

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Chirurgie
Klinik für Allgemeine-, Viszeral- und
Transplantationschirurgie
Ärztliche Direktorin Prof. Dr. D. Henne-Bruns

**Wachstumshemmung von
Pankreaskarzinomzellen und vaskulären
glatten Muskelzellen durch mTOR-Inhibitoren
und Mycophenolat in vitro**

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

vorgelegt von

**Florian Kurt Klug, München
2009**

Amtierender Dekan	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter	PD Dr. Jens Mayer
2. Berichterstatter	PD Dr. Sylvia Stracke
Tag der Promotion	15.07.2010

Diese Promotion widme ich meinen Eltern, welchen ich dieses Studium zu verdanken habe.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2. Therapie mit Gemcitabin.....	1
1.3. Therapie mit Immunsuppressiva.....	2
1.4. Hemmung der Angiogenese.....	2
1.5. Zielsetzung der Studie.....	3
2. Material und Methoden	4
2.1. Material.....	4
2.1.1. Verwendete Geräte.....	4
2.1.2. Verwendete Reagenzien.....	5
2.1.3. Glas und Plastikwaren.....	6
2.1.4. Verwendete Medikamente.....	6
2.1.5. Zelllinien.....	6
2.2. Methoden.....	7
2.2.1. Versuchsaufbau.....	7
2.2.2. Zellkultur.....	7
2.2.3. Kultivierung von Pankreastumorzellen.....	7
2.2.4. Kultivierung von glatten Muskelzellen.....	8
2.2.5. Zellzählung.....	8
2.2.6. Verdünnung der Medikamente.....	9
2.2.7. Messung des antiproliferativen Effekts.....	11
2.2.8. Statistische Auswertung.....	12
3. Ergebnisse	13
3.1. Pankreastumorzellen (MiaPaCa-2 und Panc-1).....	13
3.1.1. Monotherapie.....	13
3.1.2. Kombinationstherapie.....	16
3.2. humane vaskuläre glatte Muskelzellen.....	21
3.2.1. Monotherapie.....	21
3.2.2. Kombinationstherapie.....	24
3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	27
4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis	34
7. Danksagung	40
8. Publikation	41

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	analysis of variance
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
dFdC	2'2'difluordeoxycytidin
dFdCDP	2'2'difluordeoxycytidindiphosphat
dFdCTP	2'2'difluordeoxycytidintriphosphat
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
FKS	Fötales Kälberserum
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
hCASMCM	human Coronary Artery Smooth Muscle Cell
hEGF	human Epidermal Growth Factor
hFGF-b	human Fibroblast Growth Factor basic
IMPDH	Inosinmonophosphat-Dehydrogenase
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
RAD001	Everolimus
SEM	Standardfehler
SmBM [®]	Smooth muscle Basal Medium
SMC	Smooth Muscle Cell
SmGM [®]	Smooth muscle Growth Medium
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
TNS	Trypsin Neutralizing Solution

1. Einleitung

1.1. Das Pankreaskarzinom

Das duktales Pankreaskarzinom gehört zu den gastrointestinalen Karzinomen und stellt gegenwärtig die viert häufigste tumorbedingte Todesursache in Deutschland dar [13]. Wegen fehlenden Frühsymptomen wird es meist erst spät und in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt. Die frühzeitige Metastasierung des Pankreaskarzinoms führt zu einer ausgesprochen schlechten Prognose [30], daher besteht bei der überwiegenden Zahl der Erkrankten nach wie vor kaum eine Aussicht auf Heilung. Trotz intensiver Forschung nach den Mechanismen der Tumorentstehung und dessen Weiterentwicklung sind die Ergebnisse unbefriedigend und führten bisher zu keiner wesentlichen Lebenszeitverlängerung der Patienten. Die mediane Überlebenszeit beim Bauchspeicheldrüsenkarzinom beträgt nach Diagnosestellung durchschnittlich 3-5 Monate, die Fünfjahresüberlebensrate ca. 4% [16, 30]. Der einzige kurative Therapieansatz ist eine R0-Resektion, die meistens wegen einer verspäteten Diagnose nicht erreicht werden kann. Deshalb ist es unumgänglich, den Patienten eine möglichst schnelle Früherkennung des Tumors und eine effektive, qualitativ hochwertige Therapie anzubieten.

1.2. Chemotherapie mit Gemcitabin beim Pankreaskarzinom

In der Palliativtherapie kann das Zytostatikum Gemcitabin das Überleben und die krankheitsbezogenen Symptome des Patienten verbessern [29]. Gemcitabin (2',2'-difluordeoxycytidin = dFdC) ist ein Pyrimidin-Analogon. Als Prodrug wird es in den Zellkern transportiert und dort durch Nukleosidkinasen phosphoryliert und aktiviert. Die aktiven Metaboliten von Gemcitabin (dFdCTP und dFdCDP) werden dabei als "falsche" Base in die DNS eingebaut, wodurch die DNS-Synthese unterbrochen wird und die Zelle durch Apoptose stirbt [28]. Gemcitabin wirkt somit zellphasenspezifisch in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus. Die Wirkungen von Gemcitabin wurden unter biochemischen und pathophysiologischen Gesichtspunkten in den letzten Jahren näher untersucht, wobei sich herausstellte, dass Tumorzellen sowohl in vitro als auch in vivo gegenüber einer Gemcitabin-Behandlung sensibilisiert werden können [5, 10, 28-29].

1.3. Therapie mit Immunsuppressiva bei malignen Erkrankungen

Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen bei Tumorerkrankungen sind in den vergangenen Jahren verschiedene Immunsuppressiva näher untersucht worden. Neben immunsuppressiven Wirkungen konnte ein antiproliferativer Effekt zum Beispiel für Mycophenolat nachgewiesen werden [11, 17, 33]. Der mTOR-Inhibitor Sirolimus (Rapamycin) und sein Derivat Everolimus (RAD001) greifen am mTOR-Signalweg (mammalian Target of Rapamycin) an, der für die Expression von Wachstumsfaktoren und damit für das Zellwachstum bedeutend ist [14, 37]. In ersten Studien konnte gezeigt werden, dass Sirolimus das Tumorwachstum und die Metastasierung in vivo hemmt [14]. Die dosisabhängige zytotoxische Wirkung von Everolimus auf das Pankreaskarzinom wurde kürzlich in vivo untersucht. Everolimus zeigte dabei im Rattenmodell CA20948 einen vergleichbaren zytotoxischen Effekt wie das Standard-Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil [6-7, 15, 18].

1.4. Hemmung der Angiogenese bei Tumorerkrankungen

Neben der zytotoxischen und zytostatischen Therapie bei Neoplasien wurde in den zurückliegenden Jahren eine neue Strategie zur Behandlung von Tumorerkrankungen entwickelt: Die Zerstörung des versorgenden Gefäßnetzwerkes bzw. die Hemmung der Gefäßneubildung zur Versorgung einer wachsenden Gewebsneubildung. Bis zu einem Volumen von circa 1 mm^3 ist Tumorwachstum ohne Gefäßneubildung und Gefäßeinsprossung möglich, da Tumorzellen über Diffusion mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden [4]. Ab einer Größe von 1 mm^3 ist ein weiteres Wachstum nur möglich, wenn die Raumforderung in der Lage ist, ein eigenes Gefäßnetzwerk aufzubauen [4]. Die so genannte Angiogenese unterliegt einem Gleichgewicht von positiven und negativen Regulatorproteinen. Anti-angiogenetische Faktoren können die Ausbildung eines neuen Gefäßnetzwerkes stoppen oder hemmen, indem sie das Überleben, das Wachstum und die Funktion der einzelnen Endothelzelle beeinflussen [14, 26]. Weltweit wird an antiangiogenetischen Therapieansätzen geforscht und bis heute konnten enorme Schritte auf diesem Weg erreicht werden. Dennoch besteht immer noch ein großer Bedarf an experimenteller und klinischer Forschung, bevor diese neue Art der Tumorthherapie sich in der Klinik bewährt.

1.5. Zielsetzung der Studie

In dieser Studie haben wir untersucht, ob die Immunsuppressiva Mycophenolat (MMF), Sirolimus (Rapamycin) und Everolimus (RAD001) einen sensibilisierenden Effekt auf die Gemcitabin-Behandlung bei Pankreastumorzellen (MiaPaCa-2 und Panc-1) in vitro haben. Wegen der zentralen Rolle der Angiogenese beim Wachstum und der Metastasierung des Tumors wurde dieser Effekt zusätzlich bei glatten Muskelzellen (hCASMC) näher betrachtet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Geräte

- 4°C Kühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland)
- -20°C Kühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland)
- Brutschrank (Heraeus, Osterode, Deutschland)
- Zeiss Axioplan Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Zeiss IM F10 0,25 invers Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Zentrifuge Minifuge T (Heraeus, Osterode, Deutschland)
- Microflow Biological Safety Cabinet (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- Vakuumpumpe (Ilmvac, Ilmenau, Deutschland)
- Vibrationsrüttler Vortex Genie® 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)
- Drucker HP Laserjet 1320 (Hewlett Packard, Böblingen, Deutschland)
- Neubauerzählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland)
- Objektträger (Menzel-Gläser, Berlin, Deutschland)
- Photometer Molecular Devices (Molecular Devices, Ismaning, Deutschland)
- Softmax Software for MAXline Microplate readers V.201d (Molecular Devices, Ismaning, Deutschland)
- Taschenrechner TI-30Xa (Texas Instruments, Freising, Deutschland)
- Pipette Easytip® (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipette Multipipette® Plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipette Research® Variabel (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Reihenpipette Socorex Swiss 50-250 µl (Socorex Isba S.A., Ecublens, Schweiz)
- Wärmebad Welabo (Welabo, Düsseldorf, Deutschland)

2.1.2. Verwendete Reagenzien

Tabelle 1: verwendete Reagenzien

Reagenz	Beschreibung	Quelle
Gibco® D-PBS	200 mg/l Kaliumchlorid (KCl) 200 mg/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 8,0 g/l Natriumchlorid (NaCl) 2,16 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Accutase®	D-PBS 0,5 mM EDTA Enzyme (Proteasen und Kollagenasen)	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Trypsin	Trypsin-EDTA	Lonza, Köln, Deutschland
TNS	Trypsin Neutralisierungslösung	Lonza, Köln, Deutschland
D-MEM-Ham's F-12	50% Dulbecco's Modified Eagles Medium 50% Ham's F-12 Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gibco® Pen-Strep	10.000 Einheiten/ml Penicillin 10.000 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FKS	10% Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, Linz, Österreich
SmBM®	Smooth muscle Basal Medium	Lonza, Köln, Deutschland
Clonetics® SmGM®-2 Bullet Kit	500 ml SmBM® (Smooth muscle Basal Medium) + 0,5 ml hEGF + 1 ml hFGF-b + 0,5 ml Insulin + 0,5 ml GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B) + 25 ml FKS	Lonza, Köln, Deutschland
BrdU Kit	BrdU Labeling solution FixDenat Anti-BrdU-POD Antibody dilution solution Washing buffer Substrate solution	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
1 M H₂SO₄	Herstellung aus 98% H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser	Eigene Herstellung Uniklinik Ulm, Deutschland
Isopropanol	70% Isopropanol zur Reinigung und Desinfektion	Eigene Herstellung, Uniklinik Ulm, Deutschland

2.1.3. Glas und Plastikwaren

- 96-well Platte Delta Surface (Nunclon, Roskilde, Dänemark)
- Falcon-Röhrchen 50 ml, 10 ml (Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- Kulturflaschen 250 ml, 75 cm³ mit Filter
(Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipettenaufsätze für Easypet® div. Größen
(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen für Multipipette® Plus div. Größen
(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenaufsätze für Pipette Research® Variabel div. Größen
(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2,0 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.1.4. Verwendete Medikamente

Tabelle 2: verwendete Medikamente

Medikament	Wirkstoff	Dosis	Quelle
Gemzar®	Gemcitabin-HCl	38 mg/ml	Lilly, Bad Homburg, Deutschland
Certican®	Everolimus	10 mg/ml	Novartis, Basel, Schweiz
Rapamune®	Sirolimus	1 mg/ml	Wyeth, Münster, Deutschland
Cell Cept®	Mycophenolat Mofetil	500 mg Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland

2.1.5. Verwendete Zelllinien

Tabelle 3: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle	Medium
Panc-1	humane duktale Pankreasadenokarzinomline, adhärent	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA	D-MEM + 10% FKS + 1%Pen-Strep
MiaPaCa-2	humane duktale Pankreasadenokarzinomline, adhärent	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA	D-MEM + 10% FKS + 1%Pen-Strep
hCASMC	humane glatte Muskelzellen aus Koronararterien, adhärent	Lonza, Köln, Deutschland	SmGM®-2

2.2. Methoden

2.2.1. Versuchsaufbau

Die Pankreastumorzellen (Panc-1 und MiaPaCa-2) und die glatten Muskelzellen (hCASMC) wurden auf 96-well-Platten ausgesät und mit steigenden Konzentrationen des Zytostatikums Gemcitabin ($1 \cdot 10^5$ nM) behandelt. Um herauszufinden, ob die Kombinationstherapie mit einem Immunsuppressivum einen größeren antiproliferativen Effekt hat, wurden die Zellen zusätzlich mit einem Immunsuppressivum in ansteigender Konzentration therapiert. Für die Kombinationstherapie wurden die Immunsuppressiva Everolimus (0,001-1 µg/ml), Sirolimus (0,001-1 µg/ml) und Mycophenolat (0,1-100 µg/ml) verwendet. Es wurde eine Blindkontrolle durchgeführt, bei der die Zellen mit dem entsprechenden Medium kultiviert wurden. Alle Versuche wurden vier bis siebenmal wiederholt.

