

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Zentrum für Innere Medizin
I. Medizinische Klinik
Direktor Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

**Vergleich antiproliferativer Strategien bei
Gastroenteropankreatischen
Neuroendokrinen Karzinomen *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jutta Helle
aus Buchholz i.d.N.

Hamburg 2011

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.04.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. M. Bläker

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. K. Pantel

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. D. Benten

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Anglizismen	7
1 Einleitung	8
1.1 Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Tumore	8
1.1.1 Epidemiologie, Nomenklatur und Begriffsklärung.....	8
1.1.2 Klinische Präsentation.....	9
1.1.3 Behandlungsstrategien.....	11
1.2 Somatostatin-Analoga	11
1.2.1 Klinische Wirksamkeit von Octreotid in GEP-NET.....	12
1.3 Interferone	12
1.3.1 Signaltransduktion der Interferonrezeptoren	13
1.3.2 Klinische Wirksamkeit von IFN α in GEP-NET	13
1.4 Chemotherapeutika	13
1.4.1 Streptozotocin	14
1.4.2 5-Fluorouracil	14
1.4.3 Klinische Wirksamkeit der Chemotherapie in GEP-NET	15
1.5 Mögliche Angriffspunkte antineoplastischer Therapiestrategien.....	16
1.5.1 Beeinflussung mitogener Signalwege: Akt und ERK.....	16
1.5.2 Eingriff in den Zellzyklus.....	17
1.5.3 Induktion von Apoptose.....	18
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2 Material und Methoden	22
2.1 Materialien.....	22
2.1.1 Allgemeines.....	22
2.1.2 Plastikware.....	22
2.1.3 Geräte	22
2.1.4 Software	24
2.1.5 Reagenzien Zellkultur.....	24
2.1.6 Puffer und Reagenzien für Western-Blot-Analyse.....	24
2.1.7 Antikörper.....	27
2.1.8 Therapeutika	27
2.1.9 Zellen	28
2.2 Zellkultur.....	28
2.2.1 Passagieren und Ausplattieren der Zellen.....	28

2.2.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	29
2.3	Zellproliferations-Assay	29
2.4	Zellproliferations-Assay mittels [³ H]-Thymidin-Einbau	31
2.5	Western-Blot-Analyse.....	32
2.5.1	Proteinisolation aus Zellkultur	32
2.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	33
2.5.3	Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese.....	33
2.5.4	Auftrennung des Proteingemisches mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.5.5	Transfer auf Nitrozellulosemembran mittels Semi-Dry-Blot.....	34
2.5.6	Immunfärbung	35
2.5.7	Detektion und Filmentwicklung.....	36
2.5.8	Strippen der Nitrozellulosemembran	36
2.5.9	Densitometrische Auswertung.....	37
2.6	Apoptosenachweis mit der TUNEL-Methode.....	37
2.7	Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Proliferations-Assays.....	40
3.2	Proliferations-Assays mittels [³ H]-Thymidin-Uptake	43
3.3	Western-Blot-Analysen.....	44
3.3.1	Aktivierung von Akt.....	45
3.3.2	Aktivierung von ERK	46
3.3.3	STAT1-Aktivierung nach Interferon-Behandlung.....	47
3.3.4	Expression von Cyclin D1	48
3.3.5	Caspase 3-Spaltung.....	49
3.3.6	PARP-Spaltung	49
3.4	TUNEL-Methode	50
3.5	Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analysen.....	52
4	Diskussion	55
4.1	Rezeptorspezifische Wirkung der Somatostatin-Analoga und fehlende antiproliferative Wirksamkeit an BON-1	56
4.2	Typ 1 Interferone: Molekulare Wirksamkeit im Vergleich.....	57
4.3	STZ + 5-FU: Synergistische Wirksamkeit.....	60
4.4	Ausblick.....	63
5	Zusammenfassung.....	64
	Literaturverzeichnis	65
	Danksagung.....	72

Lebenslauf.....	73
Eidesstattliche Erklärung.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Der mitotische Zellzyklus (modifiziert nach Alberts 2004)	17
Abbildung 2.1:	Schematischer Aufbau eines Semi-Dry-Blots	35
Abbildung 3.1:	Hemmung der BON-1 Zellproliferation unter Bio- und Chemotherapie nach 4, 6 und 8 Tagen.....	41
Abbildung 3.2:	BON-1 nach 8 Tagen Inhibition.....	42
Abbildung 3.3:	Thymidin-Uptake in BON-1 Zellen nach 6 Tagen Behandlung.....	44
Abbildung 3.4:	pAkt in BON-1 nach 12h Inkubation.....	45
Abbildung 3.5:	pERK in BON-1 nach 12h Inkubation.....	46
Abbildung 3.6:	Kinetik der STAT1-Phosphorylierung in BON-1 nach 15 Minuten, 60 Minuten und 6 Stunden Interferon-Behandlung.....	47
Abbildung 3.7:	Expression von Cyclin D1 in BON-1 nach 24h Inkubation	48
Abbildung 3.8:	Fehlende Caspase-Spaltung in mit Bio- und Chemotherapeutika behandelten BON-1 Zellen	49
Abbildung 3.9:	Keine PARP-Spaltung in mit Bio- und Chemotherapeutika behandelten BON-1 Zellen.....	49
Abbildung 3.10:	Untersuchung auf DNA-Strangbrüche mittels TUNEL-Methode	51
Abbildung 3.11:	Zusammenfassende Darstellung der durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analysen an BON-1	53
Abbildung 3.12:	Keine signifikanten Änderungen in der Verteilung der Zellzyklus-Phasen nach 24 stündiger Behandlung der BON-1 Zellen	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Hypersekretionssyndrome Neuroendokriner Tumore (Jensen 1999, Plöckinger 2007).....	10
Tabelle 2.1:	Polyacrylamid-Gele (Pipettierschema für 2 Minigele).....	25
Tabelle 2.2:	Antikörper für Western-Blots	27
Tabelle 2.3:	Zweit-Antikörper für Western-Blots	27

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserum-Albumin
CAG	Chronisch aktive Gastritis
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CKI	CDK-Hemmer
CPM	Gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxy Uridintriphosphat
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	Fötale Kälberserum
h	Stunde
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IFN	Interferon
JAK	Januskinase
kD	Kilo Dalton
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
m	Milli
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MEN-1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
min	Minute
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier
n	Nano
ng	Nanogramm
NSE	Neuron-spezifische Enolase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCD	Programmierter Zelltod
PKB	Proteinkinase B
PDK	Pyruvat Dehydrogenase Kinase
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
STAT	Signalüberträger und Aktivator der Transkription
STZ	Streptozotocin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TdT	Terminale deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-vermittelte Nukleotid-Endanlagerung
U	Einheit
V	Volt
ZES	Zollinger-Ellison-Syndrom

Anglizismen

Counter	Zähler
Harvester	Zell-„Erntegerät“
Reader	Messgerät
Semi-dry	Halbtrocken
Uptake	Aufnahme/ Einbau

1 Einleitung

1.1 Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Tumore

1.1.1 Epidemiologie, Nomenklatur und Begriffsklärung

Neuroendokrine Tumore (NET) sind seltene und heterogene Neoplasien. Sie umfassen 0,49 % aller Malignome und treten mit einer alterskorrigierten Inzidenz von 1 bis 4 Fällen pro 100.000 Einwohner auf (Modlin et al. 2003). Neben dem bronchopulmonalen System sind sie vor allem in weiteren Derivaten des embryologischen Vorderdarms (Magen, Pankreas), sowie im restlichen Dünndarm und Rektum lokalisiert. Die NET des Verdauungstrakts werden unter dem Begriff der Gastroenteropankreatischen Neuroendokrinen Tumore (GEP-NET) zusammengefasst.

Phänotypisch gehören die Zellen der GEP-NET zum System der disseminierten neuroendokrinen Zellen, die Feyrter als „Helle Zellen“ bezeichnete und Pears später unter dem System der „APUD-Zellen“ zusammenfasste (Modlin et al. 2006). Diese Zellen finden sich verteilt über die Mukosa des gesamten Gastrointestinaltraktes und bilden im Pankreas die Langerhans'schen Inseln. Als neuroendokrines Differenzierungsmerkmal dient die Expression der Proteine Synaptophysin, Neuron-spezifische Enolase (NSE) und Chromogranin A, die sonst nur in Nervenzellen nachgewiesen werden.

Der auch heute noch weit verbreitete Begriff „Karzinoid“ wurde 1907 von Oberndorfer geprägt, um damit Karzinom-ähnliche, jedoch weniger aggressive, epitheliale Tumoren des Dünndarms zu beschreiben (Modlin et al. 2004). 1963 unterteilten Williams und Sandler die Karzinoide nach ihrem embryologischen Ursprung in Karzinoide des Vorderdarms (Respirationstrakt, Magen, Duodenum, Biliäres System und Pankreas), des Mitteldarms (restlicher Dünndarm, Appendix, Coecum und proximales Kolon) und des Hinterdarms (distales Kolon und Rektum) (Williams und Sandler 1963). Im Gegensatz dazu wird der Begriff „Karzinoid“ im klinischen Alltag weitläufig zur Beschreibung eines Serotonin-produzierenden Tumors mit dem typischen Karzinoid-Syndrom

benutzt. Nicht zuletzt um dieser Verwirrung Abhilfe zu schaffen, erneuerte die WHO die Klassifizierung Endokriner Tumoren im Jahr 2000 grundlegend (Solcia et al. 2000). Diese bis heute gültige Version unterscheidet neben der Tumorlokalisation auch zwischen hochdifferenzierten Neuroendokrinen Tumoren, hochdifferenzierten Neuroendokrinen Karzinomen und niedrig differenzierten Neuroendokrinen Karzinomen. Um einer prognostisch relevanten Klassifizierung gerecht zu werden, wurden außerdem die Tumorgröße, Angioinvasion, proliferative Aktivität, histologische Differenzierung, Metastasierung und Invasion angrenzender Organe mit einbezogen.

1.1.2 Klinische Präsentation

Ein Großteil der Neuroendokrinen Tumore ist funktionell inaktiv, das heißt sie verursachen keine hormonabhängige Symptomatik. Sie präsentieren sich mit einer unspezifischen Symptomatik und werden klinisch oft erst spät durch lokale Tumorausbreitung oder meist hepatische Metastasen manifest (Modlin et al. 2005).

Als funktionell aktive Tumoren bezeichnet man solche GEP-NET, die durch die Produktion und Sekretion relevanter Mengen biogener Amine oder Peptide ein Hypersekretionssyndrom verursachen. Im Folgenden sind diese verschiedenen Syndrome, ihre klinische Manifestation und die zugehörigen Primärlokalisationen zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Hypersekretionssyndrome Neuroendokriner Tumore (Jensen 1999, Plöckinger 2007)

Syndrom	Biologisch aktives Peptid/ Amin	Klinische Symptomatik	Primärlokalisierung des Tumors
Karzinoidsyndrom	Serotonin	Flush Sekretorische Diarrhoe Bronchokonstriktion Endokardfibrose (rechtslastig)	Terminales Ileum (90%) Bronchialtrakt (5%) Pankreas (selten)
Zollinger-Ellison-Syndrom	Gastrin	Rezidivierende peptische Ulzera Sekretorische Diarrhoe Maldigestion	Duodenum (70%) Pankreas (25%) Andere (5%)
Insulinom	Insulin	(Nüchtern-) Hypoglykämien	Pankreas
Glukagonom	Glukagon	Diabetes mellitus Nekrolytisch-migratorisches Erythem Anämie	Pankreas
VIPom/ Verner-Morrison-Syndrom	Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)	Massive Diarrhoe Hypokaliämie Achlorhydrie	Pankreas (90%) Andere (10%)
Somatostatinom	Somatostatin	Steatorrhoe Diarrhoe Cholelithiasis Diabetes mellitus	Pankreas (55%) Duodenum/ Jejunum (44%)
GRHom	Growth-Hormone Releasing Hormone (GRH)	Akromegalie Gestörte Glukose-toleranz	Pankreas (30%) Bronchialtrakt (54%) Jejunum (7%) Andere (13%)
ACTHom	Adrenokortikotropes Hormon (ACTH)	Cushing-Syndrom	Bronchialtrakt Pankreas (selten)

Ein geringer Anteil neuroendokriner Tumore tritt hereditär im Rahmen autosomal dominanter Erbleiden auf. Hierzu zählen die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN-1), das Von-Hippel-Lindau-Syndrom und die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) (Modlin et al. 2005).

1.1.3 Behandlungsstrategien

Die operative Therapie der GEP-NET stellt die primäre und bislang einzig potentiell kurative Option dar. Neben der lokalen Tumorexzision mit primär kurativer Absicht empfehlen viele Autoren auch eine ausgedehnte Metastasen-Chirurgie der Leber. Weitere interventionelle Strategien bei metastasierten GEP-NET sind die (Chemo-) Embolisation der Leberarterie oder in ausgewählten Einzelfällen eine Lebertransplantation (Ahlman et al. 2000).

Noch in der Phase der Evaluation und Weiterentwicklung befindet sich die Peptid-vermittelte Radiorezeptor Therapie (PRRT). Ihre Wirkung beruht auf der Expression von Somatostatinrezeptoren, vor allem des Subtyps 2 (SSTR2), auf der Zellmembran der neuroendokrinen Tumorzellen (Reubi 2003).

In der medikamentösen Therapie metastasierter GEP-NET kommen Somatostatin-Analoga, Interferone und Chemotherapeutika klinisch zum Einsatz.

Der Vergleich medikamentöser Strategien ist Gegenstand dieser Doktorarbeit.

1.2 Somatostatin-Analoga

Somatostatin ist ein nahezu ubiquitär vorkommendes Peptidhormon mit vielfältigen, zumeist inhibitorischen Einflüssen auf verschiedene Zielgewebe. Es hemmt die sekretorischen Funktionen diverser exokriner und endokriner Drüsen, vermindert die Darmmotilität sowie die Absorption von Nährstoffen und hat einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation. Die inhibitorischen Effekte von Somatostatin werden über fünf Rezeptorsubtypen vermittelt (SSTR1-5). Sie alle gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten 7-Transmembran Rezeptoren (Ferjoux et al. 2000). Die synthetisch hergestellten Somatostatin-Analoga (SSA) Octreotid und Lanreotid binden SSTR2 und SSTR5 mit hoher sowie SSTR3 mit mittlerer Affinität (Patel und Srikant 1994). In GEP-NET konnten bislang alle Rezeptorsubtypen mit unterschiedlichen Expressionsmustern identifiziert werden. In über 80% der Tumoren fand sich dabei eine Prädominanz des SSTR2 (Papotti et al. 2002). Ob das heterogene Expressionsmuster der SSTR auf verschiedenen GEP-NET einen Rückschluss auf die durchaus unterschiedlich ausfallenden Ergebnisse der therapeutischen Effizienz von Somatostatin-Analoga zulässt, ist unklar.

1.2.1 Klinische Wirksamkeit von Octreotid in GEP-NET

Octreotid und andere langwirksame Somatostatin-Analoga sind zurzeit Mittel der ersten Wahl zur Behandlung hormoneller Syndrome, und zwar vor allem des Karzinoidsyndroms und des Verner-Morrison-Syndroms (Arnold et al. 2000). Eine große Metaanalyse zur Therapie mit Somatostatin-Analoga an Patienten mit NET beschreibt eine Linderung der Symptome in 92 % der Fälle (Gorden et al. 1989).

Der antiproliferative Effekt einer Therapie mit Octreotid ist jedoch geringer ausgeprägt als die symptomatische Wirksamkeit. In älteren Untersuchungen, in denen das spontane Tumorwachstum vor Studienbeginn nicht bewertet wurde, finden sich bei 50 bis 85 % eine Stabilisierung der Erkrankung (kein radiologisch nachweisbares Tumorwachstum) und nur bei 0 bis 9 % eine partielle Tumorremission (Gorden et al. 1989, Oberg et al. 1991, Saltz et al. 1993). Legt man jedoch, wie es in neueren Bewertungen üblich ist, nur Studien zugrunde, die ausschließlich Patienten mit dokumentiertem Progress der Tumorerkrankung untersuchten, so findet sich nur noch in 37 bis 50 % eine Stabilisierung des Tumorwachstums, sowie in 0 bis 3 % der Fälle eine partielle Tumorremission (Arnold et al. 1993, Arnold et al. 1996, di Bartolomeo et al. 1996). Eine Interimsanalyse der PROMID-Studie, die derzeit aktuellste und einzig doppelblinde klinische Studie zur antiproliferativen Wirksamkeit von Octreotid bei Patienten mit hochdifferenzierten metastatischen NET des Mitteldarms, zeigte eine Stabilisierung der Erkrankung bei 66,7 % nach 6 Monaten versus 37,2 % unter Placebo. Zudem zeigte sich in dieser Studie, dass die Behandlung mit Octreotid das progressionsfreie Überleben signifikant ($p < 0,001$) von 6 Monaten unter Placebo auf median 14,3 Monate verlängerte (Rinke et al. 2009).

1.3 Interferone

Interferone (IFN) sind Zytokine mit antiviralen, anti-angiogenetischen, zellwachstums-hemmenden und immunregulatorischen Eigenschaften (Billiau 2006). Zu den Typ 1 Interferonen zählen Interferon α , welches primär von Leukozyten gebildet wird, und das von Fibroblasten produzierte Interferon β (Friedman 2008). Beide können seit den achtziger Jahren rekombinant

hergestellt werden. IFN α wird seitdem erfolgreich in der antiviralen Therapie der Hepatitis B und C eingesetzt, findet aber auch Einsatz in der Therapie verschiedener Malignome, unter anderem der Haarzell-Leukämie, des Kaposi-Sarkoms und auch der Neuroendokrinen Tumore. IFN β wird vor allem in der Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt (Friedman 2008), erwies sich in einer präklinischen Studie jedoch als erfolgsversprechend wirksam in der Therapie von GEP-NET (Vitale et al. 2006).

1.3.1 Signaltransduktion der Interferonrezeptoren

Interferonrezeptoren sind Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen. Durch Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten und in der Folge zu einer schnellen Autophosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Janus Tyrosin Kinasen (JAK) 1 und 2. Diese aktivieren wiederum durch Phosphorylierung die zytosolischen Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2 („signal transducer and activator of transcription“), welche daraufhin mit einem 48 kD großem Protein zum sogenannten „interferon-stimulated gene factor 3“ (ISGF3) assoziieren. ISGF3 wandert in den Kern und verändert dort die Genexpression verschiedener Proteine (Darnell et al. 1994).

1.3.2 Klinische Wirksamkeit von IFN α in GEP-NET

Klinische Studien zur antiproliferativen Wirksamkeit von Interferonen bei GEP-NET existieren bislang nur für IFN α . Ebenso wie Octreotid, ist das symptomatische Ansprechen auf eine IFN-Therapie gut, es liegt bei etwa 80 % (Modlin et al. 2008). Die veröffentlichten, nicht Placebo-kontrollierten klinischen Studien weisen im Median eine Stabilisierung des Tumorleidens in 35 % der Fälle auf. Bei 0 bis 27 % der Patienten kommt es dabei zu einer (partiellen) Tumorregression (Oberg 2000).

1.4 Chemotherapeutika

Viele GEP-NET zeichnen sich durch ein langsames Wachstumsverhalten aus. Eine systemische Chemotherapie kommt deshalb oft erst bei fortgeschrittenem Tumorleiden nach Versagen der interventionellen sowie der unter 1.2 und 1.3 genannten biologischen Therapieansätze zum Einsatz. Es scheint sinnvoll, für

die Indikationsstellung sowohl nach Differenzierungsgrad als auch vor allem nach Lokalisation des Primärtumors zu unterscheiden. Die Ansprechraten auf Chemotherapie liegen für pankreatische NET weit über denen extrapancreatischer NET. Ferner hat sich bei anaplastischen Karzinomen ein eigenes Therapieschema aus Cisplatin und Etoposid als besonders wirksam erwiesen (Vilar et al. 2007). Für besser differenzierte GEP-NET kommt klassischerweise die Kombination aus 5-Fluorouracil (5-FU) und Streptozotocin (STZ) oder Doxorubicin (DOX) zum Einsatz. Eine vergleichsweise große klinische Studie mit 249 Patienten zeigte dabei einen signifikanten Überlebensvorteil unter dem 5-FU/STZ Schema gegenüber dem 5-FU/DOX Schema (medianes Überleben 24 versus 16 Monate, $p=0,0267$) (Sun et al. 2005). Doxorubicin wurde deshalb nicht in die Untersuchungen dieser Arbeit eingeschlossen.

