eine geringere Bcl-X_L-Expression als die Pankreaskarzinomzellen auf (GOBE ET AL., 2002).

Über Western Blot Analysen wurden in den Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 Untersuchungen zur Spaltung von Caspasen und Spaltprodukten der Caspasen nach Behandlung mit LBPS03 und LBPS05 gemacht. Hier konnten auf Proteinebene der Tumorzellen PaTu8902 sowohl nach einer 72-stündigen als auch 96-stündigen Behandlungsdauer mit jeweils 25 μ M der IAP-Antagonisten keine aktiven Fragmente der Initiatorcaspase-8 detektiert werden. Auf Höhe von 43 kDa und 41 kDa konnten die Fragmente der gespaltenen Caspase-8 in der Positivkontrolle nachgewiesen werden. Auch die Untersuchung, in Abhängigkeit der Inkubationsdauer, auf die Spaltprodukte unterschiedlicher Substrate der Caspasen brachte zwar einen deutlichen Nachweis in der Positivkontrolle, jedoch war kein Signal in den behandelten Zellen zu detektieren. Werden im Gegensatz dazu die Nierenkarzinomzellen ClearCa-2 mit den beiden Substanzen behandelt, so konnten zumindest nach der Behandlung mit LBPS03 die Spaltprodukte der Caspase-8 sowie die Abbauprodukte Caspase-spezifischer Substrate im Western Blot nachgewiesen werden (STEVENS, 2017). Auch hier wären Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Wirkung von LBPS03 und LBPS05 auf die Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 interessant und, ob eine Zunahme der intrazellulären Caspaseaktivität nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz zu JIANG UND KOLLEGEN, die den Nachweis einer konzentrationsabhängigen Wirkung photometrisch erbracht haben, könnte man hier die Detektion von Caspasespaltprodukten auf Proteinebene durchführen. Jedoch könnte auch hier die grundsätzlich geringe intrazelluläre Caspase-8-Aktivierung als Typ-II-Zellen und die Hemmung der mitochondrialen Signalkaskade in Pankreaskarzinomzellen für den hier fehlenden Proteinnachweis ursächlich sein (HINZ ET AL., 2000; TRAUZOLD ET AL., 2003).

Betrachtet man zum einen die durchflusszytometrischen Ergebnisse der intrazellulären Caspaseaktivität in den HUP-T3-Zellen und zum anderen die Auswertungen der Western Blot Analysen in den PaTu8902 Pankreaskarzinomzellen, scheint die Behandlung allein mit den IAP-Antagonisten für eine Aktivierung der Caspasen nicht ausreichend zu sein. Als Typ-II-Zellen findet in Pankreaskarzinomzellen per se nur eine geringe Aktivierung der Caspase-8 statt und die Verstärkung, mittels mitochondrialer Signalkaskade, ist essentiell (TRAUZOLD ET AL., 2003). So konnte durch HINZ UND KOLLEGEN noch zusätzlich eine Überexpression von Bcl-X_L in Pankreaskarzinomzellen beobachtet werden. Jedoch kann möglicherweise über Kombinationsbehandlungen die notwendige Verstärkung durch den mitochondrialen Signalweg umgangen werden. Durch die IAP-Antagonisten könnte die Aktivierung der Caspasen wieder stattfinden und durch einen Kombinationspartner, wie beispielsweise TRAIL, die extrinsische Signalkaskade vermehrt induziert werden. Zusätzlich weisen die Daten von N. VAN DEN HÖFEL und J. STEVENS auf eine Steigerung der intrazellulären Effektor- bzw. Initiatorcaspasen durch die Behandlung mit LBPS03 hin. Hier konnte zum einen in der T-Zelleukämiezelllinie Jurkat M eine starke Zunahme der intrazellulären Caspase-8-Aktivität auf ungefähr 60 % detektiert werden (CAROSATI ET AL., 2015). Zum anderen zeigte sich in den Nierenkarzinomzellen ClearCa-2 sowohl eine deutliche Steigerung der Initiatorcaspasen-8 und -9, als auch der Effektorcaspasen-3/-7 (STEVENS, 2017). Wie hoch die Aktivität der intrazellulären Caspasen-3/-7 in den beiden Pankreaskarzinomzelllinien letztendlich ist, könnten weitere Untersuchungen zu den Spaltprodukten der Effektorcaspasen, wie beispielsweise der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), zeigen.

4.3 Hinweise für Apoptose als Mechanismus

Apoptose beschreibt eine Form des programmierten Zelltodes und kann entweder Rezeptorvermittelt aktiviert werden oder über die mitochondriale Signalkaskade. In beiden Fällen verläuft die Aktivierung erst über Initiatorcaspasen, die wiederum durch Spaltung der Effektorcaspasen deren Aktivierung induzieren und letztendlich in der Spaltung von Todessubstraten endet (HENGARTNER, 2000).

Um zu überprüfen, ob dem beobachteten Zelltod Apoptose als Zelltodmechanismus zugrunde liegt, erfolgte die Färbung der Zellkerne von HUP-T3 mit Propidiumiodid. Kann in der Durchflusszytometrie ein breiter hypodiploider, sogenannter Sub-G1, *Peak* der Zellen nachgewiesen werden, spricht das für Apoptose als Zelltodmechanismus (RICCARDI AND NICOLETTI, 2006).

In den Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 konnte nach einer Inkubation über drei Tage mit LBPS03 ein signifikanter Anstieg des hypodiploiden *DNA*-Gehaltes verzeichnet werden. Auch die Behandlung mit dem IAP-Antagonisten LBPS05 über 72 Stunden zeigte bei $14,3 \pm 0,7$ % der behandelten Zellen eine Verbreiterung des Sub-G1-*Peaks*. Somit könnte davon ausgegangen werden, dass durch die neu entwickelten *Smac mimetics* LBPS03 und LBPS05 zumindest teilweise der

Zelltod durch Apoptose in den Pankreaskarzinomzellen induziert wird. Ebenso konnte in den Jurkat-Zellen und ClearCa-2-Zellen nach der Behandlung mit LBPS03 eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen beobachtet werden (CAROSATI ET AL., 2015, STEVENS, 2017). Interessant wäre auch die Wirkung der IAP-Antagonisten in höheren Konzentrationen auf den Anteil apoptotischer Pankreaskarzinomzellen, da beispielsweise FAKLER ET AL. einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Anzahl apoptotischer Zellen durch die *small molecules XIAP inhibitor 1* und *XIAP inhibitor 2* aufzeigen konnte.

Einen zusätzlichen Hinweis auf einen apoptotisch-induzierten Zelltod in den Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 würde der Nachweis von Spaltprodukten der Caspasen erbringen. Ein solches Schlüsselprotein stellt das nukleare Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) dar, das während apoptotischen Prozessen durch die aktivierte Effektorcaspase-3 gespalten wird (COHEN, 1997). Da die erhöhte Caspaseaktivität nach dreitägiger Inkubationsdauer mit LBPS03 verzeichnet werden konnte, wurden die Proteine nach ebendiesem Zeitraum aus den Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 extrahiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. In allen Proben konnte die nicht gespaltene Form von PARP detektiert werden. Die gespaltene Form von PARP zeigte jedoch nur in der Positivkontrolle eine deutliche Bande auf entsprechender Höhe.

Der fehlende Nachweis einer PARP-Spaltung in den Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 könnte dafür sprechen, dass die Steigerung der Aktivität der Effektorcaspasen nach Behandlung mit den IAP-Antagonisten nicht ausreichend ist, um zur Spaltung der Schlüsselproteinen zu führen. Ebenso konnten in den Zellen der Linie PaTu8902 zum einen nicht die Fragmente p43 und p41 ermittelt werden, die hinweisend für eine Aktivierung der Initiatorcaspase-8 sind. Zum anderen wurde ein vollständiges Fehlen jeglicher Spaltprodukte der Caspasensubstrate in diesen Pankreaskarzinomzellen beobachtet.

