

Universitätsklinik Ulm  
Chirurgie I, Abteilung für Viszeral - und Transplantationschirurgie  
Ärztliche Leitung: Frau Prof. Dr. D. Henne-Bruns

***In vitro* Untersuchung der Expression  
von CK1 $\delta$  sowie deren funktioneller  
Bedeutung für Pankreaskarzinomzellen**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

vorgelegt von

**Claas Brockschmidt  
aus Hamburg**

2004

**Amtierender Dekan: Prof. Dr. Reinhard Marre**

**1. Berichterstatter: PD Dr. Uwe Knippschild**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhold Schirmbeck**

**Tag der Promotion: 08.07.2004**

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Dissertation, Universität Ulm, 2004

ISBN 3-89820-735-8

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

This document is protected by **copyright**.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of Mensch & Buch Verlag.

© **Mensch & Buch Verlag** • Nordendstr. 75 • 13156 Berlin • 030 - 45 49 48 66  
<http://www.menschundbuch.de> • [info@menschundbuch.de](mailto:info@menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungen .....	5
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>9</b>
Problemstellung .....	19
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Chemikalien .....</b>	<b>21</b>
2.1.1 Käufliche Chemikalien .....	21
2.1.2 Käufliche Kits.....	22
<b>2.2 Antikörper.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Zelllinien.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Zellkulturtechniken .....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Kultivierung von Zellen.....	24
2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	24
2.4.3 Zellzählung .....	25
<b>2.5 Phasenkontrastmikroskopie .....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Immunzytochemie.....</b>	<b>26</b>
2.6.1 Präparation von Zellen für Immunfluoreszenzanalysen .....	26
<b>2.7 Durchflusszytometrie.....</b>	<b>27</b>
<b>2.8 Proteinanalytische Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.8.1 Herstellung von zellfreien Proteinextrakten .....	27
2.8.2 Quantifizierung der Proteinmenge.....	28
2.8.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	28
2.8.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen.....	29
<b>2.9 Nachweis von Proteinen .....</b>	<b>29</b>
2.9.1 Immundetektion (Western Blot Analyse).....	29
<b>2.10 RNA-Extraktion.....</b>	<b>30</b>
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Subzelluläre Lokalisation von CK1<math>\delta</math> in Pankreaskarzinomzellen.....</b>	<b>31</b>
3.1.1 Assoziation von CK1 $\delta$ mit Zentrosomen in Pankreaskarzinomzelllinien.....	32
3.1.2 Detektion von CK1 $\delta$ und Mikrotubuli in Pankreaskarzinomzelllinien.....	34
<b>3.2 Bestimmung der CK1<math>\delta</math>-Expressionslevel auf mRNA- und Proteinebene in etablierten Pankreaskarzinomzelllinien .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3 Auswirkungen von IC261 und klassischen Spindelgiften allein und in Kombination auf das Wachstum etablierter Pankreaskarzinomzelllinien.....</b>	<b>37</b>

3.3.1	Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von unbehandelten und behandelten (IC261, Nocodazol, Taxol allein oder in Kombination) PancTu1 und Panc89 Zellen .....	37
<b>3.4</b>	<b>Morphologische Veränderungen von Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit dem Kinaseinhibitor IC261, mit den Spindelgiften Nocodazol und Taxol, sowie der Kombination dieser Substanzen.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5</b>	<b>Auswirkung der IC261 Behandlung auf den Zellzyklus von Pankreastumorzelllinien.....</b>	<b>42</b>
<b>3.6</b>	<b>Charakterisierungen der Auswirkungen der Behandlung der verschiedenen Pankreastumorzelllinien mit IC261 und Spindelgiften einzeln bzw. in Kombination.....</b>	<b>46</b>
3.6.1	Zelllinienspezifische Unterschiede nach IC261, Nocodazol, Taxol und Kombinationsbehandlung am Beispiel der BXPc3 und Panc89 Zellen .....	49
<b>3.7</b>	<b>Einfluss von IC261 auf die Zentrosomenzahl in Pankreaskarzinomzellen.....</b>	<b>53</b>
<b>3.8</b>	<b>Bestimmung der RNA Expressionslevel von CK1<math>\delta</math> in Pankreaskarzinomzelllinien nach Behandlung mit IC261, Nocodazol und Taxol.....</b>	<b>58</b>
<b>3.9</b>	<b>Einfluss von IC261, Nocodazol und Taxol allein und in Kombination auf die Expression des Tumorsuppressorproteins p53 bei etablierten Pankreaskarzinomzelllinien .....</b>	<b>60</b>
3.9.1	Expression von p53 in etablierten Pankreaskarzinomzelllinien.....	60
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Expressionslevel von CK1<math>\delta</math> in Pankreaskarzinomzelllinien unterscheiden sich auf RNA und Proteinebene .....</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>CK1<math>\delta</math> assoziiert mit Membranstrukturen und Zentrosomen .....</b>	<b>65</b>
<b>4.3</b>	<b>IC261 inhibiert das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen und führt zu Veränderungen im Zellzyklus .....</b>	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>Durch Kombinationsbehandlung von IC261 und Nocodazol werden unerwünschte Nebenwirkungen wie Polyploidie in Pankreaskarzinomzelllinien reduziert.....</b>	<b>67</b>
<b>4.5</b>	<b>Expression von p53 in unbehandelten und mit IC261 und Spindelgiften behandelten Pankreaskarzinomzelllinien.....</b>	<b>68</b>
<b>4.6</b>	<b>Die Inhibition von CK1<math>\delta</math> durch IC261 verhindert die Zellteilung und führt zu Zentrosomenamplifikationen.....</b>	<b>69</b>
<b>4.7</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>70</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>82</b>

## Abkürzungen

A	Acetylierung
A	Arterie
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinnchinoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CIS	Carcinoma in situ
CK	Casein Kinase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol
DBD	DNA-Bindung
DEL	Verlust eines Basenpaars
d.h.	das heißt
DMEM	'Dulbecco's Modified Eagle's' Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPCA	duktales Pankreaskarzinom
Dr.	Doktor
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure

## Abkürzungen

---

EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl-äther)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatische Retikulum
et al.	und andere
Fa.	Firma
FACS	Durchflusszytometer
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
5-FU	5-Fluor Uracil
GAPDH	Glycerinaldehyd 3 Phosphat Dehydrogenat
G	Grading
Glu	Glutamin
g	Schwerkraft
g	Gramm
HCL	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
HD	homozygoter Verlust
HPI	Heinrich-Pette-Institut
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IC261	3-[(2,4,6-Trimethoxyphenyl)methylidene]- indolin-2-one
IC50	Konzentration in vitro, bei der die Proliferation um 50 % gehemmt wird
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
k	Kilo
kD	Kilodalton
KD	Kinasedomäne
KHD	Kinesin homologe Sequenz
Leu	Leucin
LOH	Verlust der Heterozygotenität

## Abkürzungen

---

Lys	Lysin
μ	mikro
m	milli
m	Meter
M	molar (mol/l)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
Met	Methylierung
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	‘messenger’ Ribonukleinsäure
M	Mol
Met	Methylierung
MW	Molekulargewicht
N	Stickstoff
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NLS	Kerntransportsignal
NOC	Nocodazol
NP40	Nonidet P40
P	Phosphat
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PanIn	Pankreatische intrepitheliale Neoplasien
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PM	Punktmutation
PVA	Polyvinyl Alkohol
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
Phe	Phenylalanin
R	Resektionsrand
RDB	Regulation der DNA-Bindung

## Abkürzungen

---

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Sumoylierung
sek	Sekunde
Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
sw	schwarz-weiß
TA	Transaktivierung
TAX	Taxol
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TET	Tetramerisierung
TGN	trans-Golgi Netzwerk
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WB	„Western Blot“
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

## 1. Einleitung

Die Bedeutung des Pankreaskarzinoms nimmt auf Grund seiner hohen Letalität, der in den letzten 20 Jahren stetig steigenden Inzidenzrate, der Aggressivität des Tumors mit seiner äußerst schlechten Prognose und den fehlenden konservativen Behandlungsoptionen zu (POUR, 1991; TREDE, 1987; YAMAMOTO ET AL., 1996). Trotz seiner niedrigen Inzidenz von 35 Neuerkrankungen auf 100000 Einwohner stellt es die fünfthäufigste Todesursache bei Tumorpatienten in Deutschland dar. Erst spät auftretende Symptome der Erkrankung, sowie erschwerte diagnostische und therapeutische Möglichkeiten, die auf Grund der anatomischen Lage des Pankreas mit enger Beziehung zu großen Gefäßen (Pfortader, Arteria mesenterica superior, Vena mesenterica superior, A. hepatica, Truncus coeliacus), Nerven- und Lymphbahnen gegeben sind, verlangen neue Diagnose- und Therapiekonzepte.

Über 90% der Pankreastumore stellen Adenokarzinome vom duktalem Phänotyp dar (KLOPPEL & MAILLET, 1993). Neuroendokrine Tumore und Azinuszellkarzinome repräsentieren ca. 2-5% aller Pankreastumore. Die muzinös, nicht zystischen Karzinome, das Siegelringkarzinom, das Pankreatoblastom, das adenosquamöse Karzinom, sowie eine Anzahl weitere Karzinome werden nur in den seltensten Fällen gefunden (WARSHAW ET AL., 1990).

Nikotin scheint mit einem doppelt erhöhten Risiko für die Entstehung des Pankreaskarzinoms eine entscheidende Noxe zu sein. Die für Alkohol angenommene direkte Beziehung zur Entstehung des Pankreaskarzinoms (GHADIRIAN, SIMARD & BAILLARGEON, 1991) wurde in neueren Studien nicht bestätigt. In diesen wurde nur ein indirekter Zusammenhang nachgewiesen, da Alkohol die Inzidenz der chronischen Pankreatitis erhöht, die mit einer vierfach erhöhten Rate an Pankreaskarzinomen assoziiert ist (WHITCOMB & POGUE-GEILE, 2002).

Aus den epidemiologischen Daten ergibt sich ein doppelt so hohes Risiko für ein Pankreaskarzinom beim männlichen gegenüber dem weiblichen Geschlecht, mit dem Altersgipfel zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr (COOPERMAN ET AL., 2001; COUGHLIN

ET AL., 2000). Diabetiker erkranken im Vergleich zur Normalbevölkerung etwa zweimal so häufig am duktalem Pankreaskarzinom, wobei bislang kein pathomorphologischer Zusammenhang zwischen diesen beiden Erkrankungen nachgewiesen wurde (WAKASUGI, FUNAKOSHI & IGUCHI, 2001).

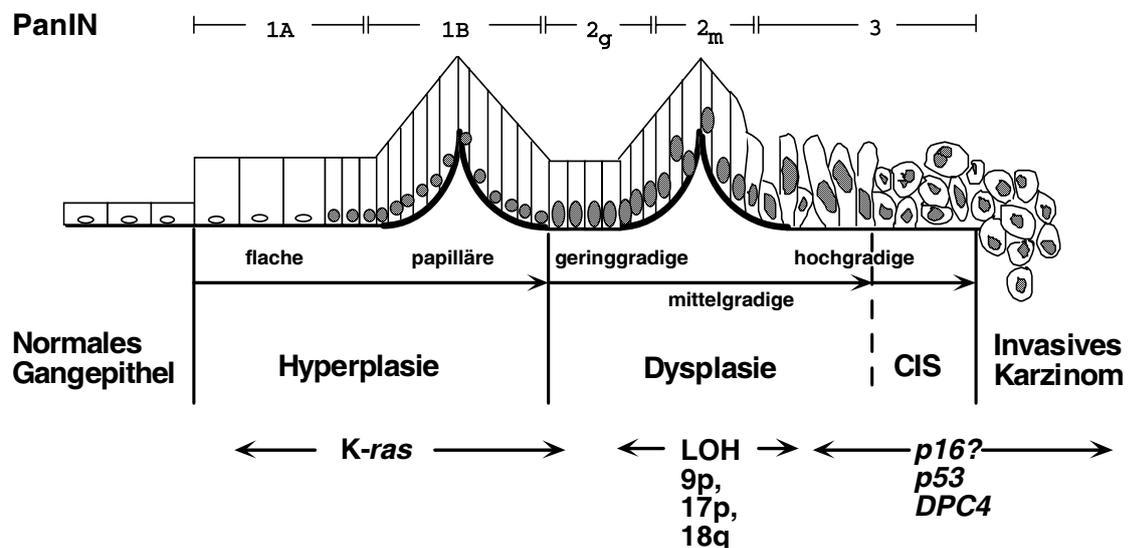
Zur kurativen Behandlung des Pankreaskarzinoms steht bei einer Lokalisation des Tumors in der Kopffregion (75% der Pankreastumoren) zur Zeit ausschließlich die vollständige operative Sanierung durch eine partielle oder pyloruserhaltene partielle Duodenopankreatektomie nach Kausch-Whipple zur Verfügung (GUDJONSSON, 1987). Bei einem Pankreaskorpus- (20%) oder Pankreasschwanzprozess (5%) ist bei gegebenem Sicherheitsabstand eine Pankreaslinksresektion möglich. Ausnahmslos ist jedoch eine R0-Resektion die Voraussetzung für eine kurative Therapie (JONES ET AL., 1999; SPECHT & STINSHOFF, 2001). Ein deutlicher Rückgang der postoperativen Mortalität unter 5% in spezialisierten Pankreaszentren und die 5-Jahres Überlebenszeit von ca. 20 % bei R0-Resezierten ist ein wesentlicher Fortschritt (COOPERMAN ET AL., 2002; WARSHAW & SWANSON, 1988) in der Pankreaskarzinomchirurgie. Neben der R0-Resektion und dem Lymphknotenbefall scheinen, neben vielen anderen Faktoren, für die Prognose genomische Veränderungen wie der DNA-Gehalt und Polyploidie entscheidend zu sein (BOTTGER ET AL., 1994; NIEDERGETHMANN ET AL., 2002; WEGER ET AL., 1992; YABROFF & MANDELBLATT, 1999).

Trotz intensiven Bemühungen spricht das Pankreaskarzinom weder auf Strahlentherapie an (KLINKENBIJL ET AL., 1999; PERMERT ET AL., 2001; WANEBO ET AL., 2000), noch konnte eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit durch Chemotherapiekonzepte mit Gemcitabine oder 5-FU in Kombination mit Interleukin2 gezeigt werden (STAIB, LINK & BEGER, 1999; YEO & CAMERON, 1999).

Mangels geeigneter Screeningverfahren und fehlender bildgebender Methoden zur Erkennung von Pankreaskarzinomen in der Frühphase, geht das Bestreben dahin, neue diagnostische Strategien zur Identifizierung von genetischen Risikofaktoren zu entwickeln. Für diese Untersuchungen eignen sich unter anderem Familien mit hereditärer Pankreatitis, da bei ihnen ein Entartungsrisiko von ca. 20 % besteht (MANU, BUCKELS & BRAMHALL, 2000).

Für die Pankreaskarzinomentwicklung gilt ebenso wie für die meisten anderen humanen Neoplasien, dass sich epitheliale Tumore in der Regel über mehrere Vorläuferstadien entwickeln.

Um die “hyperplastischen“ Veränderungen in Pankreaszellen, die vom flach muzinösem bis zum papillär-muzinösem Typ reichen (CUBILLA & FITZGERALD, 1976; LONGNECKER, 1994), besser vergleichen zu können, ist die Nomenklatur der “Pankreatischen Intraepithelialen Neoplasie“ (PanIN) entwickelt worden (HRUBAN, WILENTZ & KERN, 2000). In dieser werden die unterschiedlichen Progressionsstufen in drei Stadien unterteilt. Diese sind definiert als benigne Hyperplasie (PanIN 1), mittelgradige Dysplasie (PanIN 2) und als nicht invasiv wachsendes Karzinom (PanIN 3).



**Abbildung 1:** Molekulares Progressionsmodell der Pankreaskarzinogenese; LOH= Verlust der Heterozygotenität. Es zeigt die Progressionsstufen der Pankreatischen intraepithelialen Neoplasie (PanIN) in drei Stadien unterteilt. Diese sind definiert als benigne Hyperplasie (PanIN 1), mittelgradige Dysplasie (PanIN 2) und als nicht invasiv wachsendes Karzinom (PanIN 3).

Im Rahmen der molekulargenetischen Charakterisierung der Vorläuferläsionen wurde gezielt nach Genen gesucht, deren Expression in der Tumorgenese des Pankreas verändert sind. Dabei wurden Veränderungen in den Genen von K-ras, p16, p53 und DPC4 nachgewiesen. Mutationen von K-ras wurden in allen Formen der dysplastischen Entwicklung gefunden. Das Ziel dieser Analysen ist es, Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms auf molekularer Ebene zu erkennen, um neue Marker für eine

Frühdiagnose identifizieren zu können und damit die Chancen auf einen Therapieerfolg zu erhöhen.

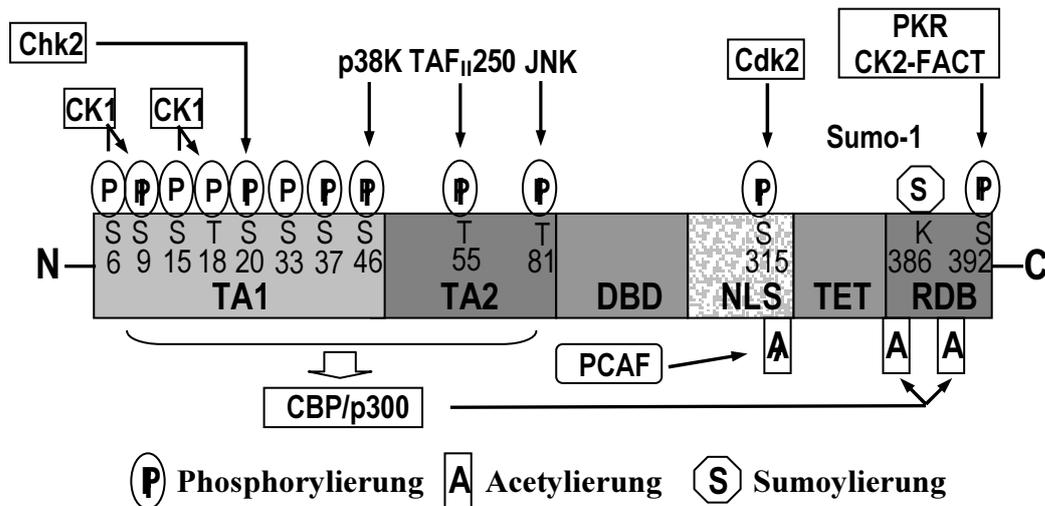
Es wurde gezeigt, dass aberrante Proteinexpressionsmuster der Tumorsuppressorgene p53 und DPC4 ausschließlich in PanIN 3 bzw. Carcinoma-in-situ Läsionen auftreten (WILENTZ ET AL., 2000). Aus dieser Datenlage lässt sich schließen, dass die muzinösen und papillären Gangläsionen als Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms zu werten sind. Dabei stellen aktivierte K-ras Mutationen eine sehr frühe, die chromosomalen Deletionen von 9p, 17p und 18q eine intermediäre und die biallelische Inaktivierung von p53 und DPC4 eine späte Veränderung dar (LUTTGES ET AL., 2001).

Daher ist p53 nicht als Frühmarker zur Erkennung des duktales Pankreaskarzinoms geeignet. Dennoch muss p53 als "Wächter des Genoms" bei der Entstehung des Pankreaskarzinoms besonders beachtet werden, denn Mutationen von p53 stellen mit annähernd 50% die häufigsten genetischen Abnormalitäten in humanen Tumoren dar (GREENBLATT ET AL., 1994).

Es ist davon auszugehen, dass ca. 90% aller Pankreaskarzinome Veränderungen der p53 Expression bzw. Funktion aufweisen (GHANEH ET AL., 2002).

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Stress-Situationen aktiviert wird. Durch p53 werden dann spezifische Zielgene aktiviert, was entweder zu einem Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führen kann. Die N-terminale Domäne von p53 ist für die Transaktivierung verantwortlich, in der C-terminalen Domäne sind wichtige regulatorische Funktionen wie die Oligomerisierung verankert. Die DNA-Bindungsstelle ist in der zentralen Domäne lokalisiert (siehe Abbildung 2). Ca 2/3 aller bekannten Mutationen liegen in der zentralen Region, davon über 50% an wenigen Stellen, den sogenannten „hot-spot-Mutationen“. Dieses spricht für die funktionelle Bedeutung dieser Region (FUKASAWA & VANDE WOUDE, 1997).

Aber auch posttranslationale Modifikationen spielen für die Regulation der Funktionen von p53 eine wichtige Rolle. Durch Acetylierung, Glykosylierung, Sumoylierung und Phosphorylierung kann p53 modifiziert werden. Dabei können durch reversible Phosphorylierung N- und C-terminaler Phosphorylierungsstellen die einzelnen Funktionen entscheidend moduliert werden (HUPP, LANE & BALL, 2000).

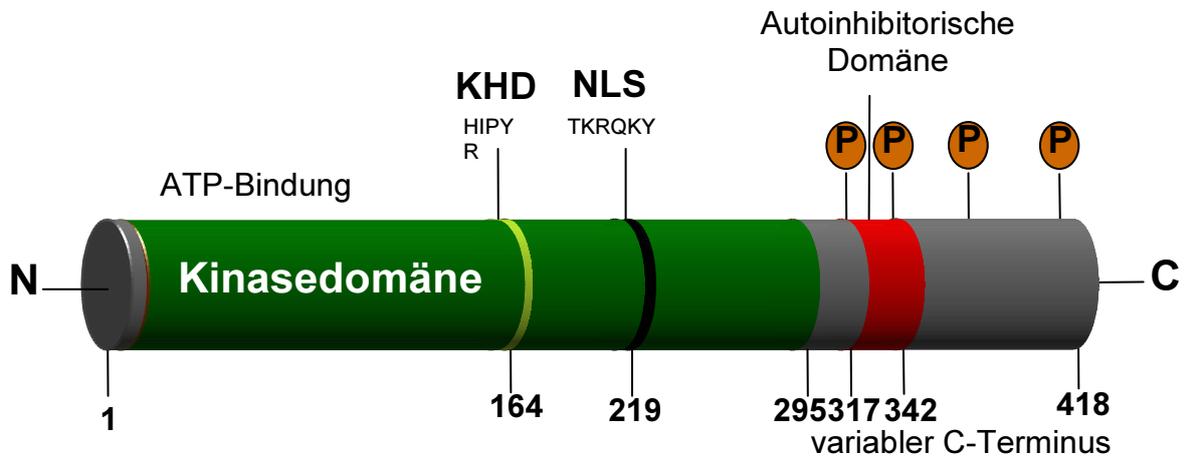


**Abb. 2: Funktionale Domänen und posttranslationale Modifikationen von humanem p53.** Funktionelle Regionen von p53 (nicht maßstabsgetreu): Transaktivierung (TA), Sequenzspezifische DNA-Bindung (DBD), nukleäre Lokalisationssignale (NLS), Tetramerisierung (TET), Regulation der DNA-Bindung (RDB). Die posttranslationalen Modifikationen und die entsprechenden Enzyme sind angegeben (angelehnt an Apella und Andersen, 2001).

Es vermehren sich die Hinweise, dass der Phosphorylierungsstatus N-terminaler Phosphorylierungsstellen von p53 die Zentrosomen-assoziierten Funktionen von p53 beeinflusst. p53 spielt sowohl bei der Initiation der Zentrosomenduplikation als auch bei der Verhinderung der Reduplikation der Zentrosome eine wichtige Rolle. Der Funktionsverlust von p53 führt zur Amplifikation der Zentrosomen, was zur chromosomalen Instabilität, Aneuploidie und letztendlich zur Entstehung von Tumoren führen kann (HARUKI ET AL., 2001; TARAPORE ET AL., 2001). Solche strukturellen und nominalen zentrosomalen Veränderungen wurden bereits in frühen Stadien der Pankreastumorgenese nachgewiesen (MIZUMOTO & TANAKA, 2002; SATO ET AL., 1999; SHONO ET AL., 2001). Obwohl genetische Veränderungen des Tumorsuppressorgens p53 erst später in der Tumorgenese des Pankreas auftreten, wurden schon in frühen Stadien Alterationen des Phosphorylierungsstatus des N-Terminus von p53 nachgewiesen. Dies könnte zu den

beobachteten frühen Veränderungen der Zentrosomenstruktur und Funktion in der Genese des Pankreaskarzinoms beitragen.

Änderungen im Phosphorylierungsstatus des N-Terminus von p53 treten besonders am Übergang von der G2-Phase zur Mitose und in Stresssituationen auf. Einige dieser N-terminalen Phosphorylierungsstellen, die für die zentrosomale Funktionen von p53 wichtig sein könnten, werden *in vitro* und *in vivo* von den Casein Kinase 1 Isoformen delta (CKI  $\delta$ ) und epsilon (CK1 $\epsilon$ ) phosphoryliert (Ciciarello et al., 2001; Tarapore et al., 2001). Es wird angenommen, dass die unter anderem durch CK1 $\delta$  hervorgerufene Veränderung im Phosphorylierungsstatus von p53 am Übergang von der G2-Phase zur Mitose eine besondere Rolle für die zentrosomalen Funktionen von p53 spielt (LANNI & JACKS, 1998). Mitglieder der Casein Kinase 1-Familie sind Serin/Threonin-spezifische Proteinkinasen, die in allen eukaryontischen Zellen vorkommen. Ihr Molekulargewicht variiert zwischen 37 und 62kD (GRAVES ET AL., 1993; GROSS & ANDERSON, 1998). Die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ , sowie Spleißvarianten dieser Isoformen weisen einen hohen Grad an Homologie innerhalb ihrer knapp 290 Aminosäuren langen Kinasedomäne auf, unterscheiden sich aber signifikant in den Sequenzen ihrer C-Termini (FISH ET AL., 1995; GRAVES ET AL., 1993; ROWLES ET AL., 1991; ZHAI ET AL., 1995). Besonders die CK1 Isoformen  $\delta$  und  $\epsilon$ , die die größte Homologie innerhalb der Familie der Casein Kinase 1 aufweisen (97% im Bereich der Kinasedomäne und 53% in der C-terminalen Domäne) sind intensiv untersucht worden (GROSS & ANDERSON, 1998). Die funktionellen Domänen sind in der Abbildung 3 am Beispiel der Casein Kinase 1 $\delta$  dargestellt.

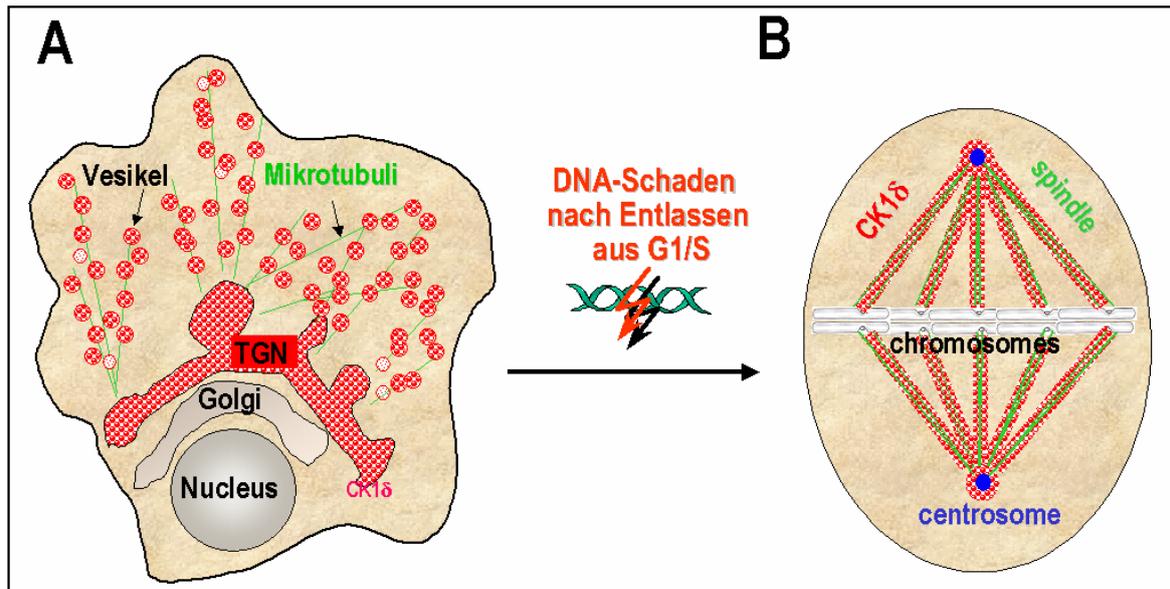


**Abbildung 3: Domänenstruktur von CK1δ (*rattus norvegicus*)** Kinasedomäne (grün), variabler C-Terminus (grau), autoinhibitorische Domäne (rot), KHD: Kinesin homologe Sequenz; NLS = Kerntransportsignal (angelehnt an Habilitationsschrift, Knippschild, Hamburg 2000)

CK1δ enthält ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) (ROWLES ET AL., 1991) und eine Kinesin homologe Sequenz (KHD) (ROOF, MELUH & ROSE, 1992; XU ET AL., 1995), die für die Interaktion mit Mikrotubuli wichtig zu sein scheint. Bisher wurden zahlreiche Proteine identifiziert, die von Mitgliedern der Casein Kinase 1-Familie phosphoryliert werden können. Zu ihnen gehören Komponenten der Transkriptionsmaschinerie wie die RNA-Polymerasen I und II, CREM, p53, virale Proteine, wie das SV40 T-Antigen (DAHMUS, 1981), Zytoskelettproteine wie Spectrin, Myosin, Troponin und Tau (SIMKOWSKI & TAO, 1980; SINGH ET AL., 1994), sowie Rezeptoren, wie die  $\beta$ -Untereinheit des Insulin-Rezeptors, der Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ -Rezeptor oder der Muskarin M3-Rezeptor (DARNAY, SINGH & AGGARWAL, 1997; RAPUANO & ROSEN, 1991; TOBIN ET AL., 1997).