2.2.2. Zellkultur

Die verwendeten Zellkulturen wuchsen in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Alle Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt und die Kulturmedien sowie ihre Zusätze steril filtriert. Täglich wurden die Zellen mikroskopisch auf ihre Vitalität überprüft und alle zwei Tage wurde das Medium erneuert. Die Kultivierung und Subkultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm³-Kulturflaschen. Für den eigentlichen Versuch, d.h. die Messung des antiproliferativen Effekts unter verschiedenen Behandlungen, wurden die Zellen auf 96-well-Platten ausgesät.

2.2.3. Kultivierung von Pankreastumorzellen (Panc-1, MiaPaCa-2)

MiaPaCa-2 und Panc-1 Zellen wurden in D-MEM-Ham's F-12 Medium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 1% Antibiotikum (Penicillin und Streptomycin) kultiviert. Die Kultivierung adhärenter Zellen erfordert ein kontinuierliches Wachstum im subkonfluenten Bereich, weshalb die Zellen wöchentlich passagiert wurden. Bei der Subkultivierung wurde das Medium abgesaugt und die konfluenten Zellen einmal mit 5 ml D-PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden die Zellen für 30 Sekunden mit 3 ml Accutase® behandelt und anschließend für

5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen unter leichtem Klopfen mit 10 ml Medium vom Flaschenboden ab gespült, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Ein Teil der Zellsuspension wurde verdünnt und für die Messung des antiproliferativen Effekts verwendet, der andere Teil der Zellen wurde in Kulturflaschen (12,5 ml Zellsuspension/Flasche) neu angesetzt.

2.2.4. Kultivierung von humanen glatten Muskelzellen (hCASMC)

Die humanen glatten Muskelzellen (hCASMC) wurden im endothelialen Wachstumsmedium SmGM-2[®] kultiviert. Für die Versuche wurden lediglich glatte Muskelzellen der Passage 3 bis 6 verwendet. Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium abgesaugt, einmal mit 5 ml D-PBS gewaschen und 2 ml Trypsin auf den Zellen verteilt. Die Inkubation mit Trypsin erfolgte für etwa 5 Minuten im Brutschrank. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde das zytotoxische Trypsin durch 4 ml TNS inaktiviert und die Zellen unter leichtem Klopfen vom Flaschenboden ab gespült. Das Gemisch wurde in ein 10 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 10 Minuten mit 1100 Umdrehungen bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer und Verdünnung der Zellsuspension wurde ein Teil der Zellen neu angesetzt, der andere Teil wurde für die Versuche verwendet.

2.2.5. Zellzählung

Bei allen Versuchen wurden die 96-well-Platten mit 5.000 Zellen/well bepflanzt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer gearbeitet. Zunächst wurden die Zählkammer und das Deckglas mit Alkohol gereinigt, die Stege leicht angefeuchtet und das Deckglas vorsichtig aufgeschoben, bis die sogenannten Newtonringe erschienen. Das Erscheinen der Newtonringe zeigt an, dass das Deckglas richtig angebracht und die Tiefe (0,1 mm) der Zählkammer richtig eingestellt ist. In die Zählkammer wurden 10 µl Zellsuspension gefüllt und die Kammer unter das Mikroskop gelegt. Das Mikroskop wurde so eingestellt, dass die Einteilungslinien der Kammer sichtbar wurden. Jedes große Quadrat der Zählkammer hat eine Fläche von 1 mm², dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl. Bei jeder Zellzählung wurden

vier große Quadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Dieser wurde in eine allgemein gültige Formel für Zählkammern eingesetzt:

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{1 \times 0,1 \times 1} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{0,1}$$

Die Zellsuspension musste auf eine Konzentration von 100.000 Zellen/ml verdünnt werden, was einer Konzentration von 5.000 Zellen/well entspricht, da in jedes well 50 μl Zellen pipettiert wurden.

2.2.6. Verdünnung der Medikamente

Die Medikamente wurden unter sterilen Bedingungen mit dem jeweiligen Medium verdünnt. Die unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen der Medikamente wurden anschließend der Zellsuspension hinzugefügt. Pro Medikament wurden 10 μl /well hinzugefügt. Um auf ein Endvolumen von 100 μl /well zu kommen, wurde noch 30 μl (bei Kombinationstherapie) bzw. 40 μl (bei Monotherapie) Medium beigefügt. Da das Medikament dabei um den Faktor 1:10 verdünnt wurde, musste es 10-fach höher dosiert werden, um auf die gewünschte Endkonzentration zu kommen.

Verdünnung Gemcitabin-HCl

Gemcitabin wurde in einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ nM verwendet. Unsere Stammlösung hatte eine Konzentration von 38 mg/ml (molare Masse 299,66). Zur Umrechnung von $\mu\text{g/l}$ in μM muss die Konzentration durch die molare Masse geteilt werden.

Tabelle 4: Verdünnung Gemcitabin

38 mg/ml = 380.000.000 $\mu\text{g/l}$		Endkonzentration	
\downarrow 1:100	(10 μl + 990 μl Medium)		
380.000 $\mu\text{g/l}$			
\downarrow	+ 267 μl Medium (zur Verdünnung auf 300.000 $\mu\text{g/l}$)		
1. 300.000 $\mu\text{g/l}$	\longrightarrow	1.000 μM = 1.000.000 nM	\longrightarrow 100.000 nM
\downarrow 1:10	(100 μl + 900 μl Medium)		\downarrow
2. 30.000 $\mu\text{g/l}$	\longrightarrow	100 μM = 100.000 nM	\longrightarrow 10.000 nM
\downarrow 1:10	(100 μl + 900 μl Medium)		\downarrow
3. 3.000 $\mu\text{g/l}$	\longrightarrow	10 μM = 10.000 nM	\longrightarrow 1.000 nM
\downarrow 1:10	(100 μl + 900 μl Medium)		\downarrow
4. 300 $\mu\text{g/l}$	\longrightarrow	1 μM = 1.000 nM	\longrightarrow 100 nM
\downarrow 1:10	(100 μl + 900 μl Medium)		\downarrow
5. 30 $\mu\text{g/l}$	\longrightarrow	0,1 μM = 100 nM	\longrightarrow 10 nM
\downarrow 1:10	(100 μl + 900 μl Medium)		\downarrow
6. 3 $\mu\text{g/l}$	\longrightarrow	0,01 μM = 10 nM	\longrightarrow 1 nM
\downarrow 1:10	(100 μl + 900 μl Medium)		\downarrow
7. 0,3 $\mu\text{g/ml}$	\longrightarrow	0,001 μM = 1 nM	\longrightarrow 0,1 nM

Verdünnung Everolimus (RAD001)

Everolimus wurde in einer Konzentration von 0,001-1 µg/ml verwendet, wobei die Stammlösung eine Konzentration von 10 mg/ml hatte. Dementsprechend musste das Medikament verdünnt werden:

Tabelle 5: Verdünnung Everolimus

10 mg/ml = 10.000 µg/ml		Endkonzentration
↓	1:100	(10 µl + 990 µl Medium)
1.	100 µg/ml	
↓	1:10	(100 µl + 900 µl Medium)
2.	10 µg/ml	→ 1 µg/ml
↓	1:10	(100 µl + 900 µl Medium)
3.	1 µg/ml	→ 0,1 µg/ml
↓	1:10	(100 µl + 900 µl Medium)
4.	0,1 µg/ml	→ 0,01 µg/ml
↓	1:10	(100 µl + 900 µl Medium)
5.	0,01 µg/ml	→ 0,001 µg/ml

Verdünnung Sirolimus

Die verwendete Stammlösung von Sirolimus hatte eine Konzentration von 1 mg/ml. In unseren Versuchen wurde Sirolimus in einer Konzentration von 0,001-1 µg/ml benötigt. Die Stammlösung musste nach folgendem Schema verdünnt werden:

Tabelle 6: Verdünnung Sirolimus

1 mg/ml = 1.000 µg/ml		Endkonzentration
↓	1: 100	(10 µl + 990 µl Medium)
1.	10 µg/ml	→ 1 µl/ml
↓	1:10	(100 µl + 900 µl Medium)
2.	1 µg/ml	→ 0,1 µg/ml
↓	1:10	(100 µl + 900 µl Medium)
3.	0,1 µg/ml	→ 0,01 µg/ml
↓	1:10	(100 µl + 900 µl Medium)
4.	0,01 µg/ml	→ 0,001 µg/ml

Verdünnung Mycophenolat

Eine Durchstechflasche MMF enthielt 500 mg Pulver zur Herstellung einer Suspension. Dazu wurde das Pulver in 10 ml 5% Glucose-Infusionslösung aufgelöst und kräftig geschüttelt. Die entstandene MMF-Suspension hatte eine Konzentration von 50 mg/ml. Es wurden Endkonzentrationen von 100-0,1 µg/ml benötigt, woraus sich folgende Verdünnungsreihe ergibt:

Tabelle 7: Verdünnung Mycophenolat

50 mg/ml = 50.000 µg/ml		Endkonzentration	
	↓ 1:50	(20 µl + 980 µl Medium)	
1.	1.000 µg/ml	→	100 µl/ml
	↓ 1:10	(100 µl + 900 µl Medium)	↓
2.	100 µg/ml	→	10 µg/ml
	↓ 1:10	(100 µl + 900 µl Medium)	↓
3.	10 µg/ml	→	1 µg/ml
	↓ 1:10	(100 µl + 900 µl Medium)	↓
4.	1 µg/ml	→	0,1 µg/ml

2.2.7. Messung des antiproliferativen Effekts

Die Messung des antiproliferativen Effekts nach der Behandlung der Zellen mit verschiedenen Medikamenten erfolgte mit Hilfe des BrdU-Assays. Dieser kalorimetrische Immunoassay zur Quantifizierung der Zellproliferation beruht auf dem Einbau und Nachweis des nichtradioaktiven Basenanalogs BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) an Stelle von Thymidin in die DNS [19, 25]. Die markierten Zellen wurden mit einer immunhistochemischen Färbemethode sichtbar gemacht und die Absorption photometrisch bestimmt.

Der Ansatz der Zellen erfolgte, wie bereits oben beschrieben, auf 96-well-Platten. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit den verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen der Medikamente für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden entweder mit Gemcitabin alleine, Everolimus alleine, Sirolimus alleine, MMF alleine oder einer Kombination von Gemcitabin mit einem der genannten Immunsuppressiva behandelt. Am folgenden Tag wurde die Labeling Solution (100 µl/well) hinzugegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden bebrütet. Die Labeling Solution dient der Markierung der Zellen durch Einbau von BrdU in die DNS [19, 25]. Am folgenden Tag erfolgte die Messung. Dazu wurden die Zellen zunächst für 30 Minuten mit einer Stopplösung (200 µl/ well FixDenat) fixiert und denaturiert. In einem nächsten

Arbeitsschritt wurde die Stopplösung entfernt und der Anti-BrdU-Antikörper (100 µl/well) für 90 Minuten hinzugegeben. Der Antikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt, die für die Umsetzung des Substrates bedeutend ist. Der Antikörper wurde entfernt und die Zellen dreimal mit 250 µl Waschpuffer gespült. Anschließend wurde das Substrat (100 µl/well 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin) hinzugegeben, wobei in einer Enzym-Substrat-Reaktion die Umsetzung des Substrates durch die Peroxidase des Antikörpers zu einem blau gefärbten Reaktionsprodukt führte. Nach ungefähr 30 Minuten wurde der Vorgang mit 1 M H₂SO₄ (25 µl/well) gestoppt, wodurch ein gelber Farbumschlag erfolgte. Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm durchgeführt. Die unbehandelte Kontrolle diente als 100%-Wert.