Von TRAUZOLD UND KOLLEGEN wurde 2003 beschrieben, dass Pankreaskarzinomzellen als Typ-II-Zellen grundsätzlich eine geringere Aktivität der Initiatorcaspase-8 aufweisen und zusätzlich den mitochondrialen Signalweg zur Induktion der Apoptose benötigen. Ferner ist jedoch auch das anti-apoptotische Protein Bcl-X_L in Pankreaskarzinomzellen erhöht, das Teil der mitochondrialen Signalkaskade ist (HINZ ET AL., 2000). Der Einfluss der überexprimierten IAPs auf die Caspaseaktivität könnte durch die neu entwickelten Substanzen im Grunde genommen reduziert werden, jedoch würde die Hemmung des, für die Pankreaskarzinomzellen notwendigen, mitochondrialen Signalweges dennoch in der verminderten Aktivierung der Effektorcaspasen-3/-7 münden. Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Nachweis zum einen der Fragmente von Caspase-8 und zum anderen jeglicher Spaltprodukte der Caspasesubstrate in den behandelten Pankreaskarzinomzelllinien sein. Weiterhin würde, bei ausbleibender Aktivierung der Effektorcaspasen, der Nachweis von der Spaltung ihres Zielproteins PARP ebenfalls fehlen, das in den Zellen HUP-T3 auch nicht nachgewiesen werden konnte. Behandelte man die Nierenkarzinomzellen ClearCa-2 mit den beiden IAP-Antagonisten, so konnte eine PARP-Spaltung in den LBPS03-behandelten Zellen nachgewiesen

werden (STEVENS, 2017). Möglicherweise ist die Einzelbehandlung mit den neu entwickelten Substanzen in den Pankreaskarzinomzellen nicht ausreichend, sondern erst eine Kombinationstherapie führt zu einer nachweisbaren Apoptose-Induktion.

4.4 Die Relevanz von XIAP und cIAP2 für die IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05

Die *Inhibitor of apoptosis proteins* sind als Gegenspieler der Caspasen in der Lage, die Signalkaskade der Apoptose zu hemmen und können dadurch zur Entstehung von malignen Erkrankungen beitragen. So sind die Expressionslevel verschiedener IAPs in Tumorzellen häufig erhöht beziehungsweise dysreguliert (DE ALMAGRO AND VUCIC, 2012). LOPES UND KOLLEGEN konnten in ihrer Arbeit 2007 zeigen, dass in Pankreaskarzinomzellen XIAP, cIAP2 und Survivin verstärkt nachgewiesen werden konnten. Aufgrund dessen stellen die IAPs einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten in der Tumorforschung dar. Die hier verwendeten IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05 wurden so entwickelt, dass sie über eine AVPI-ähnliche Struktur mit der BIR2- und BIR3-Domäne verschiedener IAPs interagieren können und so die Hemmung der Caspasen aufgehoben werden kann.

Verglichen mit den ClearCa-2-Zellen, die das *X-linked* IAP nachweislich sehr stark (RAMP ET AL., 2004) exprimieren, konnte in den Pankreaskarzinomzellen nochmals ein höheres XIAP-Level detektiert werden. Da es Hinweise auf die Beteiligung der IAPs an der Regulation der Sensitivität auf zytotoxische Therapien gibt (FULDA, 2015a), könnte die starke Überexpression der *Inhibitor of apoptosis proteins* in den Pankreaskarzinomzellen eine Ursache für die ausgeprägte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sein. Zudem scheinen die Zellen der Linie PaTu8902 nochmals ein höheres Expressionslevel an XIAP aufzuweisen, als die Zellen HUP-T3, was möglicherweise auch eine Erklärung für die insgesamt höheren IC_{50} -Werte sein könnte.

Eine geringe Ausprägung des zellulären IAP2s konnte von ESPOSITO UND KOLLEGEN in normalem Pankreasgewebe nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich eine deutlich erhöhte cIAP2-Expression in Gewebe von Pankreaskarzinomen. Diese Überexpression scheint möglicherweise auch einen Einfluss auf die pathophysiologischen Aspekte, wie die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, zu haben (ESPOSITO ET AL., 2007). In Nierenzellkarzinomen wurde 2007 von KEMPKENSTEFFEN UND KOLLEGEN ebenfalls eine Überexpression des zellulären IAP2 detektiert. Betrachtet man die basale Expression von cIAP2 sowohl in den Nierenkarzinomzellen als auch in den Pankreaskarzinomzellen, ist sie in HUP-T3 und PaTu8902 nicht ganz so ausgeprägt, wie in den ClearCa-2-Zellen. Vergleicht man aber die basalen Expressionslevel von cIAP2 in beiden Pankreaskarzinomzelllinien untereinander, so scheint das zelluläre IAP2 in den PaTu8902 stärker exprimiert zu werden, als in Zellen der Linie HUP-T3. Somit könnten sowohl die erhöhten XIAP-Level als auch

die erhöhte cIAP2-Expression in den Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 dafür verantwortlich sein, dass in diesen höheren Konzentrationen der *Smac mimetics* eingesetzt werden müssen, als in den HUP-T3-Zellen.

Da nach der Behandlung mit den IAP-Antagonisten sowohl eine sichtbare Degradation des Expressionslevels von XIAP als auch von cIAP2 ausbleibt, stellt sich die Frage, ob die neu entwickelten *Smac mimetics* tatsächlich mit den IAPs der Pankreaskarzinomzellen interagieren oder möglicherweise die Bindung nicht ausreichend ist. So konnte allerdings in den Nierenkarzinomzellen CleaCa-2 nach der Behandlung mit LBPS03 und LBPS05 eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Degradation von XIAP beobachtet werden (STEVENS, 2017). Ebenso konnten CHEN UND KOLLEGEN im hepatozellulären Karzinom sowohl einen zeit- als auch konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Abnahme der Expressionslevel von cIAP2 und dem *X-linked* IAP zeigen, nach Behandlung mit dem *Smac mimetic* APG-1387.

Die hier verwendeten Substanzen LBPS03 und LBPS05 wurden als monovalente Smac Mimetika entwickelt (CAROSATI ET AL., 2015), wohingegen das *Smac mimetic* APG-1387 eine bivalente Verbindung darstellt und aufgrund dessen einen stärkeren Einfluss auf die IAP-Degradation haben könnte (CHEN ET AL., 2018). Im Hinblick auf die Beobachtungen durch STEVENS und CHEN ET AL. bezüglich einer konzentrationsabhängigen Wirkung auf die Degradation von cIAP2 und XIAP durch *Smac mimetics*, könnten die IAP-Expressionslevel in den Pankreaskarzinomzelllinien unter steigenden LPBS-Konzentrationen noch zusätzlich untersucht werden. Da bei CHEN ET AL. ebenfalls auch ein zeitabhängiger Einfluss durch das *Smac mimetic* beobachtet wurde, könnte auch die Wirkung einer verlängerten Behandlungsdauer mit LBPS03 und LBPS05 auf die IAPs der Pankreaskarzinomzellen überprüft werden. Die hier verwendeten IAP-Antagonisten haben als monovalente Verbindungen den großen Vorteil der oralen Verfügbarkeit auf der einen Seite (SUN ET AL., 2008) und auf der anderen Seite geringere toxische Nebenwirkungen als bivalente *Smac mimetics* (FULDA, 2014).