Aufgrund dieser zahlreichen Substrate spielen Mitglieder der Casein Kinase I Familie in verschiedenen physiologischen Prozessen eine Rolle. Sie sind an der Regulation von Membranprozessen, wie der Abschnürung von Vesikeln vom ER, dem Golgi-Apparat und dem Trans- Golgi-Netzwerk sowie an dem Transport von Vesikeln entlang der Mikrotubuli beteiligt. Des Weiteren haben sie regulatorische Funktionen im Zentrosomenzyklus und in

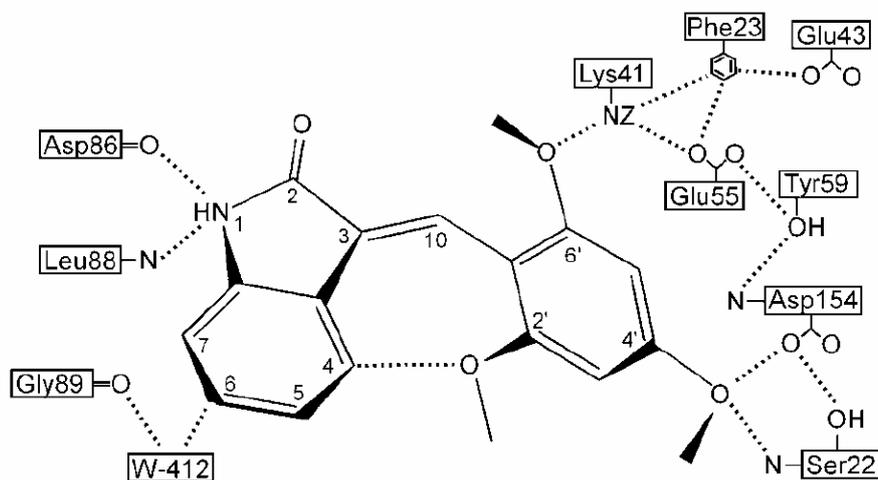
der Spindeldynamik und spielen somit eine wichtige Rolle in der Chromosomensegregation (BEHREND ET AL., 2000A; BEHREND ET AL., 2000B) (siehe auch Abbildung 4).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der subzellulären Lokalisation von CK1 $\delta$  in einer Interphasezelle (links) und einer mitotischen Zelle (rechts).** In der Interphase ist CK1 $\delta$  mit dem Trans Golgi Netzwerk (TGN) und vesikulären, entlang der Mikrotubuli organisierten Strukturen assoziiert. In Affinitätsstudien konnte darüber hinaus eine direkte Bindung an Tubulin nachgewiesen werden. In der Mitose bleibt die Assoziation mit Tubulin bestehen: CK1 $\delta$  ist entlang der Spindelfasern und am Zentrosom lokalisiert. Diese Lokalisation scheint allerdings im Zusammenhang mit zellulären Stress-Situationen zu stehen: Erst nach Schädigung der DNA in der vorangehenden S-Phase findet sich CK1 $\delta$  an der mitotischen Spindel. Demnach kann aus der Verteilung von CK1 $\delta$  in der Zelle eine duale Funktion vermutet werden. In der Interphase ist CK1 $\delta$  möglicherweise an Membrantransportprozessen, wie der Abschnürung von Vesikeln vom TGN und deren Transport entlang von Mikrotubuli beteiligt. In der Mitose kommt CK1 $\delta$  eine Funktion bei der Chromosomensegregation zu (angelehnt an Habilitationsschrift Knippschild, Hamburg, 2000).

Über die Regulation der Casein Kinasen 1 ist bisher wenig bekannt. Liu und Mitarbeiter (LIU ET AL., 2001) zeigten in ihrer Studie, dass über den Glutamatrezeptor Casein Kinase 1 Isoformen aktiviert werden können. Die Inhibition von CK1  $\delta$  und  $\epsilon$  führt *in vivo* zu einem

fehlerhaften Aufbau des mitotischen Spindelapparates. Durch diese Spindelschädigung arretieren Zellen in der Mitose und können sich nicht mehr teilen. In *in vivo* und *in vitro* lassen sich die Aktivitäten der Caseinkinasen  $\delta$  und  $\epsilon$  mit dem Kinaseinhibitor IC261 hemmen. IC261 ist ein ATP-Analogon, welches nach Kopplung an die ATP-Bindungsstelle zu einer Konformationsänderung der Kinase führt (siehe Abbildung 5 und 6). Durch diese Konformationsänderung wird die Dissoziationsgeschwindigkeit des IC261 vom aktiven Zentrum im Vergleich zu ATP herabgesetzt (LIU ET AL., 2001). Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der CK1 $\delta$  und  $\epsilon$  Isoformen bereits bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  zu 50% gehemmt wurde. Da die  $\text{IC}_{50}$  von CK1 $\alpha$  bei  $16\mu\text{M}$  liegt und andere Kinasen wie z.B. die Proteinkinase A oder die Cyklin-abhängige Kinase CDK2 erst bei einer Konzentration von  $100\mu\text{M}$  signifikant inhibiert werden, kann IC261 als spezifischer Inhibitor für CK1  $\delta$  und  $\epsilon$  bezeichnet werden (MASHHOON ET AL., 2000). Da IC261 bei neutralem pH-Wert ungeladen ist und ungehindert durch Membranen diffundieren kann, sind submikromolare Konzentrationen von IC261 *in vivo* in der Lage CK1 $\delta$  und  $\epsilon$  zu inhibieren.



**Abb.5** : Schematische Darstellung der Bindung des Inhibitors IC261 an die ATP-Bindungsstelle von CK1 (MASHHOON ET AL., 2000).

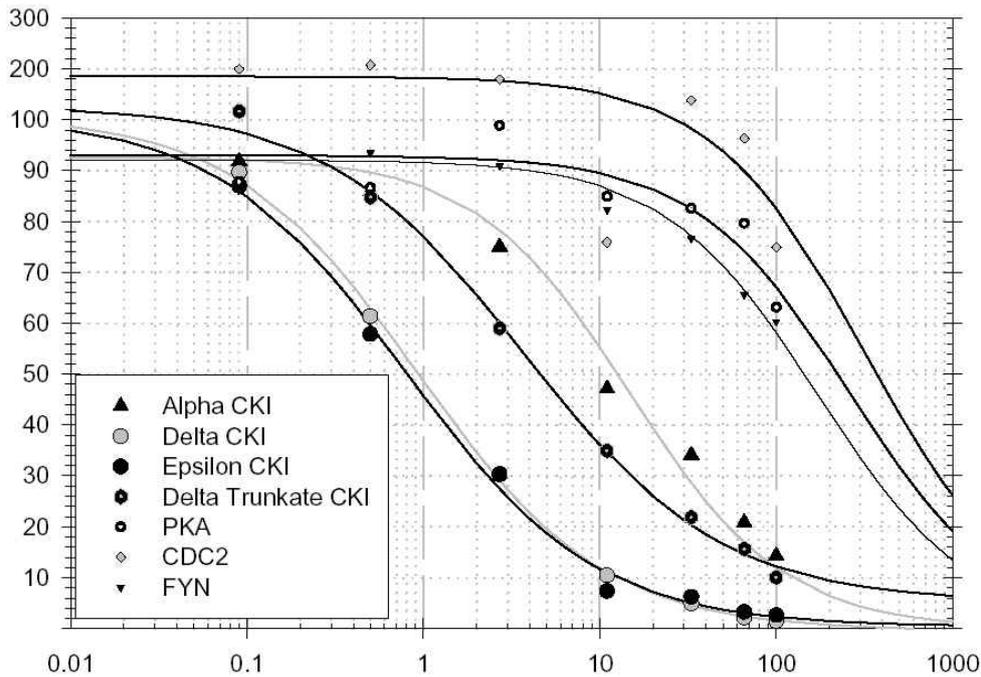


Abb. 6: Wirkung von IC261 auf die Aktivität verschiedener Kinasen *in vitro* (MASHHOON ET AL., 2000).

Um selektiv Tumorzellen zu schädigen, zielen verschiedene Strategien der Krebstherapie auf die Beeinflussung des Spindelapparates. Hierbei werden vor allem Zellen mit hoher Mitoserate geschädigt, wie beispielsweise sich schnell teilende Tumorzellen. Die bislang bevorzugt eingesetzten klassischen Spindelgifte wie z.B. Nocodazol, Vinblastin, Taxoide, Colchicin oder Vincristin (JORDAN ET AL., 1998) zeigten jedoch in der Therapie des Pankreaskarzinoms keine zufriedenstellenden Effekte.

Taxol ist ein Mikrotubuli-stabilisierendes Spindelgift. Es setzt *in vitro* die kritische Konzentration für die Polymerisation von Tubulin herab und schützt die Mikrotubuli vor depolarisierenden Einflüssen (SCHIFF, FANT & HORWITZ, 1979). Taxolkonzentrationen < 1 μM führen zu einer Veränderung des dynamischen Verhaltens von Mikrotubuli Plus- und Minusenden. Bei Konzentrationen > 1 μM kommt es außerdem zur Erhöhung der Polymerisationsrate. Taxol bindet dabei direkt an die Mikrotubuli im Verhältnis von einem Molekül Taxol pro α/β-Tubulin-Heterodimer. An der Grenze zum benachbarten Protofilament befindet sich die Bindungsstelle am Rande der α/β-Tubulin-Heterodimere

(DERRY, WILSON & JORDAN, 1995). Daher wird angenommen, dass Taxol die Interaktion zwischen den Protofilamenten der Mikrotubuli beeinflusst (FELGNER, FRANK & SCHLIWA, 1996; MICKEY & HOWARD, 1995). Klinische Anwendung findet Taxol derzeit in der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms und des Ovarialkarzinoms.

Die zweite große Gruppe von Spindelgiften stellen mikrotubuli-depolarisierende Substanzen wie Colchicin und Nocodazol dar. Nocodazol (Methyl N-(5-thenoyl-2-benzimidazolyl)carbamate) ist eine antimitotische Droge, und eines der effektivsten Mikrotubuli-depolarisierenden Agenzien (DE BRABANDER ET AL., 1976). Durch die Behandlung von Zellen mit Nocodazol konnte gezeigt werden, dass Nocodazol zur Zerstörung des Spindelapparates führt (MINN, BOISE & THOMPSON, 1996; WAHL ET AL., 1996). Nocodazol bindet an  $\beta$ -Tubulin (WOLFF & KNIPLING, 1995) und führt zu einer Konformationsänderung des Tubulins (SACKETT & VARMA, 1993), die wahrscheinlich die Polymerisation behindert. Es kommt zur Schädigung der mitotischen Spindel, wodurch die Zellen zunächst transient und p53-unabhängig in der Mitose arretieren (LANNI & JACKS, 1998). Im Anschluss treten die Zellen ohne Zytokinese in die G1-Phase ein, um bei intaktem p53 mit einem 4N DNA-Gehalt zu arretieren. Bei Zellen, die kein funktionsfähiges p53 besitzen, kommt es zur Endoreduplikation, Hyperploidie und Mikronukleation (CROSS ET AL., 1995; MINN ET AL., 1996; WAHL ET AL., 1996).

## **Problemstellung**

Die gängigen Chemotherapeutika führen bei der Behandlung des duktales Pankreaskarzinoms zu keiner signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit. Ziel ist es daher, durch neue Behandlungsstrategien die konservative Therapie des Pankreaskarzinoms zu effektivieren. Hierfür gibt es verschiedene Ansätze. Neben molekularen Behandlungsstrategien, die insbesondere die Expression von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen modulieren, stellt der Einsatz von Medikamenten, welche die Aktivität von Signaltransduktionsmolekülen verändern (vor allem von Proteinkinasen und -phosphatasen), einen viel versprechenden Ansatz dar. Solche Substanzen können möglicherweise allein (Monotherapie), in Kombination mit anderen Behandlungsverfahren

wie Bestrahlung oder Genterapie oder zur Sensibilisierung gegenüber bekannten Chemotherapeutika eingesetzt werden.

Einen neuen Therapieansatz könnte daher die Beeinflussung der Aktivität der Casein Kinase 1 $\delta$  darstellen, die wichtige Funktionen bei der Chromosomensegregation ausübt. Verschiedene Studien zeigten, dass der CK1 $\delta$  spezifische Inhibitor IC261 insbesondere zu Störungen zentrosomaler Funktionen führt. Über die Wirkungen von IC261 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, insbesondere mit Spindelgiften, ist jedoch bisher wenig bekannt. Preliminäre Ergebnisse in SV40 transformierten Zelllinien ergaben, dass die negativen Effekte von klassischen Spindelgiften, wie z.B. die Polyploidie nach Behandlung mit Nocodazol, durch die Kombinationsbehandlung mit IC261 teilweise aufgehoben werden konnten. Obwohl alle bisherige Studien, in denen die Wirkung von Spindelgiften auf Pankreastumore charakterisiert wurde, keine Therapie mit diesen Substanzen rechtfertigten, könnte die Kombinationsbehandlung von Spindelgiften mit IC261 ein neues Therapiekonzept für die Behandlung von Pankreastumoren darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirkungen von IC261 auf genotypisch gut charakterisierte Pankreastumorzelllinien allein oder in Kombination mit klassischen Spindelgiften zu charakterisieren. Hierbei handelt es sich um etablierte Pankreaskarzinomzelllinien, die von Pankreaskarzinomen mit unterschiedlichem Grading und Staging abstammen und unterschiedliche genetische Alterationen aufweisen. Zu diesem Zweck sollten Wachstumskurven und Zellzyklusanalysen unbehandelter und behandelter Zellen durchgeführt werden. Zudem galt es RNA und Proteinexpressionsanalysen vorzunehmen sowie durch Immunfluoreszenzen zu untersuchen, ob infolge der IC261 Behandlung strukturelle und numerische Veränderungen der Zentrosomen auftreten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

#### 2.1.1 Käufliche Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in Analysenqualität bezogen. Im Einzelnen wurden verwendet:

Aprotinin (Produktname: Trasylol)	Bayer, Leverkusen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
DAPI	Serva, Heidelberg
DMEM	Gibco Technologies, Eggenstein
ECL-Lösungen	Amersham, Freiburg
FCS	Boehringer, Mannheim
IC261	Fa. ICOS Corporation (USA)
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
L-Glutamin-Lösung	Gibco Technologies, Eggenstein
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Nonidet P40	Fluka, Neu-Ulm
PBS	Gibco Technologies, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco Technologies, Eggenstein
Polyvinylalkohol 25/140	Merck, Darmstadt
Protogel (30% Acrylamid/0,8%Bisacrylamid)	National Diagnostics, England
RPMI	Gibco Technologies, Eggenstein
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm
Trypsin-Lösung	Gibco Technologies, Eggenstein
Tween-20	Fluka, Neu-Ulm

### 2.1.2 Käufliche Kits

BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce, USA
Cycle Test Plus	Becton Dickinson, USA
Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit	Roboscreen, Leipzig

## 2.2 Antikörper

Für Immunfluoreszenzen:

anti- $\alpha/\beta$ -Tubulin (1:200)	Kaninchen, polyklonal (G. Rutter, HPI, Hamburg)
anti $-\gamma$ -Tubulin (1:500)	Maus, monoklonal (Sigma, Taufkirchen)
anti -Pericentrin 3120 (1:200)	Kaninchen, polyklonal (MARTIN-SUBERO ET AL., 2003)
anti-Maus gekoppelt Alexa488 (1:500)	Molekular Probes (Niederlande)
anti-Kaninchen gekoppelt Alexa568 (1:500)	Molekular Probes (Niederlande)

Für Western Blot Analysen:

anti -p53 (1:5000)	Kaninchen, polyklonal (SAPU, Schottland)
anti -p53 (1:1000)	Schaf, polyklonal (SAPU, Schottland)
anti-Maus Meerettich-Peroxidase (HRP), gekoppelt (1:2000)	monoklonal (Amersham, Freiburg)
anti-Kaninchen Meerettich-Peroxidase(HRP), gekoppelt (1:2000)	polyklonal (Amersham, Freiburg)
anti-Schaf Meerettich-Peroxidase (HRP), gekoppelt (1:2000)	polyklonal (SAPU, Schottland)

## 2.3 Zelllinien

**Tabelle 1A und B:** Genotypische Charakterisierung etablierter Pankreaskarzinomzelllinien: Zusammenfassung der über die Zelllinien bekannten Daten. DPCA = duktales Pankreaskarzinom, Del = Verlust von Basenpaar, LOH = Verlust der Heterozytogenität, VZ = Verdopplungszeit, wt = Wildtyp, PM = Punktmutation (nicht definiert), Met = Methylierung, HD = Homozygoter Verlust. (BARTON ET AL., 1991) (CHEN ET AL., 1992), (FOGH, WRIGHT & LOVELESS, 1977), (HAHN ET AL., 1996), (HIRAI ET AL., 1985), (KALTHOFF ET AL., 1993), (LIEBER ET AL., 1975), (MEITNER ET AL., 1983), (METZGAR ET AL., 1982), (MCGUINNESS ET AL., 1980), (MOORE ET AL., 2001) , (NAUMANN ET AL., 1996), (OKABE, YAMAGUCHI & OHSAWA, 1983), (TAN ET AL., 1986) ,(YUNIS, ARIMURA & RUSSIN, 1977).

### A

Zelllinien	Herkunft	Histologie, Grading	VZ	p53	K-ras	DPC4
AsPC1	Ascitis	DPCA, G2	26h	Frameshift	12Gly-Arg	100Thr
BXPC3	Primärtumor	DPCA, G2	24h	220Cys	wt	HD
Capan1	Lebermetastase	DPCA, G1	60h	159Val	12Val	343Stop
Colo357	Lymphknotenmetastase	DPCA, G1	24h	Wt	PM	HD
MiaPaCa2	Primärtumor	DPCA, G3	18h	248Arg-Trp	12Cys	wt
Panc1	Primärtumor	DPCA, G3	25h	273Arg-Cys	12Asp	wt
Panc89	Lymphknotenmetastase	DPCA, G2	25h	220Tyr-Cys	wt	wt
PancTul	Primärtumor	DPCA, G2-G3	36h	176Cys-Ser	12Gly-Arg	wt

### B

Zelllinien	p16	AKT2	13q	BRCA2	17q	MKK4	18q	DCC	9p
AsPC1	Del	Ampl.	LOH		LOH	HD	LOH		LOH
BXPC3	HD	Ampl.	LOH		LOH		LOH		LOH
Capan1	HD		LOH	Del	LOH	221Stop	LOH		LOH
Colo357	Met						LOH		
MiaPaCa2	HD				LOH		LOH		LOH
Panc1	HD	Ampl.	LOH		LOH		LOH	HD	LOH
Panc89	HD								
PancTul	HD								

## **2.4 Zellkulturtechniken**

### **2.4.1 Kultivierung von Zellen**

Alle Zelllinien wurden auf Gewebekulturschalen der Fa. Nunc (Wiesbaden) in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) und RPMI (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) bei 5% CO<sub>2</sub>, 85% Humidität und 37°C kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen durch eine drei- bis fünfminütige Behandlung mit 0,05%-tiger Trypsin-Lösung (Gibco) bei 37°C von der Kulturschale gelöst, durch Zugabe von Kulturmedium verdünnt und auf neue Gewebekulturschalen gegeben.

### **2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen von einer Gewebekulturschale mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert (400g, 3min, RT) und in 1,5ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden) sofort auf Eis gestellt, eine Stunde in der oberen und über Nacht in der unteren Gasphase des Stickstofftanks belassen und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Auftauen der Zellen kurz bei 37°C im Wasserbad. Der Inhalt eines Einfrierröhrchens wurde in 10ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (400g, 3min, RT). Abgießen des Überstandes. Die sedimentierten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und auf Gewebekulturschalen gegeben. Nach ca. 24 h wurde das Medium erneuert.

Einfriermedium: 20ml 2x DMEM, 25ml FCS, 4ml 7,5% (w/v) NaHCO<sub>3</sub>, 6 ml DMSO.

### **2.4.3 Zellzählung**

Zur Bestimmung der Proliferation wurden die entsprechenden Zelllinien (Panc89 und PancTuI) mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen in Triplikaten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Gegenwart von IC261 (1 $\mu$ M), Nocodazol (0,4 $\mu$ M), Taxol (5nM), IC261 und Nocodazol (1 $\mu$ M/0,4 $\mu$ M) bzw. IC261 und Taxol (1 $\mu$ M/5nM) kultiviert. Da die unterschiedlichen Agenzien in DMSO gelöst wurden, wurden die Kontrollgruppen mit der in den Versuchen verwandten höchsten Dosierung an DMSO (0,008%) behandelt. Die Zellzahl wurde jeden Tag ausgezählt. Um die Auswirkungen der einzelnen Behandlungen auf das Wachstum beider Zelllinien bestimmen zu können, wurde die Zellzahl in den folgenden 3 Tagen bestimmt und mit denjenigen unbehandelter Zellen verglichen.

### **2.5 Phasenkontrastmikroskopie**

Zur Untersuchung der Veränderungen der Zellmorphologie wurden die Zellen in Gegenwart von IC261 (1 $\mu$ M), Nocodazol (0,4 $\mu$ M), Taxol (5nM), IC261 und Nocodazol (1 $\mu$ M/0,4 $\mu$ M) bzw. IC261 und Taxol (1 $\mu$ M/5nM) für 72h kultiviert. Da die unterschiedlichen Agenzien in DMSO gelöst wurden, wurden die Kontrollgruppen mit der in den Versuchen verwandten höchsten Dosierung an DMSO (0,008%) behandelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten (4h, 8h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h) wurden Phasenkontrastaufnahmen (Olympusmikroskop XI81, Phasenkontrast, Vergrößerung 100x, Kamera: F-View II der Firma SIS Münster) durchgeführt.

## 2.6 Immunzytochemie

### 2.6.1 Präparation von Zellen für Immunfluoreszenzanalysen

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen unbehandelt oder in Gegenwart von IC261 (1 $\mu$ M), Nocodazol (0,4 $\mu$ M), Taxol (5nM), IC261 und Nocodazol (1 $\mu$ M/0,4 $\mu$ M), IC261 und Taxol (1 $\mu$ M/5nM) bzw DMSO (0,08%) für mindestens 24h auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend mit -20°C kaltem Methanol für mindestens 4h fixiert. Danach wurden die Zellen 2mal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen der Antikörper wurden durch Inkubation in 0,2% Gelatine in PBS für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt.

Die Präparate wurden zunächst mit 50 $\mu$ l eines spezifischen Antikörpers für 45min bei RT inkubiert. Für die Darstellung des Mikrotubulinnetzwerkes wurde ein polyklonaler Antikörper benutzt, der für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin spezifisch war (G. Rutter, HPI). Zentrosomen wurden mit dem Pericentrin-Antikörper 3120 (MARTIN-SUBERO ET AL., 2003) dargestellt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation der Präparate mit Spezies-spezifischen, sekundären, Alexa 488 oder Alexa 568-gekoppelten Antikörpern (Molecular Probes, Leiden Niederlande) für 30 bis 40min im Dunkeln. Nach weiteren Waschsritten (3x waschen) mit PBS wurde bei manchen Präparaten die zelluläre DNA durch Inkubation mit DAPI (0,1 $\mu$ g/ml, 10min, RT, im Dunkeln) angefärbt. Danach wurden die Präparate mit PBS und H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie auf einem Objektträger in PVA-Medium eingebettet wurden.

Nach dem Aushärten des PVA-Mediums konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop Olympus XI81 ausgerüstet mit einer hochauflösenden sw-Digitalkamera (F-ViewII, SIS, Münster) analysiert werden. Als Objektive wurden die Immersionsölobjektive 60x/1,6 der Fa. Olympus verwendet.

## 2.7 Durchflusszytometrie

Für die Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen für 36h in Gegenwart von IC261 (1 $\mu$ M), Nocodazol (0,4 $\mu$ M), Taxol (5nM), IC261 und Nocodazol (1 $\mu$ M/0,4 $\mu$ M), IC261 und Taxol (1 $\mu$ M/5nM) bzw. DMSO (0,08%) kultiviert. Andere Dosierungen an entsprechender Stelle beschrieben. Die Zellen wurden im Medium von der Platte geschabt, damit auch die nicht mehr adhärennten Zellen analysiert werden konnten. Zentrifugieren der Suspension bei 400U/min, 5min bei 4°C. Abgießen des Überstandes, resuspendieren des Zellpellets in kaltem PBS und bei 400U/min 5min bei 4°C zentrifugieren. Für die Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen wurde der Cycle Test Plus Kit der Firma Becton Dickinson (USA) verwendet. Das Zellpellet wurde in 1ml FACS-Puffer resuspendiert und bei -20°C eingefroren, um die Proben zu einem späteren Zeitpunkt im Durchflusszytometer zu analysieren.

Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension bei 400U/min 5min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 250 $\mu$ l Lösung A (Trypsin-Puffer) resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 200 $\mu$ l Lösung B (Trypsin-Inhibitor und RNase) zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation wurden 200 $\mu$ l Lösung C (Propidium-Jodid Lösung) hinzugefügt und für 10 Minuten in Dunkelheit bei 2-8°C inkubiert.

Die Propidium-Jodid gefärbten Zellen wurden durch ein Metallnetz (50 $\mu$ m) gefiltert und ihr DNA-Gehalt mit dem Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Software CELL QUEST.

## 2.8 Proteinanalytische Methoden

### 2.8.1 Herstellung von zellfreien Proteinextrakten

Für die Extraktion von Proteinen wurden die Zellen für 36h in Gegenwart von IC261 (1 $\mu$ M), Nocodazol (0,4 $\mu$ M), Taxol (5nM), IC261 und Nocodazol (1 $\mu$ M/0,4 $\mu$ M), IC261 und Taxol (1 $\mu$ M/5nM) bzw. DMSO (0,08%) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen im Medium von der Platte geschabt und in einer Zentrifuge bei 400U/min, 5min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in kaltem PBS aufgenommen und erneut bei

400U/min 5min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 100µl Lysispuffer aufgenommen und bei -20°C eingefroren.

NP40-Lysispuffer: 50mM Tris-HCl (pH 8,0), 120mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 0,5% (v/v) NP-40, 1 mM EDTA, 1mM EGTA  
50µM Leupeptin und 30µM Aprotinin frisch dazugeben.