1.4.1 Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) ist ein an Glukose gebundener Nitrosoharnstoff, der 1956 erstmals aus dem Bodenbakterium *Streptomyces acromogenes* isoliert wurde und vorerst Verwendung als antibiotisch wirksame Substanz fand (Vavra et al. 1959). Später stellte sich heraus, dass STZ über den Glukosetransporter GLUT2 selektiv in die β -Zellen der pankreatischen Langerhans'schen Inseln aufgenommen wird und in Versuchstieren diabetogen wirkt (Schnedl et al. 1994). In klinischen Versuchen erwies sich STZ als alkylierendes Zytostatikum wirksam in der Behandlung von Insulinomen des Pankreas. Neben der Diabetesforschung wird es heute hauptsächlich in der zytostatischen Therapie Neuroendokriner Tumore eingesetzt.

1.4.2 5-Fluorouracil

5-Fluorouracil (5-FU) wurde 1957 erstmals synthetisiert (Heidelberger et al. 1957). Es handelt sich um ein fluoriertes Pyrimidin, das aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zu natürlichen Nukleotiden als Antimetabolit sowohl in die RNA als auch in die DNA eingebaut wird und somit zytotoxisch wirkt. Darüber hinaus hemmt es die DNA-Synthese als kompetitiver Hemmer der Thymidylatsynthase, welche die De-novo-Synthese von deoxy-

Thymidinmonophosphat (dTMP) aus deoxy-Uridinmonophosphat (dUMP) und Methylen-Tetrahydrofolsäure katalysiert.

Klinisch wird es heute neben der zytostatischen Therapie Neuroendokriner Tumore in multiplen Chemotherapie-Regimen eingesetzt, so zum Beispiel in der Therapie kolorektaler und pankreatischer Malignome, sowie beim Mamma-Karzinom.

1.4.3 Klinische Wirksamkeit der Chemotherapie in GEP-NET

Pankreatische NET sprechen insgesamt gut auf eine Chemotherapie an. Für die Monotherapie mit STZ werden Ansprechraten nach uneinheitlichen Kriterien zwischen 36 und 50 % angegeben (Broder und Carter 1973, Moertel et al. 1980). Auf die Kombination aus STZ und 5-FU sprechen zwischen 45 und 63 % der pankreatischen Tumore an (Moertel et al. 1980, Moertel et al. 1992).

NET des restlichen Gastrointestinaltraktes zeigen sich insgesamt weniger chemosensibel. Oberg und Kollegen konnten für die Monotherapie mit STZ ein nur dreiprozentiges Ansprechen feststellen (Oberg et al. 1987). Das Ansprechen auf die STZ/5-FU Kombination liegt zwischen 6 und 33 % (Engstrom et al. 1984, Oberg et al. 1987, Sun et al. 2005). In Anbetracht dieser großen Varianz sei auf die äußerst uneinheitlichen Studienbedingungen hingewiesen. Viele der veröffentlichten Studien differenzierten nicht zwischen verschiedenen Tumorentitäten und benutzten statt der WHO-Kriterien (Produkt der zwei größten Diameter des Haupttumors) oder der RECIST-Leitlinien („Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“, Summe der längsten Durchmesser aller messbaren Läsionen) nicht-standardisierte Erfolgskriterien. Eine aktuelle Studie über die Wirksamkeit der STZ/5-FU Kombination von Sun und Kollegen, welche nach standardisierten Phase-III-Bedingungen an über 200 Patienten durchgeführt wurde, ergab eine Ansprechrate von 16 % (Sun et al. 2005).

1.5 Mögliche Angriffspunkte antineoplastischer Therapiestrategien

1.5.1 Beeinflussung mitogener Signalwege: Akt und ERK

Die Serin/Threonin Kinase Akt, auch bekannt als Proteinkinase B, ist ein zentraler Mediator in der Signaltransduktion diverser Wachstumsfaktoren, Zytokine und anderer überlebens- und wachstumsfördernder Stimuli. Nach Bindung eines dieser Liganden an seinen Rezeptor wird eine Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert, was über mehrere Adapterproteine zu einer vermehrten Aktivität der 3-Phosphosinositid-(PI₃)-Kinase führt. Durch Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) wird Akt zur Plasmamembran rekrutiert. Daraufhin erfolgt die Aktivierung zum Phospho-Akt (pAkt) durch die beiden Pyruvat Dehydrogenase Kinasen PDK1 und PDK2. Die von Akt in ihrer Funktion modulierten Substrate sind Regulatoren des Zellüberlebens, des Zellwachstums und der Zellzykluskontrolle (Fresno Vara et al. 2004). In den vergangenen Jahren fanden sich in diversen Tumorentitäten Fehlregulationen und eine dauerhafte Aktivierung des PIP3/Akt-Signalweges. Die Inhibition dieses Signalweges stellt somit eine Möglichkeit zur antiproliferativen Therapie dar.

ERK1/2 (Extrazellulär Regulierte Kinase, ihrer Größe nach auch p44/42 genannt) gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK). In ihrer aktiven, phosphorylierten Form (pERK) überträgt sie extrazelluläre, proliferationsfördernde Stimuli von Mitogenen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf die Transkriptionsebene. Ein solcher Stimulus der Zelle wird in endokrinen Zellen über das G-Protein Rap1 an eine sequentielle Kinase-Kaskade weitergetragen. Diese Kaskade beginnt mit den Raf Kinasen B-Raf und Raf-1 (MAP Kinase Kinase Kinasen), gefolgt von MEK1 und MEK2 (MAP Kinase Kinasen). Diese phosphorylieren die MAPK ERK. pERK transloziert daraufhin in den Zellkern und phosphoryliert diverse Substrate, unter ihnen Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren und Proteine des Zytoskeletts (Karhoff et al. 2007, Roux und Blenis 2004). Wegen seiner Schlüsselrolle in der Regulation von Zellproliferation und Zellüberleben geriet der ERK1/2-Signalweg in den vergangenen Jahren zunehmend ins Interesse der Krebstherapie (Kohno und Pouyssegur 2003).

1.5.2 Eingriff in den Zellzyklus

Eine Zelle vermehrt sich durch eine geordnete Kette von Ereignissen, während derer sie zunächst ihren Inhalt verdoppelt und sich dann zweiteilt. Dieser Zyklus aus Verdoppelung und Teilung wird Zellzyklus genannt. Er gliedert sich in verschiedene Phasen, die sich vor allem in ihrem unterschiedlichen DNA-Gehalt unterscheiden. Nach der mitotischen Zellteilung, die aus Pro-, Meta-, Ana- und Telophase besteht, treten die Zellen in die G₀- oder G₁-Phase ein. G steht für das englische Wort „gap“ (Lücke) und kennzeichnet die Phasen zwischen Synthese und Teilung. Sowohl in der G₁-Wachstums-Phase als auch in der G₀-Ruhe-Phase weisen eukaryote Zellen einen diploiden Chromosomensatz (2n) auf. In der darauf folgenden S-Phase, der Synthesephase, liegt der DNA-Gehalt zwischen 2n und 4n, bis in der G₂-Phase ein tetraploider Chromosomensatz (4n) erreicht ist. In der dann folgenden Mitose verteilt sich der Chromosomensatz auf zwei Tochterzellen (Alberts 2004). Abbildung 1.1 zeigt den schematischen Ablauf des mitotischen Zellzyklus.

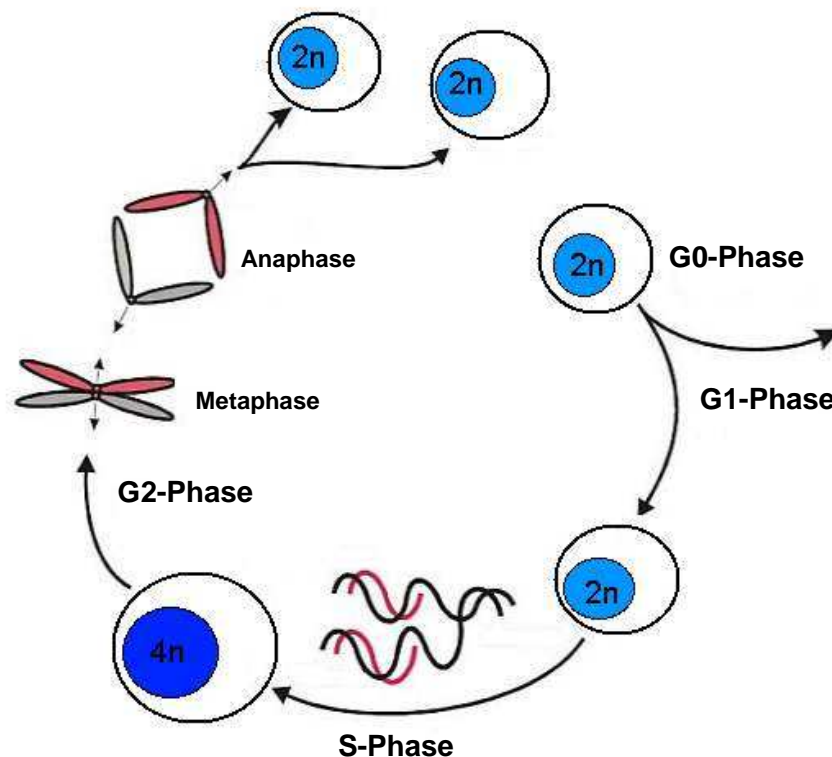


Abbildung 1.1: Der mitotische Zellzyklus (modifiziert nach Alberts 2004)

Dauer und Abfolge der Phasen werden an den zwischengeschalteten Kontrollpunkten überwacht. An diesen besteht, zum Beispiel im Falle eines Zelldefektes, die Möglichkeit einer Zellzyklusunterbrechung oder auch der Apoptose, des eingeleiteten programmierten Zelltodes. Reguliert werden diese Kontrollpunkte durch sogenannte Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und ihre zugehörigen Cykline. Die Komplexbildung aus CDK und Cyklinen wird wiederum durch Wachstumsfaktoren und Protoonkogene gesteuert. Tumorzellen weisen häufig defekte Kontrollpunkte auf und neigen so zur unkontrollierten Proliferation.

Einer der Hauptregulatoren am Kontrollpunkt zwischen G1- und Synthesephase des menschlichen Zellzyklus ist Cyclin D1, ein 36kDa großes nukleäres Protein. Als essentieller Cofaktor der CDK4 und CDK6 ermöglicht Cyclin D1 die Progression zur S-Phase. Im Komplex mit Cyclin D1 phosphorylieren und inaktivieren CDK4 und CDK6 das Retinoblastom (Rb) Tumorsuppressor Protein. Durch diese Inaktivierung kommt es zur Freisetzung des E2F Transkriptionsfaktors und die Synthesephase setzt ein (Chung 2004, Fu et al. 2004). Seit seiner Entdeckung als Onkogen in einem Adenom der Nebenschilddrüse (Motokura et al. 1991) konnte in einer Anzahl verschiedener Tumoren eine erhöhte Expression von Cyclin D1 nachgewiesen werden, unter ihnen Mantelzell-Lymphome, Mamma- und Lungen- Karzinome sowie Gastrointestinale Tumore (Donnellan und Chetty 1998). Auch in neuroendokrinen Pankreastumoren konnte durch Chung und Kollegen eine erhöhte Expression nachgewiesen werden (Chung et al. 2000). Cyclin D1 stellt also ebenfalls einen potentiellen Angriffspunkt für die antiproliferative Therapie in GEP-NET dar.

1.5.3 Induktion von Apoptose

Um das physiologische Zellsterben vom toxischen, passiven Zelltod durch Hypoxämie oder andere Noxen (Nekrose) zu differenzieren, postulierten Lockshin und Williams 1965 den Begriff des Programmierten Zelltods (PCD). Die morphologischen und biochemischen Veränderungen der Zelle während des PCD werden unter dem Begriff der Apoptose zusammengefasst (Kerr et al. 1972). Die Apoptose ist Grundlage einer Reihe physiologischer Veränderungen, wie zum Beispiel der Trennung der Finger während der Embryogenese oder der

sexuellen Differenzierung (Scovassi und Poirier 1999). Die medikamentöse Induktion von Apoptose stellt einen effektiven Mechanismus in der Krebstherapie dar.

Essentielle Faktoren der Apoptose sind proteolytische Enzyme, sogenannte Caspasen (Cystein-Aspartat-Proteasen). Sie werden als inaktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert und können durch proteolytische Prozessierung aktiviert werden. Die Effektor-Caspase 3, auch bekannt als CPP32, Apopain oder Yama (Todesgott der Hindus), ist eine 32kDa große Cystein Protease. Im Rahmen der Apoptose wird Caspase 3 sowohl durch die Initiator-Caspasen des intrinsischen (mitochondriale Signalkaskade) als auch des extrinsischen (Todesrezeptor-Signalkaskade) Signalweges in seine aktiven Einheiten (12kDa und 17kDa) gespalten (Cohen 1997, Kumar 1997). Die Identifizierung von Spaltprodukten der Caspase 3 dient somit dem methodischen Nachweise von Apoptose.

Analog dient die Identifizierung von Spaltprodukten der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) dem Apoptosenachweis. PARP ist ein 116kDa großes, hochkonserviertes Reparaturenzym das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet, die durch die Einwirkung von Nukleasen bei beginnender Apoptose entstehen. Infolge der DNA-Schädigung knüpft aktiviertes PARP unter Verbrauch von ATP und NAD^+ an nukleäre Proteine und interagiert mit der DNA-Polymerase. PARP wird durch die Caspasen 3 und 7 in zwei Fragmente von 89kDa (katalytisches Fragment) und 24kDa (DNA-Bindungsfragment) gespalten und somit inaktiviert. Da diese proteolytische Spaltung von PARP nur beim apoptotischen Zelltod auftritt, kann man durch die Identifizierung seiner Spaltprodukte eindeutig von Nekrose unterscheiden (Scovassi und Poirier 1999).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

GEP-NET sind eine Gruppe heterogener Neoplasien, die sich mit einer großen Varianz in ihrem biologischem Verhalten und klinischen Verlauf präsentieren. Angesichts der Seltenheit dieser Erkrankung gibt es nur wenige klinische Studien, die Kriterien für den Erfolg eines Behandlungsansatzes sind oft unklar definiert und es fehlen kontrollierte Daten.

In der medikamentösen Therapie kommen Somatostatin-Analoga, IFN α , sowie die Chemotherapeutika Streptozotocin und 5-FU klinisch zum Einsatz. Erfolgsversprechend präsentiert sich darüber hinaus der Einsatz von IFN β . Die antiproliferative Effizienz der einzelnen Substanzen ist jedoch zum Teil umstritten. Unklar ist außerdem, welche der genannten medikamentösen Optionen den anderen überlegen ist.

Als Modellsystem für die Erforschung von GEP-NET ist insbesondere die Zelllinie BON-1 etabliert (Evers et al. 1991). Sie wurde aus dem Operationspräparat eines peripankreatischen Lymphknotens generiert und ist seit 1986 in kontinuierlicher Kultur. Der Lymphknoten wurde einem 28-jährigen Patienten mit metastasiertem NET des Pankreas entnommen. Der Patient stellte sich mit Ikterus und Diarrhoe vor und hatte sich vor der explorativen Laparatomie noch keiner Therapie unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass die BON-1 Zellen sowohl Somatostatinrezeptoren (Evers et al. 1991), als auch Interferonrezeptoren (Detjen et al. 2000) exprimieren. Diese Tumorzelllinie eignet sich somit gut zum experimentellen Therapievergleich oben genannter Biotherapeutika.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten daher die antiproliferativen Effekte und zellulären Mechanismen von Somatostatin-Analoga, den Interferonen α und β , sowie der beiden in der Klinik etablierten Chemotherapeutika Streptozotocin und 5-FU *in vitro* an der humanen pankreatischen NET Zelllinie BON-1 untersucht und miteinander verglichen werden.

Mittels verschiedener Proliferations-Assays sollte zunächst der Effekt oben genannter Therapeutika auf die Zellteilung und das Zellwachstum der BON-1 Zellen untersucht werden. Die den Effekten auf die Zellproliferation zugrunde liegende Beeinflussung zellulärer Proteine sollte mithilfe von Western-Blot-Analysen untersucht werden. Hierzu sollte die Aktivität der mitogenen Signalwege Akt und ERK mittels phospho-spezifischer Antikörper, sowie das G1-spezifische Zellzykluskontrollprotein Cyclin D1 untersucht werden. Dem Vergleich der Wirkung von IFN α und β sollte die Untersuchung der STAT-Aktivierung dienen. Außerdem sollte eine Untersuchung auf medikamentös-induzierte Apoptose der Tumorzellen mittels Nachweis von PARP- und Caspase 3- Spaltprodukten, sowie Darstellung von DNA-Strangbrüchen mit

Hilfe der TUNEL-Methode, erfolgen. Schließlich sollten mittels Durchflusszytometrie die durch die Therapeutika verursachten Veränderungen auf den Zellzyklus untersucht werden.

Um das basale Wachstum der Tumorzellen mit einzubeziehen, sollten alle Untersuchungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen erfolgen. Ziel war das Herausarbeiten einer Rangordnung der verschiedenen medikamentösen Therapiestrategien in Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, therapeutische Strategien für den klinischen Einsatz bei GEP-NET zu optimieren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemeines

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien entsprachen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden von folgenden Lieferanten bezogen: JT Baker (Deventer, Holland), Gibco Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Riedel und Boehringer Mannheim (Mannheim).

Plastikwaren lieferten die Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhausen) und Sarstedt (Nürnbrecht). Die Gerätehersteller, sowie die Lieferanten der Therapeutika und Antikörper werden unten aufgeführt.

2.1.2 Plastikware

Gewebekulturflaschen (75 cm²/ 175 cm² Kulturfläche)

Gewebekulturplatten:

6-Loch-Platten (9,5 cm² Kulturfläche)

24-Loch-Platten (2,0 cm² Kulturfläche)

96-Loch-Platten (0,35 cm² Kulturfläche)

Pipettenspitzen (10 µl/ 200 µl/ 1000 µl)

Eppendorf-Reagiergefäße (2,0 ml/ 1,5 ml/ 0,5 ml)

Röhren (13 ml/ 50 ml)

2.1.3 Geräte

Absauggerät Servox Medizintechnik GmbH, Köln

Brutschrank Heraeus Instruments, Osterode

Digitalkamera (DP 500) Olympus, Hamburg

Zentrifugen:

Biofuge 13	Heraeus Instruments, Osterode
Minifuge RF	Heraeus Instruments, Osterode
SIGMA 3K30	B. Braun Biotech, Melsungen

2.1.4 Software

Adobe Photoshop

Cylchred (Terry Hoy, Cardiff University, Cardiff, Großbritannien)

Microsoft Excel, Microsoft Word

NIH Image J

WinMDI (Joe Trotter, Scripps Institute La Jolla, Kalifornien, USA)

2.1.5 Reagenzien Zellkultur

Die Reagenzien für die Zellkultur wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Dulbecco's PBS

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F12

Fötale Kälberserum (FCS)

GIBCO™ Penicillin-Streptomycin-Liquid

0,5 % Trypsin-EDTA

0,4 % Trypan-Blue Solution (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

2.1.6 Puffer und Reagenzien für Western-Blot-Analyse

Probenaufbereitung:

Lysispuffer: 1000 ml Stock: 11,91 g HEPES; 8,77 g NaCl ad 900 ml Aqua dest.; 10 ml Triton X-100; 2,1 g Na-Fluorid, 4 ml EDTA 0,5 M, 100 ml Glycerol; pH 7,4

Ad 5 ml Stock frisch dazu: 50 µl PMSF 100 mM;
50 µl Benzamidine 1 M; 50 µl Orthovanadat 200 mM;
5 µl Aproptinin (1,5 mg/ml); 5 µl Leupeptin (1 mg/ml)

Lämmli-Probenpuffer (5x): 1,5 g Tris-Base; 5,0 g SDS, 250 mg Bromphenolblau; 25 ml Glycerol; 3,86 g DTT ad 50 ml Aqua dest.