Eine andere Überlegung für die nicht nachweisbare Degradation von cIAP2 und XIAP im Western Blot, nach der Behandlung mit LBPS03 sowie LBPS05, könnte potentiell in einer ausbleibenden Interaktion der IAPs mit den neu entwickelten IAP-Antagonisten liegen. Mit Survivin ist beispielsweise ein weiteres *Inhibitor of apoptosis protein* bekannt, das zum einen ebenfalls über eine BIR-Domäne verfügt (BEUG ET AL., 2012) und zum anderen im Pankreaskarzinom vermehrt nachgewiesen werden konnte (LOPES ET AL., 2007). Allerdings scheint die BIR-Domäne von Survivin nicht das IBM-Bindemotiv zu enthalten, das jedoch in den BIR2- und BIR3-Domänen von XIAP und den beiden zellulären IAPs zu finden ist (ALTIERI, 2010). Die hier verwendeten Substanzen LBPS03 und LBPS05 sollen mit der BIR3-Domäne der IAPs interagieren können und die konzentrationsabhängige Degradation von XIAP in Nierenkarzinomzellen stützt diese Überlegung (STEVENS, 2017). Somit wären Untersuchungen zur Wirkung der IAP-Antagonisten in höheren Konzentrationen auf die Expressionslevel der IAPs mit BIR3-Domäne von Interesse.

Zusätzlich kann die Überexpression von mehreren unterschiedlichen *Inhibitor of apoptosis proteins* im Pankreaskarzinom dafür verantwortlich sein (MOHAMED ET AL., 2017), dass die hier verwendeten *Smac mimetics* in Einzelbehandlung nicht ausreichend wirksam sind; was für andere Smac Mimetika bereits gezeigt werden konnte (FULDA, 2015b). Aufgrund dieser Annahme wurde in weiteren Versuchen die Wirkung der Kombinationsbehandlung mit zwei verschiedenen IAP-Antagonisten auf das Proliferationsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902 untersucht.

4.5 Die Wirkung der IAP-Antagonisten in Kombinationsbehandlung

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellten Untersuchungen zur Kombinationsbehandlung der Pankreaskarzinomzellen mit den neu entwickelten *Smac mimetics* und unterschiedlichen Partnern dar. So konnte gezeigt werden, dass Apoptose, durch Chemotherapeutika induziert, mittels Kombinationsbehandlung mit beispielsweise einem *Smac mimetic* im duktalem Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse verstärkt werden kann (AWASTHI ET AL., 2011). Ebenso können *small molecules*, die in der Lage sind das *X-linked* IAP zu hemmen, zu einem gesteigerten TRAIL-induzierten Zelltod führen (AWASTHI ET AL., 2011).

Heute gilt in der adjuvanten Therapie des Pankreaskarzinoms, unter anderem die Behandlung mit Gemcitabin, immer noch als Goldstandard (D'HAESE ET AL., 2015) und eine schnell wachsende neuroendokrine Neoplasie des Pankreas kann mit Etoposid behandelt werden (NOE AND NEU, 2015). 2012 konnten ESCHENBURG UND KOLLEGEN sogar eine stärkere Reduktion der Zellzahl von Neuroblastomzellen durch die Kombinationsbehandlung eines *Smac mimetics* mit einem Chemotherapeutikum beobachten. Daher wurden in dieser Arbeit Gemcitabin und Etoposid als Kombinationspartner mit LBPS03 und LBPS05 in der Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902 eingesetzt.

Da bereits die Proliferationsversuche mit den IAP-Antagonisten allein eine signifikante Reduktion der Zellenzahlen beider Pankreaskarzinomzelllinien zeigten, stellten Untersuchungen zum Einfluss der Kombinationswirkung mit einem weiteren IAP-Inhibitor einen interessanten Ansatz dar. Hierzu wurde YM155, ein Survivin-Inhibitor, als Kombinationspartner verwendet, da Survivin ebenfalls ein IAP mit erhöhtem Expressionslevel im Pankreaskarzinom darstellt (LIU AND WANG, 2011).

Als weitere Gruppe bieten sich die Todesrezeptorliganden als potentiellen Kombinationspartner an. Zum einen sind sie selbst in der Lage Apoptose zu initiieren und zum anderen kann das Ansprechen der Zellen auf die Liganden durch die neu entwickelten *Smac mimetics* verstärkt werden. So führte die kombinierte Therapie von Birinapant mit TNF α in der Mehrzahl der getesteten Melanomzelllinien zu einer Reduktion der Zellzahl, Birinapant allein wies allerdings in nur einer der 17 Zelllinien eine Wirkung (KREPLER ET AL., 2013) auf. Auch FINLAY ET AL. konnten 2014 zeigen, dass

zuvor resistente Karzinomzelllinien, durch die Behandlung mit IAP-Antagonisten, wieder erheblich auf den Todesliganden TRAIL sensibilisiert werden konnten.

4.5.1 Verstärkte Wirkung der *Smac mimetics* durch die kombinatorische Behandlung mit Zytostatika

Betrachtet man den Einfluss der Kombinationsbehandlung der IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05 mit den Zytostatika auf das Proliferationsverhalten der beiden Pankreaskarzinomzelllinien, so zeigen sich hier ähnliche Ergebnisse.

So scheint vor allem die Wirkung des *Smac mimetic* LBPS05 durch den kombinatorischen Einsatz mit einem Zytostatikum in beiden Pankreaskarzinomzelllinien verstärkt zu werden, wohingegen der Einfluss des IAP-Antagonisten LBPS03 bereits allein einen ausgeprägten antiproliferativen Effekt aufweist und die Zellzahl durch die Doppelinkubation nicht mehr sehr stark reduziert wird. In den Arbeiten von N. VAN DEN HÖFEL und J. STEVENS zeigten sich Hinweise, dass durch die Behandlung mit LBPS05 sowohl in der Nierenkarzinomzelllinie ClearCa-2 als auch in der T-Zell Leukämiezelllinie Jurkat keine Apoptose induziert wird (STEVENS, 2017). Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit Etoposid oder Gemcitabin zu einem apoptotisch-induzierten Zelltod (HUANG AND PLUNKETT, 1995; WANG ET AL., 2016). Unter der Kombinationsbehandlung von LBPS05 mit je einem der beiden Zytostatika könnten somit zwei unterschiedliche Zelltodmechanismen induziert werden. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den stärkeren kombinatorischen Einfluss von LBPS05 mit Etoposid oder Gemcitabin auf das Zellüberleben beider Pankreaskarzinomzelllinien, als die Kombinationsbehandlung von LBPS03 mit den Zytostatika.

Die Untersuchungen zum Zelltodmechanismus durch die Behandlung mit LBPS03 zeigten in ClearCa-2- und Jurkat-Zellen ein apoptotisches Zellsterben (CAROSATI ET AL., 2015; STEVENS, 2017) und auch die Ergebnisse in der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 weisen auf Apoptose hin. Durch die Kombinationsbehandlung von LBPS03 mit einem der beiden Zytostatika würde somit der gleiche Zelltod initiiert werden und scheint für diesen IAP-Antagonisten keine maßgebliche Wirkungsverstärkung zu haben. PROBST UND KOLLEGEN beispielsweise konnten in Pankreaskarzinomzellen allerdings eine verstärkte Wirkung durch die Kombinationsbehandlung eines Apoptose-induzierenden *Smac mimetics* mit Etoposid oder Gemcitabin beobachten. Jedoch ist der Unterschied zwischen der hier verwendeten Substanz LBPS03 und JP1400, dem von PROBST ET AL. eingesetzten *Smac mimetic*, dessen Wirkung auf die Degradation von cIAP2 und XIAP nach der Behandlung. JP1400 zeigte eine konzentrationsabhängige Abnahme der beiden IAP-Expressionslevel (PROBST ET AL., 2010); dagegen konnte in den Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902 nach der Behandlung mit LBPS03 keine Degradation des zellulären IAP2 und dem X-linked IAP detektiert werden. Dies könnte wiederum entweder dafür sprechen, dass diese beiden *Inhibitor of apoptosis proteins* nicht die Interaktionspartner von LBPS03 sind oder wahrscheinlicher,

die hier verwendeten Konzentrationen nicht ausreichend hoch waren. Ob die Kombinationsbehandlung der IAP-Antagonisten mit den Zytostatika Etoposid und Gemcitabin aber zu einer erhöhten Induktion der Apoptose führt, könnten Untersuchungen mittels Propidiumiodid-Färbung und Western Blot Analysen zum Nachweis von Spaltprodukten der Caspasen weiteren Aufschluss geben.