## 2.8.2 Quantifizierung der Proteinmenge

Zur Proteinbestimmung wurde der BCA Protein Assay-Kit der Fa. Pierce verwendet. Die Lysate wurden 20 Minuten auf Eis aufgetaut und in einer Zentrifuge bei 14000g, 15min bei 4°C zentrifugiert. Von einer 1:4 Verdünnung wurden 10µl Überstand in 200µl Reagenzgemisch gelöst. In einer 96 Well-Platte wurde eine BSA-Eichreihe zur Quantifizierung der Proteinmengen erstellt. Nach 30min Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde die optische Dichte der Proteinlösung bei 595 nm im Spektrometer gemessen.

Reagenzgemisch: 12ml Reagenz A + 240µl Reagenz B (BCATM Protein Assay Reagenz A und B) der Firma Pierce

## 2.8.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese

Für die SDS-Page wurde das Polyacrylamidsystem von Laemmli (1970) und Maizel (1971) verwendet. Es wurden Gele der Abmessungen 90mm x 80mm x 0,75mm und eine Elektrophoreseapparatur der Fa. BioRad verwendet. Das Sammelgel enthielt 0,1% (w/v) SDS, 4% (w/v) Acrylamid und 130mM Tris-HCl (pH6,8), 0,09% (w/v) APS und 0,3% (v/v) TEMED. Das Trenngel enthielt 0,1% SDS, 7,5-15% Acrylamid, 130mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,05% APS und 0,12% TEMED. Das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid betrug 37,5:1. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das

Gel 5min auf 95°C erhitzt. Die Proteine wurden im Sammelgel bei einer Spannung von 80V konzentriert und im Trenngel bei 180V getrennt.

SDS-Probenpuffer (6x): 130mM Tris-HCl (pH 6,8), 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 20% (v/v) Glycerin, 4,6% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau

SDS-Elektrophoresepuffer: 25mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

## **2.8.4 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen**

Für den Transfer von Proteinen aus Gelen auf PVDF-Membranen wurde eine Nassblotapparatur (Mini-Trans Blot Kammer, Biorad) verwendet. Drei Lagen Whatman-Papier wurden in Tris-Glycin Puffer getränkt und das Gel vorsichtig daraufgelegt. Die in Methanol aktivierte PVDF-Membran wurde blasenfrei auf das Gel gelegt und mit weiteren Lagen des angefeuchteten Whatman-Papiers bedeckt. Die Proteine wurden in Richtung Anode für 2h bei 60V auf die PVDF-Membran transferiert.

Tris-Glycin Puffer: 192mM Glycin, 50mM Tris-HCl (pH 8,3)

## **2.9 Nachweis von Proteinen**

### **2.9.1 Immundetektion (Western Blot Analyse)**

Mit der Immundetektion wurden Proteine auf der PVDF-Membran mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Unspezifische Bindungsstellen der Antikörper auf der Membran wurden mit Blockpuffer in 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die anschließenden Inkubationen der Membran mit Antikörpern wurden in Blockpuffer durchgeführt. Die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern erfolgte für 45min bei RT. Nach 2maligem Waschen für 10min in Blockpuffer wurde die Membran mit dem

Meerrettichperoxidase-gekoppelten, Spezies-spezifischen sekundären Antikörper für 30min bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für je 10min in Waschpuffer gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Chemilumineszenzsystem, bei dem durch Wasserstoffperoxid Luminol oxidiert wird. Durch die Anregung des Luminolmoleküls wird Licht der Wellenlänge  $\lambda=428\text{nm}$  emittiert. Die Reaktion wird durch die Antikörpergebundene Peroxidase HRP in alkalischer Lösung katalysiert. Je 10ml der ECL-Lösungen 1 und 2 wurden gemischt und die Membran für 1 bis 2min darin inkubiert. Im Dunkeln wurden dann Röntgenfilme (Kodak, Chalon-Sur-Saone, Cedex, Frankreich) in verschiedenen Zeitintervallen belichtet.

Waschpuffer: 0,05% (v/v) Tween-20 in PBS

Blockpuffer: 5% (w/v) Milchpulver in Waschpuffer

ECL-Lösung 1: 2,5mM Luminol, 0,4mM Paracumarsäure, 100mM Tris-HCl (pH 8,5)

ECL-Lösung 2: 5,4mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100mM Tris-HCl (pH 8,5)

## 2.10 RNA-Extraktion

Für die RNA-Bestimmung wurden die Zellen für 36h in Gegenwart von IC261 ( $1\mu\text{M}$ ), Nocodazol ( $0,4\mu\text{M}$ ), Taxol ( $5\text{nM}$ ), IC261 und Nocodazol ( $1\mu\text{M}/0,4\mu\text{M}$ ), IC261 und Taxol ( $1\mu\text{M}/5\text{nM}$ ) bzw DMSO (0,08%) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen im Medium von der Platte geschabt und in einer Zentrifuge bei 400U/min, 5min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Abgießen des Überstandes und Aufnahme des Zellpellets in kaltem PBS. Erneutes zentrifugieren bei 400U/min, 5min bei  $4^\circ\text{C}$ . Das Zellpellet wurde in  $800\mu\text{l}$  RNA-Puffer aufgenommen und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die quantitative Bestimmung der RNA erfolgte durch die Firma Roboscreen (Leipzig).

### 3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, zum einen die subzelluläre Verteilung von CK1 $\delta$  in etablierten und gut charakterisierten Pankreaskarzinomzelllinien, sowie die Auswirkung des Casein Kinase 1 $\delta/\epsilon$  spezifischen Inhibitors IC261 und klassischer Spindelgifte allein, als auch in Kombination auf das Wachstumsverhalten von Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen.

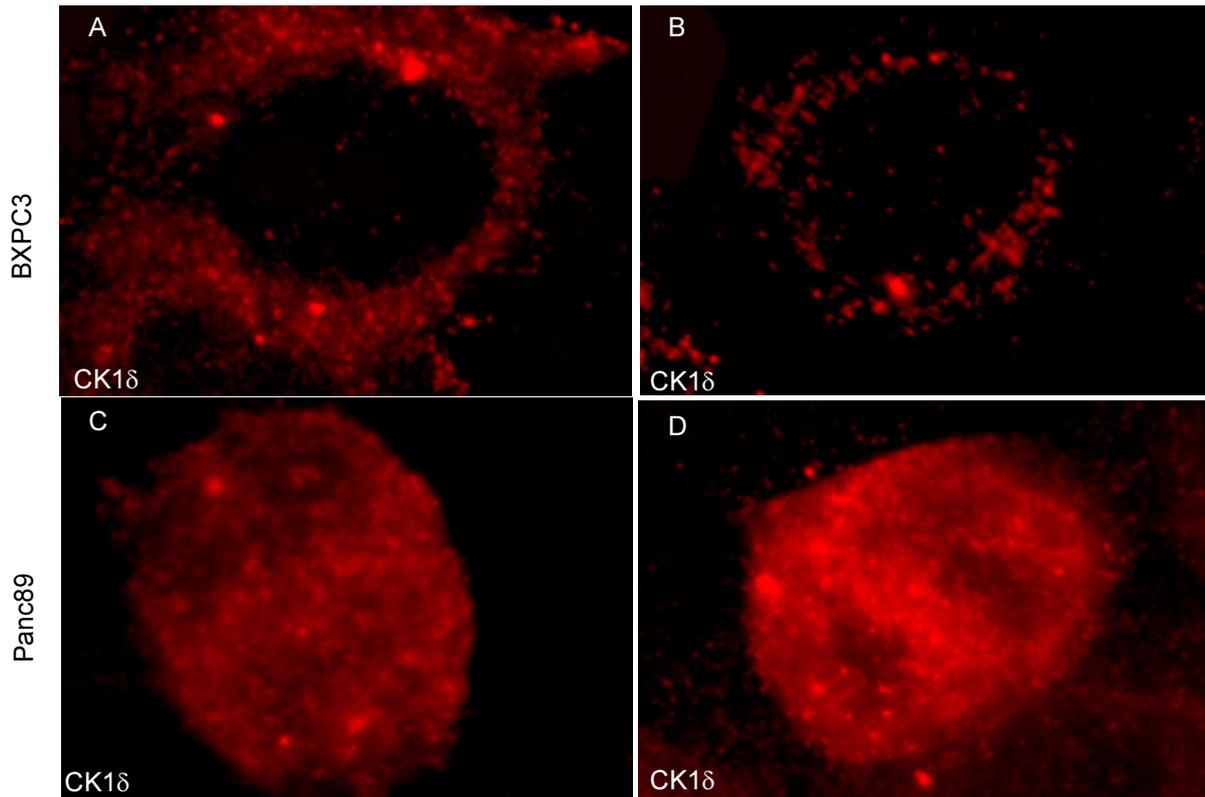
#### 3.1. Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$ in Pankreaskarzinomzellen

Um die subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in Pankreaskarzinomzelllinien analysieren zu können, wurden in AsPC1, BXPC3, CapanI, Colo357, MiaPaCa2, Panc1, Panc89 und PancTu1 Zellen Immunfluoreszenzstudien durchgeführt.

Für die Detektion der Casein Kinase 1 $\delta$  wurde der CK1 $\delta$ -spezifische, monoklonale Antikörper 128A verwendet.

In allen 8 untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien war CK1 $\delta$  in den Interphasezellen im Zytoplasma lokalisiert. Exemplarisch ist dieses für BXPC3 und Panc89 Zellen in Abb.7A und B dargestellt. Neben dem partikulär angefärbten Zytoplasma war eine Fluoreszenz insbesondere im perinukleären Zellbereich zu erkennen. Es kam im Rahmen der CK1 $\delta$ -Detektion vor allem bei den Panc89 Zellen zur Ausbildung von punktförmigen Strukturen. Auffällig waren zumeist zwei große stark leuchtende Punkte in der Nähe des Zellkerns.

In den mitotischen Zellen, exemplarisch für BXPC3 und Panc89 Zellen in Abb. 8 C und D dargestellt, zeigt sich eine diffuse Verteilung von CK1 $\delta$  über die gesamte Zelle mit kleinen Aussparungen im Bereich der Chromosomen. Es fiel auf, dass sich CK1 $\delta$  an einzelnen Punkten innerhalb der Zelle in dichteren Strukturen bestand. Zur Klärung, ob diese Anhäufung von CK1 $\delta$  mit einer Assoziation oder Koloakalisation mit Zellorganellen im Zusammenhang steht, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

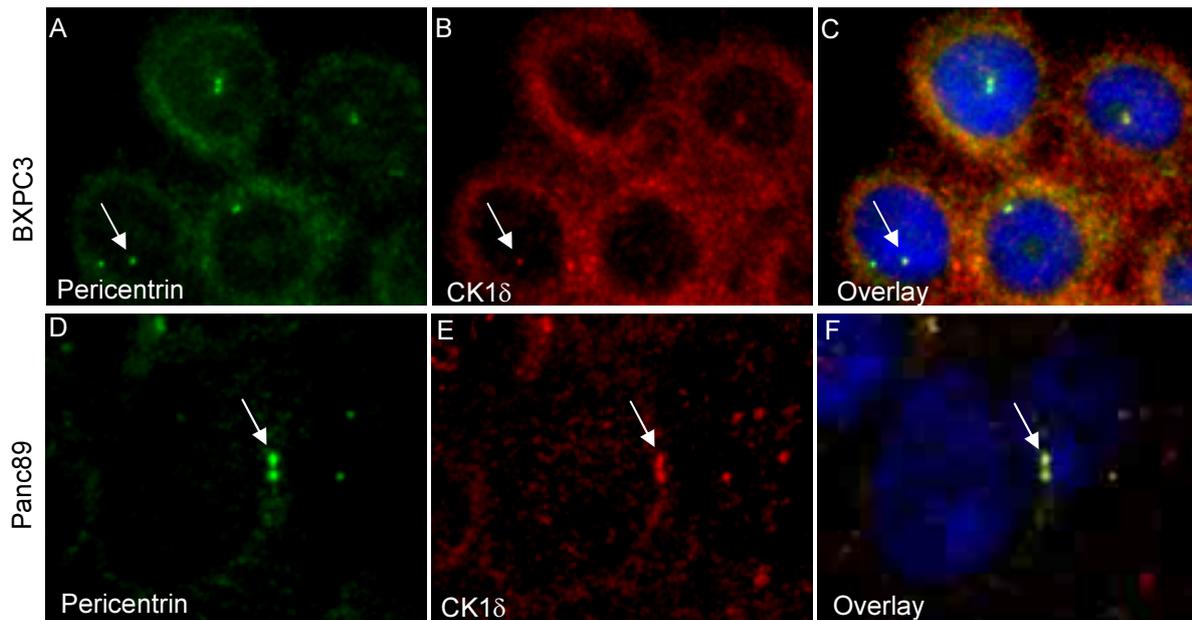


**Abb.8: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in der Interphase und Mitose von BXPC3 und Panc89 Zellen.** Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von CK1 $\delta$  wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert und in Methanol fixiert. Zur Detektion wurde CK1 $\delta$  mit dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und dem sekundären Antikörper Alexa 568 (rot) markiert. Hierbei zeigt sich eine granuläre zytoplasmatische Lokalisation von CK1 $\delta$  (600-fache Vergrößerung).

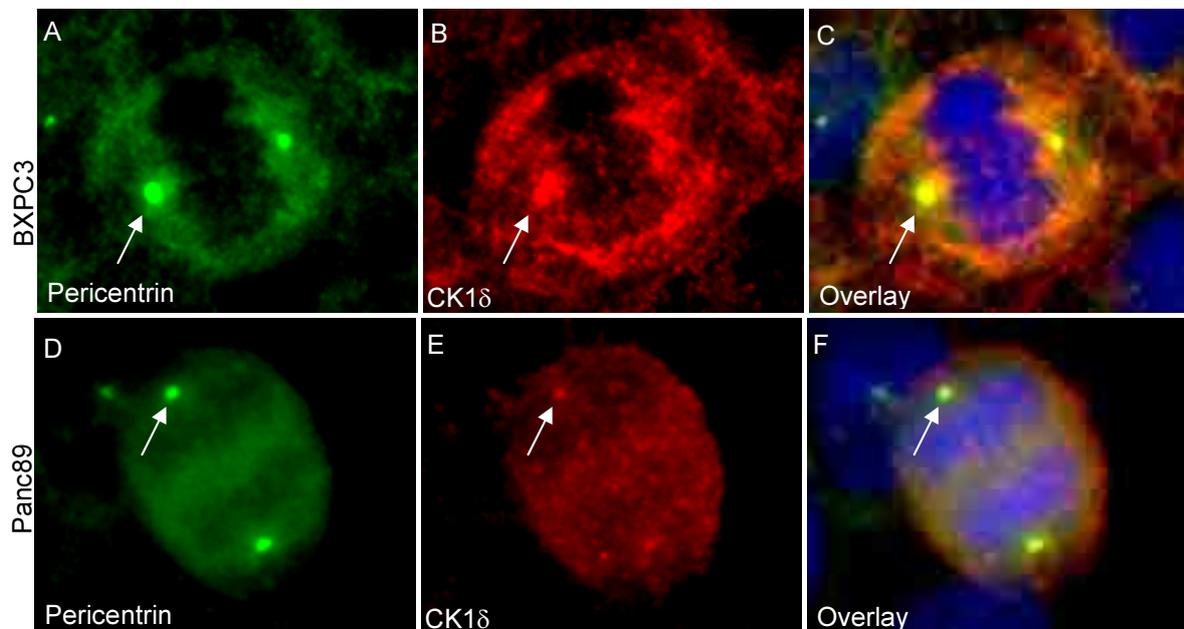
### 3.1.1. Assoziation von CK1 $\delta$ mit Zentrosomen in Pankreaskarzinomzelllinien

Da CK1 $\delta$  in Fibroblasten konstitutiv mit den Zentrosomen assoziiert (Behrend et al., 2000), sollte geklärt werden, ob diese Assoziation auch in Pankreaskarzinomzelllinien nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck wurden zusätzliche Immunfluoreszenzen durchgeführt, bei denen Pericentrin und CK1 $\delta$  mit Hilfe von spezifischen primären Antikörpern und entsprechenden markierten sekundären Antikörpern nachgewiesen wurden. Die zelluläre DNA wurde zudem mit DAPI markiert.

In allen 8 untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien fand sich eine zytoplasmatische Lokalisation von CK1 $\delta$  in Interphasezellen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass CK1 $\delta$  mit Pericentrin in der Interphase kolokalisiert (siehe Abbildung 9).



**Abb.9: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in Interphasezellen von BXPC3 und Panc89.** Zur Detektion wurde CK1 $\delta$  mit dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und dem sekundären Antikörper Alexa 568 (rot), sowie der Zentrosomen mit Pericentrin und dem sekundären Antikörper Alexa 488 (grün) markiert. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Im Overlay ist die Kolokalisation von CK1 $\delta$  und Pericentrin sichtbar (Pfeil) (600-fache Vergrößerung).



**Abb.10: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in mitotischen BXPC3 und Panc89 Zellen.** Zur Detektion wurde CK1 $\delta$  mit dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und die Zentrosomen mit Pericentrin (3120) markiert. Es sind jeweils zwei punktförmige Strukturen mit einer deutlichen fluoreszierenden Mehranreicherung von CK1 $\delta$  und Pericentrin zu erkennen (Pfeil) (600-fache Vergrößerung).

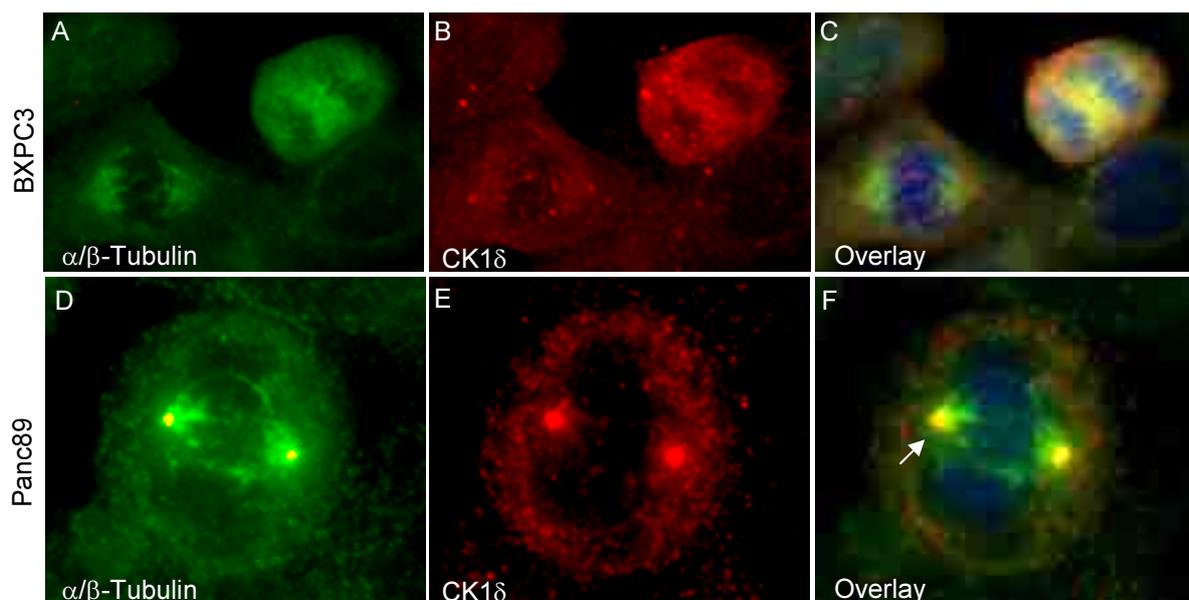
Interessanterweise assoziiert CK1 $\delta$  nicht nur in Interphasezellen mit Pericentrin, sondern wie in Abbildung 10 ersichtlich konnte in mitotischen Zellen ebenfalls eine Kolokalisation

von CK1 $\delta$  mit Pericentrin nachgewiesen werden. Im Overlay ist zu erkennen, dass es sowohl bei der sich teilenden Panc89 (siehe Abbildung 10C) als auch der BXPC3 Zelle (Abb. 10F) zur Assoziation von CK1 $\delta$  und Pericentrin kommt.

### 3.1.2. Detektion von CK1 $\delta$ und Mikrotubuli in Pankreaskarzinomzelllinien

Um zu prüfen, ob CK1 $\delta$  auch mit dem Spindelapparat morphologisch verbunden ist, wurde CK1 $\delta$  mit dem spezifischen Antikörper 128A in Kombination mit den Mikrotubuli durch  $\alpha/\beta$ -Tubulin in der Immunfluoreszenz dargestellt. Es war in beiden Zelllinien in der Interphase keine Assoziation von CK1 $\delta$  an Tubulin zu erkennen.

In den mitotischen Zellen ließ sich zeigen, dass CK1 $\delta$  zumindest partiell mit dem Spindelapparat verbunden ist (siehe Abbildung 11). Besonders am Ansatzpunkt des Spindelapparates an den Zentrosomen fand sich eine deutliche CK1 $\delta$ -Markierung.



**Abb.11: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in mitotischen BXPC3 und Panc89 Zellen.** Fixierte Zellen wurden zur Detektion von CK1 $\delta$  mit dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und die Mikrotubuli mit  $\alpha/\beta$ -Tubulin markiert. In der Nähe der Zentrosomen ist eine fluoreszierende Mehranreicherung von CK1 $\delta$  im Bereich der mitotischen Spindel im Overlay zu erkennen (Pfeil) (600-fache Vergrößerung).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass CK1 $\delta$  in den Interphasezellen verstärkt in Form granulärer Strukturen gefunden wird. In beiden dargestellten Zelllinien befand sich CK1 $\delta$  vermehrt im perinukleären Bereich. Eine Assoziation von CK1 $\delta$  mit den Mikrotubuli war in den mitotischen, nicht aber in den Interphasezellen zu beobachten. Sowohl in Interphasezellen als auch in mitotischen Zellen assoziiert CK1 $\delta$  an den Zentrosomen.

### 3.2. Bestimmung der CK1 $\delta$ -Expressionslevel auf mRNA- und Proteinebene in etablierten Pankreaskarzinomzelllinien

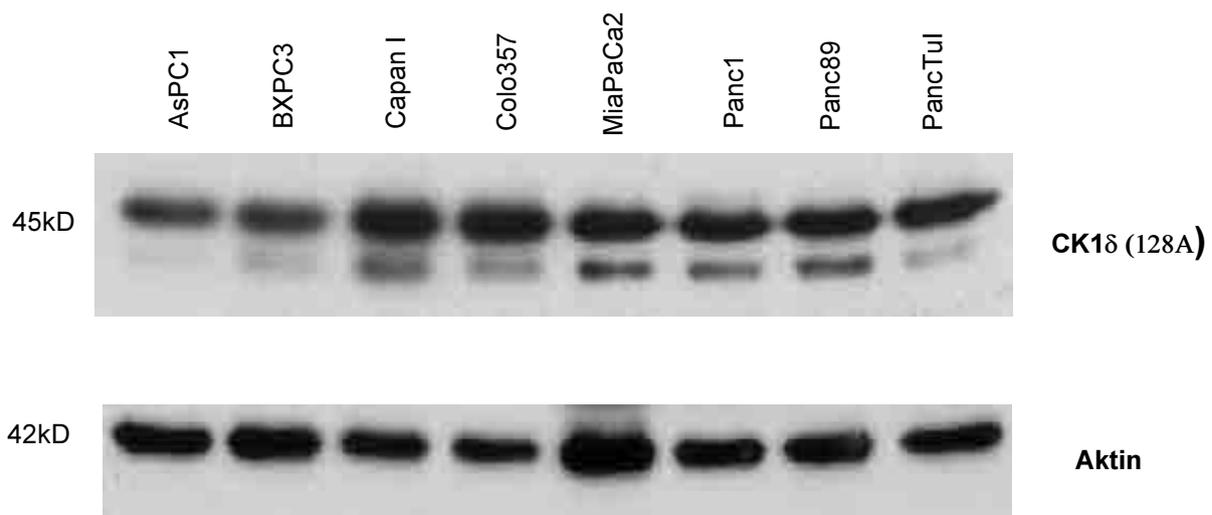
Da sich die verschiedenen Pankreastumorzelllinien genotypisch unterscheiden (siehe Tabelle 1A und B in Material und Methoden) und ihre Etablierung aus Primärtumoren und Metastasen erfolgte, stellte sich die Frage, ob in den einzelnen Pankreaskarzinomzelllinien Unterschiede im CK1 $\delta$  Expressionslevel auf mRNA- und/oder Proteinebene nachzuweisen sind.

Zur quantitativen Bestimmung der mRNA Konzentrationen von CK1 $\delta$  wurde die RNA isoliert und in Zusammenarbeit mit der Firma Roboscreen die Konzentration der Transkripte für CK1 $\delta$  bestimmt. Die Ergebnisse der mRNA Analysen der einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Für CK1 $\delta$  wurden zelllinienspezifische Unterschiede in der Expressionsrate der Transkripte für CK1 $\delta$  nachgewiesen. Die höchsten Werte zeigten sich hierbei bei Panc1 Zellen, die eine 6fach höhere Expression von CK1 $\delta$  spezifischer mRNA als MiaPaCa2 und PancTu1 Zellen aufwiesen.

**Tabelle 2:** Bei den 8 Pankreaskarzinomzelllinien wurden für CK1 $\delta$  die spezifischen RNA-Expressionslevel bestimmt. Die Werte sind in zmol/amol GAPDH angegeben.

	AsPc1	BxPC3	CapanI	Colo357	MiaPaCa2	Panc1	Panc89	PancTu1
<b>CK1<math>\delta</math></b>	24,6	15,2	23,8	12,4	10,9	64,1	16,5	10,7

Da deutliche Unterschiede in der CK1 $\delta$ -Expression auf mRNA Ebene gefunden wurden, sollte durch Bestimmung der CK1 $\delta$ -Proteinmengen in AsPC1, BXPC3, CapanI, Colo357, MiaPaCa2, Panc1, Panc89 und PancTul Zellen untersucht werden, ob diese Unterschiede auch auf Proteinebene nachweisbar sind. Dazu wurden Lysate der 8 Pankreaskarzinomzelllinien, wie in Material und Methoden beschrieben, hergestellt und jeweils gleiche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetrennt und CK1 $\delta$  anschließend im Western Blot detektiert. Dabei zeigte sich, dass bis auf AsPC1 und BXPC3 Zellen, bei denen auf Proteinebene ein geringerer CK1 $\delta$  Level zu beobachten war, alle Zelllinien ähnliche Mengen an CK1 $\delta$  exprimierten (siehe Abbildung 12).