Tabelle 2.1: Polyacrylamid-Gele (Pipettierschema für 2 Minigele)

	Sammelgel 4%	Trenngel 12%	Trenngel 16%
40 % Acrylamid	0,5 ml	4,5 ml	6 ml
Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)		3,75 ml	3,75 ml
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8)	1,25 ml		
Aqua dest.	3,2 ml	6,44 ml	4,94 ml
10 % SDS	50 µl	150 µl	150 µl
10 % APS	50 µl	150 µl	150 µl
Temed	10 µl	7,5 µl	7,5 µl

Elektrophorese und Transfer:

Blotpuffer (10x): 144 g Glycin; 30,3 g Tris-Base ad 1000 ml Aqua dest.

Blotpuffer (1x): 100 ml 10x Blotpuffer; 200 ml Methanol; 700 ml Aqua dest.

Laufpuffer (10x): 20 g SDS; 288 g Glycin; 60,6 g Tris-Base ad 2000 ml Aqua dest.

Proteinmarker: SeeBlue® Plus2 Standard, Invitrogen

Nitrozellulose-Membran: Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

Antikörperinkubation und Chemilumineszenz:

Antikörper-Grundlösung: 1x TBS; 0,05 % Tween 20; 5 % BSA oder 5 % Trockenmilchpulver (vgl. Tabelle 2.2)

Blocklösung: 1x TBS; 0,05 % Tween 20; 5 % Trockenmilchpulver

TBS (10x): 24,22 g Tris-Base; 175,32 g NaCl ad 2000 ml Aqua dest.; ca. 14,5 ml 13 M HCl für Ziel-pH = 7,6

TBS/T: 100 ml 10x TBS; 900 ml Aqua dest.; 500 µl Tween 20

ECL-Reagenz: Roti®-Lumin 1 und 2 (Roth, Karlsruhe)

Röntgenfilme: Amersham Bioscience (Buckinghamshire, England)

Entfernung der Antikörper:

Stripping-Puffer: 3,5 ml 100 mM Mercaptoethanol; 10 g SDS; 63 ml 0,5 M Tris pH 6,7; 433,5 ml Aqua dest.

2.1.7 Antikörper

Unten aufgeführte Antikörper (AK) wurden von den Firmen Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts (USA), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien (USA) und Dako, Glostrup (Dänemark) bezogen.

Tabelle 2.2: Antikörper für Western-Blots

Antikörper	Wirt	Verdünnung	AK-Lösung	Hersteller
Anti- Actin (I-19)	Ziege	1:1000	Milch	Santa Cruz
Anti- pAkt (Ser473)	Kaninchen	1:1000	BSA	Cell Signaling
Anti- Cyclin D1 (M20)	Kaninchen	1:1000	Milch	Santa Cruz
Anti- pERK (E4)	Maus	1:1000	Milch	Santa Cruz
Anti- PARP	Kaninchen	1:1000	Milch	Cell Signaling
Anti- pSTAT1 (Tyr701)	Kaninchen	1:1000	BSA	Cell Signaling

Tabelle 2.3: Zweit-Antikörper für Western-Blots

Zweit-Antikörper	Wirt	Verdünnung	AK-Lösung	Hersteller
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:2000	Milch	Cell Signaling
Anti-Maus-HRP	Pferd	1:2000	Milch	Cell Signaling
Anti-Ziege-HRP	Kaninchen	1:2000	Milch	Dako

2.1.8 Therapeutika

5-Fluorouracil min. 98 % HPLC (Sigma Aldrich, Deisenhofen)

Interferon α 2a Roferon®- A (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen)

Interferon β 1a	Rebif® (Serono Inc., Rockland, Massachusetts, USA)
Octreotidacetat	Sandostatin® (Novartis, Nürnberg)
Streptozotocin	min. 98 % HPLC (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

2.1.9 Zellen

Die Tumorzelllinie BON-1 wurde uns freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. med. R. Göke (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

2.2 Zellkultur

Die Kultivierung der BON-1 Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in DMEM/ F12-Medium unter Zugabe von 10 % FCS und jeweils 1 % Penicillin + Streptomycin in 175 cm² großen Kulturflaschen kultiviert. Alle in der Zellkultur verwendeten Substanzen wurden, mit Ausnahme der Therapeutika, zunächst auf eine Temperatur von etwa 37 °C erwärmt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage.

2.2.1 Passagieren und Ausplattieren der Zellen

Für den Beginn der Experimente wurde jeweils eine Zellkonfluenz von 70-80 % angestrebt. In dieser Konfluenz befinden sich Tumorzellen in ihrer logarithmischen Wachstumsphase und weisen folglich eine hohe Stoffwechselaktivität auf. Die Beurteilung der Konfluenz erfolgte phasenkontrastmikroskopisch.

Um die Zellen zu passagieren, wurde unter einer Sterilbank zunächst das Medium abgesaugt. Durch Zugabe und anschließendes Absaugen von 10 ml PBS wurden danach nicht vitale und nicht angewachsene Zellen aus dem Zellrasen heraus gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen für 5 Minuten bei 37 °C mit 5 ml Trypsin inkubiert. Um die potentiell toxische Wirkung des Trypsins zu limitieren, erfolgte danach eine Neutralisierung mit 5 ml FCS-haltigem DMEM-Medium. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine sterile 13 ml-Röhre überführt und für 5 min mit 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und des Zellpellet mit 5 bis 10 ml Medium resuspendiert.

Es folgte eine Zellauszählung der Zellsuspension wie in Kapitel 2.3 beschrieben. In die neue Kulturflasche wurden etwa 1×10^6 Zellen zu 25 ml Medium pipettiert.

Zum Ausplattieren der Zellen auf 6- bis 96-Loch-Platten, wurden die Zellen ausgezählt und anschließend in der gewünschten Konzentration mit Kulturmedium in einem Röhrchen angesetzt. Diese Zellsuspension wurde dann auf die Löcher verteilt.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zur längeren Lagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurde ein Zellpellet von ca. 1×10^6 Zellen mit 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO, 90 % FCS) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann über Nacht in einem Styroporblock auf $-80\text{ }^\circ\text{C}$ heruntergekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad angetaut und dann zügig in 10 ml Zellkulturmedium gegeben. Nach Abzentrifugation (5 Minuten bei 1000 rpm) konnte das Pellet in frischem Kulturmedium gelöst werden und in einer Kulturflasche anwachsen.

2.3 Zellproliferations-Assay

Ziel dieses Versuches war der direkte Proliferationsnachweis der Tumorzelllinie unter Einwirkung der Therapeutika mittels Zellzählung. Hierbei fand stets ein direkter Vergleich der behandelten Zellen mit einer unbehandelten Kontrolle statt (basales Wachstum). Eine Auszählung erfolgte zunächst an den Tagen 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9, wobei im Verlauf der Experimente aufgrund kaum erkennbarer Veränderungen auf den dritten Tag, sowie wegen einer zu hohen Zelldichte auf den neunten Tag verzichtet wurde.

Zunächst wurden die Zellen wie oben beschrieben ausplattiert. Dies erfolgte auf 24-Loch-Platten mit einer Zellkonzentration von 1×10^4 Zellen auf 1 ml Medium pro Loch. Sowohl für die unbehandelte Kontrolle, als auch für die

verschiedenen Behandlungsgruppen wurden zwei Löcher pro Zähltag angesetzt. Die Zählung erfolgte also stets in Doppelbestimmung.

Nach 24 Stunden konnte lichtmikroskopisch ein Anwachsen der Zellen am Boden bestätigt werden. Die Therapeutika wurden dann in unterschiedlichen Konzentrationen zum Medium pipettiert. In insgesamt neun unabhängigen Zählversuchen wurde die Proliferation der BON-1 Zellen unter folgenden Therapieansätzen beurteilt:

Kontrolle (Basales Wachstum)

Octreotid 0,1 μM

Interferon α 10 U/ml, 100 U/ml, 1000 U/ml

Interferon β 10 U/ml, 100 U/ml, 1000 U/ml

Streptozotocin 10 μM , 100 μM

5-FU 0,2 μM , 2 μM

Streptozotocin 100 μM + 5-FU 0,2 μM

Streptozotocin 100 μM + 5-FU 2 μM

Für jede Konzentration erfolgte hierbei eine Auszählung der mit ihr behandelten Zellen in mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Der Zeitpunkt der Zugabe der Therapeutika wurde als Tag Null bezeichnet. Am dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel (Absaugen des Mediums aus allen Löchern, erneute Zugabe von 1 ml Medium inkl. Therapeutikum pro Loch). An Tag 3, später 4, wurde mit der Auszählung der Zellen begonnen.

Zur Quantifizierung der als einschichtigen Zellrasen wachsenden Tumorzellen, musste zunächst eine Zellsuspension hergestellt werden. Das Kulturmedium wurde aus jedem Loch abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS pro Loch gewaschen. Anschließend wurden pro Loch 100 μl Trypsin hinzugefügt und die Lochplatte für 5 Minuten bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Es folgte eine Neutralisierung mit 100 μl Medium, sowie eine gründliche Durchmischung der Zellsuspensionen in jedem Loch.

Von diesen 200 μl Suspension je Loch wurden nun jeweils 10 μl abgenommen und in einem Reagiergefäß mit 10 μl Trypanblau durchmischt. Trypanblau färbt nekrotische Zellen blau, wodurch eine Zählung dieser Zellen verhindert werden konnte. Schließlich wurden 10 μl dieser Lösung zwischen Deckglas und Kammer einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden bei 110-facher Vergrößerung 4x4 Großquadrate ausgezählt und hieraus ein Mittelwert gebildet. Jedes Großquadrat hat bei einer Fläche von 1 mm^2 und einer Höhe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 μl . Um nun aus der gezählten Zellzahl eine Konzentration [Zellen pro ml] zu errechnen, wurden die Mittelwerte zunächst verdoppelt (1:2 Verdünnung mit Trypanblau) und dann mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Die absolute Zellzahl pro Loch ergab sich schließlich aus der Division durch 5, da die Zellen eines jeden Lochs in 200 μl gelöst wurden.

2.4 Zellproliferations-Assay mittels [^3H]-Thymidin-Einbau

Dieses Verfahren zur Zellproliferationsuntersuchung beruht auf der Messung der DNA-Synthese durch den Einbau radioaktiv markiertem Thymidins. Thymidin wird als natürliches Nukleotid während der Synthesephase des Zellzyklus in die sich replizierende DNA eingebaut. Das hier verwendete Thymidin ist mit dem schwachen β -Strahler Tritium markiert, welcher mithilfe eines Szintillationszählers quantifiziert werden kann.

Zunächst wurden auf einer 96-Loch-Platte $0,5 \times 10^4$ BON-1 Zellen pro Loch ausgesät. Diese Zellzahl wurde in Vorversuchen ermittelt. Ziel war eine etwa 80-prozentige Konfluenz zum Zeitpunkt der Thymidin-Zugabe. Nach einer Anwachsphase von 24 Stunden wurden die Therapeutika in folgenden Konzentrationen hinzugefügt (8-fach Bestimmung): Octreotid 0,1 μM , Interferon α 1000 U/ml, Interferon β 1000 U/ml, Streptozotocin 100 μM , 5-FU 2 μM , Streptozotocin 100 μM + 5-FU 2 μM . Acht Löcher blieben dabei ohne Therapeutika (basales Wachstum). Nach drei Tagen erfolgten ein Mediumwechsel und eine erneute Zugabe der Therapeutika. Am Abend des fünften Tages wurden in einem Isotopenlabor zu jedem Loch 25 μl der Thymidinlösung (37 MBq/ml, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England) pipettiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mithilfe eines vollautomatischen Harvesters auf eine Filterplatte übertragen. In einem β -Zähler

erfolgte dann die Messung des inkorporierten Thymidins in der Einheit counts per minute (cpm).

Die Signifikanzprüfung im Rahmen der Proliferationsassays erfolgte mithilfe eines zweiseitigen Student's t-Test. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant bewertet.

2.5 Western-Blot-Analyse

2.5.1 Proteinisolation aus Zellkultur

Zur Vorbereitung eines Western-Blot-Experiments wurden die BON-1 Zellen zunächst mit einer Dichte von 0,5 bis $0,75 \times 10^6$ Zellen pro Loch auf einer 6-Loch-Platte ausgesät. Die Zellen konnten über Nacht anwachsen und wurden dann wie folgt behandelt: Octreotid 0,1 μM , Interferon α 1000 U/ml, Interferon β 1000 U/ml, Streptozotocin 100 μM , 5-FU 100 μM , Streptozotocin 100 μM + 5-FU 100 μM . Ein Loch blieb als Kontrolle des basalen Wachstums unbehandelt.

Nach 12 beziehungsweise 24 Stunden Inkubation erfolgte dann die Zellyse. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine ca. 80-prozentige Konfluenz der Zellen angestrebt, um eine Phase mit hoher Stoffwechselaktivität untersuchen zu können.

Die Probengewinnung fand auf Eis statt, um den Abbau von Proteinen durch zelleigene Proteasen möglichst gering zu halten. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 150 μl frisch angesetztem, kaltem Lysepuffer pro Loch bedeckt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden gelöst und dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gemisch aus Lysepuffer und Zellen wurde für 30 Minuten bei 4 °C in einem Rotationsgerät durchmischt und anschließend zum weiteren Zellaufschluss mit 5 bis 10 Impulsen bei 40 % Power sonifiziert. Nach 15-minütiger Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C) konnte das Proteinlysate als Überstand abgenommen werden und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20 °C gelagert werden.

In allen weiteren Schritten wurden die Proben auf Eis bearbeitet.

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der BCA-Methode mit einem Kit der Firma Pierce (Pierce, St. Louis, USA) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Biuret-Reaktion, bei welcher Proteine in alkalischem Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Das BCA-Reagenz bildet mit Cu^+ -Ionen einen violettfarbigen Komplex, dessen Extinktion bei 540 nm gemessen werden kann.

Die Zellysate wurden in reiner Form und in einer 1:2 Verdünnung mit Aqua dest. gemessen. Hierzu wurden jeweils 10 μl der Probe/ Verdünnung in die Löcher einer 96-Loch-Platte pipettiert. Um eine Proteinstandardreihe zu erstellen, wurde neben einem Leerwert auch BSA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in definierten Mengen von 5, 10, 15, 20, 25 und 30 μg pro Loch mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10 μl aufgefüllt. Anschließend wurden sowohl zu den Proben als auch zu der Standardreihe jeweils 200 μl BCA-Reaktionsgemisch hinzugefügt und die Platte 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte im ELISA-Reader.

2.5.3 Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Abhängig von der Gesamtausbeute an Protein aus den Zellysaten wurde in unterschiedlichen Versuchen jeweils eine Proteinmenge von 30, 35 oder 40 μg pro Probe weiterverarbeitet. Der ermittelten Konzentration entsprechend, wurden die jeweiligen Probenvolumina in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit Aqua dest. auf ein einheitliches Volumen gebracht. Hierzu wurde dann noch ein Fünftel des späteren Endvolumens an 5-fach konzentriertem Ladepuffer pipettiert. Die im Ladepuffer enthaltenen Reagenzien SDS und DTT denaturierten die Proteine. Außerdem wurden die Proben anschließend für 5 Minuten im Heizblock auf 95 °C erwärmt, was ebenfalls zur Denaturierung beitragen sollte.

2.5.4 Auftrennung des Proteingemisches mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die denaturierten und somit negativ geladenen Proteine entsprechend ihrer Molekularmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Als Trennmedium dient

ein quervernetztes Polyacrylamidgel. Dabei werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel zu einer scharfen Bande fokussiert bevor sie in das Trenngel einwandern. Der Acrylamidgehalt des Trenngels richtet sich nach der Molekularmasse des gesuchten Proteins. Für die kleinemolekularen Spaltprodukte der Caspase-Spaltung wurde ein 16-prozentiges Gel hergestellt. Zum Nachweis aller anderen Proteine wurde ein 12-prozentiges Gel verwendet.

Zum Herstellen der Gele wurde ein Kammersystem aus zwei Glasplatten und 1,5 mm dicken Kunststoff-Spacern verwendet. Alle Elemente der Kammer wurden vorher gründlich mit Ethanol gereinigt und im Folgenden ausschließlich mit Handschuhen berührt. Zunächst wurde das frisch angesetzte, noch flüssige Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert und zur Vermeidung von Luftblasen mit Isopropanol beschichtet. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen, das flüssige Sammelgel auf das Trenngel pipettiert und ein Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel vernetzt war, konnte der Kamm entfernt werden. Für einen vertikalen Lauf der Proteine wurden dann jeweils zwei Gele senkrecht in eine Laufkammer gespannt. Die Gele bildeten dabei eine in sich geschlossene innere Kammer. Das System wurde einschließlich der Probenaschen mit Laufpuffer aufgefüllt. Schließlich wurden die vorbereiteten Proben und ein Proteinmarker zur Größenbestimmung in die Taschen pipettiert.

Bei einer Spannung von 100 Volt liefen die Proben zunächst durch das Sammelgel. Die weitere Gelelektrophorese erfolgte bei 150 Volt für ein bis zwei Stunden, abhängig von der Geldichte, sowie der Größe des gesuchten Proteins.

2.5.5 Transfer auf Nitrozellulosemembran mittels Semi-Dry-Blot

Der Transfer dient dazu, die Proteine vom empfindlichen, nicht lagerbaren Gel auf ein haltbareres Medium, die Nitrozellulose-Membran, zu bringen.

Hierzu wurden in einer mit Blot-Puffer gefüllten Schale die Gele vorsichtig von den Glasplatten getrennt und wie in der folgenden Abbildung luftblasenfrei geschichtet:

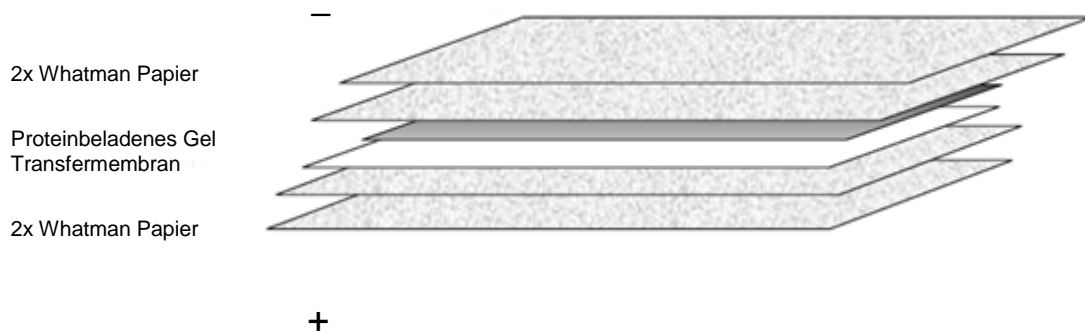


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Semi-Dry-Blots

Das so geschichtete „Sandwich“ wurde zwischen ein System aus graphitbeschichteter Kathode und Anode gespannt und dann senkrecht in eine Blotkammer überführt. Die Blotkammer wurde mit Blot-Puffer aufgefüllt und mit einem Eisblock versehen, um eine übermäßige Erhitzung während des Transfers zu verhindern. Der Proteintransfer erfolgte bei 300 mA innerhalb einer Stunde. Um ein späteres Strippen der Membranen zu ermöglichen, wurden sie nach dem Transfer gründlich an der Luft getrocknet.

2.5.6 Immunfärbung

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulose-Membran zunächst eine Stunde voll bedeckt in Blocklösung bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in einem 50 ml Röhrchen. Hierzu wurden 5 ml Antikörper-Grundlösung mit der entsprechenden Konzentration Antikörper (siehe Tabelle 2.2) versehen und die Membran in das Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Röhrendreher in Rotation gehalten.

Nach drei Waschgängen mit TBS/T für je mindestens 5 Minuten konnte dann der entsprechende Zweitantikörper (1:2000 verdünnt in 5 ml Antikörper-Grundlösung) in das Röhrchen pipettiert werden. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Röhrendreher.

Auch der Zweitantikörper wurde vor der Entwicklung durch drei Waschgänge mit TBS/T gründlich von der Membran abgewaschen.

2.5.7 Detektion und Filmentwicklung

Das zur Detektion verwendete verstärkte Chemilumineszenz-System (ECL) ermöglichte die Darstellung der Proteinbanden auf einem Röntgenfilm, da es mit der am Zweitantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase (HRP) reagiert. Von Chemilumineszenz wird gesprochen, wenn bei einer chemischen Reaktion (hier die Oxidation von Luminol mit HRP) Licht emittiert wird.