4.5.2 Starker anti-proliferativer Effekt durch die Kombinationsbehandlung mit Survivin-Inhibitor YM155

Das gute Ansprechen der Pankreaskarzinomzelllinien bezüglich des antiproliferativen Effektes der neuen IAP-Antagonisten in der Einzelbehandlung sowie die bekannte Überexpression von Survivin, einem weiteren *Inhibitor of apoptosis protein* im Pankreaskarzinom (LIU AND WANG, 2011), stellen einen interessanten Ansatz für die Kombinationsbehandlung von LBPS03 und LBPS05 mit dem Survivin-Inhibitor YM155 dar.

Im Vergleich ist die Wirkung des Survivin-Inhibitors in einer Konzentration von 5 nm auf das Zellüberleben der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 stärker als in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902. Möglicherweise wird in den PaTu8902-Zellen das anti-apoptotische Survivin vermehrt exprimiert, wie auch das *X-linked* IAP und würde somit die Notwendigkeit von höheren Konzentrationen des Survivin-Inhibitors YM155 erklären. Auch in der Arbeit von ASANUMA ET AL. konnte gezeigt werden, dass in fünf verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien fünf unterschiedliche Expressionslevel der Survivin-*mRNA* detektiert wurden.

Sowohl die Inkubation mit LPBS03 als auch mit LBPS05, jeweils in Kombination mit dem Survivin-Inhibitor YM155, zeigte eine deutlich erhöhte Zellreduktion, verglichen mit den jeweiligen Einzelbehandlungen. In der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 weisen die Ergebnisse der kombinatorischen Therapie sogar auf einen additiven Einfluss hin.

Mit dem Survivin-Inhibitor YM155 wurde ein IAP-Antagonist verwendet, der eine apoptotische Wirksamkeit auf Tumorzellen zeigt (KOJIMA ET AL., 2017; TAO ET AL., 2012; ZHANG ET AL., 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass zumindest in der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 auch ein apoptotisch-induzierter Zelltod durch LBPS03 initiiert wird, wohingegen dies in Nierenkarzinomzellen und T-Zell-Leukämiezellen bereits bestätigt werden konnte (CAROSATI ET AL., 2015, STEVENS, 2017). Die Kombination zweier apoptotisch-wirksamen IAP-Antagonisten führte in beiden Pankreaskarzinomzelllinie mit ca. 35 % nochmals zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl, im Vergleich zur Einzelbehandlung mit LBPS03 und zeigte sich damit als sehr wirkungsvoll. Einen ebenso starken Einfluss auf die Proliferation von HUP-T3 und PaTu8902 hat die kombinatorische Behandlung mit LBPS05 und YM155. Da in den Arbeiten von N. VAN DEN HÖFEL und J. STEVENS Hinweise auf einen anderen Zelltodmechanismus als Apoptose gefunden wurden (CAROSATI ET AL., 2015, STEVENS, 2017), würden unter dieser Kombinationsbehandlung

somit zwei verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden. Ob mit der Zweifachtherapie ein oder zwei Signalkaskaden aktiviert werden, scheint einen geringen Unterschied zu machen. Jedoch kann in der Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902, in der die IAPs XIAP und Survivin scheinbar erhöht sind (LOPES ET AL., 2007), vor allem unter der Kombinationsbehandlung LBPS05 mit YM155 ein nahezu additiver Effekt verzeichnet werden. In der kombinatorischen Therapie eines *Smac mimetic* mit einem Zytostatikum wurde in den Zellen, mit erhöhter Expression der *Inhibitor of apoptosis proteins*, ein stärkerer Einfluss auf den Lebendzellanteil beobachtet (ESCHENBURG ET AL., 2012). Dieser Effekt könnte auch unter der Behandlung mit zwei IAP-Antagonisten auftreten und würde den stärkeren Einfluss auf die Pankreaskarzinomzelllinie PaTu8902 erklären.

4.6 Verringertes Zellüberleben durch die Todesrezeptorliganden

Die IAP-Antagonisten LBPS03 und LBPS05 sind so entwickelt worden, dass sie die Fähigkeit besitzen, pan-selektiv an die BIR-Domäne der *Inhibitor of apoptosis proteins* zu binden. Somit könnte die Kombination von LBPS03 sowie LBPS05 mit einem Todesrezeptorliganden der TNF-Familie zur ungehinderten Induktion der Apoptose beziehungsweise zum verstärkten Zelltod in den behandelten Pankreaskarzinomzellen führen. So konnte für andere *Smac mimetics* bereits gezeigt werden, dass sie in der alleinigen Behandlung nur eine geringe Wirkung aufweisen und erst die Kombination mit einem Todesrezeptorliganden zu einem stärkeren Effekt führt (FINLAY ET AL., 2014; KREPLER ET AL., 2013). Dies führte zunächst zu Untersuchungen zum Einfluss der Einzelbehandlung mit unterschiedlichen Todesrezeptorliganden auf das Zellüberleben der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 und PaTu8902. Hier zeigte sich insbesondere nach der Inkubation mit dem *TNF-related apoptosis-inducing ligands* (TRAIL) ein starker Einfluss auf das Zellüberleben beider Pankreaskarzinomzelllinien, wobei bei den Zellen der Linie HUP-T3 die Wirkung noch deutlich stärker war. So wurde für die folgenden Kombinationsversuche eine Konzentration von 0,5 ng/ml für die HUP-T3-Zellen verwendet, wohingegen eine hundertfach höhere Konzentration bei den Zellen der Linie PaTu8902 eingesetzt wurde. In den Nierenkarzinomzellen ClearCa-2 stellte das XIAP einen Hauptgrund für deren beschriebene TRAIL-Resistenz dar (STEVENS ET AL., 2014). Zu Beginn dieser Arbeit wurden im Vergleich zu den ClearCa-2-Zellen in den Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 höhere Expressions-level von XIAP detektiert, was möglicherweise deren geringeres Ansprechen auf TRAIL erklären könnte. HINZ ET AL sowie TRAUZOLD ET AL. haben zusätzlich noch herausgefunden, dass die beiden Rezeptoren für TRAIL, TRAIL-R1 und TRAIL-R2, unterschiedlich stark in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien exprimiert werden, was eine Ursache für die Konzentrationsunterschiede der beiden verwendeten Zelllinien sein könnte.

Ferner konnte nach der Behandlung mit den Todesrezeptorliganden TNF α und Fas-Ligand eine stärker ausgeprägte Wirkung auf die Zelllinie HUP-T3 beobachtet werden. Möglicherweise auch hier

durch die unterschiedliche Rezeptor-Expression in den Pankreaskarzinomzellen begründet (TRAUZOLD ET AL., 2003). Sowohl eine Erhöhung der Konzentration von Fas-Ligand als auch eine längere Behandlungsdauer mit TNF α führten lediglich zu einer Reduktion der Zellzahl um maximal 25 % in den Pankreaskarzinomzellen PaTu8902. Somit wurden die Untersuchungen zur Wirkung der Kombinationsbehandlung mit TNF α und Fas-Ligand nur mit den Zellen der Linie HUP-T3 durchgeführt.