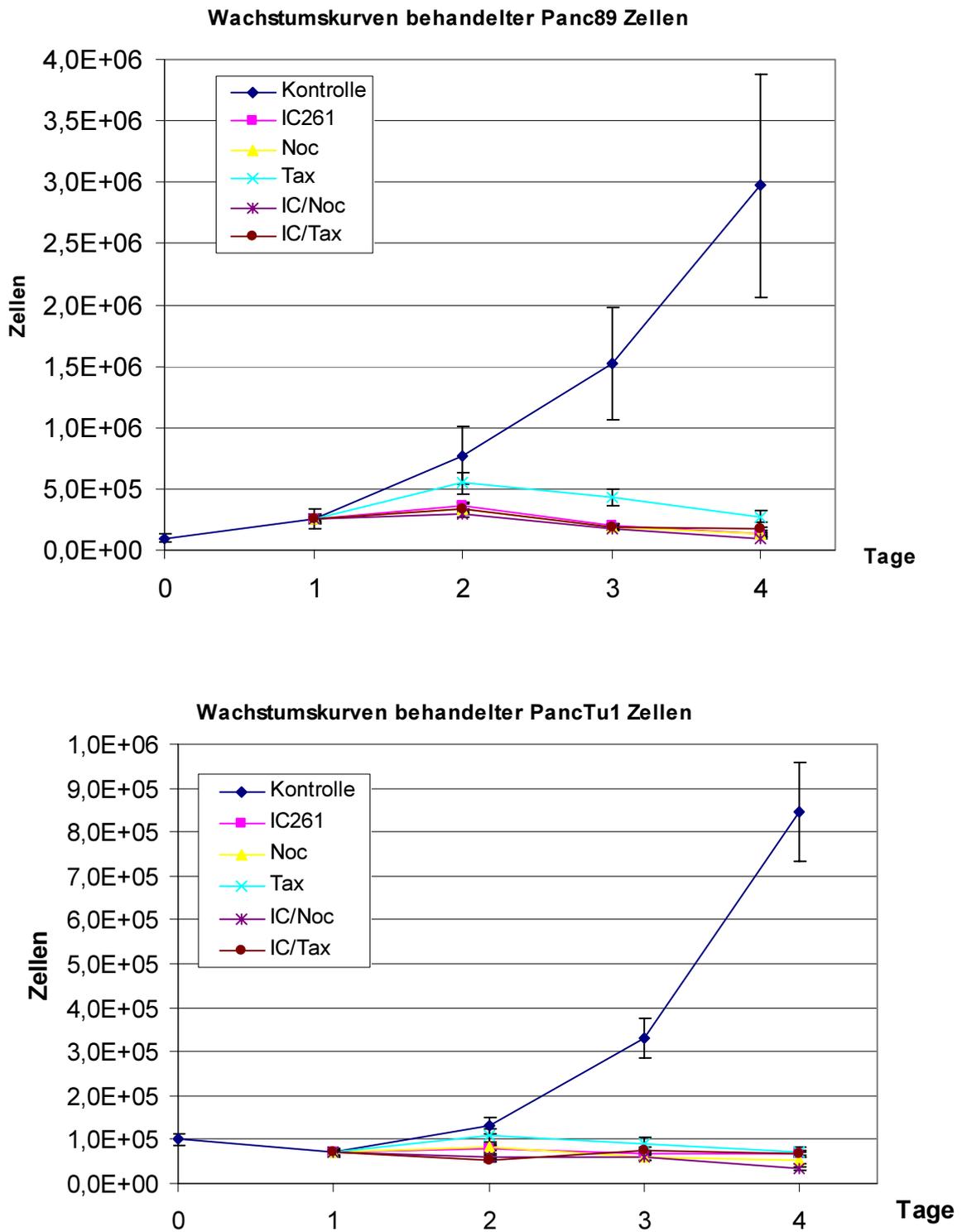
**Abb.12: Analyse der CK1 $\delta$ -Expression der 8 vorherbeschriebenen Pankreaskarzinomzelllinien.** Die Lysate der Zellen wurden auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis von Ck1 $\delta$  erfolgte mit dem Ck1 $\delta$ -spezifischen polyklonalem Antiserum der Firma ICOS und einem sekundären anti-Kaninchen HRP-gekoppeltem Antikörper. Zum Nachweis, dass ähnliche Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde  $\beta$ -Aktin detektiert.

### **3.3. Auswirkungen von IC261 und klassischen Spindelgiften allein und in Kombination auf das Wachstum etablierter Pankreaskarzinomzelllinien**

Die Inhibition von CK1 $\delta$  durch IC261, einem ATP-Analogen, kann ähnlich wie Spindelgifte einen transienten mitotischen Arrest der Zellen auslösen und in Abhängigkeit von p53 zu einem Zellzyklusarrest oder zur Endoreduplikation der Zellen führen (BEHREND ET AL., 2000). Da hieraus im Regelfall eine Wachstumshemmung der behandelten Zellen resultiert, sollte zunächst die Wirkung von IC261 und Spindelgiften auf das Wachstumsverhalten etablierter Pankreaskarzinomzelllinien untersucht werden.

#### **3.3.1. Charakterisierung des Wachstumsverhaltens von unbehandelten und behandelten (IC261, Nocodazol, Taxol allein oder in Kombination) PancTu1 und Panc89 Zellen**

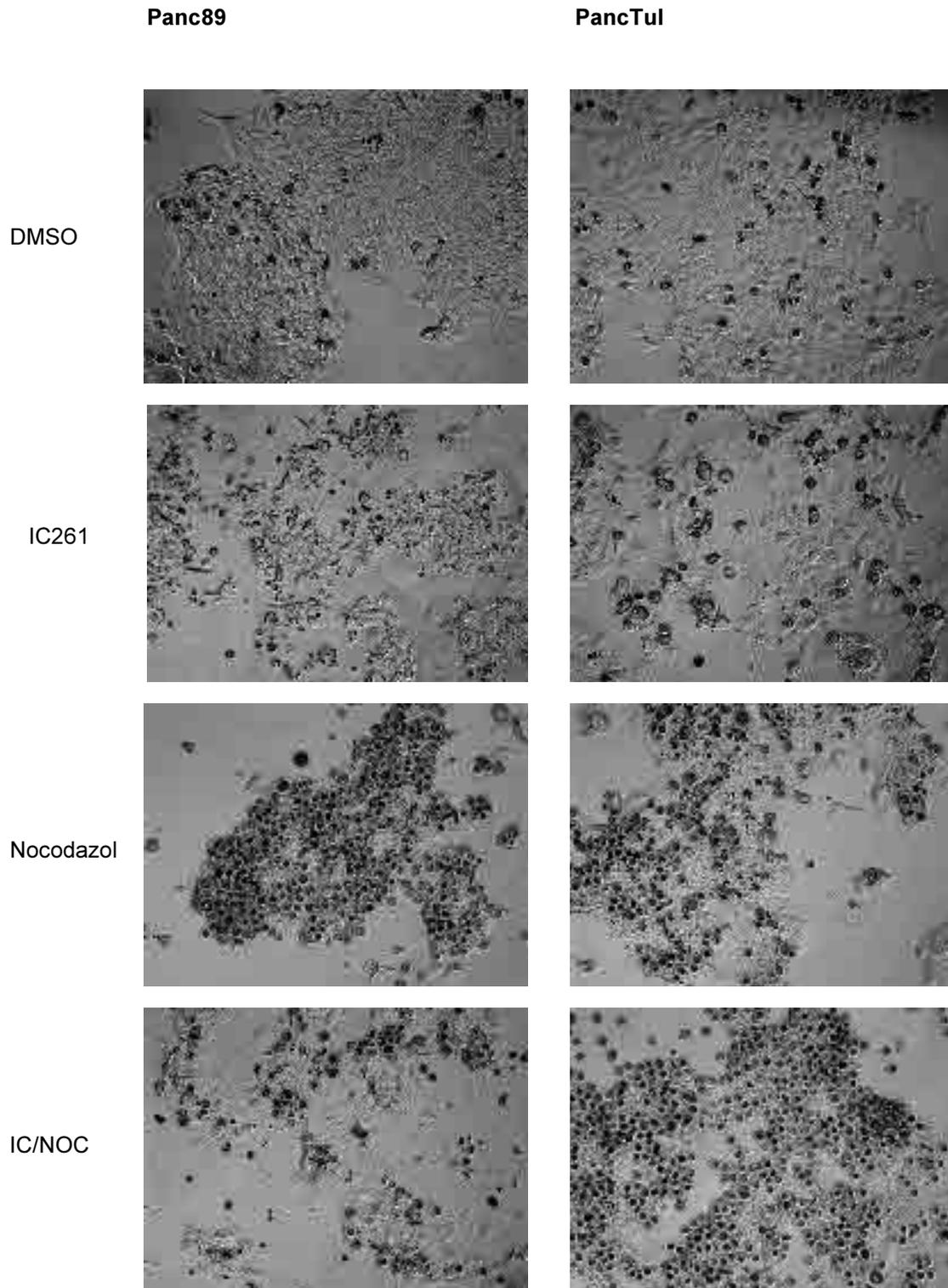
Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens von Panc89 und PancTu1 Zellen wurden von Kontrollzellen und Zellen, die mit IC261, Nocodazol und Taxol allein oder in Kombination behandelt wurden, Wachstumskurven erstellt. Sowohl die Behandlung von Panc89 (Abb.13a) als auch von PancTu1 Zellen (Abb.13b) mit den oben genannten Substanzen, führte jeweils zu einer ähnlich stark ausgeprägten Wachstumsinhibition nach 72h. Auffällig war jedoch, dass es nach 24h Behandlung mit Taxol zunächst noch zu einer Zellzahlvermehrung gekommen war, bevor auch bei diesen Zellen die Behandlung nach 48h zu einer deutlichen Wachstumsinhibition führte.



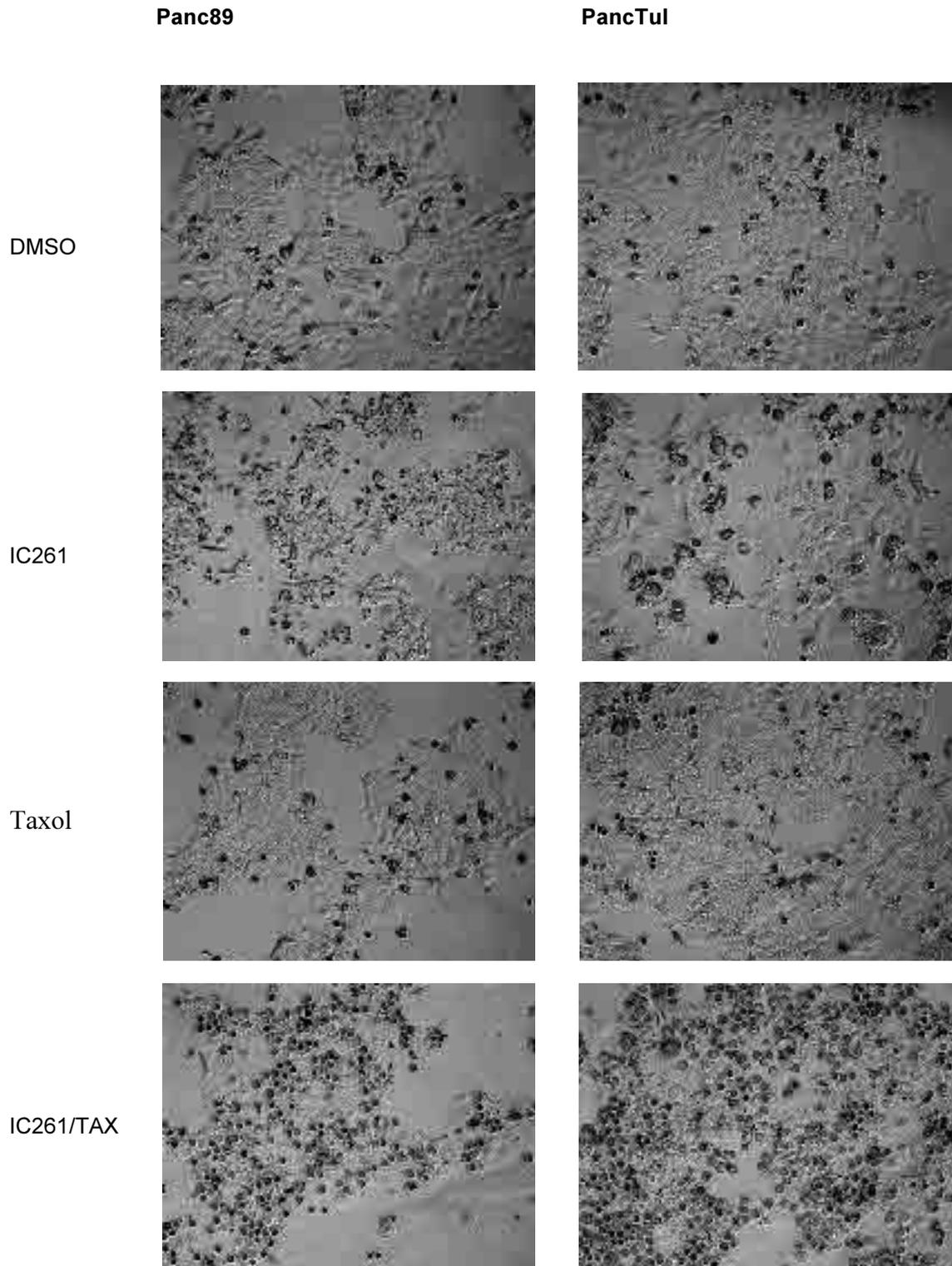
**Abb. 13a und b: Wachstumsverhalten MOCK behandelter (DMSO), IC261, Nocodazol, Taxol allein und in Kombination behandelter Panc89- und PancTu1 Zellen.** Nach dem Aussähen von  $1 \times 10^5$  Panc89 (a) und PancTu1 Zellen (b) in Triplikats und Zugabe der entsprechenden Agenzien, wurden die Zellen täglich ausgezählt. Hierbei zeigte sich in beiden behandelten Zelllinien eine starke Beeinträchtigung des Zellwachstums.

### **3.4. Morphologische Veränderungen von Pankreaskarzinomzellen nach Behandlung mit dem Kinaseinhibitor IC261, mit den Spindelgiften Nocodazol und Taxol, sowie der Kombination dieser Substanzen**

In den Wachstumskurven wurde nachgewiesen, dass es sowohl durch IC261 als auch durch klassische Spindelgifte zu einer sehr effizienten Proliferationshemmung der Pankreaskarzinomzelllinien kommt. Da sich bereits in der Lichtmikroskopie auffällige morphologische Veränderungen bei den behandelten Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt hatten, wurden diese mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie genauer untersucht. Dazu wurden Panc89 und PancTu1 Zellen für 72h mit den oben benannten Agenzien behandelt und zu den entsprechenden Zeitpunkten (4h, 8h, 12h, 24h, 36h, 48h, 72h) durch Phasenkontrastaufnahmen untersucht und dokumentiert. In den Abbildungen 13a und 13b ist zu erkennen, dass sich die entsprechend behandelten Panc89- und PancTu1 Zellen mit der Zeit immer mehr abrundeten und den Kontakt zur Oberfläche verloren. Bereits 4h nach IC261 Behandlung konnte ein vermehrtes Abrunden der Panc89 und PancTu1 Zellen beobachtet werden. Nach 48h waren annähernd alle Panc89 Zellen und die meisten PancTu1 Zellen abgerundet (Abb.14a). Nocodazol behandelte Zellen wiesen ebenfalls nach 48h eine ähnlich veränderte Morphologie wie IC261 behandelte Zellen auf. Allerdings war die Anzahl an abgerundeten Zellen noch höher als nach IC261 Behandlung. Bei der Doppelbehandlung der Zellen mit IC261 und Nocodazol trat ein additiver Effekt auf. Bereits nach 24h befanden sich vergleichbar viele Zellen in einem abgerundeten Zustand, wie dies bei den jeweiligen Einzelbehandlungen erst nach 48h zu beobachten war. Interessanterweise zeigten die mit dem Mikrotubuli stabilisierenden Spindelgift Taxol behandelten Zellen phasenkontrastmikroskopisch ein ganz anderes morphologisches Bild (Abb.14b). Obwohl Zellen unter Taxolbehandlung in ihrem Wachstum gehemmt wurden (siehe 3.3.1.), waren nach 24h im Vergleich zu IC261 und Nocodazol behandelten Zellen eine geringere Zahl an abgerundete Zellen nachweisbar. Morphologisch zeigten sich kaum Veränderungen im Vergleich zu den MOCK (DMSO) behandelten Kontrollzellen. Hingegen führte die Doppelbehandlung der Zellen mit Taxol und IC261 zu ähnlichen Effekten wie sie bei der Einzelbehandlung der Zellen mit IC261 beobachtet wurden. Sehr viele Zellen waren bereits nach 24h Behandlung abgerundet.



**Abb.14a: Veränderungen der Zellmorphologie** von MOCK (DMSO), IC261, Nocodazol, und IC261/Nocodazol behandelten Panc89 und PancTul Zellen (nach 24h, bzw. 48h), dargestellt durch Phasenkontrastaufnahmen (Olympusmikroskop XI81, Phasenkontrast, Vergrößerung 100x).

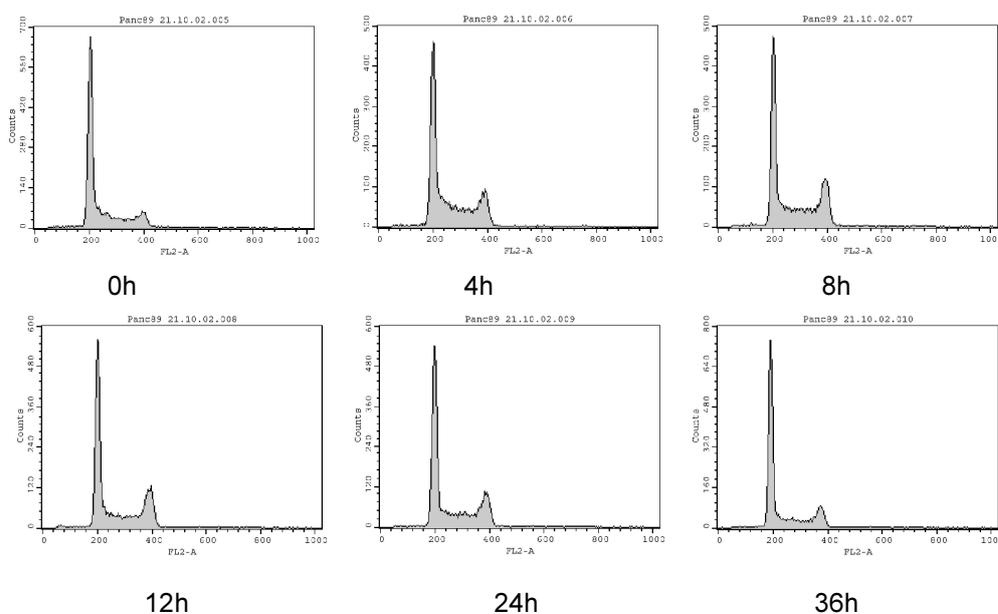


**Abb.14b: Veränderungen der Zellmorphologie** von MOCK (DMSO), IC261, Taxol und IC261/Taxol nach 24h behandelten Panc89 und PancTul Zellen, dargestellt durch Phasenkontrastaufnahmen (Olympusmikroskop XI81, Phasenkontrast, Vergrößerung 100x).

### 3.5. Auswirkung der IC261 Behandlung auf den Zellzyklus von Pankreastumorzelllinien

Anhand der durchgeführten Wachstumskurven und morphologischen Analysen ließen sich keine exakten Aussagen über Zellzyklusveränderungen im Verlauf der Behandlung der Zellen mit IC261 und Spindelgiften allein oder in Kombination mit IC261 treffen. Daher wurde mit Hilfe von durchflusszytometrischen Analysen (FACS) die Auswirkungen der oben genannten Behandlungen auf die Zellzyklusverteilung der acht verschiedenen Pankreastumorzelllinien (AsPC1, BXPC3, Colo357, CapanI, MiaPaCa2, Panc1, Panc89, PancTuI) zu unterschiedlichen Zeitpunkten charakterisiert.

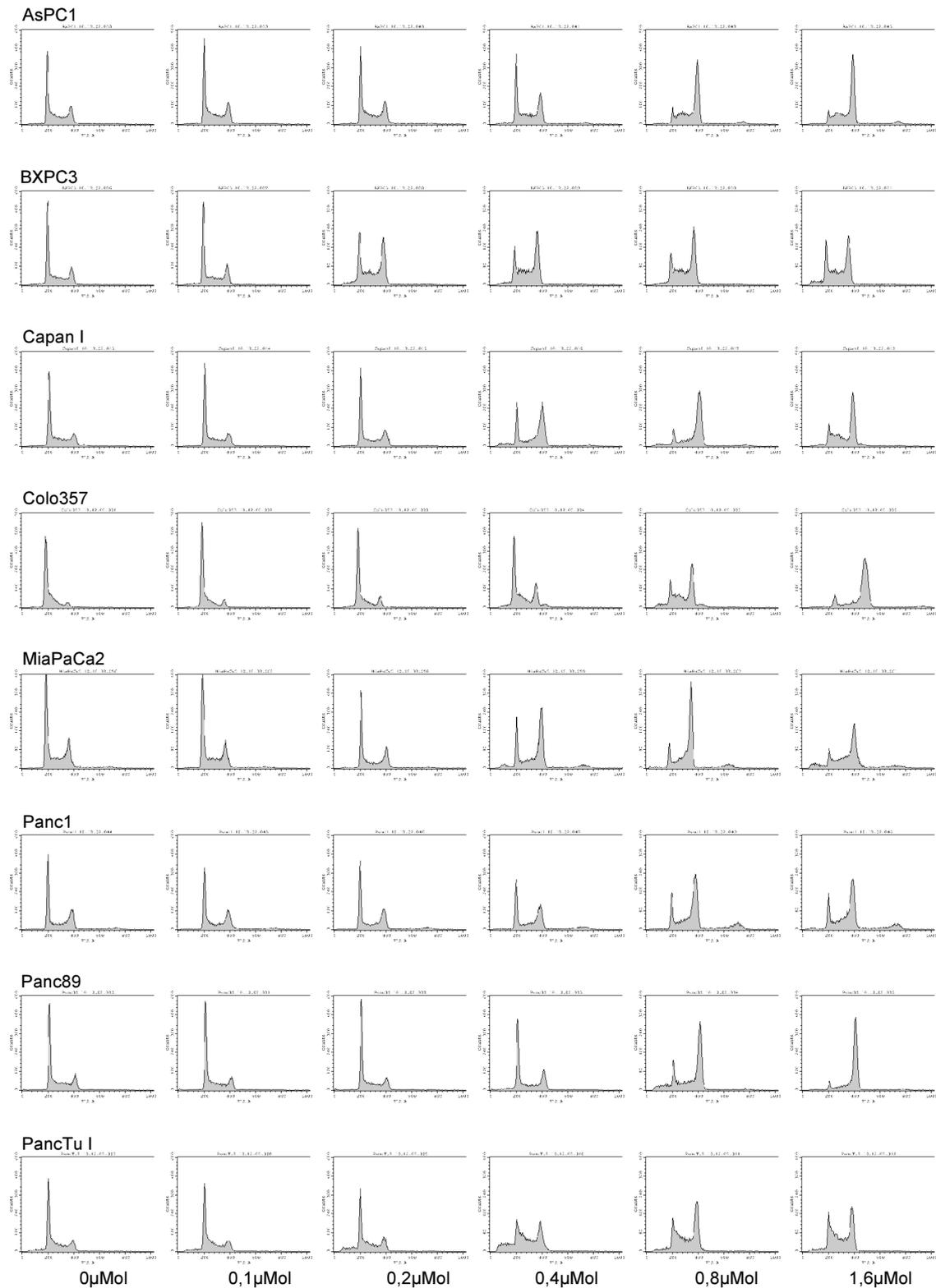
Zunächst musste jedoch ausgeschlossen werden, dass die Untersuchungsergebnisse durch das für die Aufnahme des Kinaseinhibitor IC261 verwendete Lösungsmittel DMSO beeinflusst werden, da eine zellschädigende Wirkung von DMSO bekannt ist. Aus diesem Grund wurden alle Zelllinien, mit der in den Versuchen verwendeten höchsten Konzentration an DMSO (0,008%) für 36h behandelt. Es zeigte sich, dass DMSO, in der verwendeten Konzentration im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, keine nachweisbaren Effekte auf den Zellzyklus von Pankreaskarzinomzellen hat. Exemplarisch ist dieses in Abb.15 für Panc89 Zellen gezeigt.



**Abb.15: Durchflusszytometrische Analysen von DMSO-behandelten Panc89 Zellen.** Die Panc89 Zellen wurden für 36h mit 0,008% DMSO behandelt. Nach 4h, 8h, 12h, 24h und 36h erfolgte eine Bestimmung des DNA-Gehaltes im Durchflusszytometer. Es wurden keine deutlichen Unterschiede beobachtet.

Die gewählte IC261 Konzentration (1 $\mu$ M) führte bei den durchgeführten Wachstumskurven zu einer sehr ausgeprägten Wachstumsinhibition. Daher wurde anschließend überprüft, ob IC261 bereits in niedrigeren Konzentrationen die Zellproliferation beeinflusst.

Da in IC261 Konzentrationen über 10 $\mu$ M neben CK1 $\delta$  noch weitere Kinasen in ihrer Aktivität beeinflusst werden, erfolgten zur spezifischen Hemmung von CK1 $\delta$  die Untersuchungen bei allen 8 oben genannten Pankreaskarzinomzelllinien mit IC261 Konzentrationen von 0,1-1,6 $\mu$ M. DMSO (Kontrolle) und IC261 behandelte Zellen wurden nach 12 Stunden mit dem Farbstoff Propidiumiodid gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Die Analysen zeigten (siehe Abb.16), dass bei einer Konzentration von 0,1 und 0,2 $\mu$ M IC261 kaum Auswirkungen auf den Zellzyklus der Pankreaskarzinomzelllinien zu beobachten waren. Eine Ausnahme stellten jedoch BxPC3 Zellen dar, bei denen es bereits bei einer IC261 Konzentration von 0,2 $\mu$ M zu einem deutlichen Anstieg der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx kam. Interessanterweise führte die Behandlung von BxPC3 Zellen mit höheren IC261 Konzentrationen (0,4-1,6 $\mu$ M) nur zu einer geringfügigen Zunahme an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx. Bei einer Konzentration von 0,4 $\mu$ M IC261 kam es auch bei Capan1, MiaPaCa2 und PancTu1 Zellen zu einer Anreicherung an Zellen mit einem höheren DNA Gehalt.



**Abb.16: Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit verschiedene IC261- Konzentrationen**  
 Der DNA-Gehalt der Pankreaskarzinomzellen wurde nach 12h Behandlung mit 0,1μM, 0,2μM, 0,4μM, 0,8μM und 1,6μM des Caseinkinase-spezifischen Inhibitors IC261 durch FACS-Analysen bestimmt.

Höhere Konzentrationen von IC261 führten sowohl bei MiaPaCa2 als auch Capan1 Zellen zu einem weiteren Anstieg der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx. Ähnlich wie bei BXPC3 Zellen wurde dieser Effekt bei PancTu1 Zellen nicht beobachtet. Bei diesen beiden Zelllinien änderte sich das Verhältnis von Nx zu 2Nx durch Dosissteigerung von IC261 auf 0,8 und 1,6µM nur wenig. Ab einer Konzentration von 0,8µM IC261 hatten bei allen Zelllinien mehr als die Hälfte der Zellen einen DNA Gehalt von 2Nx. Durch Steigerung der IC261 Dosis auf 1,6µM ließen sich in der durchflusszytometrischen Analyse nur noch geringe Zellzyklusveränderungen beobachten. Bei Capan1, MiaPaCa2 und Panc89 Zellen wurden bei unterschiedlichen IC261 Konzentrationen ein geringer Prozentsatz an polyploiden Zellen nachgewiesen. Hingegen zeigte sich bei behandelten Panc1 Zellen, dass es schon bei niedrigen Konzentrationen von IC261 zum Auftreten von Polyploidie kam. Der Anteil dieser Zellen nahm mit Steigerung der IC261 Konzentration zu. Bei IC261 Konzentrationen von 0,8 und 1,6µM trat auch bei AsPC1 Zellen Polyploidie auf. Allerdings betrug deren Anteil deutlich weniger als 10%. Die Behandlung der Zellen mit niedrigen IC261 Konzentrationen (bis 0,4µM) führte bei BXPC3, PancTu1 und MiaPaCa2 teilweise zum Auftreten von Zellschrott.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass unter dem Einfluss von IC261 alle 8 Pankreaskarzinomzelllinien eine deutliche Zunahme der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx zeigten. Es war die Ausbildung von polyploiden Zellen zu erkennen. Zudem kam es bei annähernd allen Zelllinien zum Auftreten von Zellschrott. Aus den einzelnen Zellzyklusanalysen kann geschlossen werden, dass die IC261 induzierten Effekte konzentrationsabhängig und zelllinienspezifisch sind.

### **3.6. Charakterisierungen der Auswirkungen der Behandlung der verschiedenen Pankreastumorzelllinien mit IC261 und Spindelgiften einzeln bzw. in Kombination**

Da bei einer Konzentrationen zwischen 0,8 und 1,6 $\mu$ M bei allen Zelllinien deutliche IC261 Effekte nachweisbar waren, wurde im nächsten Schritt die Wirkung von IC261 in einer Konzentration von 1 $\mu$ M auf den Zellzyklus mit derjenigen von Nocodazol und Taxol in verschiedenen Pankreastumorzelllinien über einen Zeitraum von 36 Stunden verglichen.

Die größten Effekte des Kinaseinhibitors und der Spindelgifte auf den Zellzyklus pankreatischer Tumorzelllinien im Vergleich zu den DMSO behandelten Kontrollzellen, wurde nach 36h Behandlung festgestellt und sind in Abbildung 17 dargestellt.