2.2.8. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden, falls nicht anders angegeben, als Mittelwert (Mean) ± Standardfehler (SEM) dargestellt. Für die statistische Varianzanalyse wurden eine zweifaktorielle ANOVA (analysis of variance) mit Messwiederholung sowie eine post-hoc Analyse (Bonferroni-Dunn) durchgeführt. Alle im Kapitel Ergebnisse dargestellten Variablen erfüllen die hierfür notwendigen Bedingungen Normalverteilung der Stichprobenvariablen. Darüber hinaus erfüllen alle als signifikant bezeichnete Unterschiede, soweit nicht anders angegeben, auch das Kriterium signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach der Bonferroni-Dunn-Methode. Zur Berechnung der log[EC₅₀] bei der Kombinationstherapie wurde eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt. Der additive Effekt der Immunsuppressiva auf die Proliferation der Zellen bei einer Kombinationstherapie wurde in Prozent bezogen auf die EC₅₀ bei Monotherapie angegeben. ANOVA, Bonferroni-Dunn wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 17 durchgeführt. Die nicht lineare Regressionsanalyse und sämtliche Grafiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 erstellt. Ein Unterschied der Ergebnisse wird im Folgenden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Pankreastumorzellen (MiaPaCa-2, Panc-1)

3.1.1. Monotherapie bei Pankreastumorzellen

Die Pankreastumorzellen MiaPaCa-2 und Panc-1 wurden in unseren Versuchen mit verschiedenen Monotherapien in vitro behandelt. Zum einem wurden sie mit dem seit langem beim Pankreaskarzinom angewandten Zytostatikum Gemcitabin behandelt, zum anderem mit einem Immunsuppressivum. Für die Monotherapie mit einem Immunsuppressivum wurden Everolimus, Sirolimus und Mycophenolat verwendet. Die Auswirkungen der Behandlung auf das Zellwachstum werden nun ausführlich betrachtet.

Monotherapie mit Gemcitabin

Wie zu erwarten führte die Behandlung der Tumorzellen MiaPaCa-2 und Panc-1 mit Gemcitabin ($1-10^5$ nM) zu einer dosisabhängigen Hemmung der Zellproliferation. Für MiaPaCa-2 Zellen war dieser Effekt signifikant für Konzentrationen > 10 nM, wobei das Zellwachstum um 40-82% gehemmt werden konnte ($p < 0,05$). Analog zu den MiaPaCa-2 Zellen erfolgte bei Panc-1 Zellen ab einer Konzentration von > 10 nM eine Abnahme des Zellwachstums ($p < 0,05$). Insgesamt konnten die Zellen um 8–85 % in ihrem Wachstum gehemmt werden, wobei eine deutliche Zunahme des antiproliferativen Effekt erst bei Konzentrationen > 1.000 nM zu beobachten war.

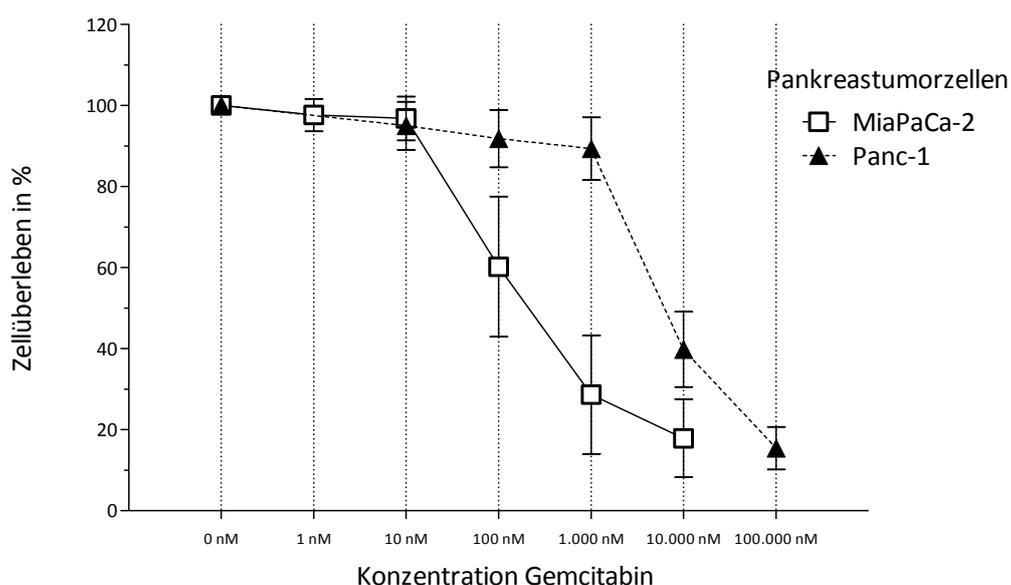


Abbildung 1: Monotherapie mit Gemcitabin bei Pankreastumorzellen

Monotherapie mit mTOR-Inhibitoren

In unseren Versuchen wurden MiaPaCa-2 und Panc-1 Zellen mit den mTOR-Inhibitoren Everolimus und Sirolimus jeweils in einer Dosierung von 0,001–1 µg/ml behandelt. Die alleinige Zugabe von Everolimus in steigender Konzentration führte weder bei MiaPaCa-2 noch bei Panc-1 Zellen zu einer Zunahme des antiproliferativen Effekts ($p > 0,05$).

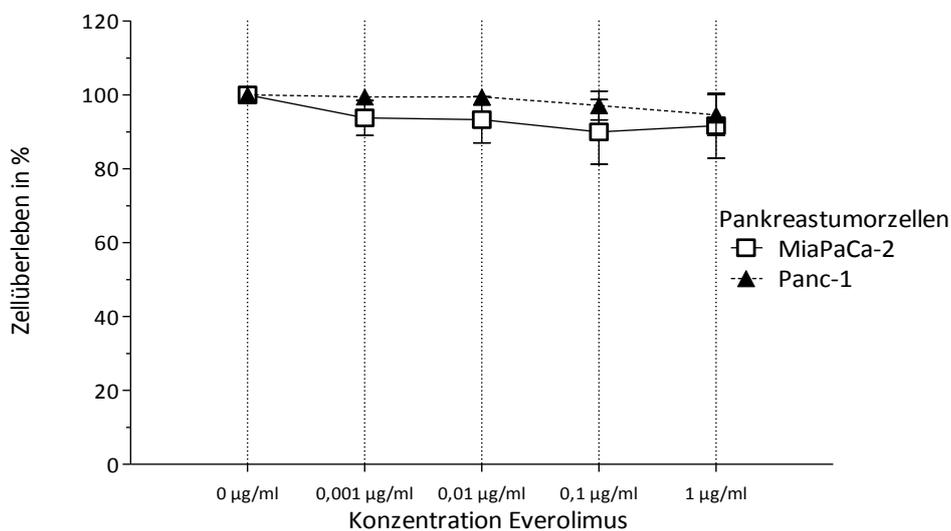


Abbildung 2: Monotherapie mit Everolimus bei Pankreastumorzellen

Ähnlich sind die Ergebnisse bei beiden Tumorzelllinien für Sirolimus. Bei MiaPaCa-2 Zellen zeigt sich keine Zunahme des antiproliferativen Effektes ($p > 0,05$). Betrachtet man die Pankreastumorzellen Panc-1 ist eine signifikante Abnahme des Zellwachstums erst bei einer Konzentration von 1 µg/ml sichtbar, jedoch nur um 5% ($p < 0,05$).

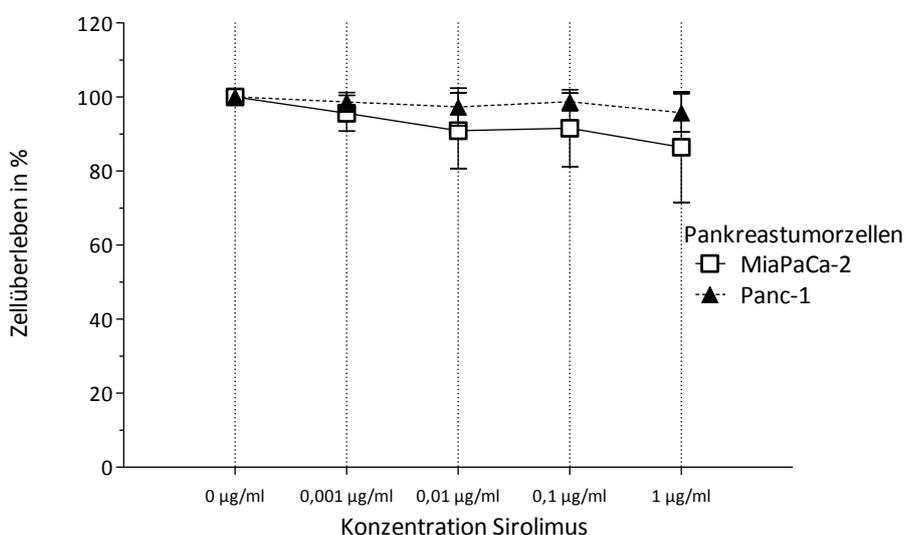


Abbildung 3: Monotherapie mit Sirolimus bei Pankreastumorzellen

Monotherapie mit Mycophenolat

Anders als bei der Monotherapie mit einem mTOR-Inhibitor führte die Zugabe von MMF zu einer deutlichen Hemmung der Zellproliferation. In einer niedriger Dosierung von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ist dieser Effekt noch nicht ausgeprägt ($p > 0,05$), aber ab einer Dosierung von 1 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ konnte das Zellwachstum in MiaPaCa-2 Zellen um 27–41% und in Panc-1 Zellen um 24-37% gehemmt werden ($p < 0,05$). Eine Erhöhung der MMF-Konzentration auf 100 $\mu\text{g/ml}$ führte zu keiner weiteren Zunahme des antiproliferativen Effekts ($p > 0,05$).

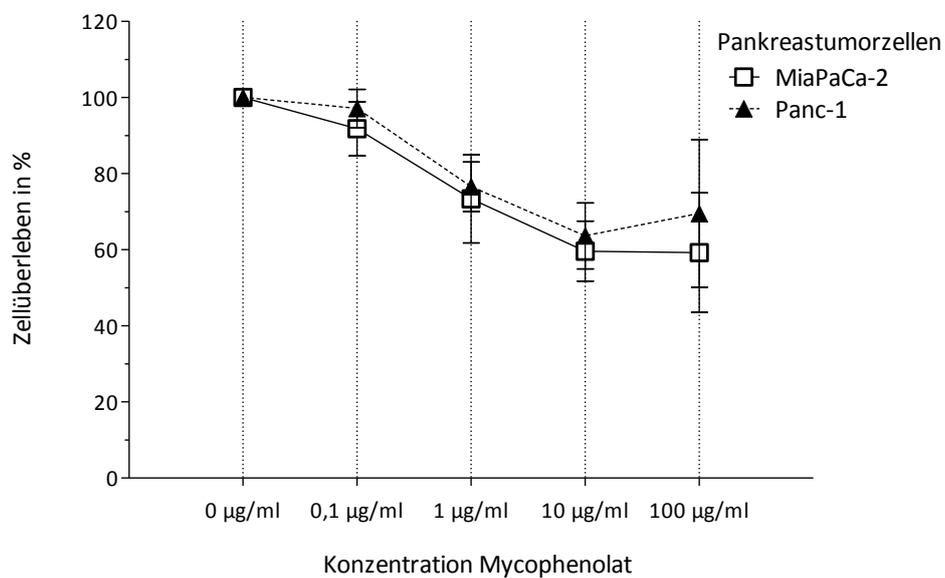


Abbildung 4: Monotherapie mit Mycophenolat bei Pankreastumorzellen

3.1.2. Kombinationstherapie bei Pankreastumorzellen

Neben der Monotherapie wurden die Pankreastumorzellen auch mit einer Kombinationstherapie behandelt. Bei dieser wurde das Zytostatikum Gemcitabin mit einem Immunsuppressivum kombiniert.

Eine Kombinationstherapie mit einem mTOR-Inhibitor führt zu keiner Wirkungsverstärkung von Gemcitabin.

Bei MiaPaCa-2 (Abb. 5A) und Panc-1 (Abb. 5B) Zellen zeigte sich, dass eine Kombination von Gemcitabin mit Everolimus (RAD001) zu keiner signifikanten Zunahme des antiproliferativen Effekts führte ($p < 0,05$). Bei der Betrachtung der $\log[EC_{50}]$ -Werte bestätigt sich dies. Für MiaPaCa-2 Zellen wurden folgende EC_{50} -Werte berechnet: $2,41 \pm 0,2$ (0 $\mu\text{g/ml}$), $2,38 \pm 0,2$ (0,001 $\mu\text{g/ml}$), $2,20 \pm 0,2$ (0,01 $\mu\text{g/ml}$), $2,15 \pm 0,2$ (0,1 $\mu\text{g/ml}$) und $2,16 \pm 0,2$ (1 $\mu\text{g/ml}$). Bei Panc-1 Zellen sind die Werte: $3,84 \pm 0,1$ (0 $\mu\text{g/ml}$), $3,78 \pm 0,1$ (0,001 $\mu\text{g/ml}$), $3,72 \pm 0,1$ (0,01 $\mu\text{g/ml}$), $3,81 \pm 0,1$ (0,1 $\mu\text{g/ml}$) und $3,77 \pm 0,1$ (1 $\mu\text{g/ml}$).