4.6.1 Klinische Bedeutung der Kombinationsbehandlung von LBPS03 und LBPS05 mit Fas-Ligand sowie TNF α

Die kombinatorische Behandlung der Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 zeigte sowohl bei der Inkubation von LBPS03 als auch von LBPS05, jeweils mit dem Todesrezeptorliganden Fas-Ligand, eine signifikante Reduktion der Zellzahl, im Vergleich zur Einzelbehandlung mit dem IAP-Antagonisten. So führte die Kombinationsbehandlung der Pankreaskarzinomzellen jeweils zu einer weiteren Abnahme um ungefähr 23 %. Dies könnte in der Hemmung der IAPs durch die IAP-Antagonisten begründet sein, wodurch eine stärkere Induktion der Apoptose durch den Todesrezeptorliganden Fas-Ligand resultieren kann. *In vitro* stellen die Ergebnisse der kombinatorischen Behandlung der neu entwickelten IAP-Antagonisten mit dem Todesrezeptorliganden Fas-Ligand einen vielversprechenden Ansatz dar. Allerdings konnte unter der systemischen Therapie mit rekombinantem Fas-Ligand eine schwere Hepatotoxizität sowie eine unspezifische Fas-Aktivierung beobachtet werden (VILLA-MORALES AND FERNANDEZ-PIQUERAS, 2012). Dagegen zeigte die lokale Applikation von Fas-Ligand einen erfolgsversprechenden Ansatz (RENSING-EHL ET AL., 1995), so dass hier die lokale kombinatorische Behandlung der IAP-Antagonisten mit dem Todesrezeptorliganden Fas-Ligand bei guter Zugänglichkeit und niedrigem Stadium des Pankreaskarzinoms denkbar wäre.

Auch unter der Kombinationsbehandlung von LBPS03 sowie LBPS05 mit jeweils 10 ng/ml *Tumor necrosis factor- α* über 48 Stunden wurde in den Pankreaskarzinomzellen HUP-T3 eine weitere Reduktion der Zellzahl beobachtet. Allerdings stellt auch hier die hohe Toxizität von TNF α in der systemischen Behandlung den limitierenden Faktor dieser Kombinationsbehandlung dar (JOSEPHS ET AL., 2018).

So waren die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen mit den IAP-Antagonisten und Fas-Ligand sowie TNF α *in vitro* als Ansatz für neue Therapiemöglichkeiten des Pankreaskarzinoms zwar vielversprechend, jedoch ist die Toxizität der beiden Todesrezeptorliganden unter der systemischen Therapie relativ hoch. Bei Pankreaskarzinomen mit geringem Stadium sowie guter Zugänglichkeit, könnten möglicherweise Untersuchungen zur lokalen Wirkung der Kombinationsbehandlungen sinnvoll sein.

4.6.2 Signifikante Reduktion der Zellzahl unter der Kombinationsbehandlung mit TRAIL

Der Todesrezeptorligand *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) ist, wie TNF α oder Fas-Ligand, ein Mitglied der TNF-Familie, die durch Interaktion mit ihrem spezifischen Rezeptor in der Lage sind, in Zellen die Apoptose zu induzieren. Im Gegensatz zu den beiden Todesrezeptorliganden Fas-Ligand und TNF α , die eine ausgeprägte Toxizität auf Normalgewebe aufweisen, zeigt TRAIL keine toxische Wirkung auf normale Zellen (ASHKENAZI ET AL., 1999). Das macht diesen Todesrezeptorliganden zu einem interessanten Kombinationspartner mit den neu entwickelten IAP-Antagonisten, da auch hier nur ein geringer Einfluss auf PBMCs und normale Nierenepithelzellen verzeichnet wird (CAROSATI ET AL., 2015; STEVENS ET AL., 2014). Bereits in den Einzelbehandlungen mit TRAIL wurde in der Pankreaskarzinomzelllinie HUP-T3 eine deutliche Reduktion der Zellzahl beobachtet.

Das erhöhte Expressionslevel des *X-linked* IAP in der Zelllinie PaTu8902 könnte eine Erklärung für die höheren Konzentrationen von TRAIL sein, die hier notwendig sind, um eine signifikante Reduktion der Zellzahl zu bewirken. Vermutlich ist das erhöhte XIAP-Level in Nierenkarzinomzellen dafür verantwortlich, dass die ClearCa-2-Zellen resistent gegenüber dem Todesrezeptorliganden TRAIL sind (STEVENS ET AL., 2014). Jedoch bewirkt eine längere Inkubationsdauer eine weitere Abnahme des Zellüberlebens in den Pankreaskarzinomzellen.

Auch die Kombinationsbehandlungen der Zelllinien HUP-T3 und PaTu8902 mit LBPS03 sowie LBPS05 zuzüglich TRAIL zeigten eine verstärkte Wirkung auf das Zellüberleben der Pankreaskarzinomzellen, im Vergleich zu den ClearCa-2-Zellen (STEVENS, 2017). Unter der kombinatorischen Therapie des IAP-Antagonisten LBPS03 mit dem Todesrezeptorliganden TRAIL wurde zusätzlich auch noch eine zeitabhängige Wirkung auf das Zellüberleben beider Pankreaskarzinomzellen beobachtet. Ähnliche Effekte durch die Kombinationsbehandlung eines *small molecules* mit TRAIL wurden 2009 auch von FAKLER UND KOLLEGEN in Jurkat-Zellen nachgewiesen. Mit einer Proliferationsrate von $30,5 \pm 6,4$ % bzw. $34,0 \pm 14,8$ % nach 72 Stunden Inkubation hatte die Dauer der Behandlung bei der kombinatorischen Behandlung von LPBS05 mit TRAIL so gut wie keine Wirkung auf die HUP-T3-Zellzahl. Möglicherweise wäre bei einer Inkubationszeit von 96 Stunden hier noch eine weitere Reduktion der Zellzahl unter der Kombinationsbehandlung zu beobachten.

Interessanterweise gaben die Ergebnisse der Proliferationsanalysen von den Zellen der Linie PaTu8902 unter der Kombinationsbehandlung der IAP-Antagonisten mit dem Todesrezeptorliganden sogar Hinweise auf einen additiven oder möglicherweise synergistischen Effekt nach 48-stündiger Behandlung. TRAUZOLD ET AL. haben in ihren Untersuchungen beobachtet, dass die Zelllinie, die am geringsten auf TRAIL anspricht, die TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 jedoch stärker exprimiert, als eine TRAIL-sensitivere Zelllinie. Die unterschiedliche Rezeptor-Expression könnte die verstärkte Wirkung der kombinatorischen Behandlung auf die

Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 erklären. Unter der kombinatorischen Behandlung der PaTu8902-Zellen mit LBPS03 und TRAIL reduzierte sich deren Zellzahl um $58,2 \pm 4,3$ % und entsprach damit ungefähr der Summe der jeweiligen Einzelbehandlungen (55,8 %). Dies würde für eine additive Wirkung der Kombinationsbehandlung mit LBPS03 und TRAIL nach einer zweitägigen Inkubationsdauer sprechen. Wurden die Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 über 48 Stunden mit LBPS05 und dem Todesliganden behandelt, ergab sich eine Summe der Einzelbehandlungen von 41,8 %. Die kombinatorische Behandlung führte zu einer Abnahme des Zellüberlebens um 59,0 % und war damit noch deutlich stärker ausgeprägt. Hier scheint sich die Wirkung von LBPS05, kombiniert mit dem Todesrezeptorliganden, zu potenzieren und damit hinweisend für einen synergistischen Effekt zu sein. Nach einer Inkubation der Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 für weitere 24 Stunden mit den beiden Kombinationsbehandlungen (LBPS03 und LBPS05 mit jeweils TRAIL), verringert sich die Zellzahl nochmals um ungefähr je 18,0 %. Allerdings konnten hier die Hinweise auf einen additiven beziehungsweise synergistischen Effekt, wie unter der zweitägigen Behandlungsdauer, nicht beobachtet werden.