Dabei ist festzustellen, dass es grundsätzlich in allen IC261 behandelten Zelllinien zu einer Anhäufung von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx kam. Es lassen sich jedoch Zelllinien-spezifische Unterschiede nachweisen. Während über 90% der BXPC3 Zellen nach IC261 Behandlung einen DNA-Gehalt von 2Nx aufwiesen, war der Anteil von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx in anderen Zelllinien nicht ganz so hoch (40%-80%). Des Weiteren trat eine Variation in der Anzahl von polyploiden Zellen auf. So stieg nach 36h IC261 Behandlung in Panc1 Zellen die Anzahl der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4Nx auf 12,5% an. In den anderen pankreatischen Tumorzelllinien wurden nach IC261 Behandlung nur wenige oder keine Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4Nx nachgewiesen. Ein geringer Anteil der Zellen war nach 36h IC261 Behandlung abgestorben und konnte zusammen mit den Zelltrümmern im Durchflusszytometer mit einem DNA-Gehalt kleiner Nx (sub-G1-Fraktion) dargestellt werden. Am deutlichsten war dieser Effekt bei den Panc89 Zellen nach 36h zu beobachten, bei denen annähernd die Hälfte der Zellen aus abgestorben Zellen und Zelltrümmern bestand. Bei den anderen Zelllinien betrug der Anteil der sub G1-Fraktion jedoch höchstens 20% (siehe Abbildung 17).

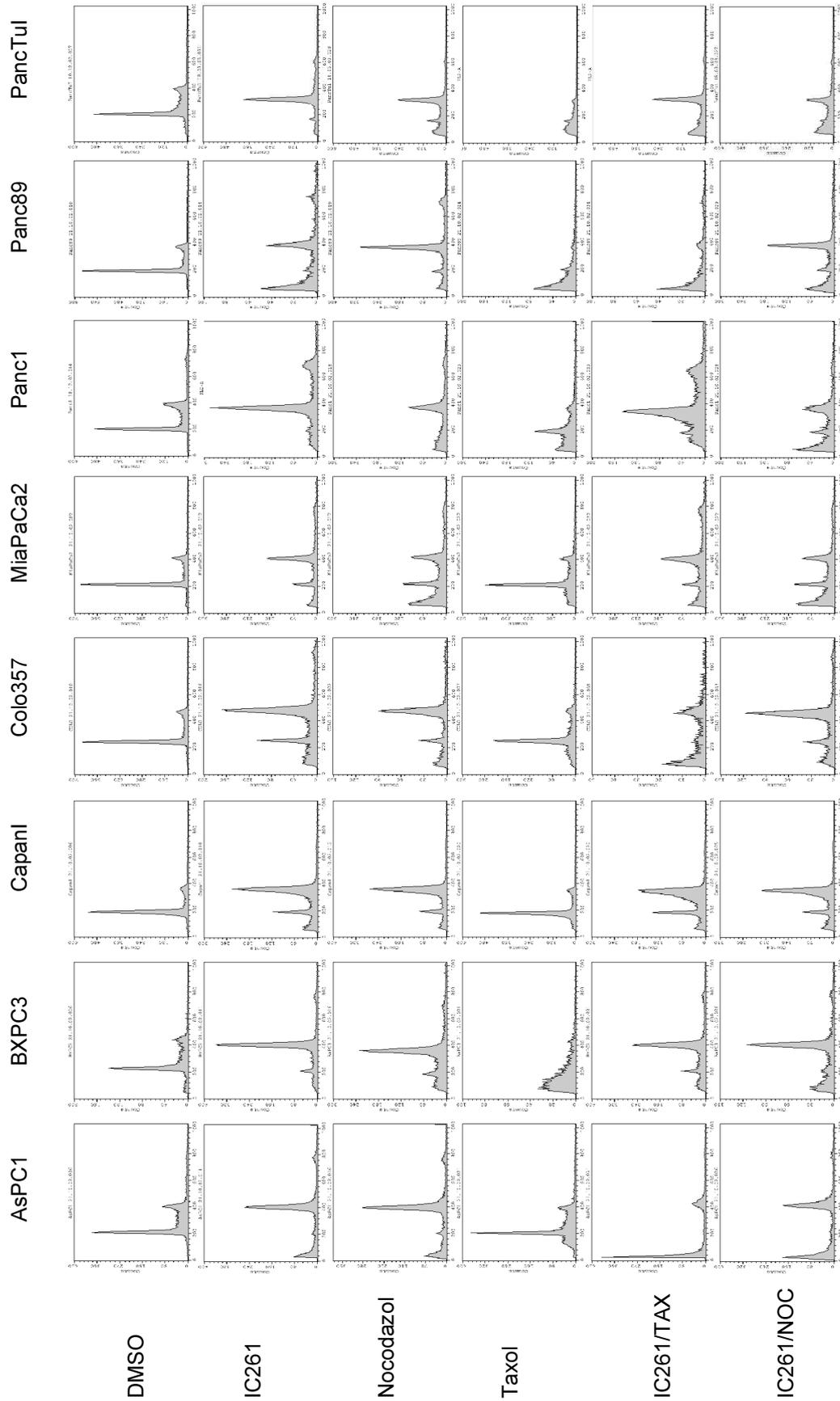
Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Spindelgifte Nocodazol und Taxol auf den Zellzyklus der pankreatischen Tumorzelllinien untersucht. Die Behandlung der einzelnen Pankreastumorzelllinien mit 0,4 $\mu$ M des Mikrotubuli-destabilisierenden Agens Nocodazol zeigte ähnliche Effekte auf die Zellzyklusverteilung, wie die Inhibition von CK1 $\delta$ . Bei allen Zelllinien kam es zu einer deutlichen Anhäufung an Zellen in der G2/M-Phase. Besonders ausgeprägt zeigte sich dieser Effekt bei den AsPC1, Panc89 und BXPC3 Zellen

(52-60%). Ein vermehrtes Auftreten von Zellen in der sub G1-Fraktion war ebenfalls bei allen Zelllinien zu erkennen, allerdings machte diese Fraktion nur bei MiaPaCa2 und Panc1 Zellen mehr als 20% aus. Polyploide Zellen kamen außer in Colo357 und Capan I ebenfalls nach 36h bei allen Zelllinien vor. Aber ähnlich wie bei IC261 lag ihr Anteil bei weniger als 5%.

Das Mikrotubuli-stabilisierende Spindelgift Taxol hingegen hatte völlig andere Effekte auf die Pankreaskarzinomzelllinien. Die Behandlung mit 5nM Taxol führte bei AsPC1, BXPC3, Panc89 und PancTul Zellen zum Absterben der Zellen. Bei Capan I schien Taxol fast keine Effekte auf die Zellen auszuüben. Ein vermehrtes Auftreten an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx wurde bei keiner der 8 Pankreaskarzinomzelllinien beobachtet.

Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Pankreaskarzinomzelllinien bei einer Kombinationsbehandlung der Spindelgifte Nocodazol oder Taxol mit dem Kinaseinhibitor IC261 verhalten. In preliminären Ergebnissen bei SV-40 transformierten Zellen ließ sich zeigen, dass eine Behandlung von Tumorzellen mit Nocodazol zum Teil zu Polyploidie führte, aber bei einer Kombination mit dem Kinaseinhibitor IC261 keine Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4Nx auftraten. Die an den Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführten Kombinationsbehandlungen mit IC261 und Nocodazol ergaben, dass weder bei den Panc1 noch bei den Panc89 behandelten Zellen im Gegensatz zu den jeweiligen Einzelbehandlungen mit diesen Substanzen, polyploide Zellen nachzuweisen waren. Der Vergleich der DNA-Verteilungsmuster mit denen der Einzelbehandlungen zeigte einen deutlichen Anstieg an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx.

Da die Behandlungen mit IC261 und Taxol bei den Pankreaskarzinomzelllinien zu unterschiedlichen Effekte führten, wurde überprüft, welche Wirkungen durch eine Kombination dieser beiden Substanzen erzielt werden könnte. Dabei zeigte sich, dass die Doppelbehandlung der Zellen mit Taxol und IC261 ähnliche Effekte wie die Einzelbehandlung mit IC261 hervorrief. Dies war vor allem bei den BXPC3, CapanI, MiaPaCa2 und Panc1 Zellen zu beobachten. Unter Kombinationsbehandlung kam es zu einer deutlichen Anhäufung von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx, welche unter dem Einfluss von IC261, nicht aber bei der Taxol Behandlung aufgetreten waren. Für die anderen Zelllinien führte die gewählte Konzentration zum vermehrten Absterben der Zellen.



**Abb.17: Bestimmung des DNA-Gehaltes im Durchflußzytometer.** Die beschriebenen 8 Pankreaskarzinomzelllinien wurden für 36h mit IC261 (1µM), Nocodazol (0,4µM), Taxol (5nM), IC261/Nocodazol (1µM/0,4µM) oder IC261/Taxol (1µM/5nM) behandelt und deren DNA-Gehalt im Durchflußzytometer bestimmt. Während in DMSO behandelten Zellen keine Veränderung in der Zellzyklusverteilung auftraten, kam es bei den einzelnen Behandlungen zu Veränderungen in der Zellzyklusverteilung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die induzierten zellulären Veränderungen, bezogen auf den DNA-Gehalt von Pankreastumorzelllinien, durch die Behandlung mit dem Kinaseinhibitor IC261 und dem Mikrotubuli-destabilisierendem Spindelgift Nocodazol vergleichbar waren, wohingegen die Behandlung mit dem Mikrotubuli-stabilisierendem Spindelgift Taxol ein völlig anderes Zellzyklusverteilungsmuster bewirkte. Bei der Kombinationsbehandlung mit IC261 und Nocodazol kam es zu einer verstärkenden Wirkung der beiden Substanzen, verbunden mit Reduktion der Polyploidie. Bei der Kombinationsbehandlung mit IC261 und Taxol überwog bei den meisten Zelllinien die Wirkung des Kinaseinhibitors.

### **3.6.1 Zelllinienspezifische Unterschiede nach IC261, Nocodazol, Taxol und Kombinationsbehandlung am Beispiel der BXPC3 und Panc89 Zellen**

Die Zelllinien-spezifischen Effekte der Behandlungen der Pankreaskarzinomzelllinien mit IC261, Nocodazol und Taxol alleine oder in Kombination, sind am Beispiel der BXPC3 und Panc89 Zellen demonstriert. In den Abbildungen 18 und 19 sind die Auswirkungen dieser Behandlungen zu den Zeitpunkten 4h, 8h, 12h, 24h und 36h dargestellt.

Bei der Behandlung von BXPC3 Zellen mit IC261 nahm die Anzahl von Zellen, die sich in der G2/M Phase befanden, mit der Zeit kontinuierlich zu und hatte nach 36h mit 68% den höchsten Wert erreicht. Dagegen zeigten die mit IC261 behandelten Panc89 Zellen bereits nach 8h einen deutlichen Anstieg an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx. Nach 12h war die Fraktion mit 2Nx Zellen mit über 50% die größte. Polyploidie trat bei Panc89 Zellen unter Behandlung mit IC261 erst nach 36h auf. Mit ca. 5% lag der Anteil deutlich höher als bei den BXPC3 Zellen. Zudem starben die Panc89 Zellen im Vergleich zu den BXPC3 Zellen früher und in größerer Anzahl ab (sub-G1). Die Behandlung mit 0,4 $\mu$ M des Mikrotubuli-destabilisierenden Agens Nocodazol bewirkte bei beiden Zelllinien ähnliche Effekte auf die Zellzyklusverteilung, wie beispielsweise die Inhibition der Kinase. Bei beiden Zelllinien zeigte sich eine deutliche Anhäufung an Zellen in der G2/M-Phase, wobei dieser Effekt bei den Panc89 Zellen deutlich stärker ausgeprägt war. Bereits nach 12h befanden sich bei Panc89 mehr als 70% in der G2/M-Phase. Ein vermehrtes Auftreten von Zellen in der sub-G1-Fraktion war ebenfalls bei beiden Zelllinien zu erkennen.

Polyploide Zellen wurden nach 36h nachgewiesen. Auch dieser Effekt war mit 8,2% bei den Panc89 Zellen gegenüber 2,5% bei den BXPC3 Zellen höher.

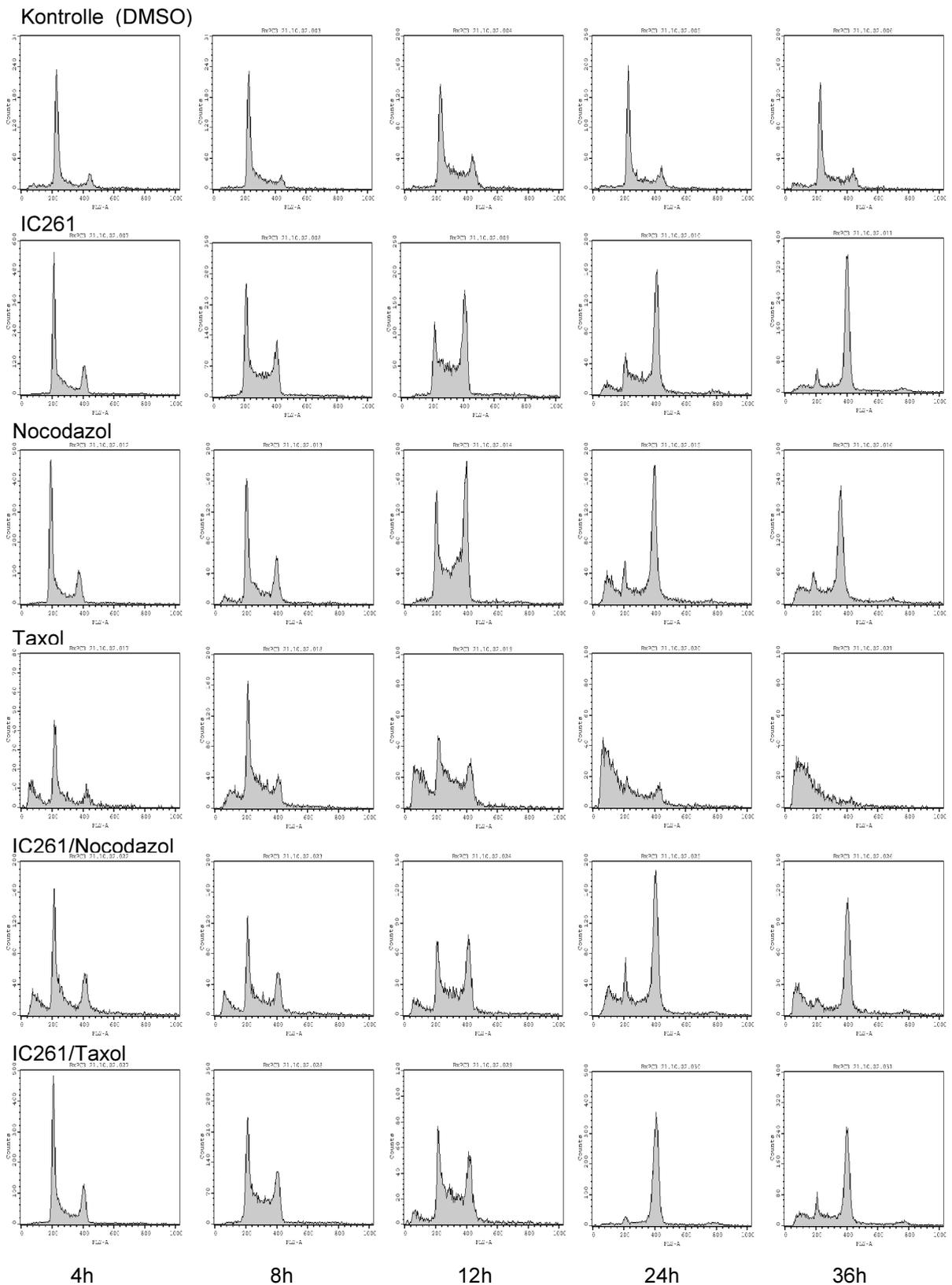
Das stabilisierende Spindelgift Taxol bewirkte bei beiden Zelllinien bereits nach 8h eine Zunahme an Zellen in der sub-G1-Fraktion. Bei BXPC3 kam es nach 12h auch zu einer leichten Anstieg an Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx. Nach 36h befanden sich jedoch sowohl bei den Panc89 als auch bei den BXPC3 beinahe alle Zellen in der sub-G1-Fraktion.

Die Kombinationsbehandlung mit IC261 und Nocodazol führte bei beiden Zelllinien zu ähnlichen Effekten im Zellzyklus wie bereits die Einzelbehandlungen. Das Auftreten von abgestorbenen Zellen war jedoch ausgeprägter als bei den Einzelbehandlungen. Allerdings waren nach 36h bei Panc89 keine Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4Nx in der FACS-Analyse zu beobachten, wohingegen bei den BXPC3 Zellen nach wie vor eine solche Fraktion vorhanden war.

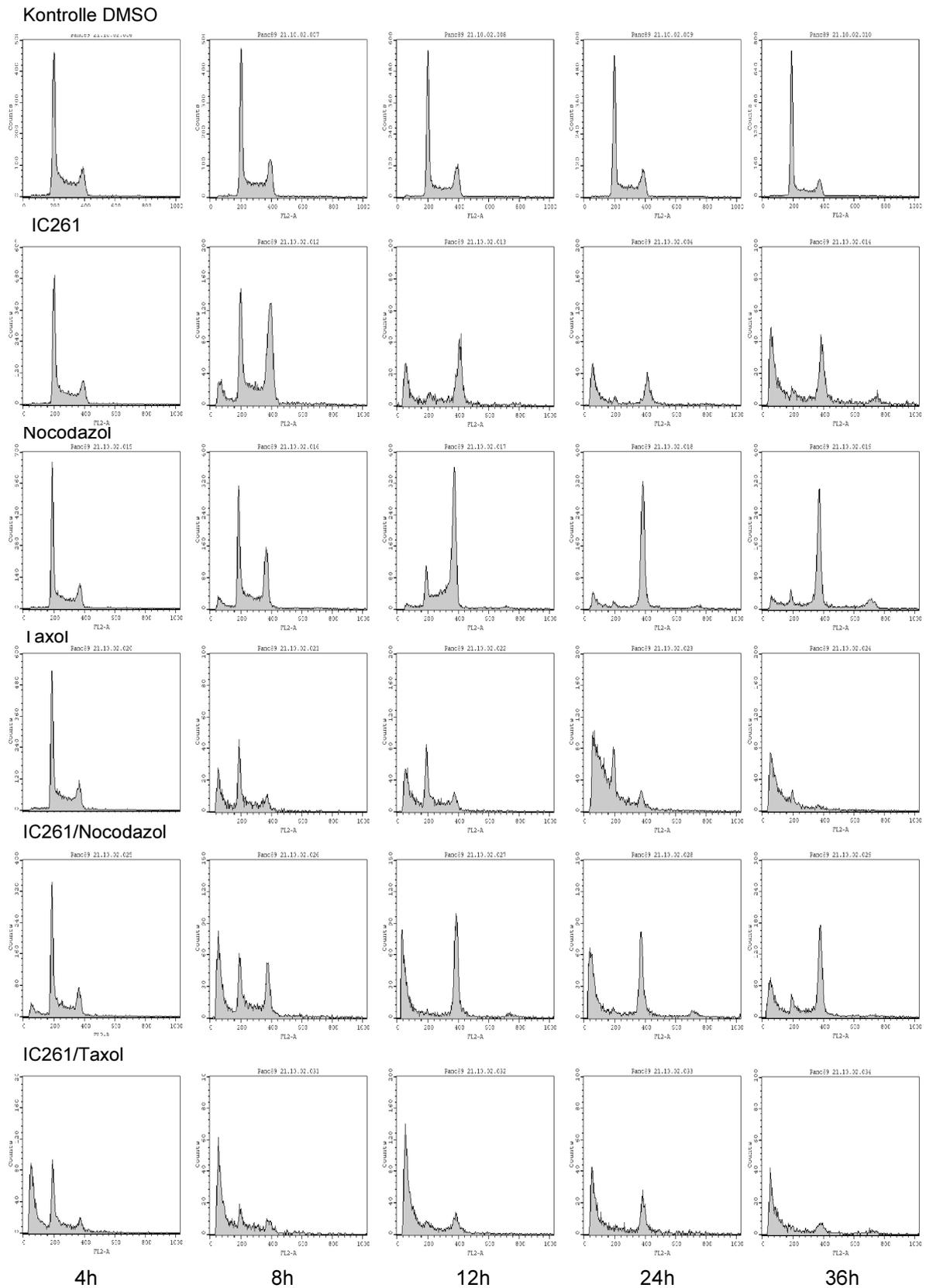
Während bei den Panc89 Zellen die Kombinationsbehandlung mit IC261 und Taxol, ähnlich wie bei der Taxol Einzelbehandlung, zu einem fast vollständigen Absterben der Zellen führte, bewirkte die Doppelbehandlung bei den BXPC3 Zellen einem deutlichen Anstieg der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx. Die Zunahme an Zellen in der sub-G1-Fraktion war bei den BXPC3 Zellen nur sehr gering ausgeprägt. Bei beiden Zelllinien fanden sich nach 36h einige Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4Nx.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Zelllinien unterschiedlich sensibel auf die verschiedenen Behandlungen reagierten. Dabei zeigten die beiden Zelllinien bei den Kombinationsbehandlungen unterschiedliche Effekte beim DNA-Gehalt der Zellen, obwohl sie ähnlich auf die Einzelbehandlungen reagierten. Bei der Kombinationbehandlung von Panc89 Zellen mit IC261 und Nocodazol wurden nach 36h kaum Zellen mit einem DNA-Gehalt von 4Nx nachgewiesen, obwohl solche Zellen bei beiden Einzelbehandlungen auftraten. Die Kombination aus IC261 und Nocodazol hatte auch bei dieser Zelllinie eine Abnahme an polyploiden Zellen zur Folge.

Bei den BXPC3 Zellen zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung aus IC261 und Taxol mit einem deutlichen Anstieg an 2Nx Zellen ein Überwiegen der IC261 Wirkung. Hingegen war bei den Panc89 Zellen mit einem leichten Anstieg an Zellen mit DNA-Gehalt von 2Nx und der Zunahme an toten Zellen Effekte der beiden Einzelbehandlungen zu beobachten.



**Abb.18: Bestimmung des DNA-Gehaltes von BXPC3 Zellen im Durchflusszytometer.** Die Zellzyklusverteilung von BXPC3 Zellen wurde nach 36h IC261 (1 $\mu$ M), Nocodazol (0,4 $\mu$ M), Taxol (5nM), IC261/Nocodazol (1 $\mu$ M/0,4 $\mu$ M) oder IC261/Taxol (1 $\mu$ M/5nM) Behandlung zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. IC261 und Nocodazol führen vornehmlich zu einem G2-Arrest, während im Verlauf der Taxolbehandlung die meisten Zellen absterben. Bei einer IC261/Taxol Doppelbehandlung überwiegen die durch IC261 hervorgerufenen Effekte.



**Abb.19: Bestimmung des DNA-Gehaltes von Panc89 Zellen im Durchflusszytometer.** Die Zellzyklusverteilung von Panc89 Zellen wurde nach 36h IC261 (1 $\mu$ M), Nocodazol (0,4 $\mu$ M), Taxol (5nM), IC261/Nocodazol (1 $\mu$ M/0,4 $\mu$ M) oder IC261/Taxol (1 $\mu$ M/5nM) Behandlung zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Bei IC261 und Nocodazol Behandlung kommt es zum Auftreten von polyploiden Zellen, wohingegen bei einer Kombinationsbehandlung dieser beiden Substanzen weniger Polyplodie zu beobachten sind.

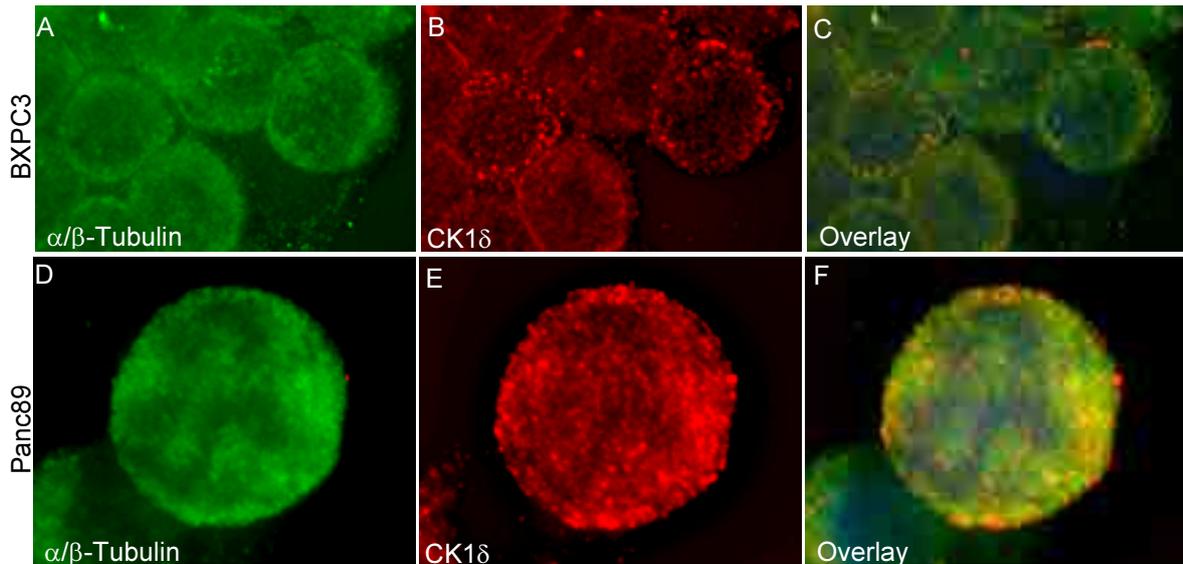
### **3.7. Einfluss von IC261 auf die Zentrosomenzahl in Pankreaskarzinomzellen**

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass die Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit IC261 zu einer Anhäufung von Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx führt. Dieses könnte eventuell mit einer Inhibition der Mitose zusammenhängen, die z.B. mit einer Störung in der Ausbildung des Spindelapparates im Zusammenhang stehen könnte. Frühere Arbeiten belegen, dass zumindest in Fibroblasten die Inhibition von CK1 $\delta$  durch IC261 die Spindeldynamik beeinflusst und zu einem transienten mitotischen Arrest führt (Behrend et al. 2000).

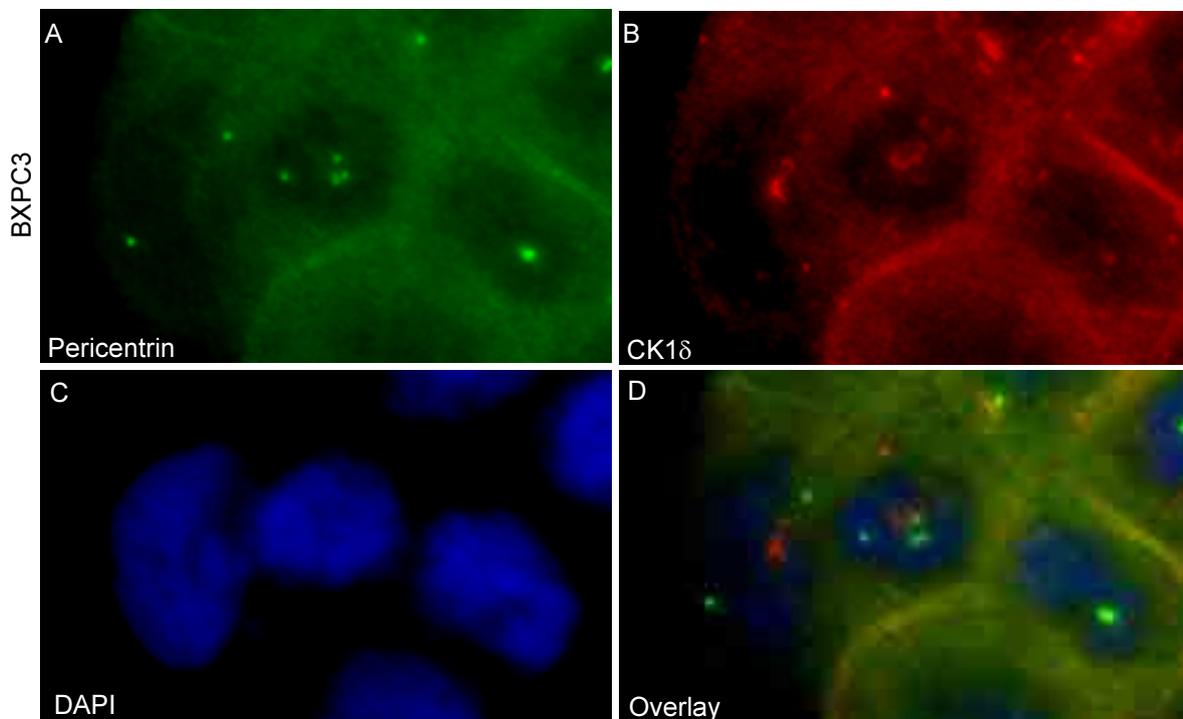
Um das Auftreten von Störungen im Aufbau des Spindelapparates nach 24h und 48h IC261 Behandlung nachzuweisen, wurde zum einen CK1 $\delta$  mit  $\alpha/\beta$ -Tubulin, bzw. CK1 $\delta$  mit dem zentrosomenassoziierten Pericentrin gemeinsam in der Immunfluoreszenz dargestellt.