Für diese Reaktion wurde nach dem Waschen zunächst das TBS/T aus dem mit der Membran bestückten 50 ml Röhrchen verworfen. Dann wurden jeweils 2 ml der beiden im Kit gestellten Detektionslösungen ins Röhrchen pipettiert und die Membran in 2 Minuten auf dem Röhrendreher mit der ECL-Lösung bedeckt. Die feuchte Membran wurde anschließend luftblasenfrei in Zellophan-Folie eingebettet und so in eine Belichtungskassette gelegt. Zügig darauffolgend wurde dann in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm in die Kassette gelegt und für 10 Sekunden bis 20 Minuten belichtet. Die Dauer der Exposition war abhängig von der Menge des eingesetzten Proteins, der Antikörperkonzentration und der Spezifität des Primärantikörpers. Die Filmentwicklung erfolgte vollautomatisch.

2.5.8 Strippen der Nitrozellulosemembran

Um eine Nitrozellulosemembran mehrfach mit verschiedenen Antikörpern versehen zu können, wurden die an den Proteinen gebundenen Antikörper nach Abschluss einer Detektion mithilfe eines Stripping-Puffers wieder entfernt. Dies erfolgte in einem 70 °C heißem Wasserbad, in welchem die in Stripping-Puffer schwimmenden Membranen für 15 Minuten geschüttelt wurden. Nach anschließend vier Waschgängen für jeweils mindestens 5 Minuten, konnte eine neue Immunfärbung der Membran erfolgen (siehe Absatz 2.5.6). Jede Membran wurde abschließend zur Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung mit einem Antikörper gegen Actin gefärbt. Actin ist ein Zytoskelettprotein, das ubiquitär exprimiert wird.

2.5.9 Densitometrische Auswertung

Nach dem Einscannen der entwickelten Fotofilme, konnten die Banden mit dem Programm ImageJ densitometrisch gemessen werden. Hierzu wurde das Bild zunächst in ein 8-Bit-Format konvertiert. Anschließend wurde jede Bande einzeln markiert. Mithilfe des Programms wurde die optische Dichte der jeweils markierten Bande gemessen und ein Produkt [x] aus der optischen Dichte und der Bandenfläche erstellt. [x] wurde als proportionales Abbild der Proteinmenge betrachtet. Um die Beladungskontrolle mit einzubeziehen wurde jedes [x] anschließend mit dem entsprechenden Wert der Actin-Bande in Verhältnis gesetzt. Die Bande der unbehandelten BON-1 Proteine wurde zur graphischen Darstellung gleich eins gesetzt.

2.6 Apoptosenachweis mit der TUNEL-Methode

Bei der TUNEL- Methode („terminal-Desoxyribosyl-Transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling“) handelt es sich um eine Einzel-Zell-Analyse, bei der Strangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen werden. Grundlage der TUNEL-Technik ist die Aktivität der terminalen Desoxyribosyl-Transferase. Dieses Enzym erkennt durch DNA-Strangbrüche entstandene freie 3'-OH-Enden und koppelt Nucleotidderivate an diese. Fluoreszenzmarkierte Nucleotide werden mittels Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen, wobei apoptotische Zellen durch die für sie charakteristischen DNA-Strangbrüche stärker fluoreszieren als nicht apoptotische Zellen.

Der TUNEL- Test wurde mit dem „In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“, von Roche durchgeführt. Folgende Reagenzien wurden zusätzlich frisch angesetzt:

- **Fixationslösung:** 4 % Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4
- **Permeabilisationslösung:** 0,1 % Triton X-100 in 0,1 % Natrium-Citrat
- **DNase I, Grad I:** Ca. 100 U/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 + 1 mg/ml BSA

Zunächst wurden auf einer 96-Loch-Platte jeweils 1×10^4 BON-1 Zellen pro Loch ausplattiert. Für die Positivkontrolle, die später mit DNase behandelt wurde, wurde eine zusätzliche Platte verwendet. Nachdem die Zellen über

Nacht im 37 °C- Brutschrank anwachsen konnten, wurden am nächsten Tag die Therapeutika in folgenden Konzentrationen hinzu gegeben (Doppelbestimmung): Interferon α 1000 U/ml, Interferon β 1000 U/ml, Octreotid 0,1 μ M, Streptozotocin 100 μ M, 5-FU 2 μ M, Streptozotocin 100 μ M + 5-FU 2 μ M. Zwei mit Zellen bestückten Löchern wurden als unbehandelte Kontrollgruppe kein Therapeutikum hinzugefügt. Ebenso wurden jeweils zwei Löcher für eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle belassen.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen zunächst fixiert. Hierzu wurden das Medium abpipettiert und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden etwa zwei bis drei Minuten an der Luft getrocknet und dann für eine Stunde mit der Fixationslösung bedeckt. Danach wurde jedes Loch zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine zwei-minütige Behandlung der Zellen mit der Permeabilisationslösung auf Eis und erneutes zweimaliges Waschen mit PBS.

Nachdem die Positivkontrolle für 10 Minuten mit DNase verdaut wurde, konnte mit der TUNEL-Markierung der Zellen begonnen werden. Hierzu wurden die Zellen für eine Stunde im dunklen Wärmerraum mit dem Reaktionsgemisch aus Enzym (TdT) und dem grün fluoreszierenden Nukleotid-Label inkubiert (Negativkontrolle nur Nukleotid-Label, kein Enzym). Es folgten drei erneute Waschgänge der Proben mit PBS.

Zur Markierung aller Zellkerne erfolgte eine Gegenfärbung mit dem blau fluoreszierenden DNA-Farbstoff DAPI (1:4000 in PBS verdünnt). Die Auswertung der Proben erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es wurden jeweils zwei Fotos vom selben Bereich gemacht: das Erste im blauen Wellenlängenbereich zur Darstellung der Zellkerne, das Zweite im grünen Wellenlängenbereich zur Fluorescein-Darstellung stattgehabter DNA-Strangbrüche.

2.7 Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

In dieser Arbeit wurde ein FACS Canto Durchflusszytometer (Becton Dickinson) für die Analysen verwendet. Mit Hilfe dieser Methode können unterschiedliche physikalische Eigenschaften einer Zelle bestimmt werden. Zur Analyse werden die Zellen aus dem Probenröhrchen mit Überdruck in eine Messküvette geleitet.

Der Flüssigkeitsstrom mit den Zellen wird dabei so weit eingengt, dass die Zellen hintereinander angeordnet werden. Die Zellen passieren anschließend einzeln den Analysepunkt. Hier werden die Zellen an einem Laserstrom vorbeigeführt und analysiert. Die Zellen werden in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität in Klassen eingeteilt, wobei die Verteilung der einzelnen Zellen in Form eines Häufigkeitsdiagramms (Histogramm) erfolgt. Durch die vergleichende Analyse unterschiedlicher Histogramme können Veränderungen des Zellzyklus in den Zellen sichtbar gemacht werden.

Für die Analyse wurden die BON-1 Zellen zunächst mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag folgte die Zugabe der Therapeutika: Octreotid $0,1 \mu\text{M}$, Interferon α 1000 U/ml , Interferon β 1000 U/ml , Streptozotocin $100 \mu\text{M}$, 5-FU $2 \mu\text{M}$, Streptozotocin $100 \mu\text{M}$ + 5-FU $2 \mu\text{M}$. Auch hier wurde ein Loch als Kontrollgruppe nicht behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen mittels Trypsin vom Loch gelöst und zusammen mit ihrem Überstand in Eppendorfgefäße überführt. Nach der Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in $500 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen. Die so aufgenommenen Zellen konnten dann in eine Fixierlösung aus 70 % Ethanol und 30 % PBS überführt werden und in diesem Zustand bis zur FACS-Analyse bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Am Analysetag wurden die Zellen dann erneut abzentrifugiert, in $800 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und in FACS-Analyse-Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte innerhalb einer Stunde der RNA-Verdau mittels $5 \mu\text{l}$ RNAse (20 mg/ml) pro Probe. Zum Anfärben der DNA wurde jede Probe 10 Minuten vor der Messung mit $30 \mu\text{l}$ Propidiumiodid (1 mg/ml) versetzt.

Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit den Programmen WinMDI (**Windows multiple Document Interface for Flow Cytometry**) und Cylchred. WinMDI erstellt Einzel-Parameter Histogramme, mit welchen Cylchred eine Zellzyklusanalyse vollziehen kann.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in fünf Teile. In den ersten beiden Abschnitten wird die Zellproliferation der BON-1 Zellen unter Behandlung mit Interferonen, Octreotid, Streptozotocin und 5-FU dargestellt (Zählung viabler Zellen, Thymidin-Uptake). Im dritten Abschnitt werden die durch die Therapeutika verursachten intrazellulären Effekte näher untersucht (Western-Blot-Analysen). Der vierte Teil beschäftigt sich mit der Frage nach Apoptose (TUNEL-Methode) und schließlich werden die Veränderungen im Zellzyklus dargestellt (Durchflusszytometrie).

3.1 Proliferations-Assays

In diesen Versuchen sollte die proliferationshemmende Wirkung von Interferon α , Interferon β , Octreotid, STZ, 5-FU, sowie STZ + 5-FU auf die Zelllinie BON-1 im direkten Vergleich zum basalen Wachstum (Kontrolle) untersucht werden.

Hierzu wurden BON-1 Zellen auf 24-Loch-Platten ausgesät, am folgenden Tag mit entsprechenden Konzentrationen der Bio- und Chemotherapeutika behandelt und ab dem dritten Tag täglich in Doppelbestimmung gezählt. An den Tagen drei und sechs fand ein Medium- und Therapeutika- Wechsel statt.

Mit Ausnahme von Octreotid zeigte sich unter allen Therapeutika ein gehemmtes Wachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

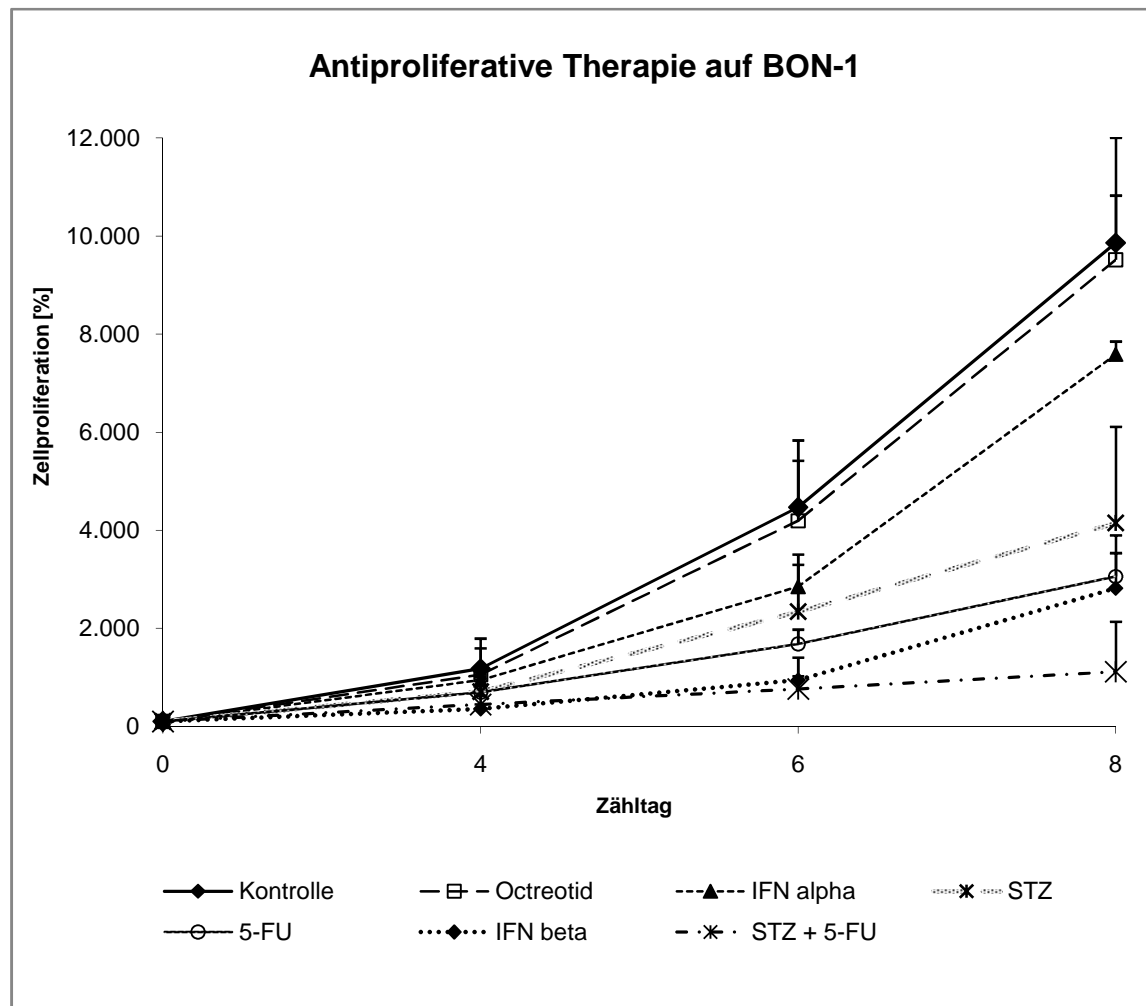


Abbildung 3.1: Hemmung der BON-1 Zellproliferation unter Bio- und Chemotherapie nach 4, 6 und 8 Tagen

Die BON-1 Zellen wurden mit folgenden Therapeutika-Konzentrationen behandelt: Octreotid 0,1 μM , IFN α 1000 U/ml, IFN β 1000 U/ml, STZ 100 μM , 5-FU 2 μM , STZ 100 μM + 5-FU 2 μM . Dargestellt sind die Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Zählversuchen. Bei jedem der Versuche wurde vom vierten bis zum achten Tag täglich gezählt. Die an Tag Null ausgesäten Zellen (1×10^4 Zellen pro Loch) wurden für die statistische Auswertung gleich 100% gesetzt. Eine Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich unter allen Therapieoptionen an jedem der gezählten Tage. Diese Proliferationshemmung war unter Octreotid an Tag 8 nicht signifikant ($p=0,142$). Unter IFN α zeigte sich eine signifikante Hemmung ($p=0,027$). Ein hochsignifikant vermindertes Wachstumsverhalten der BON-1 Zellen wurde unter STZ ($p=0,001$), 5-FU ($p<0,0001$), IFN β ($p<0,0001$) und der Kombination aus STZ und 5-FU ($p=0,001$) beobachtet. Mittelwerte (in % der ausgesäten Zellzahl) an Tag 8: Kontrolle 9860, Octreotid 9513, IFN α 7583, STZ 4146, 5-FU 3060, IFN β 2818, STZ + 5-FU 1117.

Unter allen Therapeutika trat ab dem vierten Tag ein wachstumshemmender Effekt ein. Zusammenfassend lässt sich die antiproliferative Wirkung in folgender Reihenfolge mit zunehmender Wirksamkeit feststellen: Octreotid, IFN α , STZ, 5-FU, IFN β , STZ + 5-FU. Die Kombinationsbehandlung aus STZ + 5-FU ist auf BON-1 Zellen am stärksten wachstumshemmend wirksam.

Der größte Unterschied in der Zellzahl zeigte sich an Tag 8 und ist im Folgenden isoliert dargestellt.

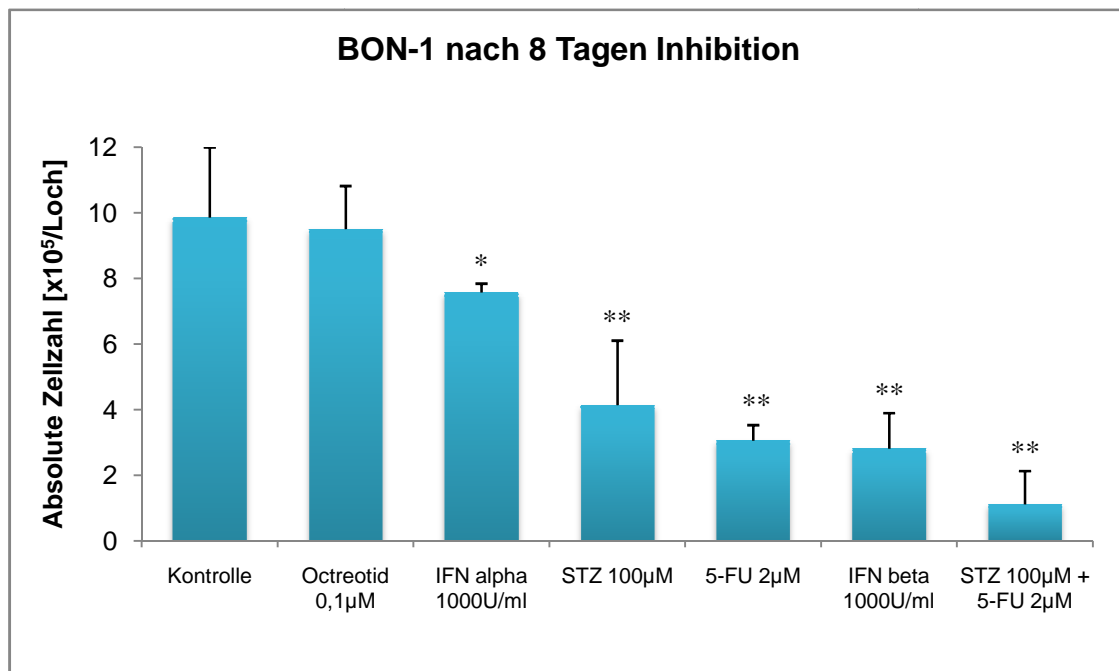


Abbildung 3.2: BON-1 nach 8 Tagen Inhibition

Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Zählversuchen. Nach 8 Tagen Inhibition mit den dargestellten Therapeutika zeigten alle behandelten Zellgruppen ein vermindertes Wachstum im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dieser Effekt war am geringsten und nicht signifikant unter einer Behandlung mit Octreotid. Ein signifikant vermindertes Wachstum zeigte sich unter der Behandlung mit IFN α (* $p \leq 0,05$). Für STZ, 5-FU, IFN β und STZ + 5-FU präsentierte sich eine hoch-signifikant verminderte Zellzahl an Tag 8 (** $p \leq 0,001$).

Unter keinem der untersuchten Therapieansätze kam es zu einem Rückgang der Zellzahl. Das Wachstum wurde also nur gemindert, ein Absterben der zu Beginn des Versuches ausgesäten Zellen blieb aus. Zusammenfassend beträgt die Wachstumshemmung an Tag 8 im prozentualen Anteil zur Kontrolle wie folgt: Octreotid 3 %, IFN α 23 %, STZ 58 %, 5-FU 69 %, IFN β 71 %, STZ + 5-FU 89 %.

3.2 Proliferations-Assays mittels [³H]-Thymidin-Uptake

Diese Methode wurde zur Verifizierung des mittels Zellzählung untersuchten Proliferationsverhaltens der unter Therapeutika-Einfluss stehenden BON-1 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 96-Loch-Platten ausgesät und am folgenden Tag mit Octreotid, IFN α , IFN β , STZ, 5-FU und der Kombination aus STZ + 5-FU behandelt. Ein Medium- und Therapeutika-Wechsel erfolgte am dritten Tag. Am Abend des fünften Tages wurde das Tritium-markierte Thymidin auf die Zellen gegeben. Am nächsten Morgen folgte dann die Messung des eingebauten Thymidins im β -Zähler.

Wie schon in der Literatur für die Therapie mit Thymidylatsynthase-Hemmern beschrieben (Yau et al. 2006), zeigte sich auch in den hier durchgeführten Versuchen für die mit 5-FU behandelten Zellen ein deutlich erhöhter Einbau des exogenen [³H]-markierten Thymidins. Durch die verminderte Produktion endogenen Thymidins überwiegt das sonst um den Einbau konkurrierende [³H]-markierte Thymidin. Da der [³H]-Thymidin-Uptake in den mit 5-FU behandelten Zellen also nicht in vergleichbarer Weise mit der DNA-Syntheserate korreliert, sind die mit dieser Methode für 5-FU erhobenen Daten im Folgenden nicht dargestellt.