So scheinen die Beobachtungen, die FINLAY UND KOLLEGEN im Jahr 2014 bezüglich der Sensibilisierung von Tumorzellen für den TRAIL-induzierten Zelltod gemacht haben, teilweise auch auf die hier verwendeten Zelllinien zuzutreffen. In beiden Pankreaskarzinomzelllinien HUP-T3 und PaTu8902 wurde eine verstärkte antiproliferative Wirkung durch die Kombination des IAP-Antagonisten mit dem Todesrezeptorliganden TRAIL beobachtet, die mittels Verlängerung der Behandlungsdauer teils noch erhöht werden konnte. In den Pankreaskarzinomzellen PaTu8902 zeigte die Kombinationsbehandlung sogar Hinweise zum einen auf einen additiven Effekt durch die Doppelinkubation von LBPS03 mit TRAIL, zum anderen auf eine synergistische Wirkung nach der Behandlung der PaTu8902-Zellen mit LBPS05 und TRAIL. Der stärkere Einfluss der Zweifachtherapie der IAP-Antagonisten mit TRAIL auf die PaTu8902-Zellen könnte für eine vermehrte Expression der spezifischen Rezeptoren auf deren Zelloberfläche sprechen, das bereits in anderen Pankreaskarzinomzellen beobachtet wurde (TRAUZOLD ET AL., 2003). In den Arbeiten von N. VAN DEN HÖFEL und J. STEVENS ergaben sich Hinweise, dass durch die Behandlung mit LBPS05 eine andere Form des Zelltodes induziert wurde (STEVENS, 2017). In der Kombination mit dem Todesrezeptorliganden TRAIL würden somit zwei verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden und könnte damit eine Erklärung für den stärkeren Einfluss von LBPS05 mit TRAIL auf das Zellüberleben beider Pankreaskarzinomzellen sein.

Vergleicht man die unterschiedlichen Kombinationsbehandlungen dieser Arbeit, die IAP-Antagonisten zusammen mit einem Zytostatikum oder dem Survivin-Inhibitor YM15 oder einem Liganden der TNF-Familie, so scheinen zwei Kombinationspartner vielversprechend zu sein. Auf der einen Seite zeigte die kombinatorische Behandlung mit dem Survivin-Inhibitor in beiden Pankreaskarzinomzelllinien eine deutliche Wirkungsverstärkung und führte in den Zellen der Linie PaTu8902 nach der Inkubation von LBPS05 kombiniert mit YM155 nahezu zu einem additiven

Effekt. Auf der anderen Seite gab es Hinweise, dass die Zellen HUP-T3 und PaTu8902 durch die hier verwendeten IAP-Antagonisten für den Todesrezeptorliganden TRAIL sensibilisiert wurden und auf diesem Wege die Apoptose in den Pankreaskarzinomzellen verstärkt induziert werden kann. Nach einer zweitägigen Behandlungszeit waren in den PaTu8902 durch die Inkubation von LBPS03 mit TRAIL möglicherweise ein additiver Effekt und durch die kombinatorische Behandlung von LBPS05 mit dem Todesrezeptorliganden sogar eine synergistische Wirkung zu beobachten. Hier könnten Untersuchungen mittels Berechnung der Interaktionsindices genaueren Aufschluss über die Wirkung der Kombinationsbehandlungen geben (TALLARIDA, 2002). Zusätzlich macht die geringe toxische Wirkung auf normales Gewebe, TRAIL zu einem vielversprechenden Kombinationspartner für die IAP-Antagonisten und bietet aufgrund der guten kombinatorischen Wirkung Anlass für weitere Untersuchungen zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten gegen das Pankreaskarzinom.

5 Literaturverzeichnis

- AKIROV, A., LAROUCHE, V., ALSHEHRI, S., ASA, S. L. & EZZAT, S. 2019.** Treatment Options for Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancers (Basel)*, 11.
- ALTIERI, D. C. 2010.** Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J*, 430, 199-205.
- ASANUMA, K., MORIAI, R., YAJIMA, T., YAGIHASHI, A., YAMADA, M., KOBAYASHI, D. & WATANABE, N. 2000.** Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. *Japanese journal of cancer research*, 91, 1204-1209.
- ASHKENAZI, A., PAI, R. C., FONG, S., LEUNG, S., LAWRENCE, D. A., MARSTERS, S. A., BLACKIE, C., CHANG, L., MCMURTREY, A. E., HEBERT, A., DEFORGE, L., KOUMENIS, I. L., LEWIS, D., HARRIS, L., BUSSIERE, J., KOEPPEN, H., SHAHROKH, Z. & SCHWALL, R. H. 1999.** Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 104, 155-62.
- ASHKENAZI, R., GENTRY, S. N. & JACKSON, T. L. 2008.** Pathways to tumorigenesis--modeling mutation acquisition in stem cells and their progeny. *Neoplasia*, 10, 1170-82.
- AWASTHI, N., KIRANE, A., SCHWARZ, M. A., TOOMBS, J. E., BREKKEN, R. A. & SCHWARZ, R. E. 2011.** Smac mimetic-derived augmentation of chemotherapeutic response in experimental pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 11, 15.
- BAGNARDI, V., BLANGIARDO, M., LA VECCHIA, C. & CORRAO, G. 2001.** Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health*, 25, 263-70.
- BALMAIN, A., GRAY, J. & PONDER, B. 2003.** The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet*, 33 Suppl, 238-44.
- BENNINGHOFF, A. & DRENCKHAHN, D. 2004.** Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Band 2: Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrine Drüsen, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- BEUG, S. T., CHEUNG, H. H., LACASSE, E. C. & KORNELUK, R. G. 2012.** Modulation of immune signalling by inhibitors of apoptosis. *Trends Immunol*, 33, 535-45.
- BIRNBAUM, M. J., CLEM, R. J. & MILLER, L. K. 1994.** An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol*, 68, 2521-8.
- BRADFORD, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- CAROSATI, E., VAN DEN HOFEL, N., REIF, M., RANDAZZO, G. M., STANITZKI, B., STEVENS, J., GABBERT, H. E., CRUCIANI, G., MANNHOLD, R. & MAHOTKA, C. 2015.** Discovery of Novel, Potent, and Specific Cell-Death Inducers in the Jurkat Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line. *ChemMedChem*, 10, 1700-6.
- CHAI, J., DU, C., WU, J. W., KYIN, S., WANG, X. & SHI, Y. 2000.** Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*, 406, 855-62.

- CHEN, Z., CHEN, J., LIU, H., DONG, W., HUANG, X., YANG, D., HOU, J. & ZHANG, X. 2018.** The SMAC Mimetic APG-1387 Sensitizes Immune-Mediated Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Front Pharmacol*, 9, 1298.
- CHU, L. C., GOGGINS, M. G. & FISHMAN, E. K. 2017.** Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. *Cancer J*, 23, 333-342.
- COHEN, G. M. 1997.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326 (Pt 1), 1-16.
- CROOK, N. E., CLEM, R. J. & MILLER, L. K. 1993.** An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 67, 2168-74.
- DANIAL, N. N. & KORSMEYER, S. J. 2004.** Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205-19.
- DE ALMAGRO, M. C. & VUCIC, D. 2012.** The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Exp Oncol*, 34, 200-11.
- D'HAESE, J., HEINEMANN, V., BELKA, C. & WERNER, J. 2015.** Aktuelle Therapiekonzepte für primär resektable und lokal fortgeschrittene Pankreaskarzinome. *Der Onkologe*, 21, 1032-1043.
- EARNSHAW, W. C., MARTINS, L. M. & KAUFMANN, S. H. 1999.** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, 68, 383-424.
- ECKELMAN, B. P. & SALVESEN, G. S. 2006.** The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem*, 281, 3254-60.
- ECKELMAN, B. P., SALVESEN, G. S. & SCOTT, F. L. 2006.** Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*, 7, 988-94.
- EDINGER, A. L. & THOMPSON, C. B. 2004.** Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current opinion in cell biology*, 16, 663-669.
- ELMORE, S. 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ESCHENBURG, G., EGGERT, A., SCHRAMM, A., LODE, H. N. & HUNSDOERFER, P. 2012.** Smac mimetic LBW242 sensitizes XIAP-overexpressing neuroblastoma cells for TNF-alpha-independent apoptosis. *Cancer Res*, 72, 2645-56.
- ESPOSITO, I., KLEEFF, J., ABIATARI, I., SHI, X., GIESE, N., BERGMANN, F., ROTH, W., FRIESS, H. & SCHIRMACHER, P. 2007.** Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an early event in the progression of pancreatic cancer. *J Clin Pathol*, 60, 885-95.
- FADOK, V. A., BRATTON, D. L., FRASCH, S. C., WARNER, M. L. & HENSON, P. M. 1998.** The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, 5, 551-62.
- FAKLER, M., LOEDER, S., VOGLER, M., SCHNEIDER, K., JEREMIAS, I., DEBATIN, K. M. & FULDA, S. 2009.** Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood*, 113, 1710-22.
- FINLAY, D., VAMOS, M., GONZALEZ-LOPEZ, M., ARDECKY, R. J., GANJI, S. R., YUAN, H., SU, Y., COOLEY, T. R., HAUSER, C. T., WELSH, K., REED, J. C., COSFORD, N. D. & VUORI, K. 2014.** Small-molecule IAP antagonists sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis: roles of XIAP and cIAPs. *Mol Cancer Ther*, 13, 5-15.
- FUENTES-PRIOR, P. & SALVESEN, G. S. 2004.** The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, 384, 201-32.