Nach 24h Behandlung mit IC261 befanden sich annähernd alle Zellen in der Mitose. Es zeigte sich, dass CK1 $\delta$  in BXPC3 Zellen nach 24h IC261 Behandlung diffus im Zytoplasma in Form granulärer Strukturen mit Aussparung der DNA-tragenden Struktur verteilt war. Es schien zu einer geringen Mehranreicherung von CK1 $\delta$  im äußeren Bereich der Zelle gekommen zu sein. Im Overlay von CK1 $\delta$  und  $\alpha/\beta$ -Tubulin war zu erkennen, dass es nach IC261 Behandlung zu keiner Assoziation von CK1 $\delta$  an die Mikrotubuli kommt (Abb.20).

In den Panc89 Zellen war nach 24h IC261 Behandlung ebenfalls eine diffuse Verteilung von CK1 $\delta$  über die gesamte Zelle zu erkennen. Im Vergleich mit den BXPC3 Zellen fanden sich hier keine Ansammlungen von CK1 $\delta$ . Ebenso wie bei den BXPC3 Zellen zeigte sich auch bei ihnen keine Assoziation von CK1 $\delta$  an Mikrotubuli (Abb.20). Auffallend war, dass sich bei beiden untersuchten Zelllinien bereits nach 24h keine mitotischen Zellen mehr mit einem intakt ausgebildeten Spindelapparat nachweisen ließen.

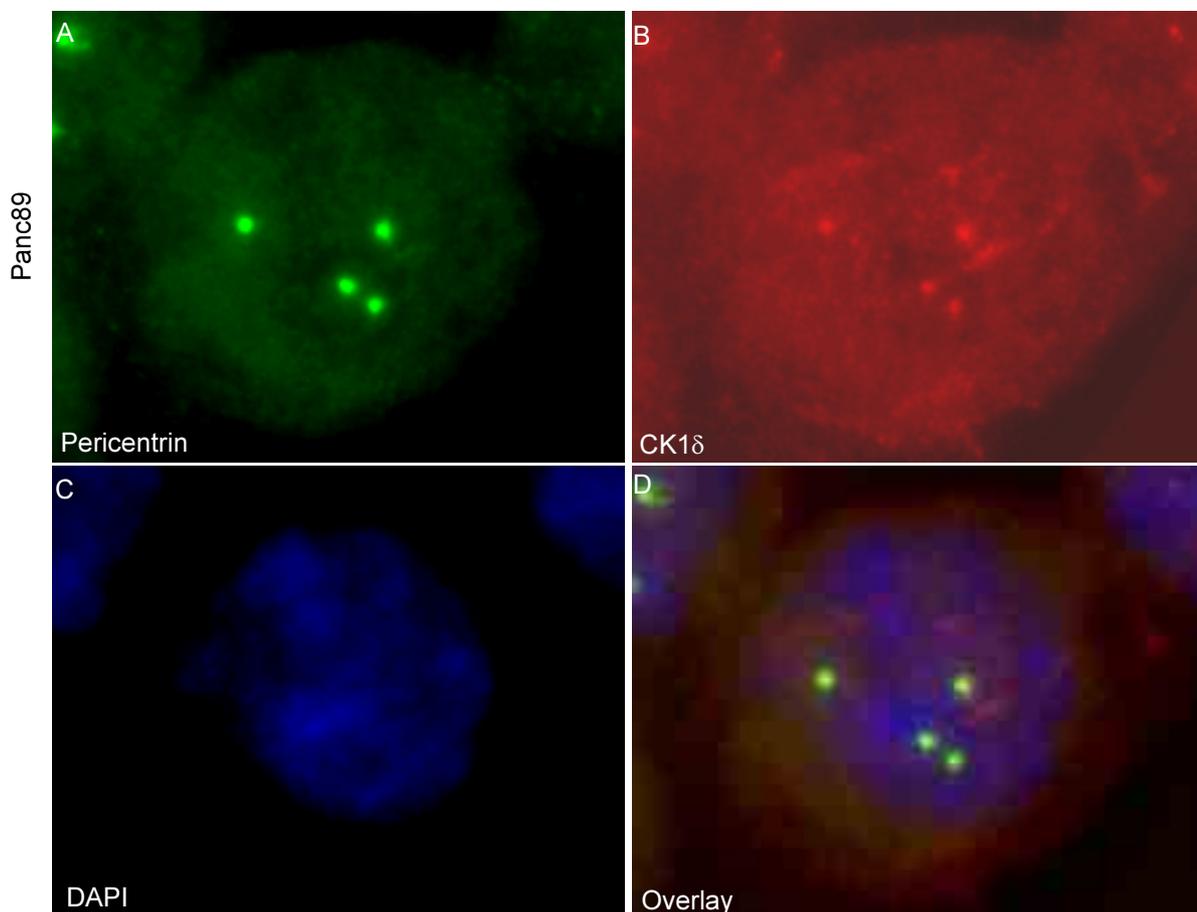


**Abb.20: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in Panc89 und BXPC3 Zellen.** Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von CK1 $\delta$  nach 24h IC261 Behandlung wurden die Zellen, auf Deckgläschen kultiviert und in Methanol fixiert. Zur Detektion wurde CK1 $\delta$  mit dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und dem sekundärem AKntikörper Alexa 568 (rot), sowie die Mikrotubuli mit  $\alpha/\beta$ -Tubulin und dem sekundärem Antikörper Alexa 488 (grün) markiert. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Diffuse Verteilung von CK1 $\delta$  ohne Assoziation an die Mikrotubuli (600-fache Vergrößerung).



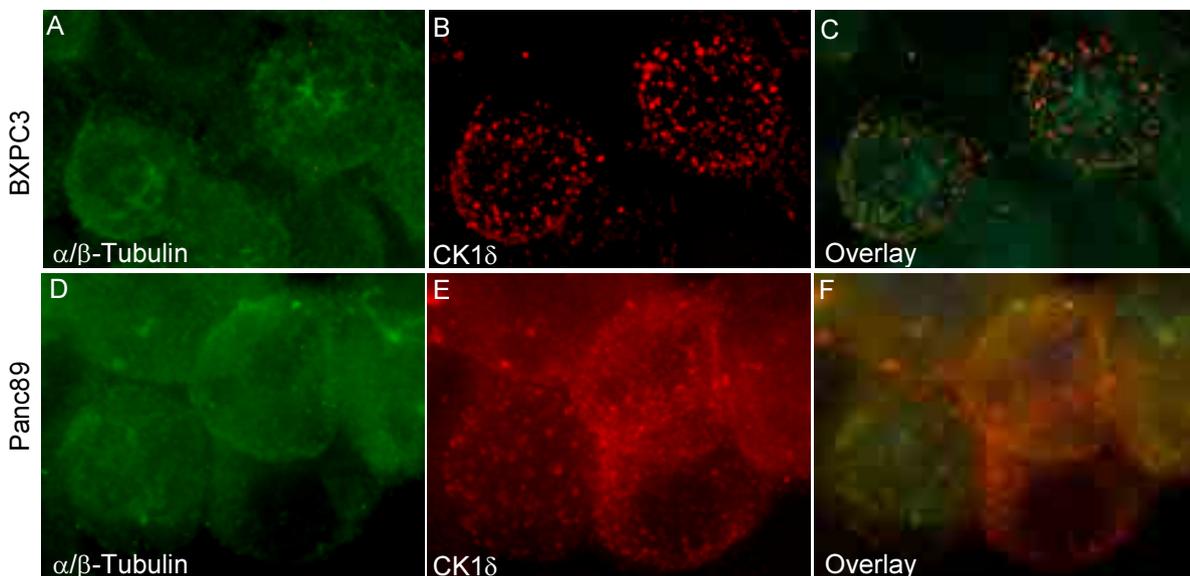
**Abb.21: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in BXPC3 Zellen nach 24h IC261 Behandlung.** CK1 $\delta$  wurde nach 24h IC261 Behandlung dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und die Zentrosomen mit Pericentrin (3120) detektiert. Dabei zeigten sich nicht mehr so deutliche punktförmige CK1 $\delta$ -Anreicherungen, wie bei den unbehandelten Kontrollen (siehe 3.1.1). Es kam zu Zentrosomenamplifikationen (600-fache Vergrößerung).

In den CK1 $\delta$ /Pericentrin Doppelfärbungen war bei beiden Zelllinien weiterhin eine Assoziation von CK1 $\delta$  mit den Zentrosomen zu erkennen. Im Gegensatz zu den nicht behandelten Zellen nahm jedoch am Zentrosom die Menge an CK1 $\delta$  in IC261 behandelten Zellen offensichtlich ab, was besonders bei den BXPC3 Zellen auffiehl (siehe Abbildung 21). Es kam sowohl bei den Panc89 als auch bei den BXPC3 Zellen nach 24h IC261 Behandlung zu numerischen Veränderungen der Zentrosomen. Zentrosomenamplifikationen (mit oftmals 4 Zentrosomen) wurden in beiden Zelllinien nachgewiesen. Diese Zellen waren nicht in der Lage, eine intakte Spindel aufzubauen (siehe Abb.21 und 22).



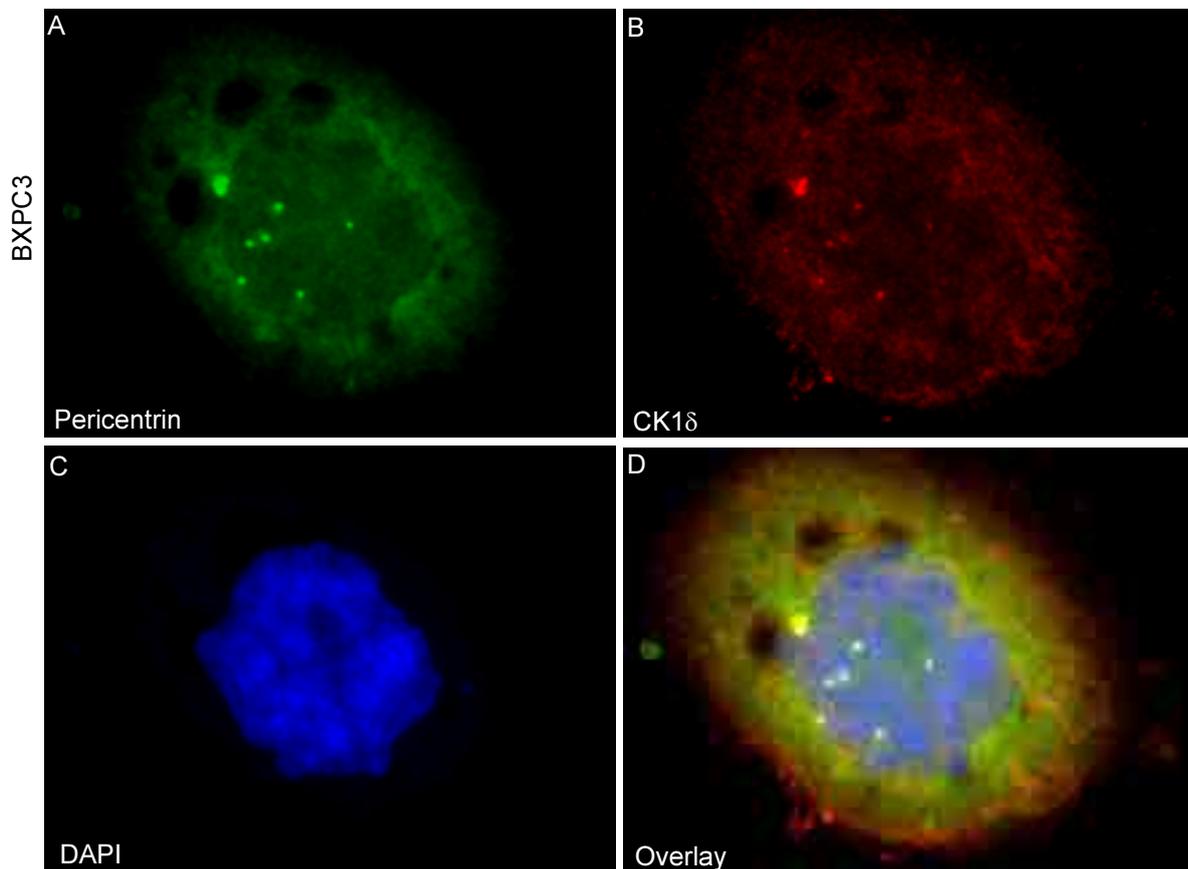
**Abb.22: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  nach 24h IC261 Behandlung in Panc89 Zellen.** CK1 $\delta$  wurde nach 24h IC261 Behandlung dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und die Zentrosomen mit Pericentrin (3120) detektiert. Dabei zeigte sich im Overlay (D) deutlich eine Kolokalisation von CK1 $\delta$  und Pericentrin. Es kam zur Zentrosomenamplifikation mit 4 Zentrosomen (600-fache Vergrößerung).

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, nahm die Anreicherung von CK1 $\delta$  in Form granulärer Strukturen in den BXPC3 Zellen 48h nach Behandlungsbeginn weiter zu. Dieser Effekt konnte in beinahe allen Zellen gesehen werden. Zusätzlich fiel auf, dass CK1 $\delta$  im äußeren Bereich der zytoplasmatischen Membran intensiver markiert wurde. Auch bei den Panc89 Zellen nahm der Anteil an CK1 $\delta$  im zytoplasmatischen Randbereich zu. Eine Assoziation von CK1 $\delta$  mit den Mikrotubuli war auch nach 48h IC261 Behandlung bei beiden Zelllinien nicht nachweisbar.

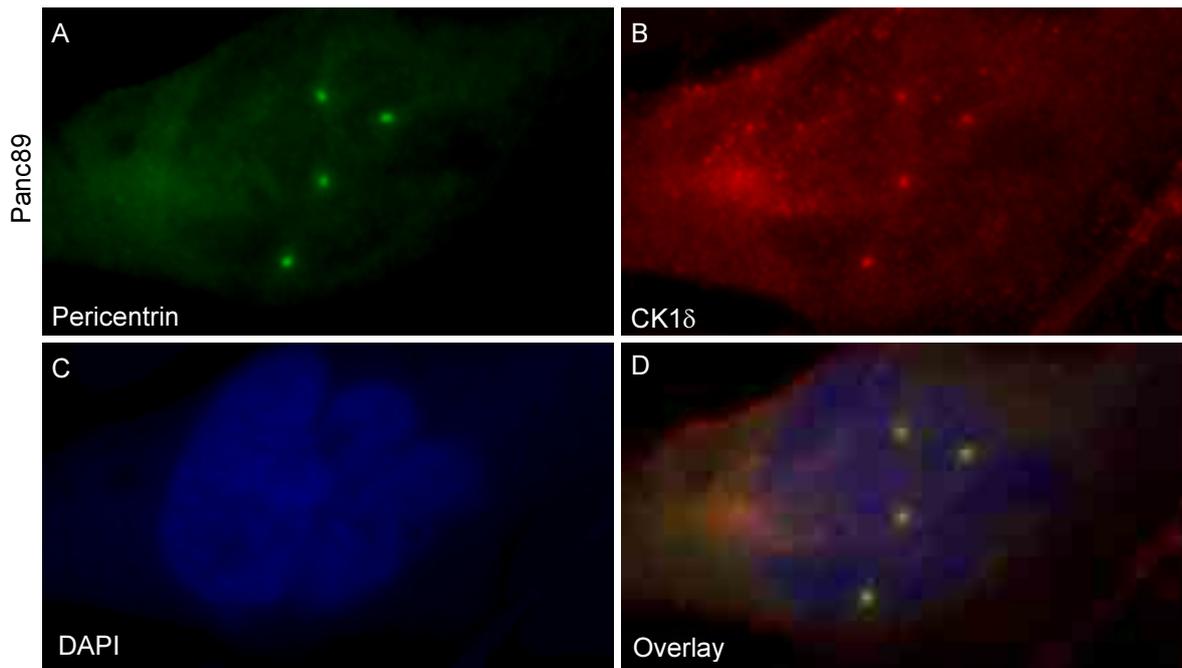


**Abb.23: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in BXPC3 und Panc89 Zellen.** Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von CK1 $\delta$  nach 48h IC261 Behandlung wurden die Zellen, auf Deckgläschen kultiviert und in Methanol fixiert. Zur Detektion wurde CK1 $\delta$  mit dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und dem sekundären Antikörper Alexa 568(rot), sowie die Mikrotubuli mit  $\alpha/\beta$ -Tubulin und dem sekundären Antikörper Alexa 488 (grün) markiert. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt (blau). Es ist nach 48h keine Assoziation von CK1 $\delta$  an den Mikrotubuli zu erkennen (600-fache Vergrößerung).

Bei beiden Zelllinien kam es nach 48h IC261 Behandlung zu einer deutlichen Zunahme an Zellen mit Zentrosomenamplifikation. Der Anteil an Zellen mit mehr als 4 Zentrosomen lag in den untersuchten Gesichtsfeldern bei den BXPC3 Zellen höher als bei den Panc89 Zellen (siehe Abb. 24 und 25). Genaue quantitative Aussagen waren allerdings nicht möglich, da es für den Nachweis aller Zentrosomen notwendig ist, jede Zelle in mehreren, einzelnen Schichten aufzunehmen. Dieses ist erforderlich, da sich auf Grund der dreidimensionalen Struktur der durch die Behandlung abgelösten und somit abgerundeten Zellen die Zentrosomen nicht alle in einer Ebene befinden. Auch nach 48h wurde keine Zellen mit einem intakt ausgebildeten Spindelapparat gefunden.



**Abb.24: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in 48h IC261 behandelten BXPC3 Zellen.** CK1 $\delta$  wurde nach 48h IC261 Behandlung dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und die Zentrosomen mit Pericentrin (3120) detektiert. Es kam zur Zentrosomenamplifikation mit 8 Zentrosomen. Im Overlay (D) ist eine Kolokalisation von CK1 $\delta$  und Pericentrin zu erkennen (600-fache Vergrößerung).



**Abb. 25: Subzelluläre Lokalisation von CK1 $\delta$  in 48h IC261 behandelten Panc89 Zellen.** Zur Detektion wurde CK1 $\delta$  mit dem monoklonalen Mausantikörper IC128A und die Zentrosomen mit Pericentrin (3120) markiert. Es sind jeweils 4 punktförmige Strukturen mit einer deutlichen fluoreszierenden Mehranreicherung von CK1 $\delta$  und Pericentrin zu erkennen (600-fache Vergrößerung).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei beiden Zelllinien die Zellteilung durch einen geschädigten und funktionsunfähigen Aufbau des Spindelapparates gestört war. CK1 $\delta$  war nach IC261 Behandlung diffus über die gesamte Zelle verteilt und im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen kam es bei den BXPC3 Zellen zu einer Häufung von CK1 $\delta$  in Form von granulären Strukturen. Bereits nach 24h Behandlungsdauer war CK1 $\delta$  nur noch zu einem geringeren Anteil mit den Zentrosomen assoziiert. Mit zunehmender Behandlungsdauer traten zudem in beiden Zelllinien vermehrt zentrosomale Störungen im Sinne von Zentrosomenamplifikationen auf.

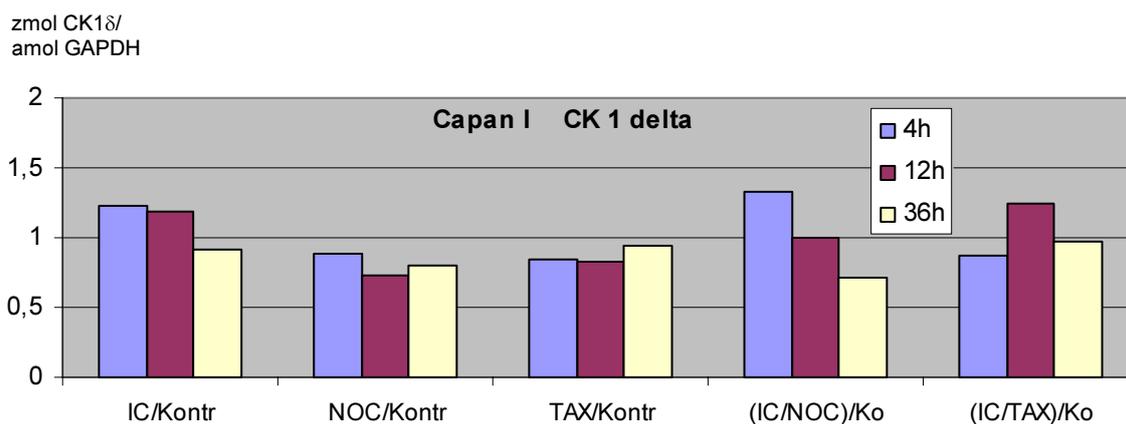
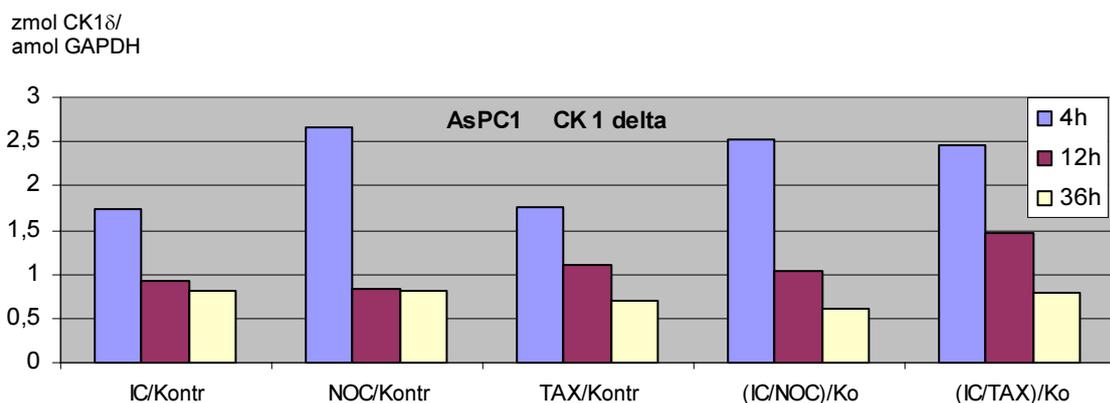
### 3.8. Bestimmung der RNA Expressionslevel von CK1 $\delta$ in Pankreaskarzinomzelllinien nach Behandlung mit IC261, Nocodazol und Taxol

Um die Auswirkungen der IC261, der Nocodazol-, der Taxol-, sowie der entsprechenden Doppelbehandlungen (IC261/NOC bzw. IC261/Taxol) auf Änderungen im CK1 $\delta$  mRNA-Spiegel im Verlauf der Behandlung zu analysieren, wurden quantitative RNA-Analysen bei allen 8 Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt. Das Verhältnis der CK1 $\delta$ -RNA

Konzentration (zmol CK1 $\delta$ ) zu der des intern gewählten Standardgens GAPDH (amol GAPDH) der behandelten Zellen wurde zu entsprechenden Zeitpunkten in Relation zu derjenigen unbehandelter Zellen gesetzt.

Es zeigte sich für die AsPC1 Zellen nach 4h eine Erhöhung der mRNA auf mehr als das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle. Im Laufe der Behandlung sanken die Expressionslevel im Vergleich zur Kontrolle jedoch wieder ab und lagen nach 36h bei allen Behandlungen unter den Kontrollwerten.

Für die anderen Zelllinien ergaben sich durch die Behandlungen keine deutlichen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen. Dies ist exemplarisch für die CapanI Zellen in Abb.26 dargestellt.



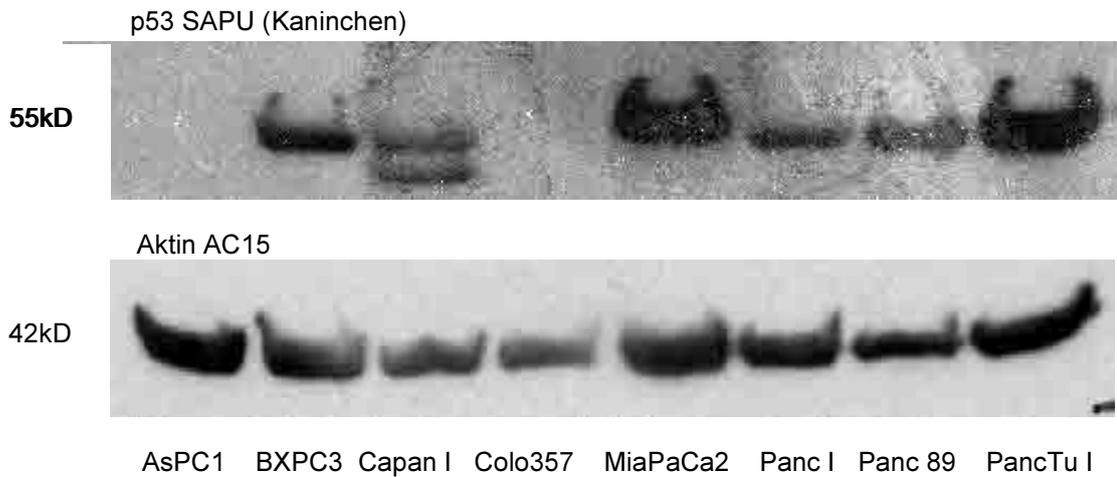
**Abb.26: Quantitative RNA-Bestimmung von CK1 $\delta$  spezifischer mRNA.** Dargestellt ist das Verhältnis von CK1 $\delta$  mRNA Konzentration (zmol CK1 $\delta$ ) zu der des intern gewählten Standardgens GAPDH (amol GAPDH) bei behandelten AsPC1 und CapanI. Diese wurden zu entsprechenden Zeitpunkten in Relation zu denjenigen unbehandelter Zellen gesetzt.

### **3.9. Einfluss von IC261, Nocodazol und Taxol allein und in Kombination auf die Expression des Tumorsupressorproteins p53 bei etablierten Pankreaskarzinomzelllinien**

#### **3.9.1 Expression von p53 in etablierten Pankreaskarzinomzelllinien**

Davon ausgehend, dass CK1 $\delta$  und p53 über einen autoregulatorischen Feedback-loop eng miteinander verbunden sind (KNIPPSCHILD ET AL., 1997), wurde anhand von Western Blot-Analysen die Auswirkungen von IC261 und klassischen Spindelgiften auf die p53 Proteinmenge analysiert. Zunächst wurde für die AsPC1, BXPC3, CapanI, Colo357, MiaPaCa2, Panc1, Panc89 und PancTuI Zellen die p53-Expression nachgewiesen. Dazu wurden jeweils Lysate aller 8 Pankreastumorzelllinien mit gleicher Menge an Protein, wie in Material und Methoden beschrieben in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis von p53 erfolgte mit dem p53-spezifischen polyklonalem Antiserum der Firma SAPU und einem sekundären anti-Kaninchen HRP-gekoppelten Antikörper. Die Detektion wurde mit Chemilumineszenz, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.