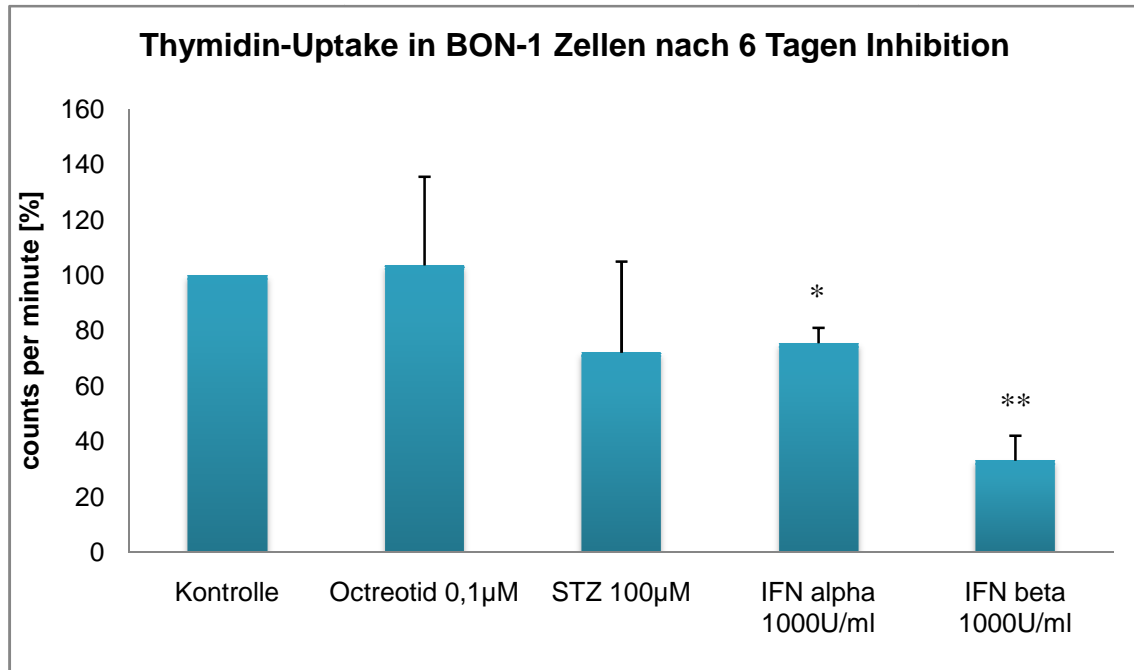


Abbildung 3.3: Thymidin-Uptake in BON-1 Zellen nach 6 Tagen Behandlung

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Hierfür wurden die counts per minute der unbehandelten Kontrolle gleich 100 % gesetzt. Es zeigt sich, dass Octreotid das Proliferationsverhalten der Tumorzellen nicht inhibiert. Auch für die mit STZ behandelten Zellen präsentierte sich keine signifikante Hemmung des Wachstums. Unter IFN α und IFN β kam es zu einem signifikant (*) bzw. hoch-signifikant (**) verminderten Einbau von Thymidin ($p=0,0016/ p=0,0002$). Thymidin-Uptake in %: Kontrolle 100, Octreotid 104, IFN α 75, STZ 72, IFN β 33.

3.3 Western-Blot-Analysen

Zur Identifizierung der molekularen Mechanismen, die der antiproliferativen Wirkung von Interferonen, Octreotid, STZ und 5-FU in BON-1 Zellen zugrunde liegen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Tumorzellen ausgesät, am folgenden Tag mit den Therapeutika behandelt und abhängig vom untersuchten Protein nach 15 und 60 Minuten, 6, 12 oder 24 Stunden lysiert. Untersucht wurden diese Lysate auf die Aktivierung der mitogenen Signalwege (Akt, ERK) und STAT1, sowie die Expression des G1-spezifischen Zellzykluskontrollproteins Cyclin D1. Ferner fand mit der Frage nach Apoptose eine Prüfung auf Spaltprodukte der Polymerase PARP und der Caspase 3 statt. Um eine gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Blots sicherzustellen, erfolgte nach der spezifischen Antikörper-Detektion immer eine Ladungskontrolle mit einem Actin-Antikörper.

3.3.1 Aktivierung von Akt

Um einen Einfluss auf die phosphorylierte, aktive Form der Serin/ Threonin Kinase Akt durch Interferone, Octreotid, STZ oder 5-FU zu evaluieren, wurden die BON-1 Zellen für 12 Stunden mit den Therapeutika behandelt und dann wie oben beschrieben für die Blot-Analysen präpariert. Eine verminderte Akt-Aktivierung zeigte sich nach einer Behandlung mit Octreotid, STZ und 5-FU und ist im Folgenden dargestellt.

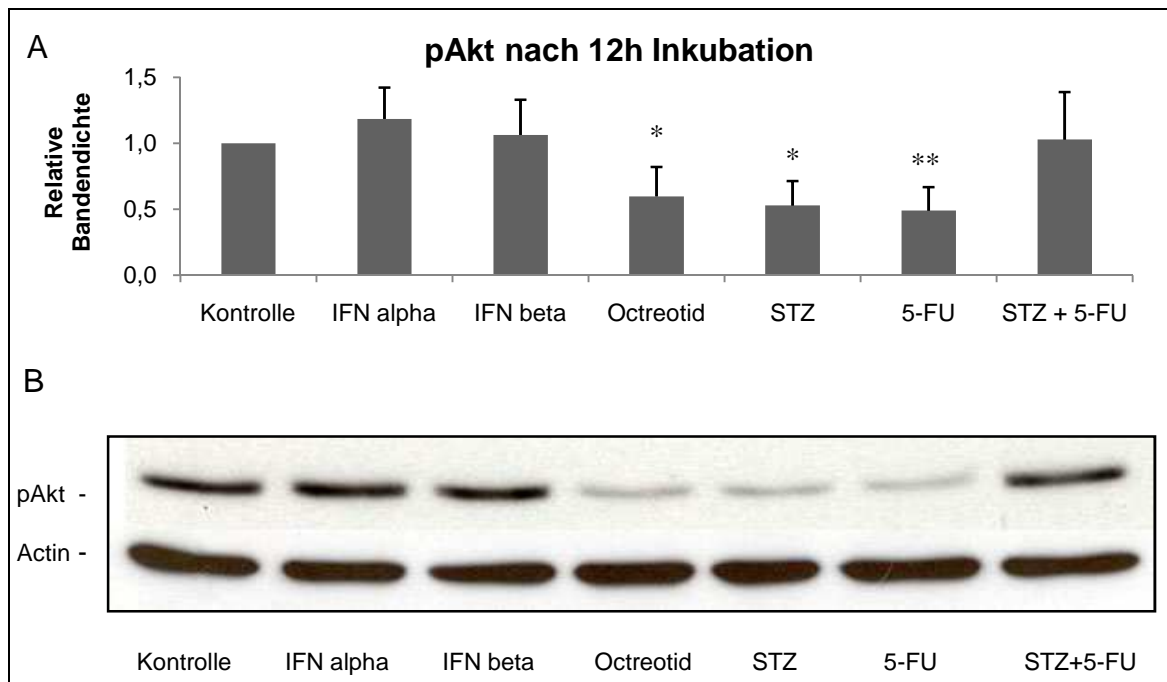


Abbildung 3.4: pAkt in BON-1 nach 12h Inkubation

BON-1 Zellen wurden für 12 Stunden behandelt und dann lysiert. (A) Zusammenfassende Darstellung der relativen Bandendichte in vier unabhängigen Western-Blots. Die Banden wurden mit dem Programm Image J densitometrisch vermessen und auf Actin normalisiert. Eine signifikante Minderung der Akt-Aktivierung zeigte sich in den mit Octreotid behandelten Zellen ($p=0,012$), ebenso wie in den mit STZ behandelten Zellen ($p=0,002$). Hoch-signifikant vermindert war die Akt-Aktivierung nach einer 12-stündigen Behandlung mit 5-FU ($p<0,001$). Dieser hemmende Einfluss auf die Akt-Phosphorylierung hob sich unter der Kombinationsbehandlung aus STZ und 5-FU wieder gänzlich auf. Auch die Behandlung mit Interferonen zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Akt-Aktivierung. (B) Repräsentativer Western-Blot. pAkt (obere Banden), Beladungskontrolle mit Actin (untere Banden).

3.3.2 Aktivierung von ERK

Analog der verminderten Akt-Aktivierung zeigte sich auch für die MAP Kinase ERK 1/2 nach einer 12-stündigen Inkubation mit Octreotid, STZ und 5-FU eine erniedrigte Proteinexpression der aktiven, phosphorylierten Form.

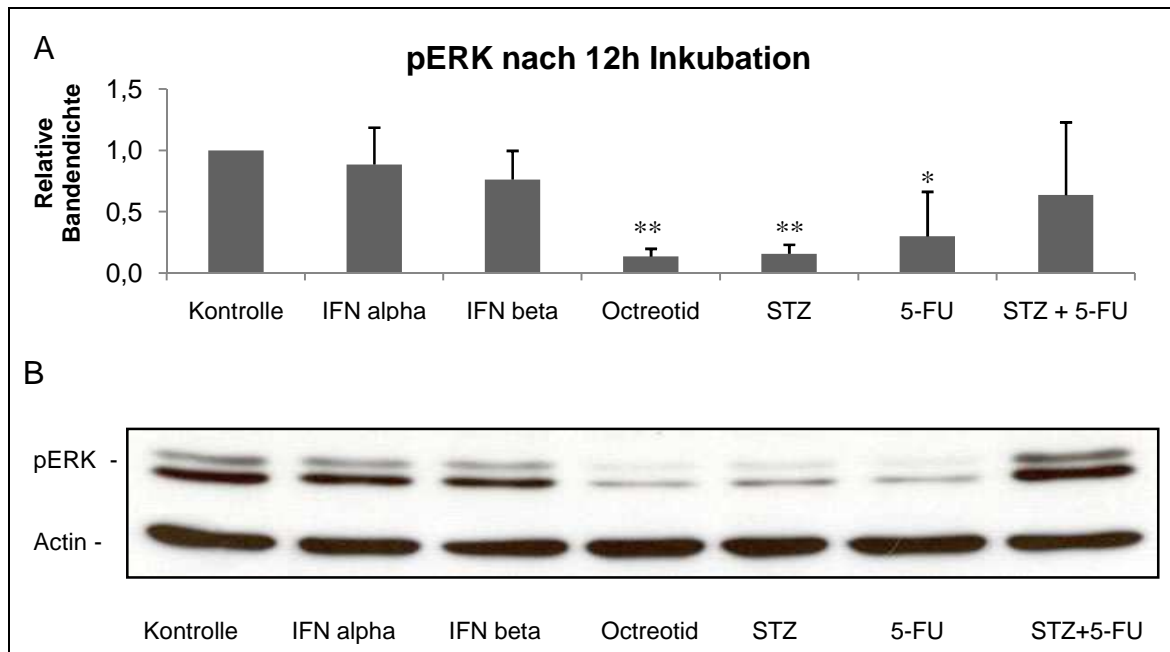


Abbildung 3.5: pERK in BON-1 nach 12h Inkubation

BON-1 Zellen wurden für 12h mit den Therapeutika inkubiert (A) Zusammenfassende Darstellung der relativen Bandendichte aus vier unabhängigen Western-Blots. Hochsignifikant vermindert stellte sich die ERK-Aktivierung nach einer Behandlung mit Octreotid ($p < 0,001$) und STZ ($p < 0,001$) dar. Eine signifikante Verminderung zeigte sich nach einer Behandlung der Zellen mit 5-FU ($p = 0,029$). Die Kombinationsbehandlung mit STZ und 5-FU bewirkte ebenso wie eine Behandlung mit Interferonen keine signifikanten Veränderungen der ERK-Aktivierung. (B) Repräsentativer Western-Blot. pERK (obere Banden), Beladungskontrolle mit Actin (untere Banden).

3.3.3 STAT1-Aktivierung nach Interferon-Behandlung

Die Phosphorylierung und Aktivierung des „signal transducers and activator of transcription“ STAT1 durch Mitglieder der Janus Kinasen (JAK) ist essentiell für das Ansprechen einer antiproliferativen Therapie mit Interferonen (Kisseleva et al. 2002). In dieser Arbeit wurde die STAT1-Phosphorylierung in BON-1 Zellen nach einer Inkubation mit IFN α und IFN β im zeitlichen Verlauf untersucht. Hierzu wurden Zelllysate nach 15 Minuten, 60 Minuten und 6 Stunden IFN-Inkubation gewonnen und anschließend im direkten Vergleich mit Hilfe von Western-Blots auf die Phosphorylierung von STAT1 untersucht. Erwartungsgemäß kam es dabei sowohl unter IFN α als auch unter IFN β zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung von STAT1. Das Signal erreichte seinen Höhepunkt nach 60 Minuten und war nach 6 Stunden nahezu abgeklungen. Unter IFN β kam es dabei zu einer deutlich stärkeren und länger andauernden Aktivierung von STAT1 als unter IFN α .

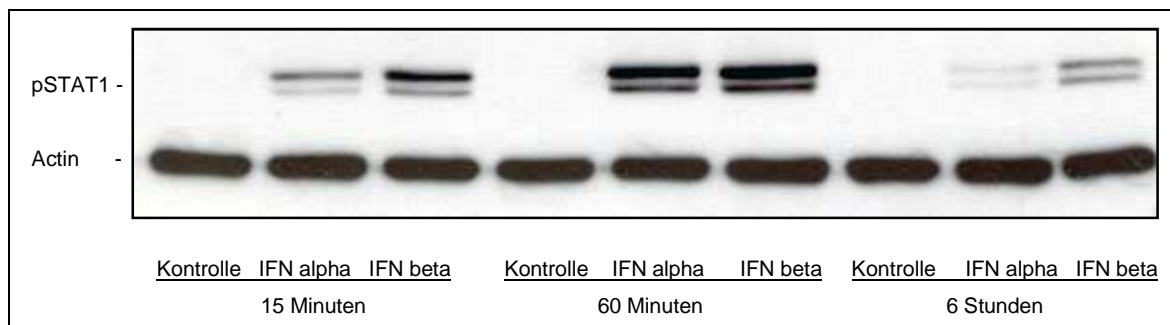


Abbildung 3.6: Kinetik der STAT1-Phosphorylierung in BON-1 nach 15 Minuten, 60 Minuten und 6 Stunden Interferon-Behandlung

Repräsentativer Western-Blot. STAT1 ist in den Zellen der unbehandelten Kontrolle nicht aktiviert. Sowohl die Behandlung mit IFN α als auch jene mit IFN β verursachen eine Phosphorylierung von STAT1 in einer zeitabhängigen Weise. Die stärkste Phosphorylierung zeigt sich dabei nach 60 Minuten. Nach 6 Stunden ist das Signal nahezu abgeklungen. IFN β bewirkt zu allen drei Zeitpunkten eine stärkere Aktivierung von STAT1 als IFN α . (Untere Banden: Beladungskontrolle mit Actin)

3.3.4 Expression von Cyclin D1

Cyclin D1 ist einer der Hauptregulatoren am G1/S- Restriktionspunkt und wurde mit der Frage nach Zellzykluseinflüssen untersucht. Eine signifikant verminderte Expression fand sich nach einer 24-stündigen Inkubation mit dem Chemotherapeutikum 5-FU als Monotherapie und in Kombination mit STZ.

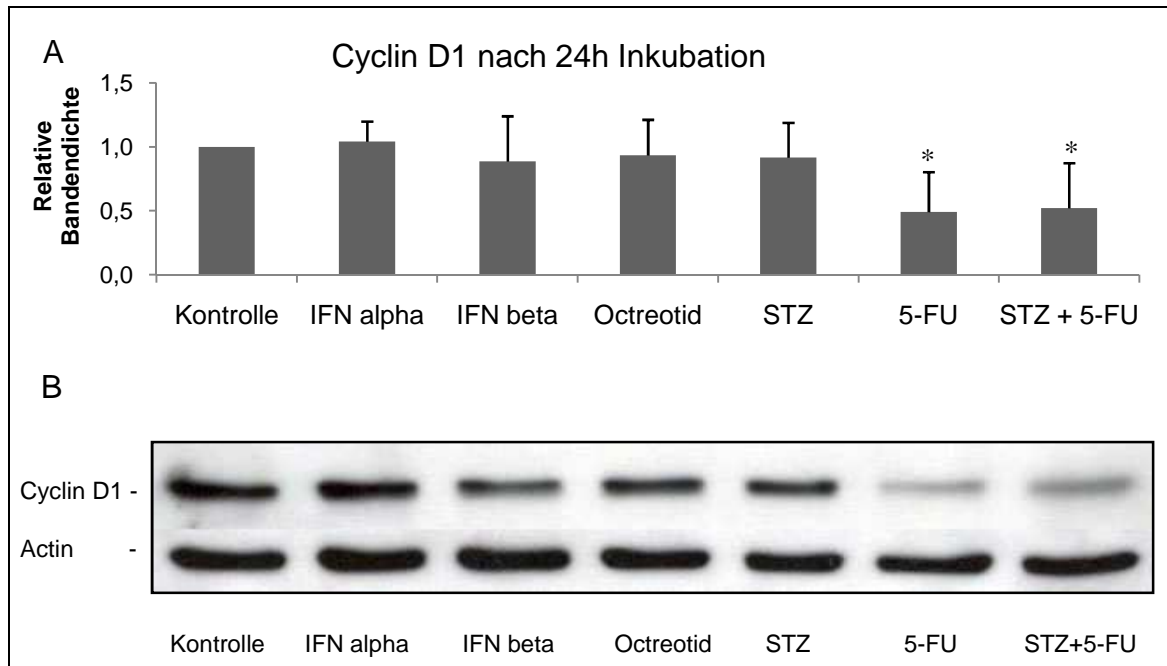


Abbildung 3.7: Expression von Cyclin D1 in BON-1 nach 24h Inkubation

BON-1 Zellen wurden für 24 Stunden mit Interferonen, Octreotid, STZ und 5-FU behandelt. (A) Zusammenfassende Darstellung der relativen Bandendichte aus 4 unabhängigen Western-Blots. Signifikant vermindert war die Expression von Cyclin D1 nach einer Behandlung mit 5-FU ($p=0,017$) und nach der Kombinationsbehandlung aus STZ + 5-FU ($p=0,035$). Unter den anderen Therapieoptionen fanden sich keine signifikanten Abweichungen in der Cyclin D1-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (B) Repräsentativer Western-Blot. Expression von Cyclin D1 (obere Banden), Beladungskontrolle mit Actin (untere Banden).

3.3.5 Caspase 3-Spaltung

Nach einer 24-stündigen Behandlung der BON-1 Zellen ließen sich unter keiner der getesteten Therapieoptionen Spaltprodukte der Effektor- Caspase 3 nachweisen.

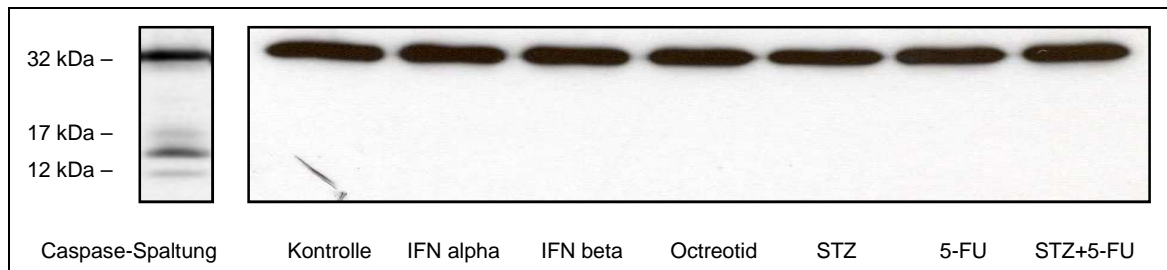


Abbildung 3.8: Fehlende Caspase-Spaltung in mit Bio- und Chemotherapeutika behandelten BON-1 Zellen

Repräsentativer Western-Blot. Ebenso wie in der unbehandelten Kontrollgruppe zeigen sich bei keinen der für 24 Stunden behandelten BON-1 Zellen die aktiven Spaltprodukte (12 und 17 kDa) der Caspase 3. Exprimiert wird jeweils nur die 32kDa große Bande des inaktiven Proenzym. Zur Veranschaulichung der Spaltprodukte ist links ein Western-Blot mit apoptotischen Zelllysaten (mit Etoposid behandelte Jurkat-T-Lymphom-Zellen) dargestellt.

3.3.6 PARP-Spaltung

Auch eine Darstellung von PARP-Spaltprodukten gelang nach einer 24-stündigen Inkubation der BON-1 Zellen nicht. Die proteolytische Spaltung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase durch die Caspasen 3 und 7 dient als Nachweis apoptotischer Ereignisse und ist in folgender Abbildung exemplarisch für apoptotische Lymphomzellen dargestellt.