- FUJINO, M., LI, X. K., KITAZAWA, Y., GUO, L., KAWASAKI, M., FUNESHIMA, N., AMANO, T. & SUZUKI, S. 2002.** Distinct pathways of apoptosis triggered by FTY720, etoposide, and anti-Fas antibody in human T-lymphoma cell line (Jurkat cells). *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 939-45.
- FULDA, S. 2014.** Molecular pathways: targeting death receptors and smac mimetics. *Clin Cancer Res*, 20, 3915-20.
- FULDA, S. 2015a.** Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res*, 21, 5030-6.
- FULDA, S. 2015b.** Smac mimetics as IAP antagonists. *Semin Cell Dev Biol*, 39, 132-8.
- GNONI, A., LICCHETTA, A., SCARPA, A., AZZARITI, A., BRUNETTI, A. E., SIMONE, G., NARDULLI, P., SANTINI, D., AIETA, M., DELCURATOLO, S. & SILVESTRIS, N. 2013.** Carcinogenesis of pancreatic adenocarcinoma: precursor lesions. *Int J Mol Sci*, 14, 19731-62.
- GOBE, G., RUBIN, M., WILLIAMS, G., SAWCZUK, I. & BUTTYAN, R. 2002.** Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest*, 20, 324-32.
- HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000.** The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- HASCHEK, W. M., ROUSSEAU, C. G., WALLIG, M. A., BOLON, B. & OCHOA, R. 2013.** *Haschek and Rousseau's handbook of toxicologic pathology*, Academic Press.
- HASSAN, M., WATARI, H., ABUALMAATY, A., OHBA, Y. & SAKURAGI, N. 2014.** Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014, 150845.
- HENGARTNER, M. O. 2000.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- 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.
- HUANG, P. & PLUNKETT, W. 1995.** Induction of apoptosis by gemcitabine. *Semin Oncol*, 22, 19-25.
- HUNTER, A. M., LACASSE, E. C. & KORNELUK, R. G. 2007.** The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*, 12, 1543-68.
- JIANG, Y., MENG, Q., CHEN, B., SHEN, H., YAN, B. & SUN, B. 2016.** The small-molecule IAP antagonist AT406 inhibits pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 478, 293-299.
- JOSEPHS, S. F., ICHIM, T. E., PRINCE, S. M., KESARI, S., MARINCOLA, F. M., ESCOBEDO, A. R. & JAFRI, A. 2018.** Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J Transl Med*, 16, 242.
- JULIEN, O. & WELLS, J. A. 2017.** Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*, 24, 1380-1389.
- KEMPKENSTEFFEN, C., HINZ, S., CHRISTOPH, F., KOLLERMANN, J., KRAUSE, H., SCHRADER, M., SCHOSTAK, M., MILLER, K. & WEIKERT, S. 2007.** Expression parameters of the inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 in renal cell carcinomas and their prognostic relevance. *Int J Cancer*, 120, 1081-6.

- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- KOJIMA, Y., HAYAKAWA, F., MORISHITA, T., SUGIMOTO, K., MINAMIKAWA, Y., IWASE, M., YAMAMOTO, H., HIRANO, D., IMOTO, N., SHIMADA, K., OKADA, S. & KIYOI, H. 2017.** YM155 induces apoptosis through proteasome-dependent degradation of MCL-1 in primary effusion lymphoma. *Pharmacol Res*, 120, 242-251.
- KREPLER, C., CHUNDURU, S. K., HALLORAN, M. B., HE, X., XIAO, M., VULTUR, A., VILLANUEVA, J., MITSUUCHI, Y., NEIMAN, E. M., BENETATOS, C., NATHANSON, K. L., AMARAVADI, R. K., PEHAMBERGER, H., MCKINLAY, M. & HERLYN, M. 2013.** The novel SMAC mimetic birinapant exhibits potent activity against human melanoma cells. *Clin Cancer Res*, 19, 1784-94.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. 2007.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87, 99-163.
- KYHSE-ANDERSEN, J. 1984.** Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10, 203-9.
- LAEMMLI, U. K. 1970.** Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680-+.
- LIU, B. B. & WANG, W. H. 2011.** Survivin and pancreatic cancer. *World J Clin Oncol*, 2, 164-8.
- LOCKSHIN, R. A. & ZAKERI, Z. 2007.** Cell death in health and disease. *J Cell Mol Med*, 11, 1214-24.
- 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.
- LUGO, A., PEVERI, G., BOSETTI, C., BAGNARDI, V., CRIPPA, A., ORSINI, N., ROTA, M. & GALLUS, S. 2018.** Strong excess risk of pancreatic cancer for low frequency and duration of cigarette smoking: A comprehensive review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 104, 117-126.
- MAISONNEUVE, P., MARSHALL, B. C. & LOWENFELS, A. B. 2007.** Risk of pancreatic cancer in patients with cystic fibrosis. *Gut*, 56, 1327-8.
- MANNHOLD, R., FULDA, S. & CAROSATI, E. 2010.** IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. *Drug Discov Today*, 15, 210-9.
- MCGUIGAN, A., KELLY, P., TURKINGTON, R. C., JONES, C., COLEMAN, H. G. & MCCAIN, R. S. 2018.** Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol*, 24, 4846-4861.
- MICHAUD, D. S. 2004.** Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir*, 59, 99-111.
- MOHAMED, M. S., BISHR, M. K., ALMUTAIRI, F. M. & ALI, A. G. 2017.** Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*, 22, 1487-1509.
- NAIR, P., LU, M., PETERSEN, S. & ASHKENAZI, A. 2014.** Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. *Methods Enzymol*, 544, 99-128.
- NOE, S. & NEU, B. 2015.** Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien (GEP-NEN). *Der Gastroenterologe*, 10, 418-421.