Sirolimus steigerte ebenfalls den antiproliferativen Effekt von Gemcitabin in MiaPaCa-2 (Abb. 6A) und Panc-1 (Abb. 6B) nicht ($p > 0,05$). Die EC_{50} -Werte für MiaPaCa-2 Zellen sind: $2,12 \pm 0,1$ (0 $\mu\text{g/ml}$), $2,04 \pm 0,1$ (0,001 $\mu\text{g/ml}$), $1,97 \pm 0,1$ (0,01 $\mu\text{g/ml}$), $1,95 \pm 0,1$ (0,1 $\mu\text{g/ml}$) und $1,97 \pm 0,2$ (1 $\mu\text{g/ml}$). Für Panc-1 Zellen lauten die Werte: $3,88 \pm 0,1$ (0 $\mu\text{g/ml}$), $3,81 \pm 0,1$ (0,001 $\mu\text{g/ml}$), $3,83 \pm 0,1$ (0,01 $\mu\text{g/ml}$), $3,87 \pm 0,1$ (0,1 $\mu\text{g/ml}$) und $3,74 \pm 0,1$ (1 $\mu\text{g/ml}$)

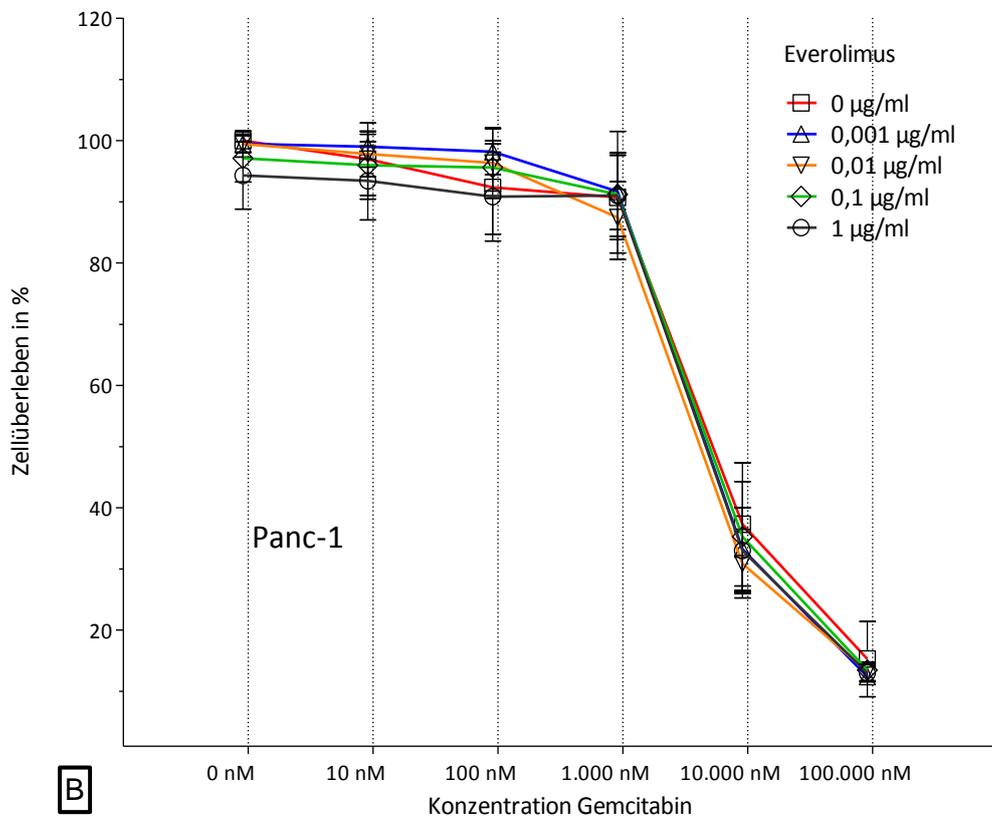
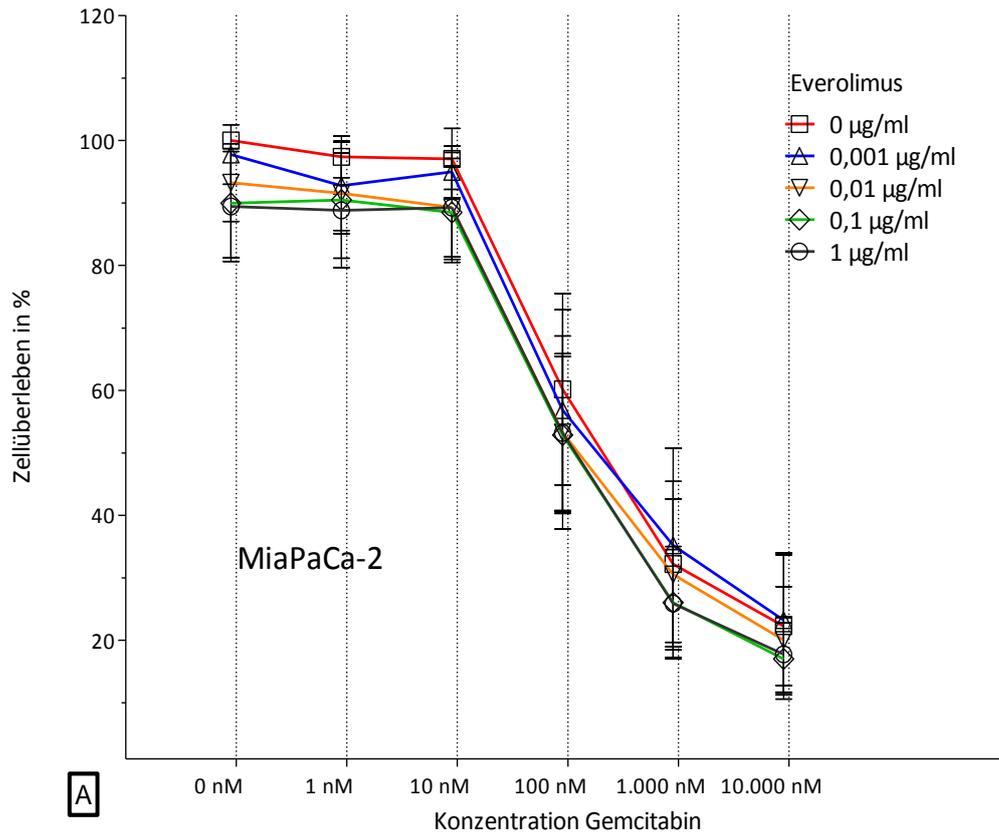


Abbildung 5: Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Everolimus bei Pankreaskarzinomzellen

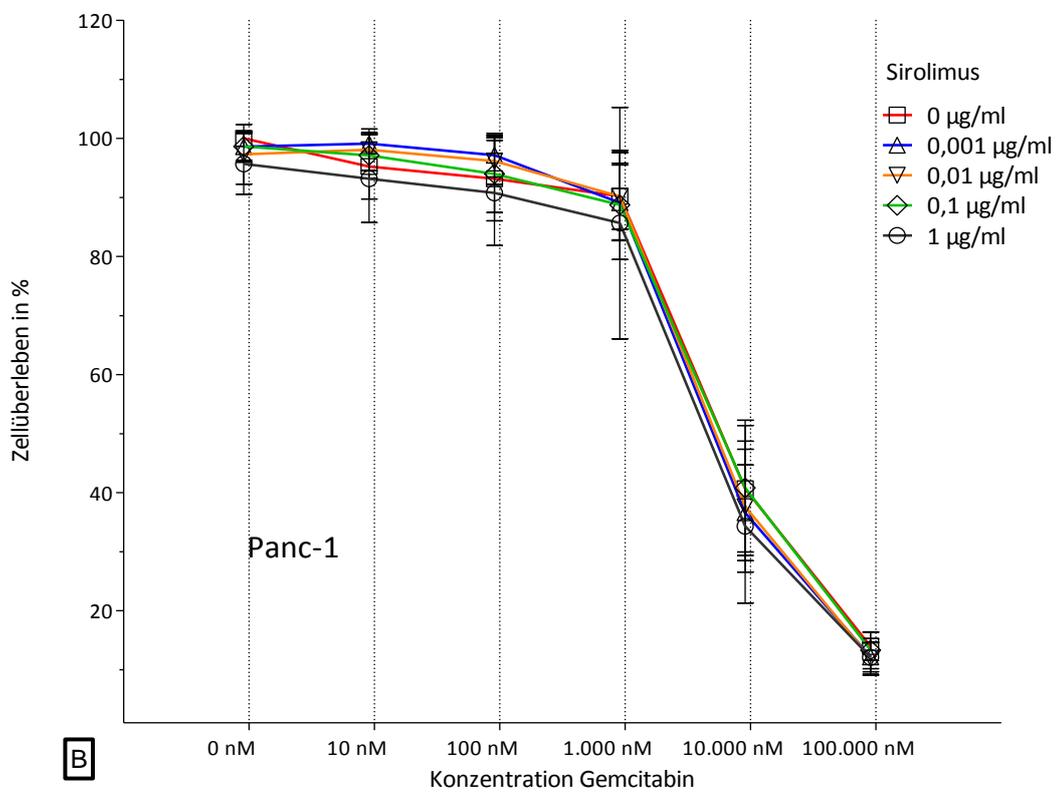
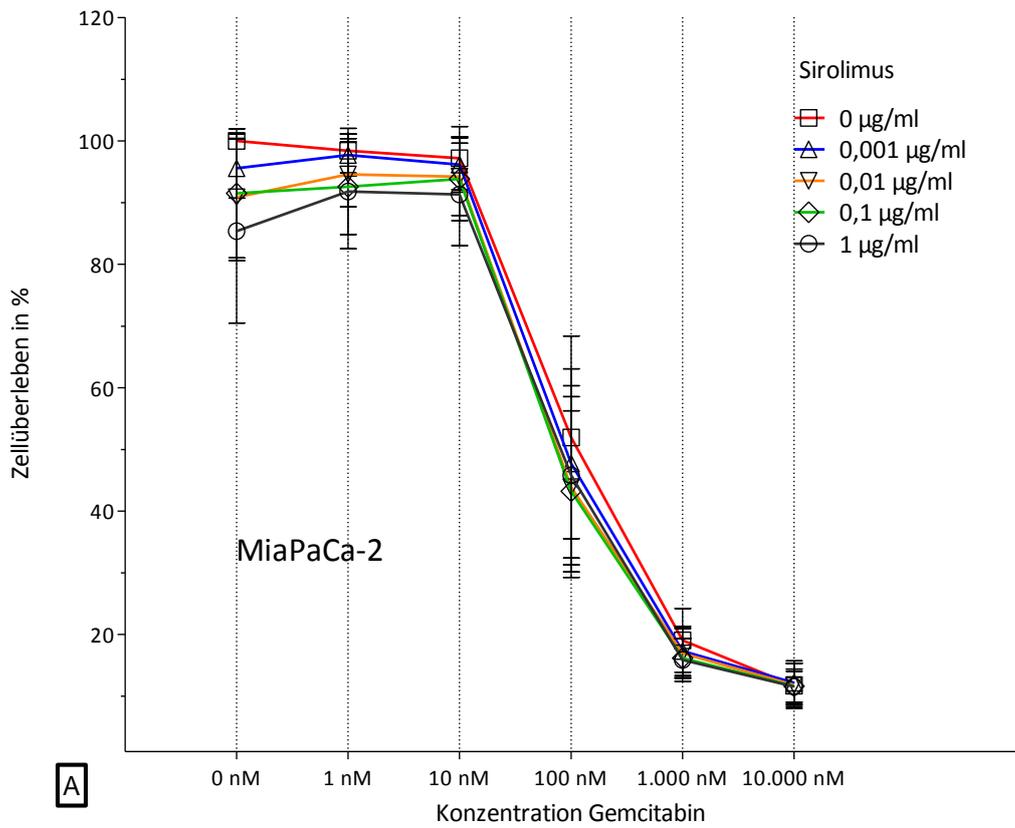


Abbildung 6: Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Sirolimus bei Pankreaskarzinomzellen

Mycophenolat steigert den antiproliferativen Effekt von Gemcitabin bei Pankreastumorzellen

MiaPaCa-2 und Panc-1 Zellen wurden in unseren Versuchen in vitro mit unterschiedlichen Kombination und Konzentrationen von Gemcitabin und MMF behandelt. In beiden Zelllinien wurde eine Zunahme des antiproliferativen Effekt durch Mycophenolat beobachtet ($p < 0,05$).