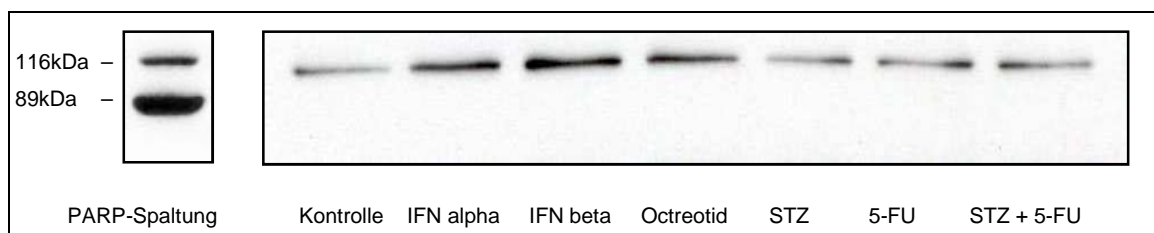


Abbildung 3.9: Keine PARP-Spaltung in mit Bio- und Chemotherapeutika behandelten BON-1 Zellen.

Sowohl die Kontrollgruppe als auch die für 24 Stunden mit Bio- und Chemotherapeutika behandelten BON-1 Zellen exprimieren das aktive, 116kDa große Reparaturenzym PARP. Das infolge von Apoptose entstehende 89kDa katalytische PARP-Fragment findet sich in keinen der behandelten Zellen. Zur Veranschaulichung der PARP-Spaltung ist links ein Western-Blot mit eindeutig apoptotischen Zelllysaten (mit Etoposid behandelte Jurkat-T-Lymphom-Zellen) dargestellt.

3.4 TUNEL-Methode

Mit der TUNEL-Methode werden Strangbrüche in der genomischen DNA apoptotischer Zellen nachgewiesen. Grundlage ist die Aktivität der Terminalen Desoxyribosyl-Transferase (TdT), welche freie 3'-OH-Enden erkennt und Nucleotidderivate an diese koppelt (Gavrieli et al. 1992). Fluoreszenzmarkierte Nucleotide werden mittels Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen, wobei apoptotische Zellen durch die für sie charakteristischen DNA-Strangbrüche stärker fluoreszieren als nicht apoptotische Zellen.

Um eine mögliche Induktion von Apoptose durch Interferone, Octreotid, STZ oder 5-FU an BON-1 Zellen zu untersuchen, wurden die in 96-Loch-Platten ausgesäten Zellen für 24 Stunden mit den Therapeutika behandelt und im Anschluss fixiert. Nach Inkubation mit der TdT-Enzymlösung und dem grün-fluoreszierenden Nucleotid-Label wurden die Zellkerne mit DAPI (blaue Fluoreszenz) gegengefärbt. Die Proben konnten dann unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurden außerdem eine Negativkontrolle (keine Inkubation mit der Enzymlösung) und eine Positivkontrolle (vorherige Behandlung mit DNase) mit in den Versuch einbezogen.

Wie aufgrund der zuvor durchgeführten Western-Blot-Analysen (in denen weder Caspase 3- noch PARP-Spaltungen nachgewiesen werden konnten) zu erwarten war, konnten auch mit dieser Methode unter keiner der Therapieoptionen apoptotischen Zellen durch DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden. Abbildung 3.10 stellt die unter dem Fluoreszenzmikroskop erstellten Fotos der verschiedenen Proben dar.

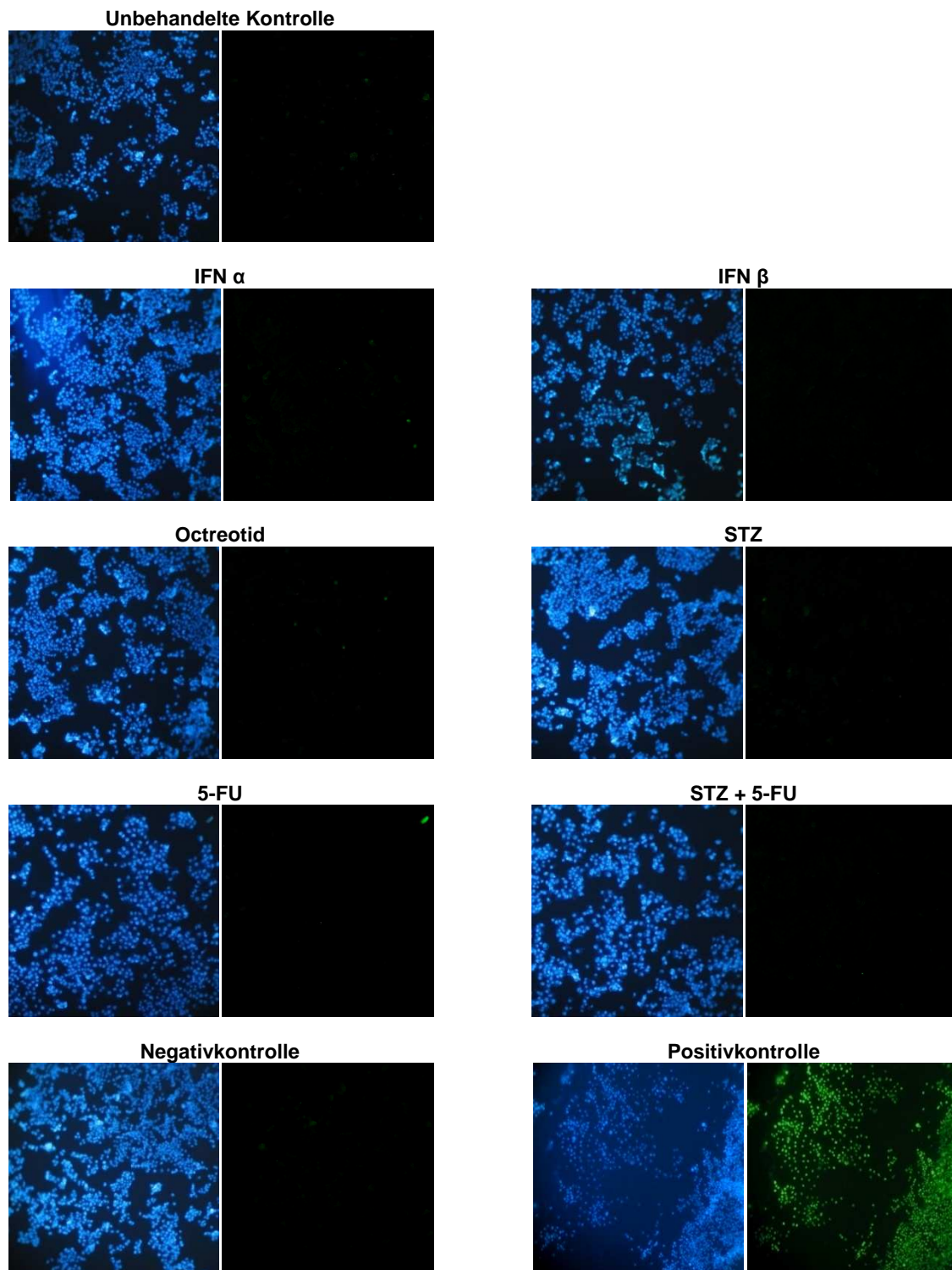


Abbildung 3.10: Untersuchung auf DNA-Strangbrüche mittels TUNEL-Methode

Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenzaufnahmen der DAPI-Gegenfärbung (358nm, blau) und des TUNEL-Nukleotidlabels (488nm, grün). Alle Proben weisen eine intensive Blau-Fluoreszenz der Zellkerne auf. Ebenso wie in der unbehandelten Kontrolle zeigen sich jedoch in keiner der behandelten Zellgruppen grün-fluoreszierende Nukleotide, es bestehen keine DNA-Strangbrüche. Negativkontrolle: keine grün fluoreszierenden Nukleotide durch unterlassene Enzyminkubation. Positivkontrolle: durch die vorherige DNase-Behandlung sind intensiv grün-fluoreszierende DNA-Strangbrüche nachweisbar.

3.5 Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analysen

Der variierende DNA-Gehalt einer sich teilenden Zelle ist Grundlage der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus. Nach Färbung der Zellen mit dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) lässt sich die Fluoreszenz einer jeden Zelle im FACS-Gerät messen. Die Stärke der Fluoreszenz ist proportional zum DNA-Gehalt der Zelle und lässt Rückschlüsse auf die jeweilige Zellzyklusphase zu.

Um den Einfluss von IFN α , IFN β , Octreotid, STZ und 5-FU auf das Zellzyklusverhalten der BON-1 Zellen zu untersuchen, wurden die in 6-Loch-Platten ausgesäten Zellen für 24 Stunden mit den Therapeutika behandelt und im Anschluss fixiert. Nach dem Verdau der RNA durch RNase und Färbung mit PI erfolgte die Messung im FACS Canto Durchflusszytometer. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen WinMDI (Erstellung von Einzel-Parameter-Histogrammen aus den FCS-Rohdaten) und Cylchred (Zellzyklusanalyse anhand gemessener Fluoreszenz).

Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Insgesamt zeigte sich unter dem Einfluss der Therapeutika keine signifikante Abweichung der Phasenverteilung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Abbildung 3.11 zeigt die Phasenverteilung der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen). Abbildung 3.12 zeigt die DNA-Histogramme eines repräsentativen Versuchs.

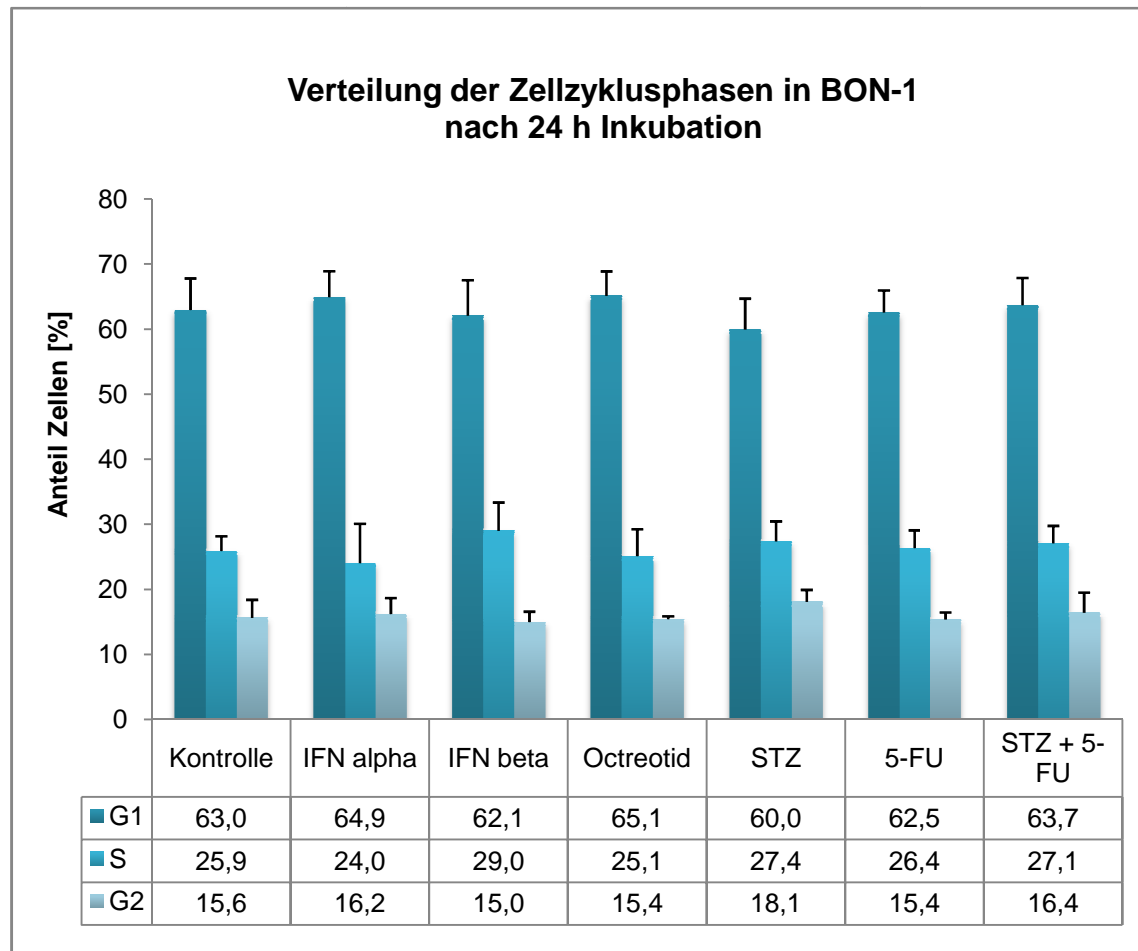


Abbildung 3.11: Zusammenfassende Darstellung der durchflusszytometrischen Zellzyklus-Analysen an BON-1

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen FACS-Analysen. Die BON-1 Zellen wurden für 24 Stunden mit den Bio- und Chemotherapeutika behandelt und anschließend auf ihre prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen in einem FACS-Gerät untersucht. Es zeigen sich unter keiner der Behandlungsoptionen signifikante Abweichungen in der Phasenverteilung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

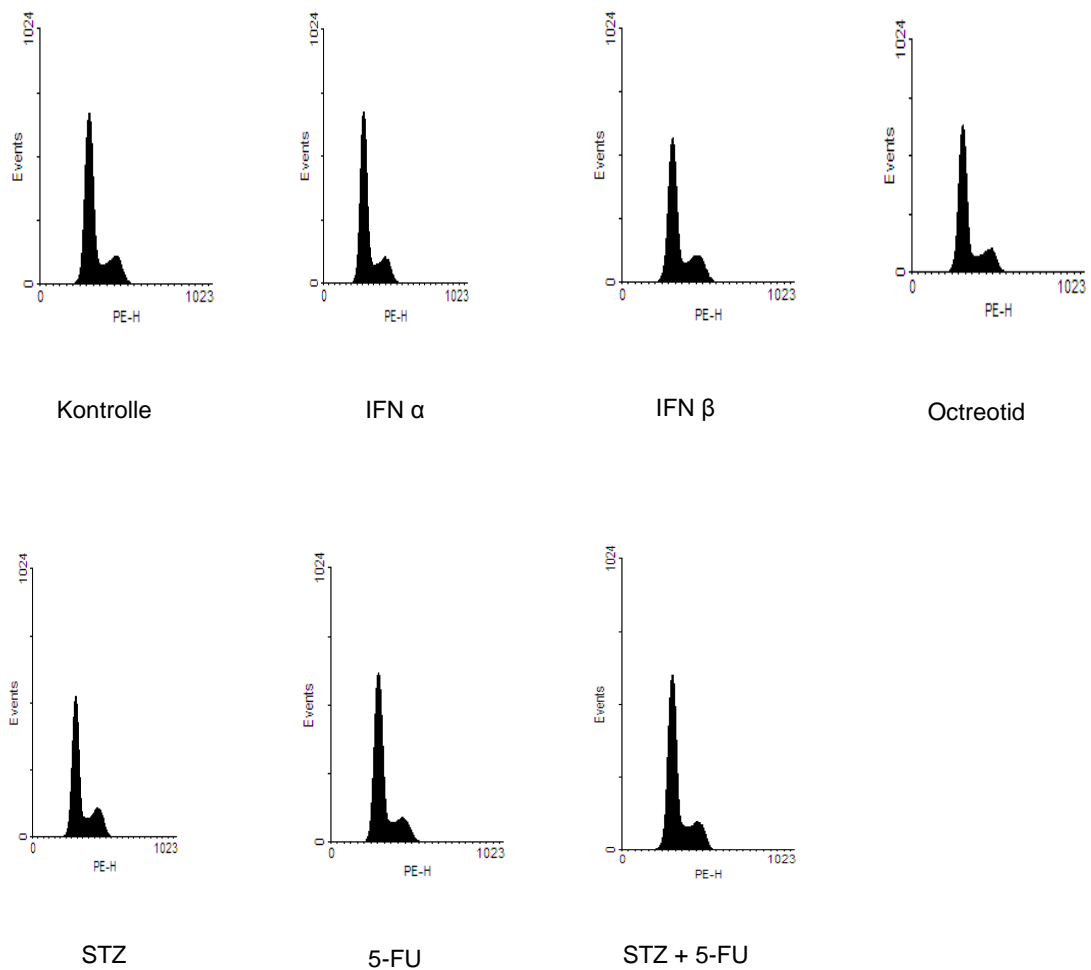


Abbildung 3.12: Keine signifikanten Änderungen in der Verteilung der Zellzyklus-Phasen nach 24-stündiger Behandlung der BON-1 Zellen

Jedes Histogramm bildet die Anzahl der Zellen in Abhängigkeit ihres DNA-Gehalts ab. Die Ordinate stellt dabei die Zahl der gemessenen Zellen dar. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität des Propidiumiodids abgebildet, welche direkt mit dem DNA-Gehalt der einzelnen Zellen korreliert. Der erste Peak entspricht den Zellen in der G0/G1-Phase, der Chromosomensatz ist diploid ($2n$). Das darauffolgende Plateau entspricht der S-Phase ($2n$ bis $4n$). Der zweite, kleinere Peak entspricht den Zellen in der G2-Phase ($4n$). Es zeigen sich keine signifikanten Abweichungen der Phasenverteilungen.

4 Diskussion

In der medikamentösen Therapie metastasierter GEP-NET kommen Somatostatin-Analoga, Interferone und die Chemotherapeutika Streptozotocin und 5-FU klinisch zum Einsatz. Da die antiproliferative Effizienz der einzelnen Substanzen jedoch zum Teil umstritten ist, wurden in dieser Arbeit vergleichende *in vitro* Untersuchungen zur Wirksamkeit der medikamentösen Therapieoptionen an der Zelllinie BON-1 durchgeführt.

Im direkten Vergleich erwies sich bei diesen Untersuchungen die Kombination der Chemotherapeutika STZ und 5-FU mit einer Wachstumshemmung von 89% gegenüber der Kontrolle als am stärksten antiproliferativ wirksam (Abbildung 3.1). Auch in klinischen Studien sprechen pankreatische NET im Vergleich zur STZ-Monotherapie stärker auf die STZ/5-FU Kombination an (Moertel et al. 1980, Oberg et al. 1987). In Bezug auf die antiproliferative Wirksamkeit folgt auf die kombinierte Chemotherapie die Therapie mit IFN β . Mit einer Wachstumshemmung von 71 % war diese deutlich wirksamer als die Therapie mit IFN α (Proliferationshemmung 29 %), was die von Vitale et al. beschriebene Therapieüberlegenheit von IFN β gegenüber IFN α (98 % vs. 26 % Wachstumshemmung) an BON-1 Zellen bestätigt (Vitale et al. 2006). Mithilfe von zwei verschiedenen Methoden (Zählung viabler Zellen und [^3H]-Thymidin-Uptake) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Somatostatin-Analoga Octreotid keine signifikante Hemmung der hochproliferativen BON-1 Tumorzellen bewirkt.

Keine der getesteten Therapieregime führte zu einer mit unseren Methoden nachweisbaren Apoptoseinduktion- es zeigten sich weder Caspase-/PARP-Spaltprodukte in den Western-Blot-Analysen noch DNA-Strangbrüche in der TUNEL-Methode.

Im Folgenden sollen die auf molekularer Ebene untersuchten potentiellen Wirkmechanismen zur Interpretation der quantitativen Effekte auf die Zellproliferation herangezogen werden.

4.1 **Rezeptorspezifische Wirkung der Somatostatin-Analoga und fehlende antiproliferative Wirksamkeit an BON-1**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Octreotid keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten von BON-1 Zellen hat. Die im Rahmen der klinischen PROMID-Studie unter Octreotid kürzlich beobachtete signifikante Tumorkontrolle von 67 % nach 6 Monaten bei Patienten mit hochdifferenzierten metastatischen NET des Mitteldarms (Rinke et al. 2009) spiegelt sich demnach in den Ergebnissen unserer *in vitro* Untersuchungen an der Zelllinie BON-1 nicht wieder. Da es sich bei BON-1 um eine pankreatische, also dem Vorderdarm zugeordnete Zelllinie handelt, unterstreicht diese Diskrepanz der Ergebnisse die Heterogenität der unter dem Oberbegriff GEP-NET zusammengefassten Tumorgruppe.