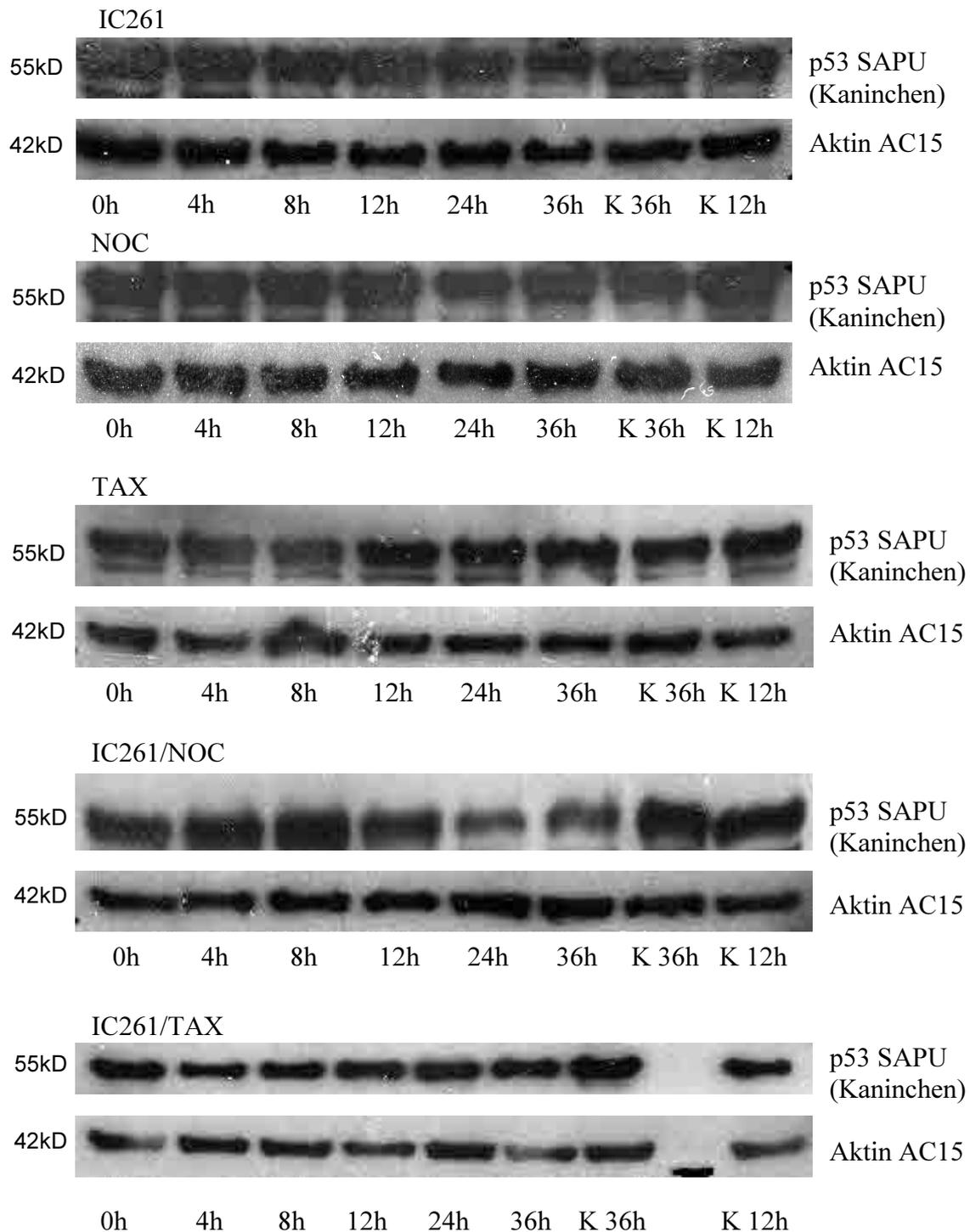
In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass im Gegensatz zu den anderen Zelllinien für Colo357 (wt p53) und bei AsPC1 Zellen (p53 Mutation führt zu frühem Stopcodon) kein p53 detektiert wurde. Die höchsten Expressionslevel waren in PancTu I und MiaPaCa2 Zellen zu beobachten. Bei Capan I zeigte sich eine Doppelbande. Zum Nachweis gleich aufgetragener Proteinmengen wurde  $\beta$ -Aktin detektiert.



**Abb.27: Western Blot-Analysen von p53 bei Pankreaskarzinomzelllinien.** Lysate wurden mit SDS-Page aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis von p53 erfolgte mit dem p53-spezifischen polyklonalen Antiserum der Firma SAPU und einem sekundären anti-Kaninchen HRP-gekoppelten Antikörper. Zum Nachweis gleich aufgetragener Proteinmengen wurde  $\beta$ -Aktin detektiert. Für AsPC1 und Colo357 zeigt sich keine p53 spezifische Bande. Bei Capan I ist eine Doppelbande zu beobachten.

Da in Stresssituationen p53 aktiviert wird, wurde des Weiteren untersucht, wie sich im Verlauf der Behandlung der einzelnen Zelllinien mit klassischen Spindelgiften (Nocodazol und Taxol) und dem Kinaseinhibitor IC261 allein bzw. in Kombination die p53 Proteinmengen veränderten. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 4h, 8h, 12h, 24h und 36h nach der jeweiligen Behandlung lysiert und p53 mit Hilfe von Western Blot-Analysen detektiert.

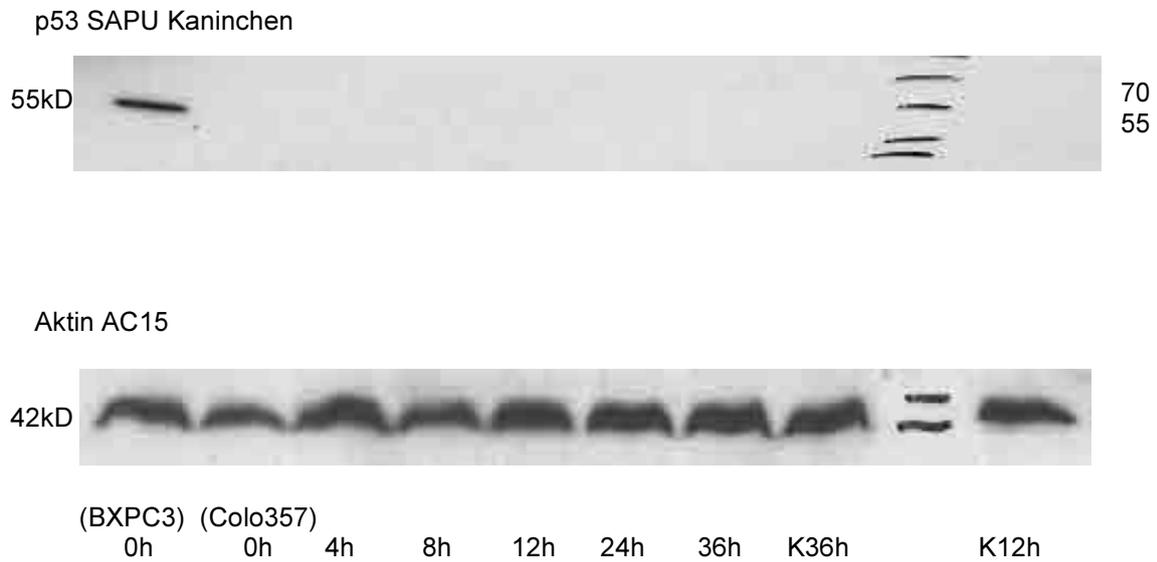
In den 6 Zelllinien, die mutante p53 exprimieren, wurde keine signifikanten Veränderung der p53 Proteinmenge nach den jeweiligen Behandlungen nachgewiesen. Ausnahme stellte nur die Doppelbehandlung von BXPC3 Zellen mit IC261 und Nocodazol dar. Hier begannen die p53 Proteinmengen bereits nach 12h IC261 Behandlung abzunehmen (siehe Abb.28).



**Abb.28: Analyse der p53-Expression der BXPC3 Zellen nach entsprechender Behandlung.**

Über die Dauer von 36h wurden die BxPC3 Zellen mit IC261 (1 $\mu$ M), Nocodazol (0,4 $\mu$ M), Taxol (5nM), IC261 (1 $\mu$ M) und Nocodazol (0,4 $\mu$ M) sowie IC261 (1 $\mu$ M) und Taxol (5nM) behandelt. Die Lysate wurden auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis von p53 erfolgte mit dem p53-spezifischen polyklonalem Antiserum der Firma SAPU und einem sekundären anti-Kaninchen HRP-gekoppeltem Antikörper. Zum Nachweis gleich aufgetragener Proteinmengen wurde  $\beta$ -Aktin detektiert.

Bei Colo357 war auch nach den Behandlungen zu keinem Zeitpunkt ein Anstieg in der p53 Konzentration zu erkennen, obwohl für die Zellen wt- p53 beschrieben wurde (Abb.29).



**Abb.29: Analyse der p53-Expression bei IC261/Nocodazol behandelten Colo357 Zellen.**

Nachweis von p53 erfolgte mit dem p53-spezifischen polyklonalem Antiserum der Firma SAPU. In der ersten Spur wurde zur Kontrolle, dass p53 detektiert wird ein unbehandeltes BXPC3 Lysat aufgetragen. In den anderen Spuren ist während der gesamten Behandlung mit IC261 und Nocodazol kein p53 nachweisbar.

## 4. Diskussion

Da das Pankreaskarzinom zu den aggressivsten Tumoren gehört, gehen Bestrebungen zu einer besseren Früherkennung und zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien. Ein Ziel ist es hierbei, die Aktivität von Schlüsselregulatoren von Signaltransduktionswegen zu beeinflussen. Zu diesen Schlüsselregulatoren gehören Proteine, wie beispielsweise die in Stress-Situationen p53 abhängig aktivierte Casein Kinase I delta, die die Aktivität zahlreicher regulatorischer Proteine beeinflusst. Diese Proteine sind in wichtige Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und DNA-Reparation involviert (GROSS & ANDERSON, 1998; MARITZEN ET AL., 2003; VIELHABER & VIRSHUP, 2001).

### 4.1. Die Expressionslevel von CK1 $\delta$ in Pankreaskarzinomzelllinien unterscheiden sich auf RNA und Proteinebene

Die quantitative Analyse der Expression von CK1 $\delta$  spezifischer mRNA in AsPC1, BXPC3, CapanI, Colo357, MiaPaCa2, Panc1, Panc89 und PancTuI Zellen, führte zum Nachweis der höchsten CK1 $\delta$  spezifischen mRNA-Spiegel in Panc1 Zellen. Sie war um das 6-fache höher als bei den PancTuI oder MiaPaCa2 Zellen, bei denen die niedrigsten CK1 $\delta$  spezifischen mRNA-Spiegel aller untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien gemessen wurden. Die verschiedenen Mengen an CK1 $\delta$  mRNA in den Pankreaskarzinomzelllinien könnten auf eine unterschiedlich starke Transkription des CK1 $\delta$  Gens oder auf eine veränderte CK1 $\delta$  mRNA Stabilität zurückzuführen sein. Weiterführende Versuche sind jedoch notwendig um genauere Aussagen treffen zu können.

Auf Proteinebene zeigten sich hingegen nicht derart ausgeprägte Unterschiede in den CK1 $\delta$ -Expressionsleveln wie bei den RNA-Analysen. In den durchgeführten Western Blot Analysen wurde gezeigt, dass bis auf AsPC1 und BXPC3 Zellen, bei denen eine etwas

geringere CK1 $\delta$  Proteinmenge zu beobachten war, alle anderen Pankreaskarzinomzelllinien ähnliche Mengen an CK1 $\delta$  exprimierten. Eine mögliche Ursache für die Unterschiede der CK1 $\delta$ -Expressionslevel auf RNA- und Proteinebene wäre, dass posttranslationale Modifikationen (CEGIELSKA ET AL., 1998; GRAVES & ROACH, 1995), insbesondere die Phosphorylierung, die Stabilität von CK1 $\delta$  auf Proteinebene beeinflussen können.

#### **4.2. CK1 $\delta$ assoziiert mit Membranstrukturen und Zentrosomen**

Die Analyse der Verteilung von CK1 $\delta$  in den einzelnen Pankreastumorzelllinien ergab, dass CK1 $\delta$  in Interphasezellen eine zytoplasmatische granuläre Verteilung aufwies, die im perinukleären Bereich verstärkt auftrat. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Transportvesikel.

Diese zytoplasmatische, granuläre Anreicherung von CK1 $\delta$  lässt eine Beteiligung am Vesikeltransport vermuten und ist im Einklang mit Daten aus früheren Veröffentlichungen (BEHREND ET AL., 2000B). Da sowohl bei der Vesikelbildung, als auch bei der Abschnürung von Vesikeln aus dem TGN, Kinasen (u.a. Proteinkinase D Familie) regulatorische Funktionen ausüben, geben die Ergebnisse Anlass zu der Annahme, dass auch CK1 $\delta$  in diese Prozesse involviert sein könnte. Diese Vermutung wird zudem durch die Tatsache unterstützt, dass CK1 $\delta$ -Homologe in Hefen eine wichtige Rolle im endozytotischen Vesikeltransport spielen (MARCHAL, DUPRE & URBAN-GRIMAL, 2002) und dass die Säugetier Isoform CK1 $\alpha$  auch in die Regulation der Exozytose synaptischer Vesikel involviert ist (DUBOIS ET AL., 2002).

Die durchgeführten Kollokalisationsstudien ergaben zudem, dass CK1 $\delta$  konstitutiv am Zentrosom assoziiert ist. Bisher konnte eine Assoziation von CK1 $\delta$  mit den Zentrosomen nur in Interphasezellen (MILNE, LOOBY & MEEK, 2001), bzw. nach der Induktion von DNA-Schädigungen gezeigt werden (BEHREND ET AL., 2000A).

In mitotischen Zellen war eine diffuse Verteilung von CK1 $\delta$  über das gesamte Zytoplasma mit einer Aussparung im Bereich der Chromosomen zu beobachten. Die durchgeführten

Immunfluoreszenzen deuten zudem an, dass eine Subpopulation von CK1 $\delta$  mit der mitotischen Spindel assoziiert. Auch dieses wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, da in der Literatur bisher nur beschrieben wurde, dass CK1 $\delta$  in Stress-Situationen mit dem Spindelapparat assoziiert (BEHREND ET AL., 2000A).

### **4.3. IC261 inhibiert das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen und führt zu Veränderungen im Zellzyklus**

Da die Assoziation von CK1 $\delta$  mit den Spindelfasern und den Zentrosomen auf regulatorische Funktionen bei der Chromosomenregulation hindeutet, wurden die Auswirkungen der CK1 $\delta$  Inhibition in den etablierten Pankreaskarzinomzelllinien untersucht. Die Wachstumskurven, durchflusszytometrischen Analysen, Phasenkontrastaufnahmen und Immunfluoreszenzen wiesen darauf hin, dass IC261 zu einer Hemmung der Proliferation und zum Zelltod der Pankreaskarzinomzellen führte. Nach IC261 Behandlung kam es zum Abrunden der Zellen, zum Arrest in der Mitose, zur Anhäufung der Zellen mit einem DNA-Gehalt von 2Nx und zu einer kompletten Inhibition des Zellwachstums. Weitergehende Analysen ergaben einen konzentrationsabhängigen und zelllinienspezifischen Effekt von IC261. So wurde bei bestimmten Zelllinien der Anstieg von mitotisch arretierten Zellen schon bei geringen IC261 Konzentrationen beobachtet (z.B. 0,2 $\mu$ M BXPC3), während bei anderen Zelllinien höhere IC261 Konzentrationen für einen Zellzyklusarrest nötig waren (z.B. 0,8 $\mu$ M Panc89). Bei einigen Zelllinien wurde zudem Polyploidie (z.B. Panc1) oder auch das Absterben von Zellen beobachtet (Panc89). Das unterschiedliche zelllinienspezifische Verhalten der einzelnen Zelllinien könnte, auf Grund der verschiedenen genetischen Grundlagen der untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien (MOORE ET AL., 2001; SIPOS ET AL., 2003), sowohl auf eine unterschiedliche Expression als auch Aktivität von CK1 $\delta$ , sowie auf Unterschiede in den Signaltransduktionswegen der Zelllinien zurückzuführen sein.

#### **4.4. Durch Kombinationsbehandlung von IC261 und Nocodazol werden unerwünschte Nebenwirkungen wie Polyploidie in Pankreaskarzinomzelllinien reduziert**

Ähnlich wie die Behandlung mit dem Kinaseinhibitor IC261 führten auch die Behandlungen der Pankreaskarzinomzelllinien mit den Spindelgiften Nocodazol sowohl allein als auch in Kombination zu einer Wachstumshemmung.

Mit den durchgeführten Zellzyklusanalysen wurde gezeigt, dass die Behandlung der einzelnen Pankreaskarzinomzelllinien mit 0,4 $\mu$ M des Mikrotubuli-destabilisierenden Agens Nocodazol ähnliche Effekte auf die Zellzyklusverteilung bewirkt, wie die Inhibition von CK1 $\delta$  durch den Kinaseinhibitor IC261. Bei allen Zelllinien kam es zu einer deutlichen Zunahme an Zellen in der G2/M-Phase. Nocodazol führt bereits in submikromolaren Konzentrationen zu einer Inhibition des Spindelaufbaus, wodurch die Chromosomen nicht segregieren können (VASQUEZ ET AL., 1997). Es wurden in den Zelllinien AsPC1, BxPC3, Panc1 und Panc89 Zellen nach 36h Behandlung mit Nocodazol polyploide Zellen nachgewiesen. Da diese Zellen kein wt-p53 exprimieren, ist davon auszugehen, dass diese Zellen nach einem transienten mitotischen Arrest, nicht über einen p53-abhängigen postmitotischen Kontrollpunkt an der erneuten DNA-Replikation gehindert werden können (KAHN ET AL., 1998; NOTTERMAN ET AL., 1998). Zellen ohne diesen postmitotischen Kontrollpunkt treten ungehindert erneut in die S-Phase ein. Die Entkopplung von Chromosomensegregation und Replikation, wird als Endoreduplikation bezeichnet, und führt schließlich zu einer Erhöhung des Chromosomensatzes auf 4N $x$  (CROSS ET AL., 1995); (DI LEONARDO ET AL., 1997). Endoreduplikation wurde auch in der Tumorzelllinie MethA nachgewiesen, welche durch ein mutiertes p53 Tumorsuppressorprotein nicht in der Lage war, einen Zellzyklusarrest auszulösen (BEHREND ET AL., 2000A).

Nach 36h Kombinationsbehandlung der Panc1 und Panc89 Zellen mit 1 $\mu$ M IC261 und 0,4 $\mu$ M des Spindelgiftes Nocodazol, ließen sich keine polyploiden Zellen nachweisen, obwohl bei diesen beiden Zelllinien durch Einzelbehandlungen sowohl mit IC261 als auch mit Nocodazol Endoreduplikation auftrat. Dieser Effekt war bisher nur bei SV-40 transformierten Zellen durch die Kombinationsbehandlung aus dem Kinaseinhibitor IC261 und dem destabilisierenden Spindelgift Nocodazol beobachtet worden (persönliche

Mitteilung Dr. Lars Behrend) und konnte in dieser Arbeit zum ersten mal für Karzinomzellen gezeigt werden.

#### **4.5. Expression von p53 in unbehandelten und mit IC261 und Spindelgiften behandelten Pankreaskarzinomzelllinien**

Da p53 regulativ in den Zellzyklus eingreift und p53 selbst durch einen autoregulatorischen Feedback-loop mit CK1 $\delta$  eng verknüpft ist (KNIPPSCHILD ET AL., 1997), wurde die Proteinexpression von p53, nach Hemmung von CK1 $\delta$  durch IC261, sowie nach Behandlung mit klassischen Spindelgiften, in Pankreaskarzinomzelllinien untersucht. Bei den Einzelbehandlungen mit dem Kinaseinhibitor bzw. den Spindelgiften wurden bei allen 8 Pankreaskarzinomzelllinien keine wesentlichen Veränderungen der Proteinexpression von p53 festgestellt werden. Dies kann durch die genotypische Charakterisierung der AsPC1, BXPC3, CapanI, MiaPaCa2, Panc1, Panc89 und PancTu1 Zellen erklärt werden, da diese Zelllinien alle kein funktionelles wt-p53 exprimieren. Überraschenderweise kam es jedoch auch bei den behandelten Colo357 Zellen zu keinem Anstieg der p53 Konzentration, obwohl für diese Zelllinie wt-p53 beschrieben wird. Dies spricht für die Vermutung, dass es sich bei dem beschriebenen wt-p53 in Colo357 Zellen, nur um eine partiell funktionell aktive Form handelt (persönliche Mitteilung Prof. Kalthoff, Kiel). Die aufgetretene Doppelbande von p53 bei Capan I lässt sich am wahrscheinlichsten durch Degradation erklären. Dafür spricht auch, dass längere Expositionszeiten auch bei den anderen Zelllinien zum Auftreten von Doppelbanden führten.

#### **4.6. Die Inhibition von CK1 $\delta$ durch IC261 verhindert die Zellteilung und führt zu Zentrosomenamplifikationen**

In den Immunfluoreszenzanalysen waren bei allen IC261 behandelten Zelllinien Zentrosomenamplifikationen mit bis zu 8 Zentrosomen in einer Zelle zu beobachten. Nach IC261 Behandlung waren diese Zellen nicht mehr in der Lage eine Spindel aufzubauen. Das Ausrichten der Chromosomen in den IC261-behandelten Zellen vor einem mitotischen Arrest in den Zelläquator, wie es bei anderen Zelllinien beschrieben wurde, war dabei nicht zu beobachten. Dieser als Metakinese bezeichnete Prozess wird der Prometaphase zugeordnet und ist von einem funktionellen Spindelapparat abhängig (HINCHCLIFFE ET AL., 2001). Eine mögliche Ursache der fehlenden Metakinese der behandelten Pankreaskarzinomzelllinien durch den Kinaseinhibitor könnte darin begründet liegen, dass es nach Behandlung der Zellen keinen intakt funktionierenden Spindelapparat mehr gab. Eine Induktion von multipolaren Spindeln und Zentrosomenamplifikationen nach IC261 Behandlung wurde bereits für Fibroblasten beschrieben (BEHREND ET AL., 2000B). Während der Fortführung des Zellzyklus durchlaufen die Zentrosomen eine Reihe von auffälligen strukturellen Veränderungen, wie Duplikation, Reifung und Trennung (BORNENS UND BOUDJOU, 1999; ZIMMERMANN ET AL., 1999; URBANI UND STEARNS, 1999). Die korrekte Ausführung des Zentrosomenverdopplungszyklus ist wichtig für die Ausbildung einer bipolaren mitotischen Spindel. Es ist schon lange bekannt, dass die Fehlfunktion von Zentrosomen die Entstehung von Tumoren begünstigt (BRINKLEY UND GOEPFERT 1998; DOXSEY 1998; SALISBURY ET AL., 1999). Die nachgewiesenen Spindel- und Zentrosomendefekte in den IC261 behandelten Pankreaskarzinomzelllinien lassen auf einen Einfluss von CK1 $\delta$  in der Zentrosomenduplikation und der Formation des Spindelapparates schließen.

Die molekularen Grundlagen der Störung der Mitose durch Blockade der CK1 $\delta$ -Funktion durch IC261 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Möglicherweise ist die Inhibition der Phosphorylierung eines oder mehrerer Proteine des mitotischen Zytoskeletts, wie z.B. Tubulin, Mikrotubuli-akzessorischer Proteine oder zentrosomaler Proteine, verantwortlich. Die Fehlorganisation der Zentrosomen könnte jedoch auch auf einen sekundären Effekt zurückzuführen sein, der Folge der Beeinflussung eines nicht-strukturellen, zellulären Prozesses durch IC261 ist. Mitotische Abnormalitäten, wie sie

nach Behandlung mit IC261 beobachtet wurden, wurden auch in Zellen gefunden, denen der Tumorsuppressor p53 fehlt. Sowohl bei Tumoren als auch bei primären Zellen und Zelllinien führt der Verlust von p53 zur unnatürlichen Amplifikation von Zentrosomen (CARROLL ET AL., 1999) (CHIBA ET AL., 2000) (FUKASAWA & VANDE WOUDE, 1997). Ein Regulationsmechanismus, über den der Verlust von p53 mit der Zentrosomenamplifikation verbunden sein könnte, verläuft über CDK2. Diese Cyklin-abhängige Kinase ist neben der DNA-Replikation auch für die Zentrosomenreplikation unentbehrlich (HINCHCLIFFE ET AL., 1998; LACEY ET AL., 1999). P53 inaktiviert über den p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-Weg die Aktivität von CDK2 (HINCHCLIFFE ET AL., 1998; LACEY ET AL., 1999). Eine ständige Aktivierung von CDK2 in Abwesenheit von p53 kann zu einer Amplifikation von Zentrosomen führen (MARX, 2001; MUSSMAN ET AL., 2000). Da die Pankreaskarzinomzelllinien fast ausnahmslos mutanten p53 exprimieren (siehe Tabelle 1 Material und Methoden), ist dieses ebenfalls eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Zentrosomenamplifikationen.

#### **4.7. Schlussfolgerung**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibition von CK1 $\delta$  einen viel versprechenden Ansatz für die Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellt. Des Weiteren könnte sich die Kombination von IC261 mit Spindelgiften positiv auswirken, obwohl Spindelgifte allein in Studien keine Wirkungen zeigten. Es erscheint interessant und notwendig diese *in vitro* gewonnenen Daten im Tiermodell zu überprüfen, um festzustellen, ob die Behandlung mit IC261 allein oder in Kombination mit einem Spindelgift ein neues Therapiekonzept für das Pankreaskarzinom darstellen könnte.

## 5. Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas ist ein hochmaligner, epithelialer Tumor, der nicht auf die gängigen Chemotherapien anspricht. Ziel ist es daher, neue Targetmoleküle für einen möglichen Therapieansatz zu identifizieren. Eines dieser Zielmoleküle stellt die Casein Kinase 1 delta (CK1 $\delta$ ) dar, die wichtige Kontrollfunktionen insbesondere während der Mitose wahrnimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Expression und subzelluläre Verteilung von CK1 $\delta$  in 8 humanen genotypisch gut charakterisierten Pankreastumorzelllinien (AsPC1, BXPc3, Capan1, Colo357, MiaPaCa2, Panc1, Panc89 und PancTul Zellen) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich die mRNA-Expressionsrate von CK1 $\delta$  in den einzelnen Zelllinien um den Faktor 6 unterscheidet, während auf Proteinebene nur geringe Unterschiede im Expressionslevel auftraten. Die Bestimmung der subzellulären Verteilung von CK1 $\delta$  in pankreatischen Tumorzellen ergab eine konstitutive Assoziation von CK1 $\delta$  mit den Zentrosomen, sowie eine granuläre zytoplasmatische Lokalisation von CK1 $\delta$  in Interphasezellen. In mitotischen Zellen war zudem eine Assoziation von CK1 $\delta$  an den Mikrotubuli in der Nähe der Zentrosomen zu beobachten. Da Ck1 $\delta$  über einen autoregulatorischen Loop eng mit p53 verbunden ist, wurden die p53-Proteinexpressionslevel untersucht. Dabei wurde in Colo357 (Wildtyp-p53) und in AsPC1 Zellen (p53 Mutation führt zu einem frühem Stopcodon) kein p53 detektiert. Hingegen wurde in allen anderen Zelllinien stabilisiertes Mutanten p53 nachgewiesen. Bei Capan1 trat eine zusätzliche im Natriumdodecylsulfat -Gel schneller wandernde Bande auf.

Um die Auswirkungen der CK1 $\delta$  Inhibition auf das Proliferationsverhalten von Pankreastumorzelllinien zu charakterisieren, wurden die Zellen mit dem CK1 $\delta$  spezifischen Inhibitor IC261 behandelt. Die Wachstumskurven zeigten, dass IC261 Behandlung zu einer Hemmung des Wachstums aller untersuchten Zelllinien führte. Diese Hemmung ist darauf zurückzuführen, dass IC261 zur Störung der mitotischen Spindel führt und wie die durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen belegen, insbesondere numerische Veränderungen der Zentrosomen hervorruft. Die Effekte von IC261 auf den Zellzyklus der Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert und ergaben, dass im Verlauf der IC261 Behandlung in allen untersuchten Zelllinien eine Anhäufung der Zellen mit einem DNA-

Gehalt von 2Nx auftrat. Der Prozentsatz der Zellen mit diesem DNA-Gehalt variierte in den einzelnen Zelllinien (60-90%) und war abhängig von der eingesetzten Inhibitorkonzentration.