Es war zu erkennen, dass eine hohe Konzentration von MMF (1 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$) in Kombination mit einer niedrigen Gemcitabin-Dosis (1-100 nM) das Zellwachstum am effektivsten hemmte ($p < 0,05$). Eine Erhöhung der MMF-Konzentration auf 100 $\mu\text{g/ml}$ brachte keine zusätzliche Abnahme der Zellproliferation ($p > 0,05$). Wird Mycophenolat niedrig dosiert (0,1 $\mu\text{g/ml}$), zeigte sich keine Verstärkung des antiproliferativen Effekts durch das Immunsuppressivum ($p > 0,05$). Die Berechnung der $\log[\text{EC}_{50}]$ -Werte für Gemcitabin zeigte ebenfalls, dass mit einer steigenden MMF-Konzentration das Zellwachstum zusätzlich gehemmt werden kann. Die EC_{50} -Werte für MMF sind $2,65 \pm 0,1$ (0 $\mu\text{g/ml}$), $2,42 \pm 0,1$ (0,1 $\mu\text{g/ml}$), $2,21 \pm 0,2$ (1 $\mu\text{g/ml}$), $1,30 \pm 0,4$ (10 $\mu\text{g/ml}$), $1,23 \pm 0,4$ (100 $\mu\text{g/ml}$). Der additive Effekt von MMF auf die Zellproliferation war besonders deutlich für Konzentrationen größer 1 $\mu\text{g/ml}$ wobei die $\log[\text{EC}_{50}]$ um 16,6-53,6% gesenkt werden konnte.

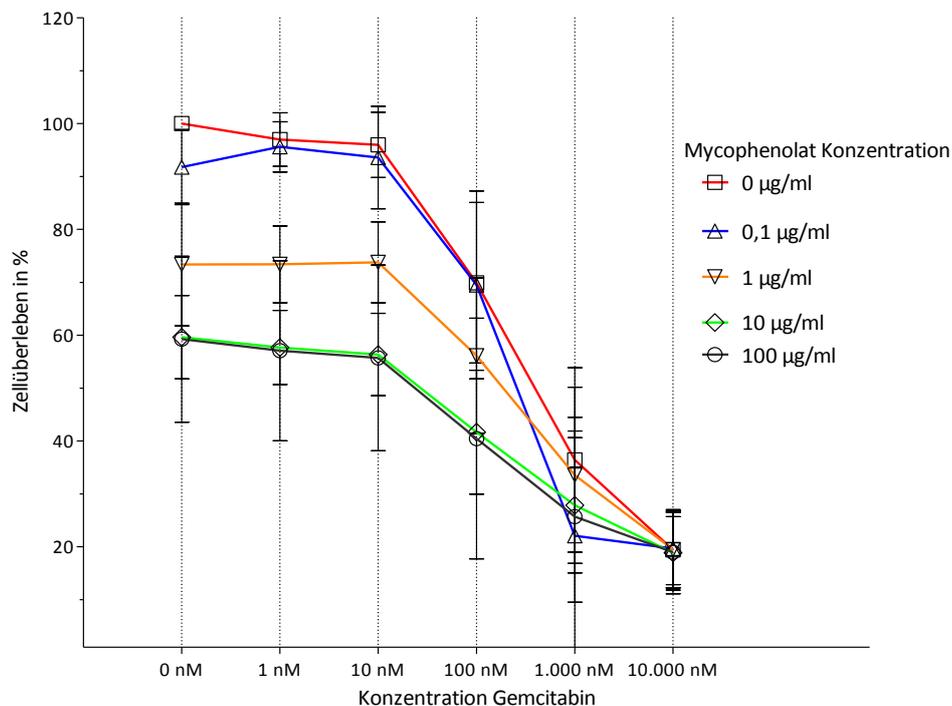


Abbildung 7: Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Mycophenolat bei MiaPaCa-2 Zellen

Die Ergebnisse bei Panc-1 Zellen sind identisch verglichen mit den MiaPaCa-2 Zellen. Durch die Kombinationstherapie mit MMF konnte das Zellwachstum zusätzlich gehemmt werden ($p < 0,05$). Dieser Effekt war ebenfalls besonders ausgeprägt für MMF-Konzentrationen größer 1 $\mu\text{g/ml}$. Bei einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ war dieser Effekt nicht sichtbar ($p > 0,05$). Die EC_{50} -Werte für Panc-1 Zellen sind $3,86 \pm 0,1$ (0 $\mu\text{g/ml}$), $3,88 \pm 0,1$ (0,1 $\mu\text{g/ml}$), $3,58 \pm 0,2$ (1 $\mu\text{g/ml}$), $2,99 \pm 0,3$ (10 $\mu\text{g/ml}$), $3,35 \pm 0,3$ (100 $\mu\text{g/ml}$). Durch die Zugabe von Mycophenolat konnte die EC_{50} um 8,3-22,9% gesenkt werden.

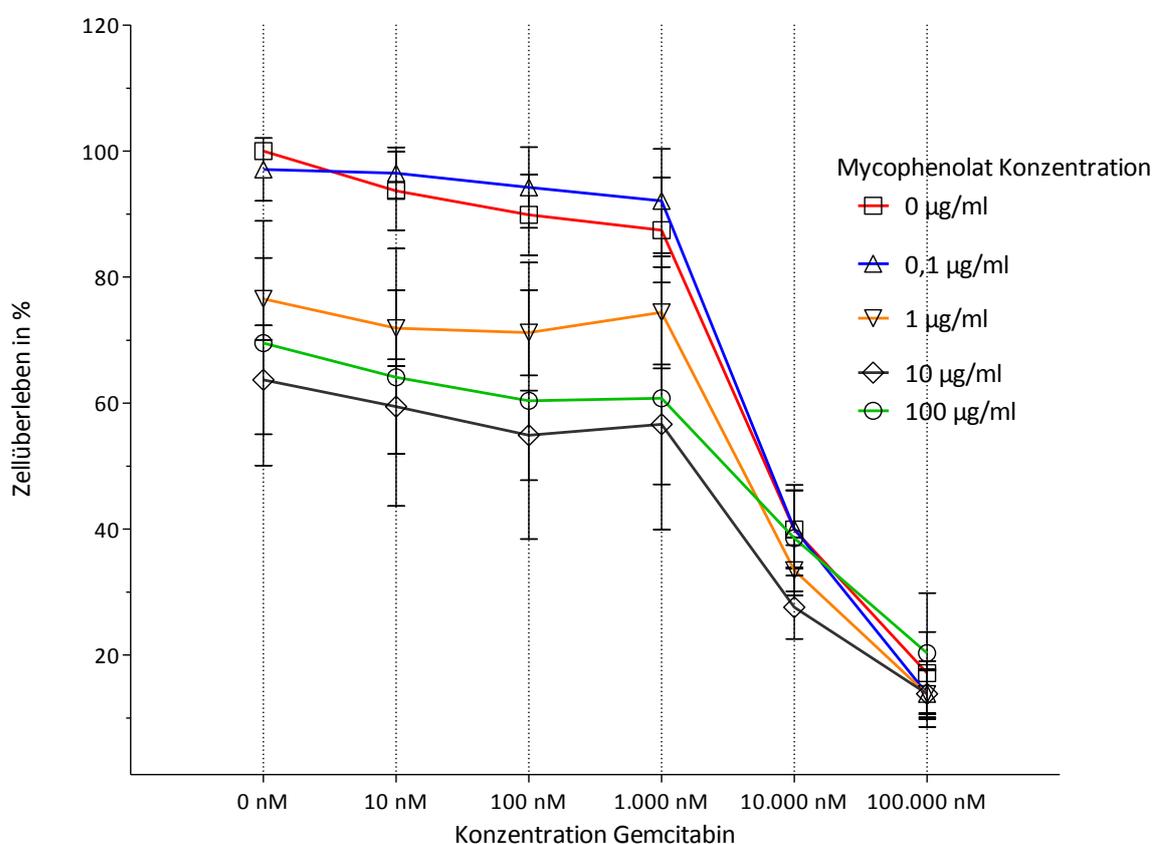


Abbildung 8: Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Mycophenolat bei Panc-1 Zellen

3.2. humane vaskuläre glatte Muskelzellen (hCASMC)

3.2.1. Monotherapie bei glatten Muskelzellen

Analog zu den Pankreastumorzellen wurden die glatten Muskelzellen mit den verschiedenen Monotherapeutika behandelt. Auf die Auswirkungen dieser Therapien wird nun im Folgenden näher eingegangen.

Monotherapie mit Gemcitabin

Eine Behandlung der hCASMC-Zellen mit Gemcitabin in ansteigender Konzentration ($0,1-10^3$ nM) führte zu einer Hemmung der Zellproliferation. Mit einer Konzentration von $0,1-1$ nM Gemcitabin konnte das Zellwachstum nur geringfügig um ca. 7% gehemmt werden, wobei dieser Unterschied als nicht signifikant zu betrachten ist ($p > 0,05$). Erst mit einer Zugabe von 10 nM bzw. 100 nM konnte die Zellproliferation um 42% bzw. 74% gehemmt werden ($p < 0,05$). Eine Dosissteigerung auf 1.000 nM führte zu keiner weiteren Abnahme der Zellproliferation ($p > 0,05$).

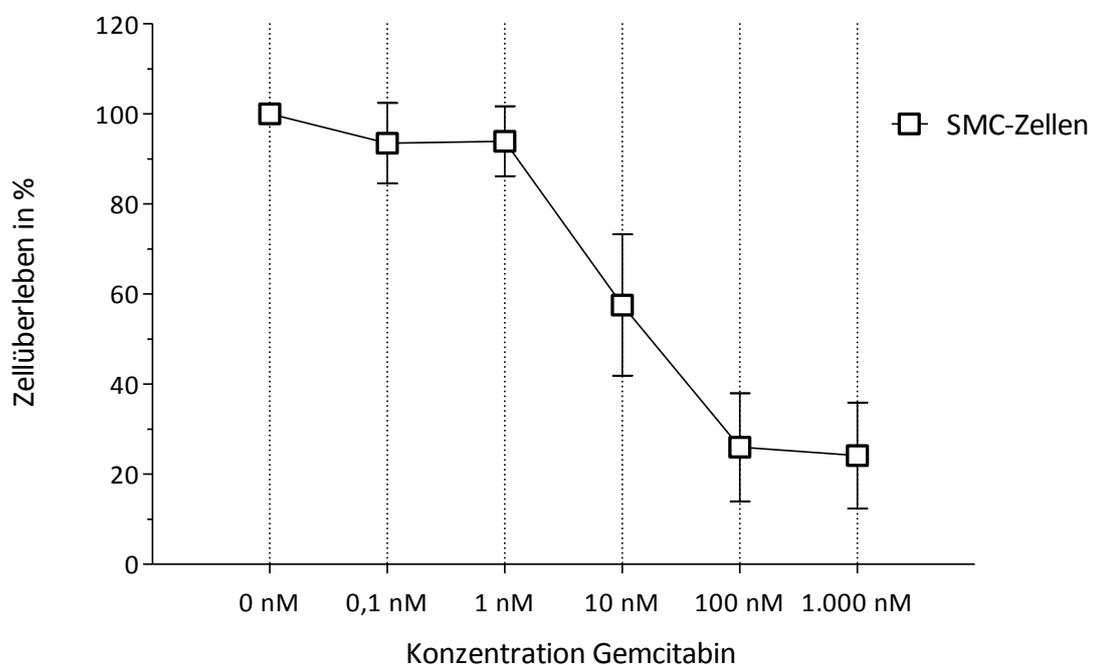


Abbildung 9: Monotherapie mit Gemcitabin bei glatten Muskelzellen
(SMC: Smooth Muscle Cell)

Monotherapie mit mTOR-Inhibitoren

In unseren Versuchen wurden die SMC-Zellen mit zwei unterschiedlichen mTOR-Inhibitoren behandelt. Zum einen wurde Everolimus (RAD001) in der Konzentration von 0,001–1 µg/ml verwendet, zum anderen Sirolimus in derselben Dosierung.

Bei einer Behandlung der Zellen mit Everolimus konnte die Zellproliferation insgesamt um 53% gesenkt werden. Ein Rückgang der Zellproliferation um 46% war bereits bei einer Everolimus-Konzentration von 0,001 µg/ml zu beobachten ($P < 0,05$). Eine Dosissteigerung auf 0,01 µg/ml verstärkte den antiproliferativen Effekt um weitere 5% auf 51% ($p < 0,05$). Mit steigender Konzentration (0,1 µg/ml und 1 µg/ml) konnte das Zellwachstum nicht weiter gehemmt werden ($p > 0,05$).

Der zweite mTOR-Inhibitor, Sirolimus, hemmte das Zellwachstum ebenfalls, aber nicht so ausgeprägt wie Everolimus. Die glatten Muskelzellen konnten mit ansteigender Konzentration um bis zu 28% in ihrem Wachstum gehemmt werden ($p < 0,05$). Sirolimus in einer Dosierung von 0,001 µg/ml senkte das Zellüberleben bereits um 20% ($p < 0,05$), wobei jede Dosissteigerung zu keiner weiteren Zunahme des antiproliferativen Effekts führte ($p > 0,05$).