Trotz mangelnder Proliferationshemmung zeigte sich im Rahmen unsere Untersuchungen mithilfe der Western-Blot-Analysen ein deutlicher Einfluss auf die mitogenen Proteine Akt und ERK, welche in den mit Octreotid behandelten Zellen vermindert aktiviert wurden. Dieser hemmende Einfluss auf die ERK-Aktivität wurde auch zuvor schon in BON-1 Zellen beschrieben, und zwar vermittelt über die SSTR Subtypen 2 und 5 (Ludvigsen et al. 2004). Auch in Ovarialzellen des chinesischer Hamsters (CHO) konnte eine über den SSTR5 vermittelte Inhibition von ERK gezeigt werden (Cordelier et al. 1997). Umgekehrt wurde in CHO Zellen aber auch eine SSTR1- vermittelte Aktivierung von ERK beschrieben (Florio et al. 1999), was die Rezeptorspezifität der Somatostatinwirkung verdeutlicht. Dass die in dieser Arbeit gezeigte Hemmung des ERK-Signalweges überwiegt, überrascht in Hinblick auf die Rezeptoraffinität des Octreotids nicht- es bindet SSTR2 und SSTR5 mit hoher Affinität, den SSTR1 jedoch kaum (Patel und Srikant 1994). Mittels SSTR-Subtypspezifischen polyklonalen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme der Gastrinome 100 % der pankreatischen NET und 95 % der NET des Mitteldarms SSTR2 exprimieren (Oberg et al. 2004). Die Hemmung der mitogenen Signalwege durch Octreotid bietet eine mögliche Erklärung für den in der Klinik beobachteten ausgeprägt antisekretorischen Effekt.

Die Beobachtung, dass die Beeinflussung der mitogenen Signalwege letztlich nicht zu einer Proliferationshemmung führt, deutet darauf hin, dass die

gesteigerte Proliferation der BON-1 Zellen nicht an eine gesteigerte mitogene Signaltransduktion gebunden ist. Auch Grozinsky-Glasberg et al., die an der Ratten-Insulinom Zelllinie INS1 einen antiproliferativen Effekt für Octreotid nachgewiesen haben, konnten zwar eine Hemmung der mTOR-Phosphorylierung, jedoch keine veränderte Akt-Aktivierung feststellen (Grozinsky-Glasberg, Franchi et al. 2008). Dieser Befund lässt an eine mehrfach vorbeschriebene Akt-unabhängige mTOR-Regulierung denken (Memmott und Dennis 2009). Weitere denkbare antiproliferative Mechanismen von Octreotid in Neuroendokrinen Tumoren umfassen den Antagonismus lokaler Wachstumsfaktoren sowie indirekte Mechanismen wie die Angiogenese-Hemmung (Grozinsky-Glasberg, Shimon et al. 2008).

4.2 Typ 1 Interferone: Molekulare Wirksamkeit im Vergleich

Wie zuvor von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben, exprimieren BON-1 Zellen funktionelle IFN-Rezeptoren, welche die Aktivierung des Jak-STAT-Signalweges initiieren (Detjen et al. 2000, Vitale et al. 2006). Da STAT1-defiziente Zelllinien durch Interferone nicht in ihrem Wachstum gehemmt werden (Bromberg et al. 1996), wurde auch in dieser Arbeit die STAT1-Phosphorylierung in BON-1 Zellen nach IFN-Behandlung untersucht, und für beide Typ 1 Interferone bestätigt (Abbildung 3.6). Im direkten Vergleich beider Interferone zeigte sich dabei zu allen drei Untersuchungszeitpunkten eine stärkere und länger andauernde STAT1-Aktivierung unter einer Behandlung mit IFN β . Wie in der Literatur bereits für Melanomzellen beschrieben (Johns et al. 1992), lässt diese Beobachtung eine höhere Rezeptoraffinität von IFN β auch in BON-1 Zellen vermuten. Eine Überlegenheit der antiproliferativen Wirksamkeit von IFN β gegenüber IFN α wurde zudem bereits für diverse Krebszelllinien, unter ihnen Brustkrebs- und Gliomzellen, sowie Hepatozelluläre Karzinom Zelllinien, beschrieben (Coradini et al. 1994, Damdinsuren et al. 2003, Rosenblum et al. 1990). Hinweise, dass die Dauer der STAT-Aktivierung einen Einfluss auf die antiproliferative Wirksamkeit hat, finden sich in der Literatur mehrfach. So verglichen zum Beispiel Maher et al. die antiproliferativen Effekte von IFN α mit denen von IFN λ an der Keratinozyten Zelllinie HaCaT und konnten neben einer verstärkten antiproliferativen Wirksamkeit auch eine deutliche Verlängerung der STAT-Aktivierung unter IFN λ feststellen (Maher et

al. 2008). Zu diesen Ergebnissen passend zeigte eine präklinische Studie mit den neuen Typ λ Interferonen IL-28A und IL-29 an BON-1 Zellen eine stärkere Wachstumshemmung als IFN α (Zitzmann et al. 2006). Darüberhinaus konnten Zitzmann et al. im Gegensatz zu den von uns getesteten Therapeutika für IFN λ auch apoptotische Effekte nachweisen.

Als mögliche molekulare Grundlage der IFN α bedingten Wachstumshemmung beobachteten Detjen et al. eine Verzögerung der S-Phasen-Progression im Zellzyklus der mit IFN α behandelten BON-1 Zellen (Detjen et al. 2000). Diese Verzögerung ging einher mit einer gehemmten Induktion von Cyclin B, welches als funktionelle Untereinheit des CDK2 Komplexes die Progression zur G2/M-Phase initiiert (Jackman und Pines 1997). Im Gegensatz zum oft beschriebenen G1/0-Arrest durch Typ 1 Interferone (Sangfelt et al. 1999), finden sich in der Literatur auch Hinweise für einen Zusammenhang zwischen IFN-bedingter S-Phasen-Akkumulation und maligner Transformation einer Zelle (Qin et al. 1997). Da BON-1 Zellen durch einen Verlust des Zellzyklusinhibitors p16^{INK4} einen defekten G1-Kontrollpunkt vorweisen (Lopez et al. 2010), lässt sich eine S-Phasen-Akkumulation mit der von Qin et al. gemachten Beobachtung in Einklang bringen. Vitale et al. konnten diesen durch IFN α vermittelten Effekt auf den Zellzyklus bestätigen, und beobachteten ferner eine noch frühere und stärkere S-Phasen-Akkumulation in den mit IFN β behandelten Zellen (Vitale et al. 2006). Darüber hinaus konnte in selbiger Arbeit mittels Durchflusszytometrie und DNA-Fragmentierung eine durch IFN β vermittelte Apoptoseinduktion nach 1, 2 und 3 Tagen Inkubation nachgewiesen werden. In den mit IFN α behandelten Zellen fand sich hingegen weder bei Detjen noch Vitale et al. eine Erhöhung der apoptotischen Zellfraktion.

Der von beiden Arbeitsgruppen beschriebene Effekt der Typ 1 Interferone auf den Zellzyklus konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Insgesamt zeigte sich in den durchflusszytometrischen Analysen keine signifikante Abweichung der Phasenverteilung nach 24 Stunden IFN-Inkubation (Abbildung 3.11). Diese Diskrepanz lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass die von beiden Arbeitsgruppen beschriebenen Zellzykluseffekte nur transienter Natur waren. Es wurde also kein S-Phasen-Arrest, sondern eine Verlangsamung der S-Phasen-Progression beschrieben. Detjen et al. stellten eine etwa sechsstündige Verzögerung im Vergleich zur Kontrollgruppe fest. Nach 21 bis 24 Stunden

erreichten dann auch die mit IFN α behandelten Zellen die G2/M- Phase. Vitale et al. beobachteten eine S-Phasen-Akkumulation in den mit IFN α behandelten Kulturen erst nach 2 und 3 Tagen. Da durchflusszytometrische Untersuchungen eine Momentaufnahme darstellen, widerlegt die zu einem Zeitpunkt (in dieser Arbeit 24 Stunden) gemessene Phasenverteilung nicht definitiv einen Einfluss auf den Zellzyklus. Darüber hinaus konnte in unseren Untersuchungen mittels zwei verschiedener Proliferationsassays ein signifikanter Effekt auf die Zellproliferation durch beide Typ 1 Interferone nachgewiesen werden. Denkbar wäre eine über mehrere Zellzyklen wiederholt verzögerte S-Phasen-Progression, die sich nach 24 Stunden noch nicht signifikant in der Phasenverteilung niederschlägt, letztlich jedoch eine Reduktion der Gesamtzellzahl nach mehreren Tagen zur Folge hat.

Der von Vitale et al. beobachtete pro-apoptotische Effekt durch IFN β lässt sich ebenfalls am ehesten mit der beeinträchtigten Zellzyklusprogression erklären. In der Literatur finden sich Hinweise, dass ein S-Phasen-Arrest den Caspase-abhängigen apoptotischen Zelltod triggern könnte (Santiago-Walker et al. 2005). Im Rahmen unserer Experimente wurden die BON-1 Zellen nach 24 Stunden auf Caspase- und PARP-Spaltung, sowie eine eventuell stattgehabte DNA-Fragmentierung untersucht. Keines der Experimente konnte die von Vitale et al. beschriebenen apoptotischen Effekte bestätigen. Auch hier lässt sich ähnlich wie bei den Zellzyklus-Untersuchungen vermuten, dass eine eventuell wiederholt stattfindende S-Phasen-Verzögerung nach 24 Stunden noch keine signifikante Phasenverschiebung der Gesamtzellpopulation erreicht und die damit einhergehende Apoptoseinduktion zu diesem Zeitpunkt noch ausbleibt. Ferner sei anzumerken, dass in der Arbeit von Vitale et al. der durchflusszytometrische Apoptosenachweis mithilfe der Annexin V Methode erfolgte. Annexin V bindet an Phosphatidylserin (PS), welches sich im Rahmen der frühen Apoptose als Zeichen der Membranzerstörung von der inneren Zellmembran vermehrt nach Außen richtet und als sehr sensibler und früher Marker für Apoptose, aber auch für Nekrose gilt (Vermees et al. 1995). Als Marker später Apoptose nutzte diese Arbeitsgruppe den DNA-Farbstoff 7-Aminoactinomycin (7-AAD), und verzeichnete hierunter erst nach zweitägiger IFN β - Inkubation ein Maximum an apoptotischen Zellen. Im Gegensatz hierzu erfolgten die Versuche zur Apoptoseprüfung in dieser Arbeit mit dem stark vom

Analysezeitpunkt abhängigen Nachweis von Caspase- und PARP-Spaltprodukten bereits nach 24 Stunden.

Auch wenn die molekularen Mechanismen der Interferon-bedingten Proliferationshemmung in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden konnten, so bieten die Ergebnisse der Proliferations-Assays dennoch einen Anhalt dafür, IFN β in klinische Untersuchungen zur Therapie von GEP-NET einzuführen. Hervorzuheben sei hier, dass wir auch schon mit einer Konzentration von 10 U/ml eine signifikante Wachstumshemmung der BON-1 Zellen nach 5 Tagen Inkubation verzeichnen konnten (Daten nicht dargestellt) und diese Konzentrationen auch *in vivo* erreichbar sind. Im Rahmen pharmakokinetischer Studien konnten nach subkutaner Gabe des Zytokins Serumkonzentrationen von bis zu 12,3 U/ml in gesunden Probanden gemessen werden (Buchwalder et al. 2000, Salmon et al. 1996).

4.3 STZ + 5-FU: Synergistische Wirksamkeit

Die kombinierte Chemotherapie aus STZ und 5-FU erwies sich in dieser Arbeit als das am stärksten antiproliferativ wirksamste Therapieregime auf BON-1 Zellen. Methodisch konnte zur Messung der wachstumshemmenden Wirkung von 5-FU nur die Zählung viabler Zellen, nicht aber der [^3H]-Thymidin-Uptake herangezogen werden. Wie zuvor von Yau et al. beschrieben, steigt der Einbau radiomarkierten Thymidins in Zellen, die mit einem Thymidilatsynthase-Hemmer wie 5-FU behandelt wurden, überproportional an, da kein zelleigenes (nicht radioaktiv-messbares) Thymidin mehr produziert wird. Es besteht also keine Korrelation mehr mit der eigentlich gehemmten DNA-Syntheserate (Yau et al. 2006).

Da in der Literatur bislang keine *in vitro* Arbeiten zur Chemotherapie mit STZ und 5-FU auf GEP-NET Zelllinien beschrieben wurden, stellen unsere Ergebnisse eine sinnvolle Ergänzung zu klinischen Vergleichsstudien der beiden Chemotherapeutika untereinander dar. Wie zuvor dargestellt, bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die in klinischen Studien beschriebene Therapieüberlegenheit der kombinierten Chemotherapie gegenüber einer Monotherapie mit STZ oder 5-FU.

Mittels Western-Blot-Analysen konnte in dieser Arbeit sowohl in den mit 5-FU als auch in den mit 5-FU plus STZ behandelten BON-1 Zellen eine signifikant verminderte Expression von Cyclin D1 nachgewiesen werden (Abbildung 3.7). Als essentieller Cofaktor der Cyclin-abhängigen Kinase CDK4 ist Cyclin D1 einer der Hauptregulatoren am Restriktionspunkt zwischen G1- und S-Phase des Zellzyklus. Da das Cyclin die Progression zur S-Phase initiiert, würde seine Aktivitätsminderung eine Vermehrung der G1-Population in den Zellzyklusanalysen erwarten lassen. Einen solchen Effekt konnten wir in unseren Zellzyklusstudien nicht nachweisen (Abbildung 3.11). Es lässt sich jedoch vermuten, dass die verlangsamenden Einflüsse auf den Zellzyklus, wie bereits in Absatz 4.2 im Kontext der Interferone beschrieben, transienter Natur sind und dieser Effekt den Momentaufnahmen der FACS-Analyse nach genau 24 Stunden 5-FU Inkubation entgeht. Auch Studien mit embryonischen Stammzellen und Kopf-/ Halstumor-Zelllinien zeigten nach einer 5-FU Behandlung eine verminderte Expression von Cyclin D1. Dieser Effekt ging in beiden Studien mit einem G1-Arrest einher (Kim et al. 2009, Li et al. 2004). Cyclin D1 spielt eine entscheidende Rolle in der Onkogenese diverser Tumore (Donnellan und Chetty 1998) und eine erhöhte Cyclin D1 Expression wurde mit einer Verkürzung der G1-Phase, verminderter Zellgröße und einer verminderten Abhängigkeit von mitogenen Stimuli in Verbindung gebracht (Jiang et al. 1993, Quelle et al. 1993). Kornmann et al. konnten nach erfolgreicher Transfektion von Cyclin D1 Antisense cDNA Konstrukten in die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie PANC-1 signifikant verminderte Proliferationsraten nachweisen. Im Mausmodell beobachtete die gleiche Arbeitsgruppe eine Verminderung der Tumorigenität der Cyclin D1-defizienten Zellen (Kornmann et al. 1998). Darüber hinaus zeigte sich in gleicher Arbeit ein erhöhtes Ansprechen auf das Zytostatikum Cisplatin in den Cyclin D1-defizienten Zellkulturen. Eine erhöhte Cisplatinsensitivität durch Cyclin D1-Inhibition ist ferner in oralen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien beobachtet worden (Wang et al. 2001, Zhou et al. 2009). Streptozotocin ist ebenso wie Cisplatin ein alkylierendes, phasenunspezifisches Zytostatikum. Analog der von Kornmann et al. gemachten Beobachtung ließe sich der von uns beobachtete synergistische Effekt zwischen 5-FU und STZ also mit der 5-FU induzierten Cyclin D1-Inhibition erklären. In Kombination mit 5-FU erhöhte sich die antiproliferative

Wirkung durch STZ von 58 % auf 89 % (vgl. Abbildung 3.2). Eine mögliche Erklärung für die oben beschriebene Chemosensitivierung wäre eine mit der Cyclin D1- Inhibition einhergehende Hemmung der DNA-Reperaturenzyme. Möglich scheint auch eine Kumulation von STZ in der Tumorzelle durch eine verminderte Aktivität des P-Glykoproteins, welches als Genprodukt des Multi-Drug-Resistance Gens (MDR-1) einen aktiven Transporter zur Elimination zytotoxischer Stoffe aus der Zelle bildet (Black und Livingston 1990).

Erwähnenswert bleibt zuletzt die Veränderung der mitogenen Signalwege unter chemotherapeutischem Einfluss. So lies sich sowohl unter 5-FU als auch unter der Monotherapie mit STZ eine signifikante Hemmung der Akt- und der ERK-Aktivierung verzeichnen. Dieser Effekt wurde jedoch durch die Kombination beider Chemotherapeutika gänzlich aufgehoben (vgl. Abbildung 3.4 und Abbildung 3.5), was in Hinblick auf die synergistische Wirksamkeit der Kombinationstherapie verwundert. Zudem finden sich in der Literatur vielfach Hinweise, dass das Ansprechen auf eine 5-FU Therapie eher durch eine Hemmung der mitogenen Signalwege potenziert wird. Zhang et al. konnten im direkten Vergleich mehrerer humaner HCC-Zelllinien eine deutlich bessere 5-FU Wirksamkeit bei abnehmender ERK-Aktivierung feststellen (Zhang et al. 2009). Auch Shigematsu et al. fanden einen potenzierenden Effekt der 5-FU Wirkung durch ERK-Hemmung an humanen Magenkarzinom-Zelllinien (Shigematsu et al. 2009). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde für den Akt-Signalweg an einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie veröffentlicht (Kodach et al. 2006). An der Zelllinie BON-1 besteht jedoch unseren Ergebnissen zufolge keine Korrelation zwischen antiproliferativer Wirksamkeit der Chemotherapeutika und einer Hemmung der ERK- oder Akt-Aktivierung, da eine solche Hemmung unter dem wirksamsten Chemotherapieregime, also der Kombinationsbehandlung, nicht zu verzeichnen war. Analog der Beeinflussung mitogener Signalwege durch Octreotid, die sich nicht in einer Wachstumshemmung der BON-1 Zellen niederschlug, unterstützt auch diese Beobachtung die Hypothese, dass weder der Akt- noch der ERK-Signalweg einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorigenität der BON-1 Zellen haben. Die antiproliferative Wirksamkeit von 5-FU ist wohl eher durch die oben vermuteten Einflüsse auf den Zellzyklus zu erklären. Die Relevanz der Akt- und ERK-

Hemmung durch STZ und 5-FU, zum Beispiel im Sinne eines möglichen Effektes auf die Hormonsekretion neuroendokriner Tumore, bleibt unklar.

4.4 Ausblick

Die antiproliferative Wirksamkeit der aktuell in der medikamentösen Behandlung fortgeschrittener GEP-NET zum Einsatz kommenden Therapeutika bleibt Gegenstand klinischer Forschung.

In dieser *in vitro* Arbeit erwies sich neben der kombinierten Chemotherapie aus 5-FU und STZ vor allem IFN β als ausgesprochen stark antiproliferativ wirksam. *In vivo* Studien mit diesem Biotherapeutikum an Neuroendokrinen Tumoren stehen ebenso wie klinische Studien noch aus, erscheinen angesichts der hier erhobenen Ergebnisse jedoch erfolgsversprechend.

Ein eventuell hemmender Einfluss der Therapeutika auf die Hormonsekretion Neuroendokriner Tumore wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Angesichts der Tatsache, dass die Lebensqualität der Patienten mit NET oft wesentlich stärker durch die Hormonwirkung als durch die Tumorlast beeinträchtigt wird, wäre die hormonhemmende Wirkung ein wichtiger Fokus für weitere Studien.

In jüngerer Zeit bleibt auch der Vergleich mit neuen, sogenannten zielgerichteten Therapien nicht aus. Klinische Phase II Studien an Neuroendokrinen Tumoren zeigten erfolgsversprechende Ergebnisse für den Einsatz der Angiogenese- und Multikinaseinhibitoren Bevacizumab und Sunitinib, sowie dem mTOR-Inhibitor Everolimus (Kulke et al. 2008, Yao, Phan, Hoff et al. 2008, Yao, Phan, Chang et al. 2008). Im orthotopen Mausmodell mit BON-1 Zellen erwies sich der orale Multikinase-Inhibitor ZK 304709 als effizienter Tumorsuppressor und war im direkten Vergleich sowohl der Therapie mit einem SST-Analogen, als auch der kombinierten STZ/5-FU Chemotherapie überlegen (Scholz et al. 2009). Weitere Therapieoptionen könnten sich in der Zukunft auch mit den neu aufkommenden Aurorakinase-Inhibitoren ergeben. Die bislang noch nicht weiter als in frühen Phase I Studien getesteten Medikamente, erwiesen sich unter anderem in präklinischen Studien zum Hepatozellulären Karzinom und der Chronisch Myeloischen Leukämie als stark antiproliferativ wirksam (Benten et al. 2009, Gontarewicz et al. 2008).