- NUNEZ, G., BENEDICT, M. A., HU, Y. & INOHARA, N. 1998.** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17, 3237-45.
- PROBST, B. L., LIU, L., RAMESH, V., LI, L., SUN, H., MINNA, J. D. & WANG, L. 2010.** Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF-alpha-dependent manner. *Cell Death Differ*, 17, 1645-54.
- RAMP, U., KRIEG, T., CALISKAN, E., MAHOTKA, C., EBERT, T., WILLERS, R., GABBERT, H. E. & GERHARZ, C. D. 2004.** XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. *Hum Pathol*, 35, 1022-8.
- RATHORE, R., MCCALLUM, J. E., VARGHESE, E., FLOREA, A. M. & BUSSELBERG, D. 2017.** Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*, 22, 898-919.
- RENSING-EHL, A., FREI, B., FLURY, B., MATIBA, S., MARIANI, M., WELLER, P., AEBISCHER, P., KAMMER, P. & FONTANA, A. 1995.** Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. *Eur J Immunol*, 25, 2253-2258.
- RICCARDI, C. & NICOLETTI, I. 2006.** Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1, 1458-61.
- ROBERT KOCH-INSTITUT UND DIE GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. 2017.** Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe.
- SALVESEN, G. S. & DUCKETT, C. S. 2002.** IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 401-10.
- SCAFFIDI, C., FULDA, S., SRINIVASAN, A., FRIESEN, C., LI, F., TOMASELLI, K. J., DEBATIN, K. M., KRAMMER, P. H. & PETER, M. E. 1998.** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J*, 17, 1675-87.
- SCOTT, F. L., DENAULT, J. B., RIEDL, S. J., SHIN, H., RENATUS, M. & SALVESEN, G. S. 2005.** XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J*, 24, 645-55.
- SHALINI, S., DORSTYN, L., DAWAR, S. & KUMAR, S. 2015.** Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*, 22, 526-39.
- SILKE, J. & MEIER, P. 2013.** Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5.
- SOBIN, L. H., GOSPODAROWICZ, M. K. & WITTEKIND, C. 2011.** *TNM classification of malignant tumours, Seventh Edition*, John Wiley & Sons.
- SOLARY, E., DUBREZ, L. & EYMIN, B. 1996.** The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Eur Respir J*, 9, 1293-305.
- STEVENS, J. 2017.** *Die Wirkung neuartiger Zelltod-Aktivatoren auf das Nierenzellkarzinom*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität.
- STEVENS, J., CAROSATI, E., RANDAZZO, G. M., MANNHOLD, R., HORSCH, L. D., SCHNEIDER, A., HEIKAUS, S., CRUCIANI, G., GABBERT, H. E. & MAHOTKA, C. 2014.** Novel apoptosis inducers overcome IAP-mediated resistance of the renal cell carcinoma cell line ClearCa-2. *Oncology Research and Treatment*, 37, 23-23.

- SUN, H., NIKOLOVSKA-COLESKA, Z., YANG, C. Y., QIAN, D., LU, J., QIU, S., BAI, L., PENG, Y., CAI, Q. & WANG, S. 2008. Design of small-molecule peptidic and nonpeptidic Smac mimetics. *Acc Chem Res*, 41, 1264-77.
- SUN, Q., ZHENG, X., ZHANG, L. & YU, J. 2011. Smac modulates chemosensitivity in head and neck cancer cells through the mitochondrial apoptotic pathway. *Clin Cancer Res*, 17, 2361-72.
- TALLARIDA, R. J. 2002. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*, 98, 163-8.
- TAO, Y. F., LU, J., DU, X. J., SUN, L. C., ZHAO, X., PENG, L., CAO, L., XIAO, P. F., PANG, L., WU, D., WANG, N., FENG, X., LI, Y. H., NI, J., WANG, J. & PAN, J. 2012. Survivin selective inhibitor YM155 induce apoptosis in SK-NEP-1 Wilms tumor cells. *BMC Cancer*, 12, 619.
- TAYLOR, R. C., CULLEN, S. P. & MARTIN, S. J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 231-41.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 4350-4.
- TRAUZOLD, A., SCHMIEDEL, S., RODER, C., TAMS, C., CHRISTGEN, M., OESTERN, S., ARLT, A., WESTPHAL, S., KAPISCHKE, M., UNGEFROREN, H. & KALTHOFF, H. 2003. Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells. *Br J Cancer*, 89, 1714-21.
- TUMMERS, B. & GREEN, D. R. 2017. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*, 277, 76-89.
- VASUDEVAN, D. & RYOO, H. D. 2015. Regulation of Cell Death by IAPs and Their Antagonists. *Curr Top Dev Biol*, 114, 185-208.
- VILLA-MORALES, M. & FERNANDEZ-PIQUERAS, J. 2012. Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16, 85-101.
- VOGLER, M., WALCZAK, H., STADEL, D., HAAS, T. L., GENZE, F., JOVANOVIĆ, M., BHANOT, U., HASEL, C., MOLLER, P., GSCHWEND, J. E., SIMMET, T., DEBATIN, K. M. & FULDA, S. 2009. Small molecule XIAP inhibitors enhance TRAIL-induced apoptosis and antitumor activity in preclinical models of pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 69, 2425-34.
- VUCIC, D. & FAIRBROTHER, W. J. 2007. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 5995-6000.
- WANG, C., ZHANG, F., CAO, Y., ZHANG, M., WANG, A., XU, M., SU, M., ZHANG, M. & ZHUGE, Y. 2016. Etoposide Induces Apoptosis in Activated Human Hepatic Stellate Cells via ER Stress. *Sci Rep*, 6, 34330.
- WANG, J. & LI, W. 2014. Discovery of novel second mitochondria-derived activator of caspase mimetics as selective inhibitor of apoptosis protein inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 349, 319-29.
- WARSHAW, A. L. & FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C. 1992. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med*, 326, 455-65.
- WELSH, K., MILUTINOVIC, S., ARDECKY, R. J., GONZALEZ-LOPEZ, M., GANJI, S. R., TERIETE, P., FINLAY, D., RIEDL, S., MATSUZAWA, S., PINILLA, C., HOUGHTEN, R., VUORI, K., REED, J. C. & COSFORD, N. D. 2016. Characterization of Potent SMAC Mimetics that Sensitize Cancer Cells to TNF Family-Induced Apoptosis. *PLoS One*, 11, e0161952.

- WESTPHAL, S. & KALTHOFF, H. 2003.** Apoptosis: Targets in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer*, 2, 6.
- WHITCOMB, D. C. 2004.** Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G315-9.
- ZHANG, C., CAO, X., GEI, Y., WANG, Y., LIU, G., CHENG, G. & LIU, Q. 2015.** Silencing of survivin by YM155 induces apoptosis and growth arrest in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*, 10, 1627-1631.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. I. Esposito, für die Aufnahme in ihr Institut und die Möglichkeit hier meine Doktorarbeit anzufertigen.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. C. Mahotka. Er stand mir die gesamte Zeit im Labor und während des Schreibprozesses als Doktorvater sowie Betreuer unterstützend zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen. Im Rahmen seiner Arbeitsgruppe konnte ich mich mit einem spannenden Forschungsthema befassen und habe die praktische Tätigkeit im Labor kennengelernt.

Eine fantastische Zeit hatte ich mit meinen Laborkollegen, die ich zu jedem Zeitpunkt mit Fragen löchern konnte oder die mich bei der praktischen Umsetzung meiner Experimente immer tatkräftig unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich mich bei Natascha bedanken, die mich in die Welt der Zellkultur und der Western Blots eingeführt hat. Ohne dich hätten die Versuche nicht so gut geklappt und ich hätte nicht so eine Freude an der Laborzeit gehabt. Ich freue mich in dir eine tolle Freundin gefunden zu haben.

Am Ende gilt mein größter Dank meinen Eltern, meinen beiden Onkels und meiner guten Freundin Nicole. Ihr habt mich das gesamte Studium und in jeder Lebenslage begleitet und unterstützt. Ich hatte immer das Gefühl, dass ich stets auf euch zählen kann und ihr auch in schwierigen Zeiten für mich da seid. Ohne eure großartige Unterstützung und eure lauschenden Ohren wäre mir das Studium und die Doktorarbeit nicht in dieser Form möglich gewesen.

Und Nicole, du hast meine gesamte Studienzeit großartig gemacht. Wir hatten gemeinsam rauchende Köpfe und haben geflucht, aber ich habe in dir eine wirklich wunderbare Freundin gefunden.