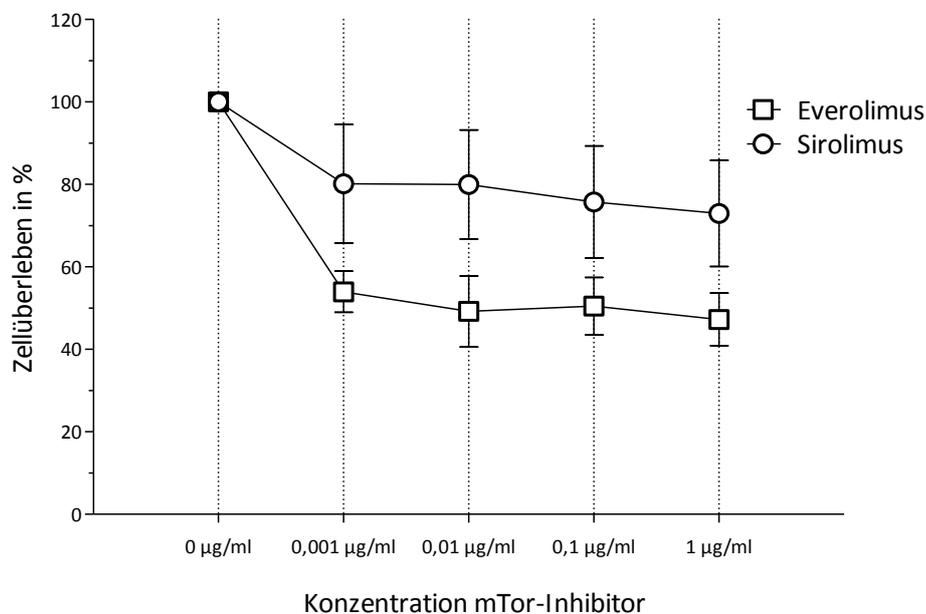


Abbildung 10: Monotherapie mit einem mTOR-Inhibitor bei glatten Muskelzellen
(mTOR: mammalian Target of Rapamycin)

Monotherapie mit Mycophenolat

Die Monotherapie mit Mycophenolat (0,1-100 $\mu\text{g/ml}$) bei hCASM-Cellen führte zu einer deutlichen Abnahme des Zellwachstums. Insgesamt konnte durch Mycophenolat das Zellwachstum um 69% gehemmt werden, wobei zu beachten ist, dass es erst ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zu einem signifikanten antiproliferativen Effekt kam ($p < 0,05$).

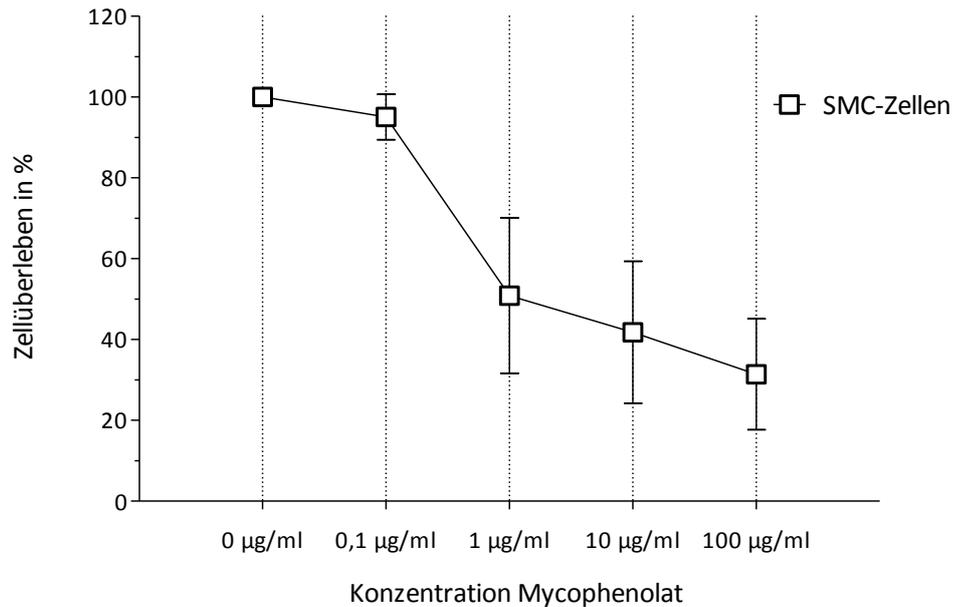


Abbildung 11: Monotherapie mit Mycophenolat bei glatten Muskelzellen
(SMC = Smooth Muscle Cell)

3.2.2. Kombinationstherapie bei glatten Muskelzellen

Eine Kombinationstherapie mit einem mTOR-Inhibitor steigert den antiproliferativen Effekt von Gemcitabin

Bei SMC-Zellen führt die Zugabe von Everolimus (0,001-1 μ g/ml) bei jeder Konzentration zu einer deutlichen Abnahme der Zellproliferation ($p < 0,05$). Die Wirkungsverstärkung von Everolimus war vor allem bei niedrigen Gemcitabin-Konzentrationen (1-1.000 nM) sichtbar ($p < 0,05$). Bei höheren Konzentrationen (1.000 nM und 10.000 nM) unterschied sich die Kombinationstherapie nicht von der Kombinationstherapie ($p > 0,05$). Die $\log[EC_{50}]$ -Werte für Everolimus sind $1,20 \pm 0,2$ (0 μ g/ml), $0,27 \pm 0,4$ (0,001 μ g/ml), $-0,01 \pm 0,4$ (0,01 μ g/ml), $0,02 \pm 0,4$ (0,1 μ g/ml) und $-0,02 \pm 0,5$ (1 μ g/ml). Bei den EC_{50} -Werten handelt es sich um die mittels linearer Regressionsanalyse berechnete Gemcitabin-Konzentration, bei der das Zellwachstum um 50% gehemmt wird. Da bei einer Monotherapie mit Everolimus teilweise das Zellwachstum um mehr als 50% gehemmt wird, fällt dieser theoretische Wert teilweise negativ aus.

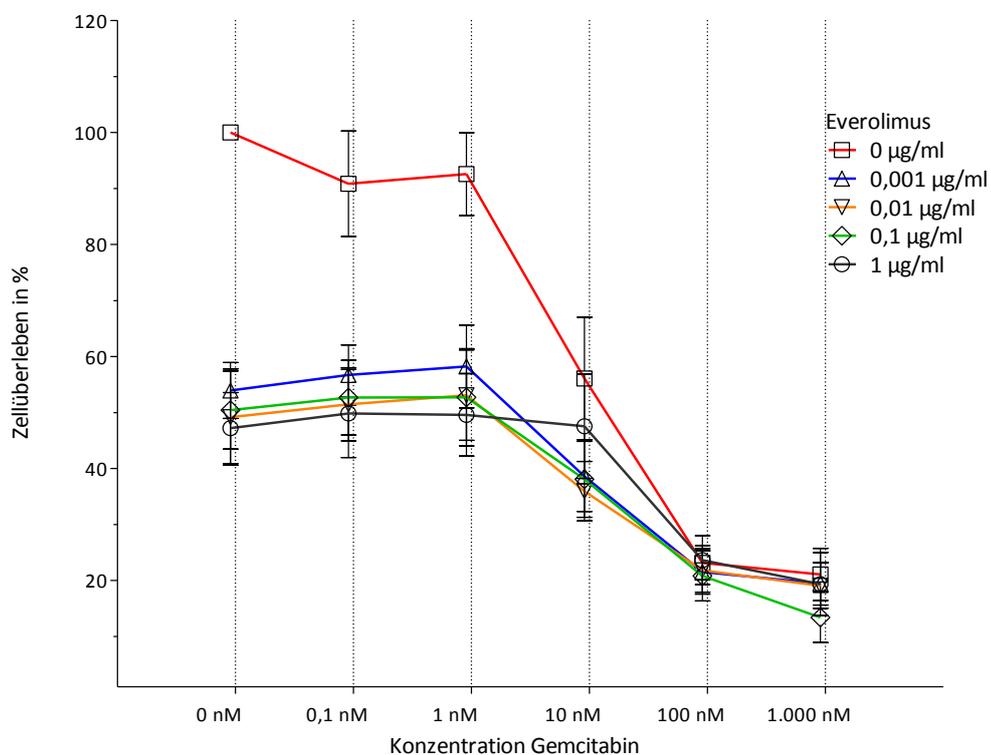


Abbildung 12: Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Everolimus bei glatten Muskelzellen

Die Kombinationstherapie mit Sirolimus steigert ebenfalls den antiproliferativen Effekt von Gemcitabin. Am Effektivsten ist dieser Effekt bei niedrigen Gemcitabin-Konzentrationen (1-100 nM). Ab einer Gemcitabin-Konzentration von 1.000 nM führte eine Zugabe von Sirolimus zu keiner weiteren Hemmung des Zellwachstums. Die berechneten $\log[EC_{50}]$ -Werte für Sirolimus in den entsprechenden Konzentrationen sind $1,19 \pm 0,1$ (0 $\mu\text{g/ml}$), $0,89 \pm 0,2$ (0,001 $\mu\text{g/ml}$), $0,88 \pm 0,3$ (0,01 $\mu\text{g/ml}$), $0,85 \pm 0,3$ (0,1 $\mu\text{g/ml}$) und $1,17 \pm 0,3$ [1 $\mu\text{g/ml}$]. Durch die Zugabe von Sirolimus konnte die EC_{50} um 25,3-28,6% gesenkt werden.

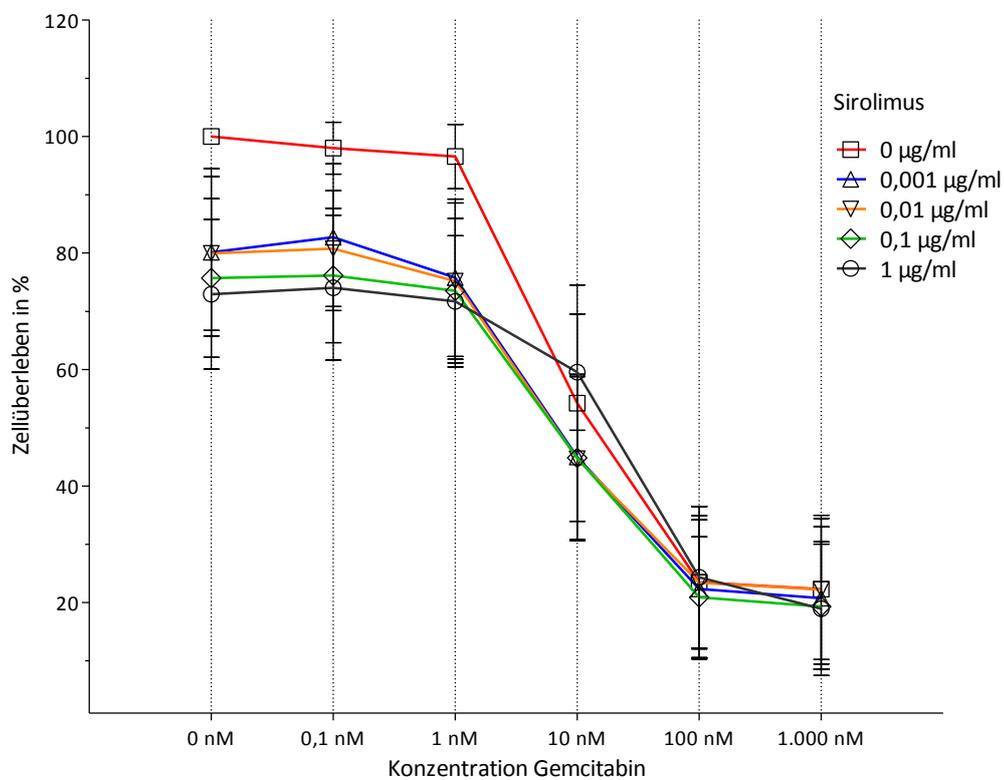


Abbildung 13: Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Sirolimus bei glatten Muskelzellen

Mycophenolat steigert den antiproliferativen Effekt von Gemcitabin bei glatten Muskelzellen

Die Ergebnisse bei der Kombinationstherapie mit MMF sind vergleichbar mit den Ergebnissen bei Pankreastumorzellen. Durch die Zugabe von MMF konnte das Zellwachstum zusätzlich gehemmt werden ($p < 0,05$). Analog zu den Tumorzellen war dieser Effekt erst bei Konzentrationen größer $1 \mu\text{g/ml}$ erkennbar ($p < 0,05$). Es stellte sich heraus, dass eine niedrige Gemcitabin-Konzentration ($0,1\text{-}10 \text{ nM}$) in einer Kombination mit einer hohen MMF-Konzentration ($1\text{-}100 \mu\text{g/ml}$) am effektivsten ist. Die $\log[\text{EC}_{50}]$ -Werte für Gemcitabin sind $1,42 \pm 0,2$ ($0 \mu\text{g/ml}$), $1,37 \pm 0,2$ ($0,1 \mu\text{g/ml}$), $0,28 \pm 0,4$ ($1 \mu\text{g/ml}$), $-0,95 \pm 0,5$ ($10 \mu\text{g/ml}$), $-1,23 \pm 0,5$ ($100 \mu\text{g/ml}$).