5 Zusammenfassung

Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Tumore (GEP-NET) sind seltene und in ihrer biologischen sowie klinischen Präsentation sehr heterogene Neoplasien. Neben der potentiell kurativen operativen Therapie in frühen Tumorstadien stehen medikamentöse Behandlungsstrategien bei fortgeschrittenen, metastasierten Stadien im Vordergrund.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden das Somatostatin-Analogon Octreotid, die Typ 1 Interferone (IFN) α und β , sowie die Chemotherapeutika Streptozotocin (STZ) und 5-Fluorouracil (5-FU) erstmalig im direkten Vergleich in Hinsicht auf ihre antiproliferative Wirksamkeit an der humanen pankreatischen NET Zelllinie BON-1 untersucht. Octreotid erwies sich dabei als nicht signifikant wachstumshemmend, zeigte jedoch einen hemmenden Einfluss auf die mitogene Signaltransduktion (Akt- und ERK-Signalwege), was seine in der Klinik beobachtete hormonsuppressive Wirksamkeit erklären könnte. Die anderen Therapeutika zeigten sich in folgender Reihenfolge zunehmend antiproliferativ wirksam (Wachstumshemmung nach 8 Tagen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen): IFN α (23%), STZ (58%), 5-FU (69%), IFN β (71%), STZ + 5-FU (89%).

Für die kombinierte Chemotherapie lässt sich dabei ein synergistischer Effekt durch die unter 5-FU beobachtete Hemmung von Cyclin D1 vermuten. Eine Beeinflussung der Zellzyklus-Phasen wurde jedoch in der Durchflusszytometrie nach 24 Stunden Therapie nicht beobachtet, was unter der Annahme eines nur transienten Effekts auf den Zellzyklus am ehesten als methodisches Defizit zu werten ist.

Eine Aktivierung des Jak-STAT-Signalweges zeigte sich für beide Typ 1 Interferone. Unter IFN β war dabei eine stärkere und längere STAT-Aktivierung zu beobachten, was sich in seiner stärkeren antiproliferativen Wirksamkeit widerspiegelt. Ein pro-apoptotischer Effekt konnte nach 24 Stunden für keine der Therapieregime nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

- Ahlman H, Wangberg B, Jansson S, Friman S, Olausson M, Tylen U, Nilsson O (2000) Interventional treatment of gastrointestinal neuroendocrine tumours. *Digestion* 62 Suppl 1:59-68
- Alberts B (2004) *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim ; [Chichester]
- Arnold R, Benning R, Neuhaus C, Rolwage M, Trautmann ME (1993) Gastroenteropancreatic endocrine tumours: effect of Sandostatin on tumour growth. The German Sandostatin Study Group. *Digestion* 54 Suppl 1:72-75
- Arnold R, Trautmann ME, Creutzfeldt W, Benning R, Benning M, Neuhaus C, Jurgensen R, Stein K, Schafer H, Bruns C, Dennler HJ (1996) Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours. *Gut* 38:430-438
- Arnold R, Simon B, Wied M (2000) Treatment of neuroendocrine GEP tumours with somatostatin analogues: a review. *Digestion* 62 Suppl 1:84-91
- Benten D, Keller G, Quaas A, Schrader J, Gontarewicz A, Balabanov S, Braig M, Wege H, Moll J, Lohse AW, Brummendorf TH (2009) Aurora kinase inhibitor PHA-739358 suppresses growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in a xenograft mouse model. *Neoplasia* 11:934-944
- Billiau A (2006) Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:381-409
- Black DJ, Livingston RB (1990) Antineoplastic drugs in 1990. A review (Part II). *Drugs* 39:652-673
- Broder LE, Carter SK (1973) Pancreatic islet cell carcinoma. II. Results of therapy with streptozotocin in 52 patients. *Ann Intern Med* 79:108-118
- Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr. (1996) Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7673-7678
- Buchwalder PA, Buclin T, Trinchara I, Munafo A, Biollaz J (2000) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of IFN-beta 1a in healthy volunteers. *J Interferon Cytokine Res* 20:857-866
- Chung DC, Brown SB, Graeme-Cook F, Seto M, Warshaw AL, Jensen RT, Arnold A (2000) Overexpression of cyclin D1 occurs frequently in human pancreatic endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4373-4378
- Chung DC (2004) Cyclin D1 in human neuroendocrine: tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1014:209-217
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1):1-16

- Coradini D, Biffi A, Pirronello E, Di Fronzo G (1994) The effect of alpha-, beta- and gamma-interferon on the growth of breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 14:1779-1784
- Cordelier P, Esteve JP, Bousquet C, Delesque N, O'Carroll AM, Schally AV, Vaysse N, Susini C, Buscail L (1997) Characterization of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9343-9348
- Damdinsuren B, Nagano H, Sakon M, Kondo M, Yamamoto T, Umeshita K, Dono K, Nakamori S, Monden M (2003) Interferon-beta is more potent than interferon-alpha in inhibition of human hepatocellular carcinoma cell growth when used alone and in combination with anticancer drugs. *Ann Surg Oncol* 10:1184-1190
- Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-1421
- Detjen KM, Welzel M, Farwig K, Brembeck FH, Kaiser A, Riecken EO, Wiedenmann B, Rosewicz S (2000) Molecular mechanism of interferon alfa-mediated growth inhibition in human neuroendocrine tumor cells. *Gastroenterology* 118:735-748
- di Bartolomeo M, Bajetta E, Buzzoni R, Mariani L, Carnaghi C, Somma L, Zilembo N, di Leo A (1996) Clinical efficacy of octreotide in the treatment of metastatic neuroendocrine tumors. A study by the Italian Trials in Medical Oncology Group. *Cancer* 77:402-408
- Donnellan R, Chetty R (1998) Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol* 51:1-7
- Engstrom PF, Lavin PT, Moertel CG, Folsch E, Douglass HO, Jr. (1984) Streptozocin plus fluorouracil versus doxorubicin therapy for metastatic carcinoid tumor. *J Clin Oncol* 2:1255-1259
- Evers BM, Townsend CM, Jr., Upp JR, Allen E, Hurlbut SC, Kim SW, Rajaraman S, Singh P, Reubi JC, Thompson JC (1991) Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* 101:303-311
- Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C (2000) Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 94:205-210
- Florio T, Yao H, Carey KD, Dillon TJ, Stork PJ (1999) Somatostatin activation of mitogen-activated protein kinase via somatostatin receptor 1 (SSTR1). *Mol Endocrinol* 13:24-37
- Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30:193-204
- Friedman RM (2008) Clinical uses of interferons. *Br J Clin Pharmacol* 65:158-162
- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004) Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145:5439-5447

- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501
- Gontarewicz A, Balabanov S, Keller G, Colombo R, Graziano A, Pesenti E, Benten D, Bokemeyer C, Fiedler W, Moll J, Brummendorf TH (2008) Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood* 111:4355-4364
- Gorden P, Comi RJ, Maton PN, Go VL (1989) NIH conference. Somatostatin and somatostatin analogue (SMS 201-995) in treatment of hormone-secreting tumors of the pituitary and gastrointestinal tract and non-neoplastic diseases of the gut. *Ann Intern Med* 110:35-50
- Grozinsky-Glasberg S, Franchi G, Teng M, Leontiou CA, Ribeiro de Oliveira A, Jr., Dalino P, Salahuddin N, Korbonits M, Grossman AB (2008) Octreotide and the mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) block proliferation and interact with the Akt-mTOR-p70S6K pathway in a neuroendocrine tumour cell Line. *Neuroendocrinology* 87:168-181
- Grozinsky-Glasberg S, Shimon I, Korbonits M, Grossman AB (2008) Somatostatin analogues in the control of neuroendocrine tumours: efficacy and mechanisms. *Endocr Relat Cancer* 15:701-720
- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J (1957) Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179:663-666
- Jackman MR, Pines JN (1997) Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv* 29:47-73
- Jensen RT (1999) Pancreatic endocrine tumors: recent advances. *Ann Oncol* 10 Suppl 4:170-176
- Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante AS, Doi S, Santella RM, Weinstein IB (1993) Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene* 8:3447-3457
- Johns TG, Mackay IR, Callister KA, Hertzog PJ, Devenish RJ, Linnane AW (1992) Antiproliferative potencies of interferons on melanoma cell lines and xenografts: higher efficacy of interferon beta. *J Natl Cancer Inst* 84:1185-1190
- Karhoff D, Sauer S, Schrader J, Arnold R, Fendrich V, Bartsch DK, Horsch D (2007) Rap1/B-Raf signaling is activated in neuroendocrine tumors of the digestive tract and Raf kinase inhibition constitutes a putative therapeutic target. *Neuroendocrinology* 85:45-53
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
- Kim GD, Rhee GS, Chung HM, Chee KM, Kim GJ (2009) Cytotoxicity of 5-fluorouracil: Effect on endothelial differentiation via cell cycle inhibition in mouse embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 23:719-727

- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285:1-24
- Kodach LL, Bos CL, Duran N, Peppelenbosch MP, Ferreira CV, Hardwick JC (2006) Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 27:508-516
- Kohno M, Pouyssegur J (2003) Pharmacological inhibitors of the ERK signaling pathway: application as anticancer drugs. *Prog Cell Cycle Res* 5:219-224
- Kornmann M, Arber N, Korc M (1998) Inhibition of basal and mitogen-stimulated pancreatic cancer cell growth by cyclin D1 antisense is associated with loss of tumorigenicity and potentiation of cytotoxicity to cisplatin. *J Clin Invest* 101:344-352
- Kulke MH, Lenz HJ, Meropol NJ, Posey J, Ryan DP, Picus J, Bergsland E, Stuart K, Tye L, Huang X, Li JZ, Baum CM, Fuchs CS (2008) Activity of sunitinib in patients with advanced neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol* 26:3403-3410
- Kumar S (1997) The apoptotic cysteine protease CPP32. *Int J Biochem Cell Biol* 29:393-396
- Li MH, Ito D, Sanada M, Odani T, Hatori M, Iwase M, Nagumo M (2004) Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncol* 40:63-70
- Lopez JR, Claessen SM, Macville MV, Albrechts JC, Skogseid B, Speel EJ (2010) Spectral karyotypic and comparative genomic analysis of the endocrine pancreatic tumor cell line BON-1. *Neuroendocrinology* 91:131-141
- Ludvigsen E, Stridsberg M, Taylor JE, Culler MD, Oberg K, Janson ET (2004) Subtype selective interactions of somatostatin and somatostatin analogs with sst1, sst2, and sst5 in BON-1 cells. *Med Oncol* 21:285-295
- Maher SG, Sheikh F, Scarzello AJ, Romero-Weaver AL, Baker DP, Donnelly RP, Gamero AM (2008) IFN α and IFN λ differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity. *Cancer Biol Ther* 7:1109-1115
- Memmott RM, Dennis PA (2009) Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* 21:656-664
- Modlin IM, Lye KD, Kidd M (2003) A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 97:934-959
- Modlin IM, Shapiro MD, Kidd M (2004) Siegfried Oberndorfer: origins and perspectives of carcinoid tumors. *Hum Pathol* 35:1440-1451
- Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Shapiro MD (2005) Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* 128:1717-1751
- Modlin IM, Champaneria MC, Bornschein J, Kidd M (2006) Evolution of the diffuse neuroendocrine system--clear cells and cloudy origins. *Neuroendocrinology* 84:69-82

- Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruzsniwski P, Sundin A (2008) Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 9:61-72
- Moertel CG, Hanley JA, Johnson LA (1980) Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med* 303:1189-1194
- Moertel CG, Lefkopoulo M, Lipsitz S, Hahn RG, Klaassen D (1992) Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N Engl J Med* 326:519-523
- Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A (1991) A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350:512-515
- Oberg K, Norheim I, Lundqvist G, Wide L (1987) Cytotoxic treatment in patients with malignant carcinoid tumors. Response to streptozocin--alone or in combination with 5-FU. *Acta Oncol* 26:429-432
- Oberg K, Norheim I, Theodorsson E (1991) Treatment of malignant midgut carcinoid tumours with a long-acting somatostatin analogue octreotide. *Acta Oncol* 30:503-507
- Oberg K (2000) Interferon in the management of neuroendocrine GEP-tumors: a review. *Digestion* 62 Suppl 1:92-97
- Oberg K, Kvols L, Caplin M, Delle Fave G, de Herder W, Rindi G, Ruzsniwski P, Woltering EA, Wiedenmann B (2004) Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Ann Oncol* 15:966-973
- Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, Allia E, Landolfi S, Helboe L, Schindler M, Cole SL, Bussolati G (2002) Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Arch* 440:461-475
- Patel YC, Srikant CB (1994) Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr 1-5). *Endocrinology* 135:2814-2817
- Plöckinger U (2007) Neuroendokrine gastrointestinale Tumoren. UNI-MED Verlag, Bremen
- Qin XQ, Runkel L, Deck C, DeDios C, Barsoum J (1997) Interferon-beta induces S phase accumulation selectively in human transformed cells. *J Interferon Cytokine Res* 17:355-367
- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 7:1559-1571
- Reubi JC (2003) Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 24:389-427
- Rinke A, Muller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Blaker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold

- R (2009) Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J Clin Oncol* 27:4656-4663
- Rosenblum MG, Yung WK, Kelleher PJ, Ruzicka F, Steck PA, Borden EC (1990) Growth inhibitory effects of interferon-beta but not interferon-alpha on human glioma cells: correlation of receptor binding, 2',5'-oligoadenylate synthetase and protein kinase activity. *J Interferon Res* 10:141-151
- Roux PP, Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320-344
- Salmon P, Le Cotonnec JY, Galazka A, Abdul-Ahad A, Darragh A (1996) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human interferon-beta in healthy male volunteers. *J Interferon Cytokine Res* 16:759-764
- Saltz L, Trochanowski B, Buckley M, Heffernan B, Niedzwiecki D, Tao Y, Kelsen D (1993) Octreotide as an antineoplastic agent in the treatment of functional and nonfunctional neuroendocrine tumors. *Cancer* 72:244-248
- Sangfelt O, Erickson S, Castro J, Heiden T, Gustafsson A, Einhorn S, Grander D (1999) Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins. *Oncogene* 18:2798-2810
- Santiago-Walker AE, Fikaris AJ, Kao GD, Brown EJ, Kazanietz MG, Meinkoth JL (2005) Protein kinase C delta stimulates apoptosis by initiating G1 phase cell cycle progression and S phase arrest. *J Biol Chem* 280:32107-32114
- Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 43:1326-1333
- Scholz A, Wagner K, Welzel M, Remlinger F, Wiedenmann B, Siemeister G, Rosewicz S, Detjen KM (2009) The oral multitarget tumour growth inhibitor, ZK 304709, inhibits growth of pancreatic neuroendocrine tumours in an orthotopic mouse model. *Gut* 58:261-270
- Scovassi AI, Poirier GG (1999) Poly(ADP-ribosylation) and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 199:125-137
- Shigematsu H, Yoshida K, Sanada Y, Osada S, Takahashi T, Wada Y, Konishi K, Okada M, Fukushima M (2009) Rapamycin enhances chemotherapy-induced cytotoxicity by inhibiting the expressions of TS and ERK in gastric cancer cells. *Int J Cancer*
- Solcia E, Klöppel G, Sobin LH (2000) *Histological typing of endocrine tumours*. Springer, Berlin ; New York
- Sun W, Lipsitz S, Catalano P, Mailliard JA, Haller DG (2005) Phase II/III study of doxorubicin with fluorouracil compared with streptozocin with fluorouracil or dacarbazine in the treatment of advanced carcinoid

- tumors: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1281. *J Clin Oncol* 23:4897-4904
- Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, Hanka LJ, Sokolski WT (1959) Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu* 7:230-235
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39-51
- Vilar E, Salazar R, Perez-Garcia J, Cortes J, Oberg K, Tabernero J (2007) Chemotherapy and role of the proliferation marker Ki-67 in digestive neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 14:221-232
- Vitale G, de Herder WW, van Koetsveld PM, Waaijers M, Schoordijk W, Croze E, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ (2006) IFN-beta is a highly potent inhibitor of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell growth in vitro. *Cancer Res* 66:554-562
- Wang MB, Yip HT, Srivatsan ES (2001) Antisense cyclin D1 enhances sensitivity of head and neck cancer cells to cisplatin. *Laryngoscope* 111:982-988
- Williams ED, Sandler M (1963) The classification of carcinoid tumours. *Lancet* 1:238-239
- Yao JC, Phan A, Hoff PM, Chen HX, Charnsangavej C, Yeung SC, Hess K, Ng C, Abbruzzese JL, Ajani JA (2008) Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment phase II study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon alpha-2b. *J Clin Oncol* 26:1316-1323
- Yao JC, Phan AT, Chang DZ, Wolff RA, Hess K, Gupta S, Jacobs C, Mares JE, Landgraf AN, Rashid A, Meric-Bernstam F (2008) Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- to intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 26:4311-4318
- Yau K, Price P, Pillai RG, Aboagye E (2006) Elevation of radiolabelled thymidine uptake in RIF-1 fibrosarcoma and HT29 colon adenocarcinoma cells after treatment with thymidylate synthase inhibitors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33:981-987
- Zhang Z, Zhou X, Shen H, Wang D, Wang Y (2009) Phosphorylated ERK is a potential predictor of sensitivity to sorafenib when treating hepatocellular carcinoma: evidence from an in vitro study. *BMC Med* 7:41
- Zhou X, Zhang Z, Yang X, Chen W, Zhang P (2009) Inhibition of cyclin D1 expression by cyclin D1 shRNAs in human oral squamous cell carcinoma cells is associated with increased cisplatin chemosensitivity. *Int J Cancer* 124:483-489
- Zitzmann K, Brand S, Baehs S, Goke B, Meinecke J, Spottl G, Meyer H, Auernhammer CJ (2006) Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 344:1334-1341

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Michael Bläker für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Ohne seine professionelle und wissenschaftliche Unterstützung, Ermutigung und konstruktive Kritik wäre es nicht zur Fertigstellung dieser Arbeit gekommen.

Recht herzlich danken möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Daniel Benten und Herrn Dr. med. Jörg Schrader für ihre Geduld in der Betreuung meiner Experimente, ihre profunde fachkundige Unterstützung und ihre Freude an der Wissenschaft, die ansteckend war!

Für die fachliche wie persönliche Unterstützung im Labor danke ich besonders Frau Martina Fahl, geb. Schulz, und Frau Verena Matzat, die die Stunden während und nach der Laborarbeit bereichert haben, und ohne deren Hilfe ich vielleicht noch immer die Pipette in der Hand hätte. Ein großes Dankeschön gebührt auch Frau Dr. rer. nat. Sibyll Hein, die mir während der Einarbeitung in die Methodik der Zellkultur stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand.

Meinen Eltern, Dr. med. Maria und Dietmar Helle, soll diese Arbeit gewidmet sein, als Dankeschön für dieses wunderbare Studium.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Jutta Helle
Geburtsdatum : 30.04.1983 in Buchholz in der Nordheide
Konfession: Römisch-Katholisch
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

SCHULBILDUNG

1989 - 1993 Katholische Grundschule Harburg
1993 - 1999 Orientierungsstufe und Albert-Einstein-Gymnasium Buchholz
1999 - 2000 Dekalb High School, Auburn/IN (USA)
2000 - 2002 Sophie-Barat-Schule Hamburg, Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

10/02 - 09/03 Studium der Gesundheitsökonomie, Universität Bayreuth
10/03 - 05/10 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg
- 08/05: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 05/10: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PRAKTISCHES JAHR

02/09 - 01/10:
Chirurgie Helios Mariahilf Klinik Hamburg
Innere Medizin Dept. of Oncology, Guy's Hospital/King's College London, GB
Marienkrankenhaus Hamburg
Tropenmedizin UK Hamburg-Eppendorf/ Bernhard-Nocht-Institut Hamburg

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Seit 08/10 Assistenzärztin in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Asklepios Klinik St. Georg Hamburg

PUBLIKATION

Diel R, Helle J, Gottschalk R (2005) Transmission of hepatitis B in Hamburg, Germany, 1998-2002: a prospective, population-based study. Med Microbiol Immunol 194:193-199

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Jutta Helle