Änderungen in der Expressionsrate von p53 nach IC261 Behandlung war auf Proteinebene weder bei den Zelllinien mit Mutanten p53 noch bei Colo357 zu erkennen, obwohl letztere wt-p53 exprimieren. Diese spricht für die Vermutung, dass es sich bei Colo357 nicht um funktionelles Wildtyp-p53 handelt.

Die Wirkungen des CK1 $\delta$  spezifischen Inhibitors IC261 auf den Zellzyklus etablierter Pankreastumorzelllinien wurden mit denen klassischer Spindelgifte verglichen. Während die Wirkungen von Nocodazol denjenigen von IC261 ähnelten, führte die Behandlung der Zellen mit Taxol vermehrt zum Absterben der Zellen. Die durchgeführten Kombinationsbehandlungen mit IC261 und Nocodazol belegen, dass die unerwünschten Nebenwirkungen, nämlich das Auftreten polyploider Zellen, unterdrückt werden können. Des Weiteren ergaben die durchgeführten IC261/Taxol Doppelbehandlungen, dass die durch IC261 hervorgerufenen Effekte dominanter sind als diejenigen des Taxol.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass die Inhibition von CK1 $\delta$  ein neues viel versprechendes Konzept für die Behandlung des Pankreaskarzinoms darstellt. Vor allem in der Kombination mit dem Spindelgift Nocodazol konnte für IC261 eine starke Hemmung der Proliferation von Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden, wobei besonders die Reduktion der Endoreduplikation eine neue und interessante Erkenntnis darstellt. Letztlich ist es notwendig, diese *in vitro* gewonnenen Daten, im Tiermodell zu überprüfen, um festzustellen, ob die Behandlung mit IC261 allein oder in Kombination mit einem Spindelgift ein neues Therapiekonzept für das Pankreaskarzinom darstellen könnte.

## 6. Literatur

- BARTON, C. M., HALL, P. A., HUGHES, C. M., GULLICK, W. J. & LEMOINE, N. R. (1991). Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J Pathol* **163**, 111-116.
- BEHREND, L., MILNE, D. M., STOTER, M., DEPERT, W., CAMPBELL, L. E., MEEK, D. W. & KNIPPSCHILD, U. (2000a). IC261, a specific inhibitor of the protein kinases casein kinase 1-delta and -epsilon, triggers the mitotic checkpoint and induces p53-dependent postmitotic effects. *Oncogene* **19**, 5303-5313.
- BEHREND, L., STOTER, M., KURTH, M., RUTTER, G., HEUKESHOVEN, J., DEPERT, W. & KNIPPSCHILD, U. (2000b). Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. *Eur J Cell Biol* **79**, 240-251.
- BOTTGER, T. C., STORKEL, S., WELLEK, S., STOCKLE, M. & JUNGINGER, T. (1994). Factors influencing survival after resection of pancreatic cancer. A DNA analysis and a histomorphologic study. *Cancer* **73**, 63-73.
- CARROLL, P. E., OKUDA, M., HORN, H. F., BIDDINGER, P., STAMBROOK, P. J., GLEICH, L. L., LI, Y. Q., TARAPORE, P. & FUKASAWA, K. (1999). Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* **18**, 1935-1944.
- CEGIELSKA, A., GIETZEN, K. F., RIVERS, A. & VIRSHUP, D. M. (1998). Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J Biol Chem* **273**, 1357-1364.
- CHEN, Y., LORENZ, E., HARNOSS, B. M. & HARING, R. (1992). [Cystadenoma and cystadenocarcinoma of the pancreas. Symptoms, diagnosis and surgical consequences]. *Zentralbl Chir* **117**, 87-90.
- CHIBA, S., OKUDA, M., MUSSMAN, J. G. & FUKASAWA, K. (2000). Genomic convergence and suppression of centrosome hyperamplification in primary p53<sup>-/-</sup> cells in prolonged culture. *Exp Cell Res* **258**, 310-321.
- CICIARELLO, M., MANGIACASALE, R., CASENGI, M., ZAIRA LIMONGI, M., D'ANGELO, M., SODDU, S., LAVIA, P. & CUNDARI, E. (2001). p53 displacement from centrosomes and p53-mediated G1 arrest following transient inhibition of the mitotic spindle. *J Biol Chem* **276**, 19205-19213.
- COOPERMAN, A. M., FADER, A., CUSHIN, B., GOLIER, F., FELD, M., KASMIN, F., COHEN, S., MAHADEVIA, P. & SHAH, K. (2002). Surgery and cancer of the pancreas: will common sense become common practice? *Hematol Oncol Clin North Am* **16**, 81-94.
- COOPERMAN, A. M., SNADY, H., BRUCKNER, H. W., HAMMERMAN, H., SIEGEL, J., STARK, B. & BANK, S. (2001). Long-term follow-up of twenty patients with adenocarcinoma of the pancreas: resection following combined modality therapy. *Surg Clin North Am* **81**, 699-708.

- COUGHLIN, S. S., CALLE, E. E., PATEL, A. V. & THUN, M. J. (2000). Predictors of pancreatic cancer mortality among a large cohort of United States adults. *Cancer Causes Control* **11**, 915-923.
- CROSS, S. M., SANCHEZ, C. A., MORGAN, C. A., SCHIMKE, M. K., RAMEL, S., IDZERDA, R. L., RASKIND, W. H. & REID, B. J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267**, 1353-1356.
- CUBILLA, A. L. & FITZGERALD, P. J. (1976). Morphological lesions associated with human primary invasive nonendocrine pancreas cancer. *Cancer Res* **36**, 2690-2698.
- DAHMUS, M. E. (1981). Calf thymus RNA polymerases I and II do not contain subunits structurally related to casein kinases I and II. *J Biol Chem* **256**, 11239-11243.
- DARNAY, B. G., SINGH, S. & AGGARWAL, B. B. (1997). The p80 TNF receptor-associated kinase (p80TRAK) associates with residues 354-397 of the p80 cytoplasmic domain: similarity to casein kinase. *FEBS Lett* **406**, 101-105.
- DE BRABANDER, M. J., VAN DE VEIRE, R. M., AERTS, F. E., BORGERS, M. & JANSSEN, P. A. (1976). The effects of methyl (5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate, (R 17934; NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro. *Cancer Res* **36**, 905-916.
- DERRY, W. B., WILSON, L. & JORDAN, M. A. (1995). Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* **34**, 2203-2211.
- DI LEONARDO, A., KHAN, S. H., LINKE, S. P., GRECO, V., SEIDITA, G. & WAHL, G. M. (1997). DNA rereplication in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblasts lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res* **57**, 1013-1019.
- DUBOIS, T., HOWELL, S., ZEMLICKOVA, E. & AITKEN, A. (2002). Identification of casein kinase I alpha interacting protein partners. *FEBS Lett* **517**, 167-171.
- FELGNER, H., FRANK, R. & SCHLIWA, M. (1996). Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers. *J Cell Sci* **109 ( Pt 2)**, 509-516.
- FISH, K. J., CEGIELSKA, A., GETMAN, M. E., LANDES, G. M. & VIRSHUP, D. M. (1995). Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J Biol Chem* **270**, 14875-14883.
- FUKASAWA, K. & VANDE WOUDE, G. F. (1997). Synergy between the Mos/mitogen-activated protein kinase pathway and loss of p53 function in transformation and chromosome instability. *Mol Cell Biol* **17**, 506-518.
- GHADIRIAN, P., SIMARD, A. & BAILLARGEON, J. (1991). Tobacco, alcohol, and coffee and cancer of the pancreas. A population-based, case-control study in Quebec, Canada. *Cancer* **67**, 2664-2670.
- GHANEH, P., KAWESHA, A., EVANS, J. D. & NEOPTOLEMOS, J. P. (2002). Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **9**, 1-11.
- GRAVES, P. R., HAAS, D. W., HAGEDORN, C. H., DEPAOLI-ROACH, A. A. & ROACH, P. J. (1993). Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. *J Biol Chem* **268**, 6394-6401.
- GRAVES, P. R. & ROACH, P. J. (1995). Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J Biol Chem* **270**, 21689-21694.

- GREENBLATT, M. S., BENNETT, W. P., HOLLSTEIN, M. & HARRIS, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* **54**, 4855-4878.
- GROSS, S. D. & ANDERSON, R. A. (1998). Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family [In Process Citation]. *Cell Signal* **10**, 699-711.
- GUDJONSSON, B. (1987). Cancer of the pancreas. 50 years of surgery. *Cancer* **60**, 2284-2303.
- FOGH, J., WRIGHT, W. C. & LOVELESS, J. D. (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* **58**, 209-214.
- HAHN, S. A., HOQUE, A. T., MOSKALUK, C. A., DA COSTA, L. T., SCHUTTE, M., ROZENBLUM, E., SEYMOUR, A. B., WEINSTEIN, C. L., YEO, C. J., HRUBAN, R. H. & KERN, S. E. (1996). Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. *Cancer Res* **56**, 490-494.
- HARUKI, N., HARANO, T., MASUDA, A., KIYONO, T., TAKAHASHI, T., TATEMATSU, Y., SHIMIZU, S., MITSUDOMI, T., KONISHI, H., OSADA, H. & FUJII, Y. (2001). Persistent increase in chromosome instability in lung cancer: possible indirect involvement of p53 inactivation. *Am J Pathol* **159**, 1345-1352.
- HINCHCLIFFE, E. H., CASSELS, G. O., RIEDER, C. L. & SLUDER, G. (1998). The coordination of centrosome reproduction with nuclear events of the cell cycle in the sea urchin zygote. *J Cell Biol* **140**, 1417-1426.
- HINCHCLIFFE, E. H., MILLER, F. J., CHAM, M., KHODJAKOV, A. & SLUDER, G. (2001). Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* **291**, 1547-1550.
- HIRAI, H., OKABE, T., ANRAKU, Y., FUJISAWA, M., URABE, A. & TAKAKU, F. (1985). Activation of the c-K-ras oncogene in a human pancreas carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* **127**, 168-174.
- HRUBAN, R. H., WILENTZ, R. E. & KERN, S. E. (2000). Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* **156**, 1821-1825.
- HUPP, T. R., LANE, D. P. & BALL, K. L. (2000). Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* **352 Pt 1**, 1-17.
- JONES, L., GHANEH, P., HUMPHREYS, M. & NEOPTOLEMOS, J. P. (1999). The matrix metalloproteinases and their inhibitors in the treatment of pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci* **880**, 288-307.
- JORDAN, A., HADFIELD, J. A., LAWRENCE, N. J. & MCGOWN, A. T. (1998). Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* **18**, 259-296.
- KALTHOFF, H., SCHMIEGEL, W., ROEDER, C., KASCHE, D., SCHMIDT, A., LAUER, G., THIELE, H. G., HONOLD, G., PANTEL, K., RIETHMULLER, G. & ET AL. (1993). p53 and K-RAS alterations in pancreatic epithelial cell lesions. *Oncogene* **8**, 289-298.
- KAHN, S. E., VERCHERE, C. B., ANDRIKOPOULOS, S., ASBERRY, P. J., LEONETTI, D. L., WAHL, P. W., BOYKO, E. J., SCHWARTZ, R. S., NEWELL-MORRIS, L. & FUJIMOTO, W. Y. (1998). Reduced amylin release is a characteristic of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes* **47**, 640-645.

- KLINKENBIJL, J. H., JEEKEL, J., SAHMOUD, T., VAN PEL, R., COUVREUR, M. L., VEENHOF, C. H., ARNAUD, J. P., GONZALEZ, D. G., DE WIT, L. T., HENNIPMAN, A. & WILS, J. (1999). Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* **230**, 776-82; discussion 782-784.
- KLOPPPEL, G. & MAILLET, B. (1993). Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* **8**, 659-670.
- KNIPPSCHILD, U., MILNE, D. M., CAMPBELL, L. E., DEMAGGIO, A. J., CHRISTENSON, E., HOEKSTRA, M. F. & MEEK, D. W. (1997). p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* **15**, 1727-1736.
- LACEY, E. A., MALDONADO, J. E., CLABAUGH, J. P. & MATOCQ, M. D. (1999). Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Mol Ecol* **8**, 1754-1756.
- LANNI, J. S. & JACKS, T. (1998). Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol* **18**, 1055-1064.
- LIEBER, M., MAZZETTA, J., NELSON-REES, W., KAPLAN, M. & TODARO, G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* **15**, 741-747.
- LIU, F., MA, X. H., ULE, J., BIBB, J. A., NISHI, A., DEMAGGIO, A. J., YAN, Z., NAIRN, A. C. & GREENGARD, P. (2001). Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase 1 by metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11062-11068.
- LONGNECKER, D. S. (1994). The quest for preneoplastic lesions in the pancreas. *Arch Pathol Lab Med* **118**, 226.
- LUTTGES, J., ZAMBONI, G., LONGNECKER, D. & KLOPPPEL, G. (2001). The immunohistochemical mucin expression pattern distinguishes different types of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas and determines their relationship to mucinous noncystic carcinoma and ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* **25**, 942-948.
- MANU, M., BUCKELS, J. & BRAMHALL, S. (2000). Molecular technology and pancreatic cancer. *Br J Surg* **87**, 840-853.
- MARCHAL, C., DUPRE, S. & URBAN-GRIMAL, D. (2002). Casein kinase I controls a late step in the endocytic trafficking of yeast uracil permease. *J Cell Sci* **115**, 217-226.
- MARITZEN, T., LOHLER, J., DEPERT, W. & KNIPPSCHILD, U. (2003). Casein kinase I delta (CKIdelta) is involved in lymphocyte physiology. *Eur J Cell Biol* **82**, 369-378.
- MARTIN-SUBERO, J. I., KNIPPSCHILD, U., HARDER, L., BARTH, T. F., RIEMKE, J., GROHMANN, S., GESK, S., HOPFNER, J., MOLLER, P., PARWARESCH, R. M. & SIEBERT, R. (2003). Segmental chromosomal aberrations and centrosome amplifications: pathogenetic mechanisms in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma? *Leukemia* **17**, 2214-2219.
- MARX, J. (2001). Cell biology. Do centrosome abnormalities lead to cancer? *Science* **292**, 426-429.

- MASHHOON, N., DEMAGGIO, A. J., TERESHKO, V., BERGMEIER, S. C., EGLI, M., HOEKSTRA, M. F. & KURET, J. (2000). Crystal structure of a conformation-selective casein kinase-1 inhibitor. *J Biol Chem* **275**, 20052-20060.
- MCGUINNESS, E. E., MORGAN, R. G., LEVISON, D. A., FRAPE, D. L., HOPWOOD, D. & WORMSLEY, K. G. (1980). The effects of long-term feeding of soya flour on the rat pancreas. *Scand J Gastroenterol* **15**, 497-502.
- MEITNER, P. A., KAJIJI, S. M., LAPOSTA-FRAZIER, N., BOGAARS, H. A., JOLLY, G. A., DEXTER, D. L., CALABRESI, P. & TURNER, M. D. (1983). "COLO 357," a human pancreatic adenosquamous carcinoma: growth in artificial capillary culture and in nude mice. *Cancer Res* **43**, 5978-5985.
- METZGAR, R. S., GAILLARD, M. T., LEVINE, S. J., TUCK, F. L., BOSSEN, E. H. & BOROWITZ, M. J. (1982). Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res* **42**, 601-608.
- MICKEY, B. & HOWARD, J. (1995). Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *J Cell Biol* **130**, 909-917.
- MILNE, D. M., LOOBY, P. & MEEK, D. W. (2001). Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. *Exp Cell Res* **263**, 43-54.
- MINN, A. J., BOISE, L. H. & THOMPSON, C. B. (1996). Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev* **10**, 2621-2631.
- MIZUMOTO, K. & TANAKA, M. (2002). Genetic diagnosis of pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **9**, 39-44.
- MOORE, P. S., SIPOS, B., ORLANDINI, S., SORIO, C., REAL, F. X., LEMOINE, N. R., GRESS, T., BASSI, C., KLOPPPEL, G., KALTHOFF, H., UNGEFROREN, H., LOHR, M. & SCARPA, A. (2001). Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* **439**, 798-802.
- MUSSMAN, J. G., HORN, H. F., CARROLL, P. E., OKUDA, M., TARAPORE, P., DONEHOWER, L. A. & FUKASAWA, K. (2000). Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene* **19**, 1635-1646.
- NAUMANN, M., SAVITSKAIA, N., EILERT, C., SCHRAMM, A., KALTHOFF, H. & SCHMIEGEL, W. (1996). Frequent codeletion of p16/MTS1 and p15/MTS2 and genetic alterations in p16/MTS1 in pancreatic tumors. *Gastroenterology* **110**, 1215-24.
- NIEDERGETHMANN, M., REXIN, M., HILDENBRAND, R., KNOB, S., STURM, J. W., RICHTER, A. & POST, S. (2002). Prognostic implications of routine, immunohistochemical, and molecular staging in resectable pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* **26**, 1578-1587.
- NOTTERMAN, D., YOUNG, S., WAINGER, B. & LEVINE, A. J. (1998). Prevention of mammalian DNA reduplication, following the release from the mitotic spindle checkpoint, requires p53 protein, but not p53-mediated transcriptional activity. *Oncogene* **17**, 2743-2751.
- OKABE, T., YAMAGUCHI, N. & OHSAWA, N. (1983). Establishment and characterization of a carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cell line from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Cancer* **51**, 662-668.

- PEARSE, B. M. & ROBINSON, M. S. (1990). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 151-171.
- PERMERT, J., HAFSTROM, L., NYGREN, P. & GLIMELIUS, B. (2001). A systematic overview of chemotherapy effects in pancreatic cancer. *Acta Oncol* **40**, 361-370.
- POUR, P. M. (1991). Modification of tumor development in the pancreas. *Prog Exp Tumor Res* **33**, 108-131.
- RAPUANO, M. & ROSEN, O. M. (1991). Phosphorylation of the insulin receptor by a casein kinase I-like enzyme. *J Biol Chem* **266**, 12902-12907.
- ROOF, D. M., MELUH, P. B. & ROSE, M. D. (1992). Kinesin-related proteins required for assembly of the mitotic spindle. *J Cell Biol* **118**, 95-108.
- ROWLES, J., SLAUGHTER, C., MOOMAW, C., HSU, J. & COBB, M. H. (1991). Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9548-9552.
- SACKETT, D. L. & VARMA, J. K. (1993). Molecular mechanism of colchicine action: induced local unfolding of beta-tubulin. *Biochemistry* **32**, 13560-13565.
- SATO, N., MIZUMOTO, K., NAKAMURA, M., NAKAMURA, K., KUSUMOTO, M., NIYAMA, H., OGAWA, T. & TANAKA, M. (1999). Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin Cancer Res* **5**, 963-970.
- SCHIFF, P. B., FANT, J. & HORWITZ, S. B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**, 665-7.
- SHONO, M., SATO, N., MIZUMOTO, K., MINAMISHIMA, Y. A., NAKAMURA, M., MAEHARA, N., URASHIMA, T., SAIMURA, M., QIAN, L., NISHIO, S., NAGAI, E. & TANAKA, M. (2001). Effect of serum depletion on centrosome overduplication and death of human pancreatic cancer cells after exposure to radiation. *Cancer Lett* **170**, 81-89.
- SIMKOWSKI, K. W. & TAO, M. (1980). Studies on a soluble human erythrocyte protein kinase. *J Biol Chem* **255**, 6456-6461.
- SINGH, T. J., GRUNDKE-IQBAL, I., McDONALD, B. & IQBAL, K. (1994). Comparison of the phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* **131**, 181-189.
- SIPOS, B., MOSER, S., KALTHOFF, H., TOROK, V., LOHR, M. & KLOPPEL, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch* **442**, 444-452.
- SPECHT, G. & STINSHOFF, K. (2001). [Walther Kausch (1867-1928) and his significance in pancreatic surgery]. *Zentralbl Chir* **126**, 479-481.
- STAIB, L., LINK, K. H. & BEGER, H. G. (1999). Immunotherapy in pancreatic cancer - current status and future. *Langenbecks Arch Surg* **384**, 396-404.
- TAN, M. H., NOWAK, N. J., LOOR, R., OCHI, H., SANDBERG, A. A., LOPEZ, C., PICKREN, J. W., BERJIAN, R., DOUGLASS, H. O., JR. & CHU, T. M. (1986). Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* **4**, 15-23.
- TARAPORE, P., TOKUYAMA, Y., HORN, H. F. & FUKASAWA, K. (2001). Difference in the centrosome duplication regulatory activity among p53 'hot spot' mutants: potential role of Ser 315 phosphorylation-dependent centrosome binding of p53. *Oncogene* **20**, 6851-6863.

- TOBIN, A. B., TOTTY, N. F., STERLIN, A. E. & NAHORSKI, S. R. (1997). Stimulus-dependent phosphorylation of G-protein-coupled receptors by casein kinase 1alpha. *J Biol Chem* **272**, 20844-20849.
- TREDE, M. (1987). Treatment of pancreatic carcinoma: the surgeon's dilemma. *Br J Surg* **74**, 79-80.
- VASQUEZ, R. J., HOWELL, B., YVON, A. M., WADSWORTH, P. & CASSIMERIS, L. (1997). Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* **8**, 973-985.
- VIELHABER, E. & VIRSHUP, D. M. (2001). Casein kinase I: from obscurity to center stage. *IUBMB Life* **51**, 73-78.
- WAHL, A. F., DONALDSON, K. L., FAIRCHILD, C., LEE, F. Y. F., FOSTER, S. A., DEMERS, G. W. & GALLOWAY, D. A. (1996). Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nature Med* **2**, 72-79.
- WAKASUGI, H., FUNAKOSHI, A. & IGUCHI, H. (2001). Clinical observations of pancreatic diabetes caused by pancreatic carcinoma, and survival period. *Int J Clin Oncol* **6**, 50-54.
- WANEBO, H. J., GLICKSMAN, A. S., VEZERIDIS, M. P., CLARK, J., TIBBETTS, L., KONESS, R. J. & LEVY, A. (2000). Preoperative chemotherapy, radiotherapy, and surgical resection of locally advanced pancreatic cancer. *Arch Surg* **135**, 81-88.
- WARSHAW, A. L., GU, Z. Y., WITTENBERG, J. & WALTMAN, A. C. (1990). Preoperative staging and assessment of resectability of pancreatic cancer. *Arch Surg* **125**, 230-233.
- WARSHAW, A. L. & SWANSON, R. S. (1988). Pancreatic cancer in 1988. Possibilities and probabilities. *Ann Surg* **208**, 541-553.
- WEGER, A. R., LINDHOLM, J., GLASER, K., MAIRINGER, T. & MIKUZ, G. (1992). Morphometry and prognosis in cancer of the pancreatic head. *Pathol Res Pract* **188**, 764-769.
- WHITCOMB, D. C. & POGUE-GEILE, K. (2002). Pancreatitis as a risk for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **31**, 663-678.
- WILENTZ, R. E., GOGGINS, M., REDSTON, M., MARCUS, V. A., ADSAY, N. V., SOHN, T. A., KADKOL, S. S., YEO, C. J., CHOTI, M., ZAHURAK, M., JOHNSON, K., TASCILAR, M., OFFERHAUS, G. J., HRUBAN, R. H. & KERN, S. E. (2000). Genetic, immunohistochemical, and clinical features of medullary carcinoma of the pancreas: A newly described and characterized entity. *Am J Pathol* **156**, 1641-1651.
- WOLFF, J. & KNIPLING, L. (1995). Colchicine binding by the "isolated" beta-monomer of tubulin. *J Biol Chem* **270**, 16809-16812.
- XU, R. M., CARMEL, G., SWEET, R. M., KURET, J. & CHENG, X. (1995). Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase. *Embo J* **14**, 1015-1023.
- YABROFF, K. R. & MANDELBLATT, J. S. (1999). Interventions targeted toward patients to increase mammography use. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**, 749-757.
- YAMAMOTO, M., NAKANO, S., MUGIKURA, M., TACHIBANA, I., OGAMI, Y. & OTSUKI, M. (1996). Pancreatic cancer and hypercalcemia associated with von Recklinghausen's disease. *J Gastroenterol* **31**, 728-731.

- YEO, C. J. & CAMERON, J. L. (1999). Improving results of pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *World J Surg* **23**, 907-912.
- YUNIS, A. A., ARIMURA, G. K. & RUSSIN, D. J. (1977). Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* **19**, 218-235.
- ZHAI, L., GRAVES, P. R., ROBINSON, L. C., ITALIANO, M., CULBERTSON, M. R., ROWLES, J., COBB, M. H., DEPAOLI-ROACH, A. A. & ROACH, P. J. (1995). Casein kinase I gamma subfamily. Molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the *Saccharomyces cerevisiae* YCK genes. *J Biol Chem* **270**, 12717-12724.

## **7. Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Uwe Knippschild für die Überlassung dieses interessanten Themas und seiner hervorragenden Betreuung, die zum Gelingen der Arbeit entscheidend beigetragen hat.

Bei Frau Prof. Dr. Doris Henne-Bruns möchte ich mich für die ausgesprochen guten Möglichkeiten bedanken, wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Eichfuss danke ich für sein Engagement, mich in der Entscheidung zu unterstützen, wissenschaftlich zu arbeiten.

Bei Herrn Martin Stöter und Herrn Thorsten Eismann bedanke ich mich für die Einarbeitung in die verschiedenen Arbeitstechniken sowie ihre stetige Bereitschaft, mir mit Rat und Tat bei Seite zu stehen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. Peter Würfl, Dr. Andreas Hillenbrand, Nadine Huber und Nadine Diersch, sowie allen Mitarbeitern der Abteilung Chirurgie I, die durch wertvolle Diskussion und vielerlei Hilfestellungen mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Frau Dr. Mahtab Bahramsoltani und Herrn Christian Brandes danke ich nicht nur für ihre zahlreichen Hilfestellungen bei Computerproblemen und die professionelle Durchsicht dieser Arbeit, sondern auch für ihre jahrelange Freundschaft, die mir sehr wichtig ist.

Meiner geliebten Frau Rita und meinen wundervollen Kindern Annabell, Chantal, Jacqueline und Caitlin möchte ich für ihr Verständnis und Unterstützung in der gesamten Zeit danken, in der sie mir immer wieder auf so wunderbare Weise gezeigt haben, was wirklich wichtig ist im Leben.

Aber vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern für die jahrelange sowohl finanzielle als auch emotionale Unterstützung bedanken.

## 8. Lebenslauf

Familienname: Brockschmidt  
Vorname: Claas  
Geburtsdatum: 18.01.1969  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: verheiratet  
Kinder: 4  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulischer Werdegang:

1975-1979 Grundsschule  
Friedrich-von-Schiller-Schule, Wolfsburg  
1979-1981 Orientierungsstufe  
Hellwinkelschule, Wolfsburg  
1991-1988 Gymnasium  
Ratsgymnasium, Wolfsburg  
Juni 1988 Abitur

### Ausbildung und beruflicher Werdegang:

Oktober 1988- Januar 1990 Bundeswehr, FSK100, Braunschweig  
1990 -1998 Studium der Humanmedizin an der FU-Berlin  
April 1998 Staatsexamen  
Juli 1998 - Januar 2000 AIP in der Allgemein Chirurgie des Akademischen  
Lehrkrankenhauses Salzgitter Lebenstedt  
Januar 2000 Approbation  
Januar 2000 – August 2000 Assistenzarzt in der Allgemein Chirurgie des St.  
Elisabeth-Krankenhauses Salzgitter-Bad  
August 2000 – Mai 2002 Assistenzarzt in der Allgemein Chirurgie des  
Akademischen Lehrkrankenhauses Salzgitter  
Lebenstedt  
Ab Mai 2002 Assistenzarzt in der Abteilung für Viszeral- und  
Transplantationschirurgie der Universität Ulm

## **9. Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Ulm, den 14. Juni 2004

Claas Brockschmidt