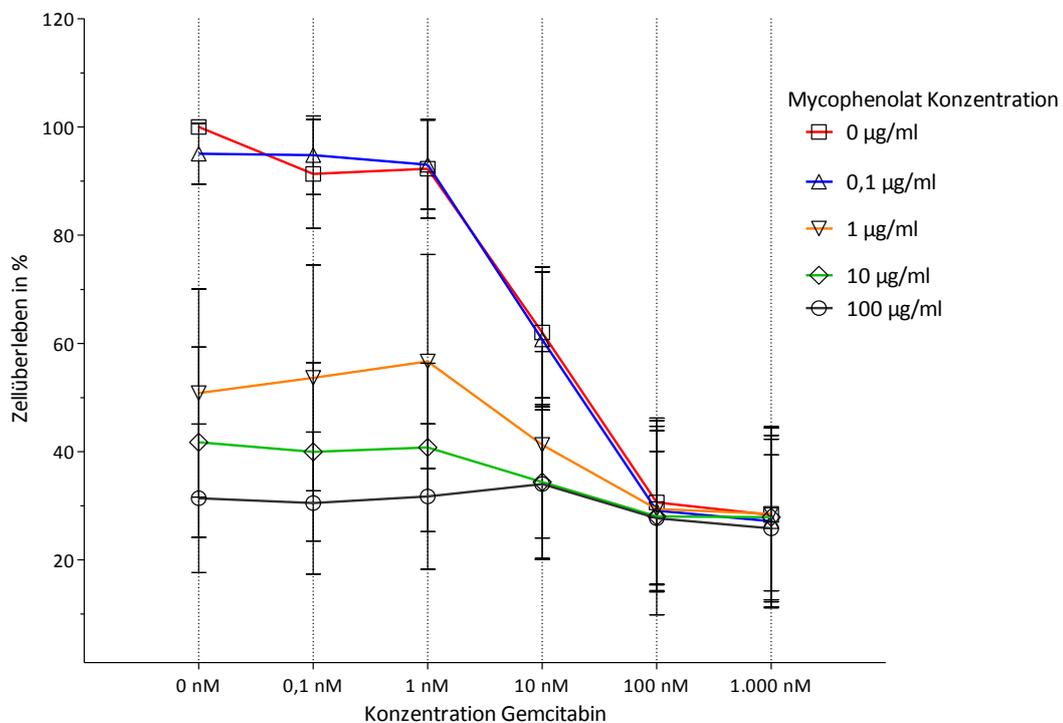


Abbildung 14: Kombinationstherapie mit Gemcitabin und Mycophenolat bei glatten Muskelzellen

3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der Monotherapie von Pankreastumorzellen (MiaPaCa-2 und Panc-1) mit den verschiedenen Medikamenten zeigte sich, dass das Zellwachstum sowohl mit Gemcitabin als auch mit Mycophenolat gehemmt werden konnte ($p < 0,05$). In der Kombinationstherapie war lediglich Mycophenolat erfolgsversprechend ($p < 0,05$). Die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Sirolimus verstärkten den antiproliferativen Effekt von Gemcitabin nicht ($p > 0,05$).

Bei glatten Muskelzellen (hCASMC) konnte die Zellproliferation erfolgreich mit Gemcitabin, Everolimus, Sirolimus und Mycophenolat gehemmt werden ($p < 0,05$). Auch bei der Kombinationstherapie verstärkten alle drei Immunsuppressiva die Wirkung von Gemcitabin ($p < 0,05$).

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie sollte gezeigt werden, inwieweit die antiproliferative Wirkung des seit langem beim Pankreaskarzinom verwendeten Zytostatikum Gemcitabin durch ein Immunsuppressivum verstärkt werden kann. Neben der Hemmung des Tumorzellwachstums ist bei der Behandlung von Tumorerkrankungen eine Hemmung der Tumorangiogenese wünschenswert. Solide Tumore, die eine Größe von 1 mm^3 überschreiten, können nicht mehr durch Diffusion ernährt werden, sondern müssen Anschluss an das Gefäßsystem finden [4]. Durch Hemmung der Tumorangiogenese kann die Versorgung der Tumore mit Nährstoffen gestört und vermutlich die Ausbreitung bzw. Metastasierung verhindert werden [4, 38]. Die Auswirkungen einer Kombinationstherapie mit einem Immunsuppressivum auf glatte Muskelzellen und damit auf die Tumorangiogenese wurden ebenfalls in dieser Studie untersucht. Die Pankreastumorzellen MiaPaCa-2 und Panc-1 sowie die glatten Muskelzellen hCASMIC wurden dazu mit verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen der verschiedenen Immunsuppressiva mit Gemcitabin in klinisch relevanten Dosierungen in vitro behandelt [1, 24, 34].

Bedeutung von mTOR-Inhibitoren in Monotherapie bei malignen Erkrankungen

Auf der Suche nach neuen Therapieoptionen bei Tumorerkrankungen ist in den letzten Jahren das Interesse an mTOR-Inhibitoren gestiegen. mTOR, eine Proteinkinase der Phosphatidylinositol-3-Kinase, spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Tumorzellwachstums [9]. Medikamente, die an der mTOR-Kinase angreifen, hemmen Signale, die für den Zellzyklus, das Zellwachstum und die Proliferation in gesunden und malignen Zellen verantwortlich sind [8, 23, 31, 36]. Die Wirkung von mTOR-Inhibitoren auf Zellen des Immunsystems wird in der Transplantationsmedizin zur Prophylaxe einer akuten und chronischen Abstoßungsreaktion nach Transplantationen genutzt [12]. Für die Tumorthherapie werden derzeit der mTOR-Inhibitor Sirolimus (Rapamycin), seine Derivate Everolimus (RAD001) und Temsirolimus (CCI-779) in klinischen Studien untersucht [9]. Die antiproliferative Eigenschaft von mTOR-Inhibitoren auf Tumormodelle in vitro und in vivo ist in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen worden [21]. Für Sirolimus wurde neben den

immunsuppressiven Eigenschaften und dem antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen auch eine Hemmung der Zellproliferation in glatten Muskelzellen und damit der Angiogenese gezeigt [14, 38-40]. Eine Monotherapie bei malignen Erkrankungen mit Sirolimus und seinen Derivaten wurde in ersten klinischen Studien gut vertragen [9]. Seit November 2007 ist Temsirolimus (CCI-779) wegen seinen antiproliferativen Eigenschaften der erste mTOR-Inhibitor, der zur Behandlung einer Tumorerkrankung, dem fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom, in Europa zugelassen ist. Im Oktober 2009 erhielt Temsirolimus von der EMEA (European Medicines Agency) ebenfalls die Zulassung für die Behandlung des Mantelzelllymphoms [38].

Bedeutung von mTOR-Inhibitoren in Kombination mit einer traditionellen Chemotherapie

Die Kombination eines mTOR-Inhibitors mit einer traditionellen Tumorthherapie ist in den letzten Jahren ebenfalls immer wieder untersucht worden. Ergebnisse einer Phase I-Studie zeigen, dass eine Kombination von Temsirolimus mit Interferon-Alpha [20] bzw. 5-Fluorouracil [27] zu einer gesteigerten Toxizität bei gleichzeitig niedrigerer Dosierung führt. Für Everolimus (RAD001), einem relativ neuen mTOR-Inhibitor, wurde kürzlich gezeigt, dass es Zellen gegenüber Cisplatin sensibilisiert, indem es die durch p53 induzierte p21-Expression hemmt [3]. Darüber hinaus berichten Pacey et al. über eine Wirkungsverstärkung von Gemcitabin in Kombination mit Everolimus [22]. Bei allen bisherigen Studien ist jedoch keine pharmakologische Interaktion zwischen den Medikamenten zu beobachten gewesen, wobei wegen der begrenzten Anzahl von Studien diesbezüglich noch keine endgültige Aussage getroffen werden kann. Es scheint sich aber abzuzeichnen, dass die erhöhte Toxizität der Kombinationstherapie auf die veränderte Expression von Enzymen, die am Medikamentenstoffwechsel beteiligt sind, zurückzuführen ist [9]. Ebenfalls denkbar wäre, dass die Medikamente unabhängig voneinander ihre Wirkung entfalten und so in Kombination einen größeren toxischen Effekt erzielen.

In von uns veröffentlichten Ergebnissen konnten wir zeigen, dass Everolimus den antiproliferativen Effekt von Gemcitabin in MiaPaCa-2 und Panc-1 Zellen bei klinisch relevanten Dosierungen steigert [35]. Bei den Versuchen für meine Arbeit hingegen war dieser Effekt nicht zu beobachten. MiaPaCa-2 und Panc-1 Zellen konnten in ihrem

Wachstum durch eine Monotherapie mit einem mTOR-Inhibitor nicht signifikant gehemmt werden. Auch bei einer Kombination mit Gemcitabin zeigte sich keine Wirkungsverstärkung des Zytostatikums durch den mTOR-Inhibitor.

Bei glatten Muskelzellen führte die Behandlung mit einem mTOR-Inhibitor jedoch zu einem deutlichen antiproliferativen Effekt der mTOR-Inhibitoren. Sowohl Sirolimus als auch Everolimus in Monotherapie hemmten die Proliferation entscheidend. Durch eine Kombination des mTOR-Inhibitors mit Gemcitabin konnte diese toxische Wirkung weiter verstärkt werden. Folglich muss angenommen werden, dass die Therapie mit einem mTOR-Inhibitor die Proliferation der glatten Muskelzellen und somit die Tumorangiogenese hemmt. Die Ergebnisse stellen lediglich in vitro-Beobachtungen dar und können nicht einfach auf in vivo Bedingungen übertragen werden. Weitere Untersuchungen in vivo und in klinischen Studien müssen zeigen, ob diese Beobachtungen dort ebenfalls zu erkennen sind und vielleicht mTOR-Inhibitoren eine neue Therapieoption beim Pankreaskarzinom darstellen.

Mycophenolat bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms

Mycophenolat (MMF) ist ein selektiver, nicht-kompetitiver und reversibler Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) und somit ein Schlüsselenzym in der De-novo-Synthese von Purinen, auf die vor allem T- und B-Lymphozyten angewiesen sind, während andere Zellen einen großen Teil ihrer Purine wiederverwenden können („salvage pathway“). Bevorzugt wird die DNS-Synthese der Lymphozyten gehemmt, weshalb Mycophenolat als Immunsuppressivum zur Prophylaxe sowohl bei einer akuten als auch bei einer chronischen Abstoßung nach Transplantationen eingesetzt werden kann [2, 37]. In aktuellen Studien wird neben den immunsuppressiven auch über die zytotoxischen Eigenschaften von MMF in anderen Zellen berichtet [32-33, 37]. Das Zellwachstum konnte in vitro bei Pankreastumorzellen und glatten Muskelzellen gehemmt werden [33]. Diese Erkenntnisse könnten eine neue Therapieoption beim Pankreaskarzinom darstellen.

In der vorliegenden Studie wird der ausgeprägte zytotoxische Effekt von Mycophenolat auf Pankreastumorzellen in vitro bestätigt. Bei MiaPaCa-2 und Panc-1 Zellen, die mit einer Kombination aus Mycophenolat und Gemcitabin behandelt wurden, konnte eine Steigerung des antiproliferativen Effekts im Vergleich zu einer Gemcitabin-Monotherapie

beobachtet werden. Der additive antiproliferative Effekt des Immunsuppressivums ist dosisabhängig und wächst mit steigender Konzentration.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch eine Kombinationstherapie neben dem Tumorzellwachstum auch die Proliferation in glatten Muskelzellen gehemmt werden kann. Wie bei den Tumorzellen ist der zytotoxische Effekt von Mycophenolat ebenfalls bei einer Monotherapie zu beobachten. Wird Mycophenolat kombiniert mit Gemcitabin angewendet, steigert es dosisabhängig den antiproliferativen Effekt von Gemcitabin.

Eine weitere wichtige Beobachtung ist, dass der additive Effekt von MMF auf Gemcitabin bei Dosierungen erreicht wird, die auch in vivo als unbedenklich angesehen werden [1, 34].

Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine Kombinationstherapie mit MMF bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms in vitro zwei Auswirkungen hat: Zum einen wird die Tumorzellproliferation deutlicher gehemmt, zum anderen kann die Tumorangiogenese gehemmt werden. Letzteres führt zu einer Mangelversorgung des Tumors mit Nährstoffen und kann somit vermutlich eine weitere Ausbreitung bzw. Metastasierung verhindern. In weiteren Studien muss nun geklärt werden, ob die in vitro beobachteten Effekte auch in vivo erkennbar sind.

5. Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom ist die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache in Deutschland. Wegen mangelnder Frühsymptome und einer ausgeprägten Metastasierungstendenz hat es eine infauste Prognose, ein kurativer Therapieansatz ist nur in seltenen Fällen möglich. In der Palliativtherapie verbessert das Zytostatikum Gemcitabin das Überleben und die krankheitsbezogenen Symptome des Patienten.

In den letzten Jahren sind Immunsuppressiva zur Behandlung von Tumorerkrankungen näher untersucht worden, um neue Therapieoptionen zu finden. In verschiedenen Arbeiten konnte für Sirolimus, Everolimus und Mycophenolat ein antiproliferativer Effekt gezeigt werden, wobei bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht endgültig geklärt ist, ob Immunsuppressiva Pankreaskarzinomzellen gegenüber einer Gemcitabin-Behandlung sensibilisieren können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Immunsuppressiva sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit dem Standardtherapeutikum Gemcitabin *in vitro* näher untersucht.

Bei der Behandlung von malignen Erkrankungen ist neben der zytostatischen Behandlung die Angiogenese immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. Die Hemmung der Tumorangiogenese kann die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen stören und so vermutlich das Wachstum und die Metastasierung des Tumors hinauszögern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss von Immunsuppressiva in Kombination mit Gemcitabin auf vaskuläre glatte Muskelzellen näher betrachtet.

Bei den Versuchen wurden Pankreastumorzellen (MiaPaCa-2 und Panc-1) und vaskuläre glatte Muskelzellen (hCASM) unter Standardbedingungen kultiviert und mit verschiedenen Medikamentenkombinationen und -konzentrationen behandelt. Neben dem Zytostatikum Gemcitabin wurden die Zelllinien mit den Immunsuppressiva Sirolimus, Everolimus und Mycophenolat behandelt. Die Auswirkungen der Behandlung auf das Zellwachstum wurde mit Hilfe des BrdU-Immunoassays bestimmt.

Mycophenolat steigerte *in vitro* zum einen den zytotoxischen Effekt einer Gemcitabin-Behandlung, zum anderen konnte die Tumorangiogenese gehemmt werden. Die Kombinationstherapie mit Mycophenolat sensibilisierte somit Pankreaskarzinomzelllinien gegenüber der zytostatischen Therapie mit Gemcitabin und die dazugehörigen EC_{50} -Werte konnten gesenkt werden. Ein zytotoxischer Effekt von Mycophenolat bei MiaPaCa-2, Panc-1 und hCASM-Zellen konnte ebenfalls belegt werden. Bei

mTOR-Inhibitoren war ein additiver Effekt auf die Gemcitabin-Behandlung in beiden Tumorzelllinien in vitro nicht zu beobachten, jedoch konnte das Zellwachstum der glatten Muskelzellen und damit die Tumorangiogenese entscheidend gehemmt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind erfolgsversprechend, wobei zu beachten ist, dass es sich um in vitro Untersuchungen handelt. Weitere Studien müssen belegen, ob die beschriebenen Effekte auch in vivo erzielt werden können und somit künftig eine neue Therapieoption für die Behandlung des Pankreaskarzinoms zur Verfügung steht.

6. Literaturverzeichnis

1. Abbruzzese JL, Grunewald R, Weeks EA, Gravel D, Adams T, Nowak B, Mineishi S, Tarassoff P, Satterlee W, Raber MN: A phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study of gemcitabine. J Clin Oncol 9: S. 491-498, 1991.
2. Allison AC, Eugui EM: Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. Transplantation 80: S. 181-190, 2005.
3. Beuvink I, Boulay A, Fumagalli S, Zilbermann F, Ruetz S, O'Reilly T, Natt F, Hall J, Lane HA, Thomas G: The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. Cell 120: S. 747-759, 2005.
4. Bhat TA, Singh RP: Tumor angiogenesis--a potential target in cancer chemoprevention. Food Chem Toxicol 46: S. 1334-1345, 2008.
5. Bocci G, Fioravanti A, Orlandi P, Bernardini N, Collecchi P, Del Tacca M, Danesi R: Fluvastatin synergistically enhances the antiproliferative effect of gemcitabine in human pancreatic cancer MIAPaCa-2 cells. Br J Cancer 93: S. 319-330, 2005.
6. Boulay A, Zumstein-Mecker S, Stephan C, Beuvink I, Zilbermann F, Haller R, Tobler S, Heusser C, O'Reilly T, Stolz B, Marti A, Thomas G, Lane HA: Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. Cancer Res 64: S. 252-261, 2004.
7. Boulay A, Rudloff J, Ye J, Zumstein-Mecker S, O'Reilly T, Evans DB, Chen S, Lane HA: Dual inhibition of mTOR and estrogen receptor signaling in vitro induces cell death in models of breast cancer. Clin Cancer Res 11: S. 5319-5328, 2005.

8. Chan S: Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. Br J Cancer 91: S. 1420-1424, 2004.
9. Dancey JE: Therapeutic targets: MTOR and related pathways. Cancer Biol Ther 5: S. 1065-1073, 2006.
10. Eisenberg DP, Adusumilli PS, Hendershott KJ, Yu Z, Mullerad M, Chan MK, Chou TC, Fong Y: 5-fluorouracil and gemcitabine potentiate the efficacy of oncolytic herpes viral gene therapy in the treatment of pancreatic cancer. J Gastrointest Surg 9: S. 1068-1079, 2005.
11. Engl T, Makarevic J, Relja B, Natsheh I, Muller I, Beecken WD, Jonas D, Blaheta RA: Mycophenolate mofetil modulates adhesion receptors of the beta1 integrin family on tumor cells: impact on tumor recurrence and malignancy. BMC Cancer 5: S. 4, 2005.
12. Geissler EK, Schlitt HJ, Thomas G: mTOR, cancer and transplantation. Am J Transplant 8: S. 2212-2218, 2008.
13. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends., 6. überarbeitete Auflage, 2008
14. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK: Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat Med 8: S. 128-135, 2002.
15. Janus A, Robak T, Smolewski P: The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy. Cell Mol Biol Lett 10: S. 479-498, 2005.

16. Krempien R, Heinemann V, Münter M, Harms W, Debus J: Multimodale kurative/neoadjuvante Therapie beim Pankreaskarzinom. Onkologe 10: S. 1301-1310, 2004.
17. Lorber MI, Mulgaonkar S, Butt KM, Elkhammas E, Mendez R, Rajagopalan PR, Kahan B, Sollinger H, Li Y, Cretin N, Tedesco H: Everolimus versus mycophenolate mofetil in the prevention of rejection in de novo renal transplant recipients: a 3-year randomized, multicenter, phase III study. Transplantation 80: S. 244-252, 2005.
18. Lukashev AN, Fuerer C, Chen MJ, Searle P, Iggo R: Late expression of nitroreductase in an oncolytic adenovirus sensitizes colon cancer cells to the prodrug CB1954. Hum Gene Ther 16: S. 1473-1483, 2005.
19. Magaud JP, Sargent I, Mason DY: Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. J Immunol Methods 106: S. 95-100, 1988.
20. Motzer RJ, Hudes GR, Curti BD, McDermott DF, Escudier BJ, Negrier S, Duclos B, Moore L, O'Toole T, Boni JP, Dutcher JP: Phase I/II trial of temsirolimus combined with interferon alfa for advanced renal cell carcinoma. J Clin Oncol 25: S. 3958-3964, 2007.
21. Oudard S, Medioni J, Ayllon J, Barrascourt E, Elaidi RT, Balcaceres J, Scotte F: Everolimus (RAD001): an mTOR inhibitor for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. Expert Rev Anticancer Ther 9: S. 705-717, 2009.
22. Pacey S, Rea D, Steven N, Brock C, Knowlton N, Shand N, Hazell K, Zoellner U, O'Donnell A, Judson I: Results of a phase 1 clinical trial investigating a combination of the oral mTOR-inhibitor Everolimus (E, RAD001) and Gemcitabine (GEM) in patients (pts) with advanced cancers. J Clin Oncol (Meeting Abstracts) 22: S. 3120, 2004.

23. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles FJ: Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. Cancer 100: S. 657-666, 2004.
24. Ponticelli C: Clinical experience with everolimus (Certican): a summary. Transplantation 79: S. S93-94, 2005.
25. Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S: Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. J Immunol Methods 82: S. 169-179, 1985.
26. Prox D, Becker C, Pirie-Shepherd SR, Celik I, Folkman J, Kisker O: Treatment of human pancreatic cancer in mice with angiogenic inhibitors. World J Surg 27: S. 405-411, 2003.
27. Punt CJ, Boni J, Brunsch U, Peters M, Thielert C: Phase I and pharmacokinetic study of CCI-779, a novel cytostatic cell-cycle inhibitor, in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced solid tumors. Ann Oncol 14: S. 931-937, 2003.
28. Rauchwerger DR, Firby PS, Hedley DW, Moore MJ: Equilibrative-sensitive nucleoside transporter and its role in gemcitabine sensitivity. Cancer Res 60: S. 6075-6079, 2000.
29. Reni M, Cordio S, Milandri C, Passoni P, Bonetto E, Oliani C, Luppi G, Nicoletti R, Galli L, Bordonaro R, Passardi A, Zerbi A, Balzano G, Aldrighetti L, Staudacher C, Villa E, Di Carlo V: Gemcitabine versus cisplatin, epirubicin, fluorouracil, and gemcitabine in advanced pancreatic cancer: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol 6: S. 369-376, 2005.
30. Seufferlein T, Adler G: The S3 guideline exocrine pancreatic cancer. Med Klin (Munich) 104: S. 869-874, 2009.

31. Shinohara ET, Cao C, Niermann K, Mu Y, Zeng F, Hallahan DE, Lu B: Enhanced radiation damage of tumor vasculature by mTOR inhibitors. Oncogene 24: S. 5414-5422, 2005.
32. Silva SL, Silva SF, Cavalcante RO, Mota RS, Carvalho RA, Moraes MO, Campos HH, Moraes ME: Mycophenolate mofetil attenuates Walker's tumor growth when used alone, but the effect is lost when associated with cyclosporine. Transplant Proc 36: S. 1004-1006, 2004.
33. Takebe N, Cheng X, Wu S, Bauer K, Goloubeva OG, Fenton RG, Heyman M, Rapoport AP, Badros A, Shaughnessy J, Ross D, Meisenberg B, Tricot G: Phase I clinical trial of the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil (cellcept) in advanced multiple myeloma patients. Clin Cancer Res 10: S. 8301-8308, 2004.
34. Thervet E, Anglicheau D, Legendre C: Pharmacology of mycophenolate mofetil: recent data and clinical consequences. Nephrologie 22: S. 331-337, 2001.
35. Tuncyurek P, Mayer JM, Klug F, Dillmann S, Henne-Bruns D, Keller F, Stracke S: Everolimus and mycophenolate mofetil sensitize human pancreatic cancer cells to gemcitabine in vitro: a novel adjunct to standard chemotherapy? Eur Surg Res 39: S. 380-387, 2007.
36. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E: mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. Ann Oncol 16: S. 525-537, 2005.
37. Vitko S, Margreiter R, Weimar W, Dantal J, Kuypers D, Winkler M, Oyen O, Viljoen HG, Filiptsev P, Sadek S, Li Y, Cretin N, Budde K: Three-year efficacy and safety results from a study of everolimus versus mycophenolate mofetil in de novo renal transplant patients. Am J Transplant 5: S. 2521-2530, 2005.

38. Yuan R, Kay A, Berg WJ, Lebwohl D: Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. J Hematol Oncol 2: S. 45, 2009.
39. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL: Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. Cancer Res 60: S. 1541-1545, 2000.
40. Zhong H, Hanrahan C, van der Poel H, Simons JW: Hypoxia-inducible factor 1alpha and 1beta proteins share common signaling pathways in human prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 284: S. 352-356, 2001.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Dissertationsarbeit eine große Hilfe waren.

Frau Prof. Dr. Henne-Bruns danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation in der Abteilung Chirurgie I zu verfassen.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Sylvia Stracke und Herrn PD Dr. Jens Mayer für die exzellente Betreuung dieser Arbeit. In unzähligen Gesprächen gaben sie mir immer wieder neue Denkanstöße und halfen mir somit bei der Anfertigung der Dissertationsarbeit. Sowohl fachlich als auch organisatorisch waren sie mir eine große Hilfe, so dass sie maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt sind.

Rosi Herzog möchte ich für die anhaltende Unterstützung bei der Bewältigung der zahlreichen kleinen und großen Problemen im Laboralltag, welche mit meiner Dissertation verbunden waren, danken.

Meiner Kommilitonin Stefanie Dillmann danke ich für die die große Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Meiner Freundin Nathalie möchte ich für die wertvolle Kritik bezüglich des Layouts und für die vielen ermutigenden Worte danken.

Zum Schluss gilt mein Dank meinen Eltern, die mich die ganzen Jahre des Studiums begleitet und unterstützt haben und ohne welche die Approbation und Dissertation nie möglich gewesen wäre.

8. Publikation

Everolimus and mycophenolate mofetil sensitize human pancreatic cancer cells to gemcitabine in vitro: a novel adjunct to standard chemotherapy?

Tuncyurek P, Mayer JM, Klug F, Dillmann S, Henne-Bruns D, Keller F, Stracke S
European Surgical Research 39: S. 380-387, 2007